



Universitat de Lleida

PAPEL DE *YFH1* EN LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN *Saccharomyces cerevisiae*

ARMANDO J. MORENO CERMEÑO

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**UNIVERSITAT DE LLEIDA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES**

**PAPEL DE *YFH1* EN LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO Y SU
RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN
*Saccharomyces cerevisiae***

ARMANDO J. MORENO CERMEÑO

LLEIDA, MAYO 2011



**UNIVERSITAT DE LLEIDA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES**

**PAPEL DE *YFH1* EN LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO Y SU
RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN
*Saccharomyces cerevisiae***

Memoria para optar al Grado de Doctor por la
Universidad de Lleida presentada por
ARMANDO J. MORENO CERMEÑO

Dirigida por:

Dr. Joaquim Ros i Salvador
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Jordi Tamarit i Sumalla
Profesor Agregat de Bioquímica y Biología Molecular

RESUM

El ferro és el metall de transició més important per als sistemes biològics. Al llarg de l'evolució, aquest metall s'ha convertit en un element essencial per a la cèl·lula. Això es deu al fet que posseeix una gran versatilitat com a catalitzador biològic, la qual cosa li ha permès formar part de processos biològics indispensables per a la vida. A més, se sap que l'adquisició d'aquest metall és un procés altament controlat. En cèl·lules eucariotes s'ha vist que la desregulació del metabolisme d'aquest metall està associada amb importants defectes que poden conduir, en última instància, a la pèrdua de la viabilitat cel·lular. En humans la sobrecàrrega de ferro s'ha associat a una varietat creixent de patologies, com per exemple, l'Ataxia de Friedreich. Aquesta malaltia és causada pel dèficit d'una proteïna anomenada frataxina. Nombrosos estudis relacionen a aquesta proteïna amb el metabolisme de ferro, ja que en diferents models s'ha vist que el seu dèficit provoca sobrecàrrega d'aquest metall i disminució de l'activitat dels enzims amb centres Fe-S. Aquesta disminució ha establert les bases per a què la majoria dels estudis la considerin essencial per a la biosíntesi d'aquests centres. No obstant això, la funció precisa d'aquesta proteïna es troba en discussió. *Saccharomyces cerevisiae* ha estat àmpliament utilitzat com a model d'estudi de la funció d'aquesta proteïna ja que posseeix un gen ortòleg anomenat *YFH1* (Yeast frataxina homologue). Els resultats obtinguts en aquesta tesi, en què s'han analitzat mutants condicionals de *YFH1*, emfatitzen la implicació de Yfh1p en el metabolisme del ferro mitocondrial. L'activació del sistema d'alta afinitat d'adquisició de ferro és l'efecte primari de la depleció d'aquesta proteïna. Aquest fet constitueix una prova definitiva de la seva implicació en el metabolisme del ferro. No obstant això, l'anàlisi dels enzims amb centre Fe-S ha permès establir que aquesta activació no depèn del correcte funcionament d'aquest procés biosintètic mitocondrial, ja que la inactivació d'aquests enzims és posterior a l'activació del reguló de ferro. Per tant, la pèrdua d'activitat dels enzims Fe-S seria una conseqüència secundària d'un conjunt d'esdeveniments promoguts per la sobrecàrrega de ferro. Entre aquests esdeveniments destaca un increment del dany oxidatiu induït a les proteïnes (formació de carbonils), el qual seria el reflex d'un augment de l'estrès oxidatiu en l'interior de la mitocòndria. Aquest increment és el resultat de dos importants esdeveniments: i) l'augment del nivell de ferro a l'òrganul i ii) la pèrdua d'activitat de l'enzim antioxidant Mn-SOD. Es va trobar que aquesta pèrdua d'activitat era el resultat d'una baixa biodisponibilitat de manganès. A més es va observar que aquest baix contingut cel·lular de manganès era el resultat de la disminució de l'activitat del transportador Smf2p. Utilitzant el doble mutant $\Delta yfh1 \Delta aft1$ es va

aconseguir prevenir la disminució de l'activitat de l'esmentat transportador, la qual cosa va constituir la prova definitiva del rol de la sobrecàrrega de ferro en aquesta disminució. Es va trobar que la pèrdua de funció dels enzims dependents de centres Fe-S provoca una fallada en la capacitat respiratòria de la cèl·lula, la qual cosa condueix a una disminució del creixement. Una anàlisi de l'expressió gènica global (microarrays) va servir per a comprovar, una vegada més, l'activació de Aft1 i va demostrar que hi ha una resposta transcripcional del mutant davant la pèrdua de capacitat respiratòria. A més es va trobar que el factor de transcripció *ADRI* podria tenir un paper clau en aquesta resposta. En resum, els resultats obtinguts permeten establir un jerarquia temporal entre els diferents esdeveniments que segueixen a la manca de *YFH1*.

RESUMEN

El hierro es el metal de transición más importante para los sistemas biológicos. A lo largo de la evolución, este metal se ha convertido en un elemento esencial para la célula. Esto se debe a que posee una gran versatilidad como catalizador biológico, lo cual le ha permitido formar parte de procesos biológicos indispensables para la vida. Además, se sabe que la adquisición de este metal es un proceso altamente controlado. En células eucariotas se ha visto que la desregulación del metabolismo de este metal está asociada con importantes defectos que pueden conducir, en última instancia, a la pérdida de la viabilidad celular. En humanos la sobrecarga de hierro se ha asociado a una variedad cada vez mayor de patologías, como por ejemplo, la Ataxia de Friedreich. Dicha enfermedad es causada por el déficit de una proteína denominada frataxina. Numerosos estudios relacionan a esta proteína con el metabolismo de hierro, ya que en diferentes modelos se ha visto que su déficit provoca sobrecarga de este metal y disminución de la actividad de las enzimas con centros Fe-S. Esta disminución ha sentado las bases para que la mayoría de los estudios la consideren esencial para la biosíntesis de dichos centros. Sin embargo, la función precisa de esta proteína se encuentra en discusión. *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio de la función de esta proteína ya que posee un gen ortólogo denominado *YFH1* (*Yeast frataxin homologue*). Los resultados obtenidos en esta tesis, en la que se han empleado mutantes condicionales de *YFH1*, enfatizan la implicación de Yfh1p en el metabolismo del hierro mitocondrial. La activación del sistema de alta afinidad de adquisición de hierro es el efecto primario de la depleción de esta proteína. Este hecho, constituye una prueba definitiva de su implicación en el metabolismo del hierro. Sin embargo, el análisis de las enzimas con centro Fe-S ha permitido establecer que dicha activación no depende del correcto funcionamiento de este proceso biosintético mitocondrial, ya que la inactivación de estas enzimas ocurre posteriormente a la activación del regulón de hierro. Por ende, la pérdida de actividad de las enzimas Fe-S sería una consecuencia secundaria de un conjunto de eventos promovidos por la sobrecarga de hierro. Entre estos eventos destaca un incremento del daño oxidativo inducido a las proteínas (formación de carbonilos), el cual sería el reflejo de un aumento del estrés oxidativo en el interior de la mitocondria. Este incremento es el resultado de dos importantes eventos: i) el aumento del nivel de hierro en el organelo y ii) la pérdida de actividad de la enzima antioxidante Mn-SOD. Se encontró que esta pérdida de actividad era el resultado de una baja biodisponibilidad de manganeso. Además se observó que este bajo contenido celular de manganeso era el resultado de la down-regulación del transportador Smf2p. Utilizando el

doble mutante *Δyfh1Δaft1* se consiguió prevenir dicha down-regulación, lo cual constituyó la prueba definitiva del papel de la sobrecarga de hierro en dicha disminución. Se encontró que la pérdida de función de las enzimas Fe-S provocaba un fallo en la capacidad respiratoria de la célula, lo cual conduce a una disminución del crecimiento. Un análisis de la expresión génica global (microarrays) sirvió para comprobar, una vez más, la activación de *AFT1* y demostró que existe una respuesta transcripcional del mutante frente a la pérdida de capacidad respiratoria. Además se encontró que el factor de transcripción *ADR1* podría tener un papel clave en esta respuesta. En resumen, los resultados obtenidos permiten establecer un jerarquía temporal entre los distintos eventos que siguen a la falta de *YFH1*.

ABSTRACT

Iron is the most important transition metal for biological systems. This metal became an essential element for cell throughout the evolution. This fact is due to its versatility as a biological catalyst, which allowed it take part in essential biological processes. The uptake of this metal is a highly controlled process. In eukaryotic cells deregulation of the iron metabolism is associated with significant defects that can lead ultimately to the loss of cell viability. In humans iron overload has been associated with an increasing variety of diseases such as Friedreich's ataxia. This disease is caused by a deficiency in frataxin. Several studies link this protein to iron metabolism because its deficiency leads to iron overload. It has also described in different models that its deficit causes a decrease in the activity of Fe-S enzymes. Based on this observation, several authors consider frataxin essential for the biosynthesis of Fe-S centers. Nevertheless, the precise function of this protein remains unclear. *Saccharomyces cerevisiae* has been widely used as a model for studying the function of this protein. *YFH1* (*Yeast frataxin homologue*) is the orthologue of this gene in yeast. The results obtained in this thesis using conditional *YFH1* mutants emphasize the involvement of Yfh1p in mitochondrial iron metabolism. Activation of high affinity iron uptake system is a primary effect of Yfh1p depletion and constitutes a definitive probe of its implication in mitochondrial iron metabolism. Interestingly, the analysis of Fe-S enzymes established that the activation of the regulon it does not depend on the status of this mitochondrial biosynthetic pathway, since inactivation of this enzyme occurs long after the activation of the iron regulon. In fact, loss of Fe-S enzymes activity is a secondary consequence of a series of events promoted by iron overload. These events include an increase of oxidative damage to proteins (carbonylation), which would reflect an increase in oxidative stress conditions inside of mitochondria. This increase is the result of two major events: i) an increase in the level of iron in the organelle ii) the loss of the antioxidant enzyme Mn-SOD. It was found that this loss of activity was the result of low bioavailability of manganese. It was also observed that this low manganese content was due to the down-regulation of the Smf2p transporter. This down-regulation was prevented in $\Delta yfh1 \Delta aft1$ double mutant. This was the definitive evidence that emphasized a key role for iron overload in this decrease. It was also found that decrease of Fe-S enzymes caused a failure in the respiratory capacity of the cell that lead to slow growth. A global gene expression analysis by microarrays further confirmed *AFT1* activation and demonstrated that there is a yeast transcriptional response related to the loss of respiratory capacity. It was also found that the transcription factor *ADR1* could play a central role in this response. In

summary, the results obtained show a temporal order between the different events which follow the *YFHI* deficiency. In summary, we have characterized in detail the biochemical events that are triggered by *YFHI* depletion in order to identify the early events affected by the loss of this protein.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios, por la fortaleza que ha hecho posible que haya alcanzado esta meta.

A mi compañera en este camino, Alejandra, porque juntos hemos conseguido cada objetivo que nos hemos propuesto. Tu determinación y talento ha ayudado a convertir en hechos mis pensamientos. Gracias también por esos dos tesoros Diego y Sofía.

A Joaquim Ros y Elisa Cabiscol, por la oportunidad de formar parte de este gran proyecto, el “Grupo de Bioquímica del Estrés Oxidativo”.

A Jordi Tamarit, porque sin su orientación y enseñanza, este trabajo no sería lo que es.

A los compañeros del Lab, los que están y los que estuvieron durante estos años. Una mención distinguida para Enric Herrero y Gemma Belli, por su constante colaboración. También para todo el equipo de BML.

A Jerry Kaplan y Liangtao Li en Utah, por la hospitalidad y fuerte estímulo científico.

A esta ciudad, Lleida, por habernos abierto los brazos y ser la tierra de nuestros hijos.

A mis familias, la propia y la política, por su interés y gran apoyo.

A los amigos que hemos ido cultivando al ir poco a poco echando raíces en esta tierra.

A todos gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Electroforesis monodimensional
2D	Electroforesis bidimensional
CHAPS	3-[(3 colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DNA	Acido desoxiribonucleico
DNP	2,4-dinitrofenilo
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
dNTP	Deoxinucleótido
DTNB	Acido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
IEF	Isoelectroenfoque
INT	Iodonitrotetrazolium chloride
IP	Inhibidores de proteasas
IPG	Immobilized pH gradient
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
ONPG	O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
PMS	Metasulfato de fenanzina
PVDF	Difluoruro de polivenilida
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RHB	Tampón de rehidratación
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SC	Medio sintético
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOD	Superoxido dismutasa
TAE	Tampón Tris-HCl—Acetato—EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
Wt	<i>Wild type</i> (cepa salvaje)
Yfh1	Yeast frataxin homologue
YPD	Medio rico (<i>yeast-peptone-dextrose</i>)
YPG	Medio rico (<i>yeast-peptone-glycerol</i>)

ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. METABOLISMO DEL HIERRO EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1 EL HIERRO COMO ELEMENTO ESENCIAL PARA LA CÉLULA.....	3
1.2 TRANSPORTE DE HIERRO EN LA LEVADURA.....	4
1.2.1 Sistema de Baja Afinidad.....	4
1.2.2 Sistema de Alta Afinidad.....	5
1.2.3 Sideróforos.....	6
1.3 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.4 ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA UTILIZACIÓN Y EL ALMACENAMIENTO DE HIERRO EN LEVADURA.....	9
1.5 BIOGÉNESIS DE LOS CENTROS HIERRO-AZUFRE (Fe-S) EN LEVADURA.....	10
1.6 RELACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO CON LA SÍNTESIS DE CENTROS Fe-S EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
1.7 ENFERMEDADES HUMANAS PROVOCADAS POR MUTACIONES DE GENES DE LA SÍNTESIS DE CENTROS Fe/S: LA LEVADURA COMO MODELO DE ESTUDIO.....	15
2. ATAXIA DE FRIEDREICH (FRDA).....	17
2.1 FRATAXINA: UNA PROTEÍNA MUY CONSERVADA.....	17
2.2 BASES MOLECULARES DEL DÉFICIT DE FRATAXINA EN HUMANOS	19
2.3 ACERCA DE LA POSIBLE FUNCIÓN DE FRATAXINA.....	19
2.3.1 Implicación en la síntesis de centros Fe-S.....	19
2.3.2 Interacción de Yfh1 con hierro: posible función en el almacenamiento/detoxicación.....	21
2.3.3 Posible función como reguladora de la síntesis de centros Fe-S.....	23
2.3.4 Otras funciones descritas.....	24
3. ESTRÉS OXIDATIVO.....	25
3.1 ORIGEN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.....	26
3.2 DEFENSAS ANTIOXIDANTES.....	28
3.2.1 Sistemas no enzimáticos.....	30
3.2.1.1 Glutación (GSH).....	30
3.2.1.2 Otros metabolitos antioxidantes.....	31
3.2.2 Sistemas enzimáticos.....	31

3.2.2.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	31
3.2.2.1.1 Cu/Zn SOD.....	32
3.2.2.1.2 Mn-SOD.....	32
3.2.2.1.3 Catalasa.....	34
3.2.2.1.4 Peroxiredoxinas (Prx).....	35
3.2.2.1.5 Glutati3n transferasas (GST).....	35
3.2.2.1.6 Sufiredoxinas.....	36
3.2.2.1.7 Metionina sulf3xido reductasa (MSR).....	36
3.2.2.1.8 Sistema Tioeredoxina (TRX).....	37
3.2.2.1.9 Glutaredoxinas (GRX).....	38
3.2.2.1.9.1 GRX Diti3licas (CPYC).....	39
3.2.2.1.9.2 GRX Monoti3licas (CGFS).....	40
3.2.2.1.9.3 Otras glutaredoxinas (C[P/S]YS).....	44
4. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FRENTE AL ESTR3S OXIDATIVO.....	45
4.1 OTROS FACTORES TRANSCRIPCIONALES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA A ESTR3S.....	46
4.1.1 <i>SKN7</i>	46
4.1.2 <i>MSN2/MSN4</i>	47
II. OBJETIVOS.....	49
III. MATERIALES Y M3TODOS.....	53
1. MICROORGANISMOS.....	55
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	55
2.1 Condiciones de cultivo.....	55
2.2 Cultivo de bacterias (<i>Escherichia coli</i>).....	55
2.3 Medidas de tiempos de generaci3n.....	57
3. DETERMINACI3N DEL CONSUMO DE OX3GENO.....	57
4. METODOS DE AN3LISIS DE PROTE3NAS.....	58
4.1 OBTENCI3N DE EXTRACTOS PROTEICOS.....	58
4.2 DETERMINACI3N DE LA CONCENTRACI3N DE PROTE3NAS.....	59
4.3 M3TODOS ELECTROFOR3TICOS.....	59
4.3.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	59
4.3.2 Electroforesis bidimensional (2DE).....	60

4.3.2.1	Isoelectroenfoque (primera dimensión).....	61
4.3.2.2	Segunda dimensión.....	62
4.3.3	Electroforesis no desnaturizante.....	63
4.4	OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS.....	63
4.5	INMUNOPRECIPITACIÓN DE Yfh1p.....	65
4.6	TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS O “WESTERN BLOT”.....	65
4.7	DETECCIÓN DE GRUPOS CARBONILO EN PROTEÍNAS.....	67
4.8	MÉTODOS DE TINCIÓN DE PROTEÍNAS.....	69
4.8.1	Azul brillante de Coomassie.....	69
4.8.2	Tinción de plata.....	69
4.8.3	Tinción fluorescente con <i>SyproRuby</i>	69
4.9	ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	70
4.10	PURIFICACIÓN DE <i>GRX5</i> RECOMBINANTE DE <i>Escherichia coli</i>	70
4.11	FIJACIÓN Y BÚSQUEDA DE INTERACCIONES DE Grx5 EN COLUMNA SEPHAROSE™ - ACTIVADA CON CNBr.....	71
4.11.1	Preparación de la columna.....	71
4.11.2	Incubación de la columna con los extractos mitocondriales.....	72
5.	MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	72
5.1	ELECTROFORESIS DE DNA.....	72
5.2	PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	74
5.3	PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS A PARTIR DE CULTIVOS DE <i>E. coli</i>	74
5.4	AMPLIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.....	75
5.5	TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE.....	75
5.5.1	Sustitución de promotor de <i>YFH1</i>	75
5.5.2	Amplificación de los plásmidos pCM224 y pCM225.....	76
5.6	MARCAJE CON EPÍTOPO HA (3XHA).....	77
5.6.1	Amplificación del plásmido pCYC106 (Selección con NAT).....	77
5.6.2	Amplificación del plásmido pYM24 (Selección con hygromicina b).....	78
5.7	MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA.....	78
5.8	CRUZAMIENTO DE CEPAS POR ESPORULACIÓN.....	79
5.8.1	Formación de cigotos diploides y esporulación.....	80
5.8.2	Selección de las esporas y separación de las células haploides.....	81
5.8.3	Selección de células haploide.....	81

5.9 OTROS PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.....	81
5.9.1 Sobreexpresión de Mrs4.....	81
5.9.2 Plásmido pFet3-LacZ y pCCC1-LacZ.....	82
6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE RNA.....	82
6.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>YFHI</i> POR NORTHERN BLOT.....	82
6.2 EXTRACCIÓN DE RNA Y REAL-TIME PCR CUANTITATIVA.....	83
6.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (MICROARRAYS).....	83
7. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	84
7.1 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	84
7.1.1 Aconitasa.....	84
7.1.2 Succinato deshidrogenasa (SDH).....	84
7.1.3 Citrato sintasa.....	85
7.1.4 Actividad β -galactosidasa.....	86
7.2 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN GEL (ZIMOGRAMA).....	87
8. DETERMINACIÓN DE METALES.....	88
8.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO INTRACELULAR.....	88
8.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MANGANESO INTRACELULAR.....	89
IV. RESULTADOS.....	91
CAPITULO 1	
DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DEL ESTUDIO Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DOXICICLINA <i>per se</i> EN LA LEVADURA.....	93
1.1 SELECCIÓN DEL MEDIO Y LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS LEVADURAS.....	94
1.2 EVALUACIÓN DE LOS POSIBLES EFECTOS DE LA DOXICICLINA <i>per se</i> EN LA CEPA SALVAJE W303.....	95
CAPITULO 2: CONSTRUCCION DEL LOS MUTANTES CONDICIONALES EN <i>YFHI</i>: EVALUACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MUTANTES.....	97
2.1 SUSTITUCIÓN DEL PROMOTOR ENDÓGENO DE <i>YFHI</i> POR UN PROMOTOR REGULABLE POR DOXICICLINA (<i>tetO</i>).....	98
2.2 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA Y PROTEÍNA EN LOS MUTANTES CONDICIONALES <i>tetO-YFHI</i>	99

2.3	EVALUACIÓN DE LA REPRESIÓN DE Yfh1p DURANTE EL TRATAMIENTO CON DOXICICLINA EN EL MUTANTE CONDICIONAL..	101
CAPITULO 3: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Yfh1p EN EL CONTENIDO CELULAR DE HIERRO Y LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Fe/S ACONITASA Y SUCCINATO DESHIDROGENASA.....		
103		
3.1	LA FALTA DE Yfh1p EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SE CORRELACIONA CON UN INCREMENTO EN LOS NIVELES DE HIERRO.....	104
3.2	EVALUACIÓN DE UNA POSIBLE VÍA MOLECULAR RESPONSABLE DEL PROCESO DE ACUMULACIÓN DE HIERRO EN LA LEVADURA DEFICIENTE EN Yfh1p: IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE ALTA AFINIDAD (<i>FET3/FTR1</i>).....	105
3.3	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE CONDICIONAL FRENTE A LA DEPLECIÓN DE Yfh1p.....	107
3.4	EVALUACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE Yfh1p.....	108
3.5	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Yfh1p EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Fe/S.....	110
3.6	LA INACTIVACIÓN DE ACONITASA SE PRODUCE A TRAVÉS DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE HIERRO.....	112
CAPITULO 4: ANALISIS DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Yfh1p SOBRE LAS ENZIMAS SOD: IMPLICACIÓN EN EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL EFECTO SOBRE ACONITASA.....		
115		
4.1	LA DEPLECIÓN DE Yfh1p ESTA RELACIONADA CON UNA INDUCCIÓN DE LAS ENZIMAS SOD Y UNA SUBSIGUIENTE PERDIDA DE ACTIVIDAD DE AMBAS ENZIMAS.....	116
4.2	EVALUACION DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA INACTIVACIÓN DE Mn-SOD.....	118
4.3	INCREMENTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MUTANTE CONDICIONAL <i>tetO7-YFHI</i>	120
4.4	EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON Mn EN LA ACTIVIDAD DE Mn-SOD Y ACONITASA.....	122
CAPITULO 5: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Yfh1p EN EL METABOLISMO DE LA LEVADURA Y SU REPERCUSION EN EL CRECIMIENTO DE LA CÉLULA.....		
125		
5.1	LA DEPLECIÓN DE Yfh1p INDUCE UN FALLO DE LA CAPACIDAD RESPIRATORIA EN LA LEVADURA.....	126
5.2	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FRENTE A LA PERDIDA DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA.....	127
5.2.1	Análisis de proteínas cuya expresión se encontró disminuida.....	127
5.2.2	Estudio de la respuesta transcriptómica del mutante <i>tetO7-YFHI</i>	129

CAPITULO 6:	
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Grx5p EN EL MUTANTE CONDICIONAL <i>tetO7-GRX5</i> : PAPEL DE Grx5p EN LA SINTESIS DE CENTROS Fe-S EN LA LEVADURA	
BUSQUEDA DE POSIBLES SUSTRATOS DE Grx5p.....	131
6.1 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Grx5p SOBRE EL HIERRO CELULAR.....	132
6.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Grx5p EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Fe/S.....	134
6.3 LA DEPLECIÓN DE Grx5 PROVOCA LA INDUCCIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD: ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE Mn-SOD	136
6.4 LA EVALUACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE Smf2p EN LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD Mn-SOD.....	138
6.5 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE Grx5p EN COLUMNA.....	139
V. DISCUSION.....	143
1. LA DEPLECIÓN DE <i>YFHI</i> INDUCE LA ACTIVACIÓN DEL REGULÓN DE HIERRO A TRAVES DE UNA VIA DEPENDIENTE DE <i>AFTI</i> E INDEPENDIENTE DE LA SINTESIS DE CENTROS Fe-S EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	145
2. CAUSAS DE LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Fe-S: EXISTE UNA RELACIÓN CON EL INCREMENTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	149
2.1 La acumulación de hierro en la mitocondria promueve la inactivación de proteínas con centros Fe-S.....	149
2.2 Existen marcadores de estrés oxidativo en los mutantes <i>tetO-YFHI</i>	151
2.3 La baja actividad de las enzimas SOD contribuye a aumentar el estrés oxidativo.....	152
2.4 La recuperación de la actividad Mn-SOD previene la inactivación de aconitasa.....	153
3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA INACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS SOD.....	154
4. LA PÉRDIDA DE CAPACIDAD RESPIRATORIA INDUCE UNA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE CONDICIONAL: EXISTE UNA RESPUESTA METABÓLICA.....	157
5. POSIBLE FUNCIÓN DE YFH1.....	161
VI. CONCLUSIONES.....	163
VII. BIBIOGRAFÍA.....	167
VIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	185

I. INTRODUCCIÓN

1. METABOLISMO DEL HIERRO EN *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ha sido utilizado ampliamente como un modelo de estudio a lo largo de mucho tiempo. La secuencia completa del genoma de la cepa S288C se obtuvo en 1996, lo cual lo convirtió en el primer organismo eucariota cuyo genoma fue completamente secuenciado (Mewes, et al., 1997). La levadura ha emergido, por tanto, como una valiosa herramienta para estudios bioquímicos, genéticos y genómicos. Gracias a los ensayos genéticos clásicos realizados en ella se han descubierto y caracterizado muchos de los genes que componen la célula eucariota. Alrededor de un 20% de los genes de la levadura tienen sus ortólogos en humanos. También ha permitido conocer muchos otros genes que participan en importantes procesos biológicos, tal es el caso del metabolismo del hierro. A pesar de su relativa simplicidad, la importancia que tiene el hierro para este organismo queda ilustrada por el número de rutas metabólicas genéticamente diferenciadas que utiliza esta célula para asimilar el hierro, además de los complejos sistemas de regulación que gobiernan este proceso.

1.1. EL HIERRO COMO ELEMENTO ESENCIAL PARA LA CÉLULA

El hierro es el metal de transición más importante para los sistemas biológicos. Esta dependencia no es casual, sino por el contrario el resultado del proceso evolutivo de la célula en nuestro planeta. El hierro es un elemento muy abundante en la tierra, de hecho, es el cuarto elemento en abundancia en la corteza terrestre. En condiciones fisiológicas el hierro puede ser encontrado principalmente en dos estados redox que son interconvertibles: a) una forma reducida o ferrosa (Fe^{2+}) y una forma oxidada o férrica (Fe^{3+}). Además este metal puede adoptar diferentes niveles de energía tanto en su forma ferrosa como férrica, dependiendo del ligando que lo acompañe. Debido a estas propiedades el hierro fue elegido por los sistemas biológicos para su incorporación en las proteínas durante el proceso evolutivo, convirtiéndose en un elemento esencial en los primeros centros catalíticos de las proteínas de las nuevas células (Beinert, et al., 1997). De este modo el hierro se convirtió en un elemento indispensable para todas las formas de vida (con algunas escasas excepciones), y ello se debe a que participa en muchos de los más importantes procesos biológicos de la célula, como lo son: la fotosíntesis, la fijación del N_2 , la metanogénesis, la producción y consumo de H_2 , la respiración, el ciclo de Krebs, el transporte de oxígeno, la regulación génica y la síntesis del DNA. En estos procesos su funcionalidad depende exclusivamente de su incorporación en

las proteínas como una especie mono o bi-nuclear o en una forma más compleja, al formar parte de un grupo prostético como hemo o de un centro Fe/S. En estas condiciones, el hierro puede adoptar el potencial redox necesario para cumplir su función biológica (de -300 a +700mV) (Andrews, et al., 2003). Sin embargo, el manejo de este metal se ha convertido en uno de los grandes desafíos para la célula y ello se debe a dos razones fundamentales. La primera y más importante de ellas viene dada por esa misma versatilidad y reactividad que le permite fácilmente donar electrones al oxígeno o hidropéroxido, generando las extremadamente dañinas especies reactivas del oxígeno (ROS, siglas del inglés *reactive oxygen species*), superóxido y el radical hidroxilo. Debido a esa toxicidad inherente de este metal, su metabolismo es un proceso que está altamente regulado desde los eucariotas más simples (como *Saccharomyces cerevisiae*) hasta los mamíferos. Esta regulación se lleva a cabo fundamentalmente a nivel de la absorción y el transporte, ya que los eucariotas no poseen mecanismos regulados de excreción del metal (Kaplan and Kaplan, 2009). La segunda de estas razones es que la biodisponibilidad del hierro es escasa y está muy mal distribuida. Existen extensas regiones, como los mares, que son muy pobres en el metal. Adicionalmente la mayoría del hierro encontrado en su forma natural, se halla en la forma extremadamente insoluble de hidróxido férrico. Esto último se debe a que la atmósfera pasó de ser reductora a oxidante con la aparición de los primeros organismos fotosintéticos que la “contaminaron” de oxígeno molecular. En estas nuevas condiciones las reservas de hierro pasaron de su estado ferroso, relativamente soluble (0,1 M pH 7.0), al estado férrico extremadamente insoluble (10^{-18} M pH 7.0) (Andrews, et al., 2003).

Todo el conocimiento adquirido sobre el metabolismo del hierro ha permitido hoy en día entender que todo el proceso está minuciosamente regulado y que requiere un enorme gasto para la célula. Ello se debe a que no sólo la adquisición y almacenamiento del metal son controlados, sino que la redistribución hacia las diferentes rutas bioquímicas de la célula se hallan igualmente bien reguladas.

1.2. TRANSPORTE DE HIERRO EN LA LEVADURA

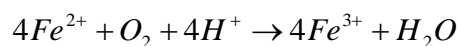
1.2.1. Sistema de Baja Afinidad

En *S. cerevisiae* el hierro extracelular (Fe^{3+}) es reducido por las reductasas de la membrana plasmática *FRE1* y *FRE2* (Anderson, et al., 1992; Dancis, et al., 1992). Este hierro reducido

puede ser entonces asimilado tanto por el sistema de alta como de baja afinidad. La proteína de membrana encargada del transporte es denominada Fet4p y está codificada por el gen *FET4*. Este gen no responde a la regulación de Aft1p. Sin embargo, en condiciones de anaerobiosis Fet4p se convierte en el transportador de hierro más importante (ter Linde, et al., 1999). La K_m del sistema de baja afinidad por el hierro es de 30 μm , además este sistema no es específico para el hierro, ya que puede transportar también otros metales como Mn^{2+} , Cu^+ y Zn^{2+} (Dix, et al., 1994). También se ha descrito que la proteína *Smf1p* formaría parte del sistema de baja afinidad. Esta proteína es un miembro de la familia de las *Nramp*, la cual posee homólogo en muchos reinos incluidos plantas, bacterias y vertebrados (Supek, et al., 1996). Este transportador es un simporter, es decir, puede movilizar dos o más metales diferentes empleando un gradiente de H^+ .

1.2.2. Sistema de Alta Afinidad

Este sistema es el utilizado por la levadura en condiciones de baja disponibilidad de hierro en el medio. Recibe esta denominación debido a que presenta una afinidad muy alta por el metal, con una K_m de 0.15 μm . El sistema está compuesto por dos proteínas, en primer lugar Ftr1p que es una permeasa de hierro transmembranal y Fet3p que es una multicobre oxidasa integrada a la membrana plasmática (Stearman, et al., 1996). Se ha observado que *Saccharomyces cerevisiae* es incapaz de crecer en un medio con limitaciones de hierro en ausencia del sistema de transporte Fet3p/Ftr1p (Askwith, et al., 1994). Estas dos proteínas forman un complejo y se cree que deberían ser sintetizadas a la vez para poder ser transportadas correctamente a la membrana plasmática (Stearman, et al., 1996). Fet3p es una proteína bioquímicamente similar a la ceruloplasmina de mamíferos. Esta enzima utiliza el Fe^{2+} como sustrato y lo oxida a Fe^{3+} (Frieden and Hsieh, 1976; Williams, et al., 1974). La proteína oxida tres átomos de hierro de manera secuencial y almacena los electrones. Una vez oxida un cuarto átomo, mediante una reacción bien coordinada, reduce una molécula de oxígeno a agua. De esta forma previene la formación de especies reactivas del oxígeno. La ecuación balanceada de la oxidación del hierro catalizada por Fet3p se muestra a continuación:



Otra de las más resaltantes diferencias que se observan en el sistema Fet3p/Ftr1 con respecto al sistema de baja afinidad, es que el primero es específico para hierro. En este sentido, se ha planteado que la unión del hierro férrico a la permeasa transmembranal sea la responsable de esta especificidad (Kaplan and Kaplan, 2009).

1.2.3. Sideróforos

Los sideróforos son pequeñas moléculas orgánicas que tiene una alta afinidad por el hierro. Un ejemplo es la desferrioxamina, un sideróforo producido por *Streptomyces pilosus* que tiene una afinidad por el hierro de 10^{-33} M, lo cual le permite unir Fe^{3+} en solución acuosa. *Saccharomyces cerevisiae* no es capaz de sintetizar sus propios sideróforos, sin embargo es capaz de capturar los complejos sideróforo-hierro del medio mediante transportadores localizados en la superficie celular (Yun, et al., 2000b). La levadura expresa cuatro diferentes genes para estos transportadores que son: *ARN1-4*. Estos transportadores son específicos para cada tipo de sideróforo. La expresión de estos genes está bajo la regulación de Aft1p (Yun, et al., 2000a). Existe otro mecanismo a través del cual la levadura puede asimilar el hierro contenido en los sideróforos, el cual consiste en la reducción del hierro unido al sideróforo de su forma Fe^{3+} a la Fe^{2+} por las reductasas férricas Fre1p-4. Esta reducción permite la disociación del hierro del sideróforo para luego ser transportado por el sistema de alta afinidad Fet3p/Ftr1p (Lesuisse, et al., 1998)

1.3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN *Saccharomyces cerevisiae*

La internalización del hierro requiere que se cumplan dos importantes pasos para que se lleve a cabo, primero la solubilización del metal y finalmente su internalización en la célula. Este proceso requiere la intervención de un conjunto de genes que en conjunto se denominan “regulón de hierro” (Yamaguchi-Iwai, et al., 2002). En levadura la expresión de estos genes es regulada de manera coordinada en función de las necesidades de hierro. *AFT1* y su parálogo *AFT2* son los genes responsables de esta regulación (Blaiseau, et al., 2001; Rutherford, et al., 2001). Ambas proteínas comparten un 39% de identidad. Aft1p, el producto del gen *AFT1*, es un activador de la transcripción que responde a la privación de hierro. En condiciones de suficiencia de hierro Aft1p es una proteína principalmente localizada en el citosol. Cuando la célula se haya en un medio en el que la disponibilidad de hierro es limitada,

Aft1p es traslocado al núcleo de la célula donde se acumula e interacciona con el promotor de los genes implicados en la adquisición y transporte de este metal (Tabla 1).

Tabla 1. Genes del regulón de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*—Se muestran los genes regulados por Aft1p y Aft2p (Kaplan and Kaplan, 2009)

Gen	Localización del producto	Función
<i>FET3</i>	Superficie celular	Oxidasa dependiente de cobre
<i>FTR1</i>	Superficie celular	Permeasa de hierro
<i>FRE1</i>	Superficie celular	Ferrireductasa
<i>FRE2</i>	Superficie celular	Ferrireductasa
<i>FRE3</i>	Superficie celular	Ferrireductasa
<i>ARN1</i>	Superficie celular	Transportador de sideróforos
<i>ARN2/TAF1</i>	Superficie celular	Transportador de sideróforos
<i>ARN3/SIT1</i>	Superficie celular	Transportador de sideróforos
<i>ARN4/ENB1</i>	Superficie celular	Transportador de sideróforos
<i>FIT1</i>	Superficie celular	Interacción con sideróforos
<i>FIT2</i>	Superficie celular	Interacción con sideróforos
<i>FIT3</i>	Superficie celular	Interacción con sideróforos
<i>AKR1</i>	Superficie celular	Palmitoil transferasa
<i>VHT1</i>	Superficie celular	Transportador de biotina
<i>FET5</i>	Vacuola	Oxidasa dependiente de cobre
<i>FTH1</i>	Vacuola	Permeasa de hierro
<i>FRE6</i>	Vacuola	Ferrireductasa
<i>COT1</i>	Vacuola	Transportador de Co ²⁺ Zn ²⁺
<i>CCC2</i>	Golgi	Transportador de Cu (necesario para el ensamblaje de Fet3p/Fet5p)
<i>ATX1</i>	Golgi	Chaperona de CCC2 (Cu-dependiente) necesaria para ensamblaje de Fet3p/Fet5p
<i>HMX1</i>	Retículo endoplásmico	Hemo-oxidasa
<i>CTH1</i>	Citosol	Proteína de unión a mRNA
<i>CTH2/TIS11</i>	Citosol	Proteína de unión a mRNA
<i>BNA2</i>	Citosol	Putativa triptófano 2,3-dioxigenasa
<i>ECM4</i>	Citosol	Glutación transferasa
<i>ISU1</i>	Mitocondria	Biogénesis de centros Fe-S
<i>MRS4</i>	Mitocondria	Transportador de Fe ²⁺

Aft1p se une a la secuencia consenso T/CG/ACACCC, la cual se localiza up-stream de la región 5' de los genes diana. Al igual que la mayoría de los factores de transcripción, Aft1p presenta un dominio de unión a DNA y un dominio de activación de la transcripción. La región N-terminal de Aft1p es rica en residuos básicos con lo que sería la responsable del reconocimiento e interacción con el DNA. En esta misma región de Aft1p se aprecia una señal de exportación nuclear (NES, *nuclear export signal*), la cual está adyacente al dominio rico en histidinas (10% His). Además, también se han descrito que la fosforilación de los residuos Ser²¹⁰ y Ser²²⁴ permitiría a Aft1p interaccionar con Msn5p que sería la proteína encargada de la exportación nuclear de Aft1p (exportina). Este mismo trabajo demostró que

esta fosforilación no es dependiente de la disponibilidad celular de hierro (Ueta, et al., 2007). Sin embargo, se observó que la interacción de Aft1p con Msn5p es dependiente de el status del hierro y de la fosforilación de Ser²¹⁰ y Ser²²⁴ (Ueta, et al., 2007). La región C-terminal, rica en glutaminas, sería responsable de la función de activación de la transcripción. En la región N-terminal, tanto de Aft1p como Aft2p, existe un motivo CXC (Cys²⁹¹ y Cys²⁹³) directamente relacionado con la interacción con el DNA de los genes diana. La mutación de cualquiera de estas cisteínas resulta en la activación constitutiva de los genes diana. Más específicamente, el reemplazo del aminoácido Cys²⁹¹ por Phe²⁹¹ resulta en el alelo dominante denominado *AFT1^{up}*, el cual está constitutivamente activo (Yamaguchi-Iwai, et al., 1995; Yamaguchi-Iwai, et al., 1996). Adicionalmente, se ha descrito que Aft1p presenta dos secuencias de aminoácidos necesarias para la importación nuclear de la proteína (NLS, nuclear localization signal). Están ubicadas en las regiones correspondientes a los aminoácidos 198-225 y 332-365. Ambas secuencias funcionan de manera independiente y son necesarias para el reconocimiento de Aft1p por la importina Pse1p. En este mismo trabajo se demostró que Aft1p responde a la privación por hierro de manera independiente a esta secuencia, lo cual sugiere que la misma no es necesaria para la actividad de regulación transcripcional de Aft1p (Ueta, et al., 2003).

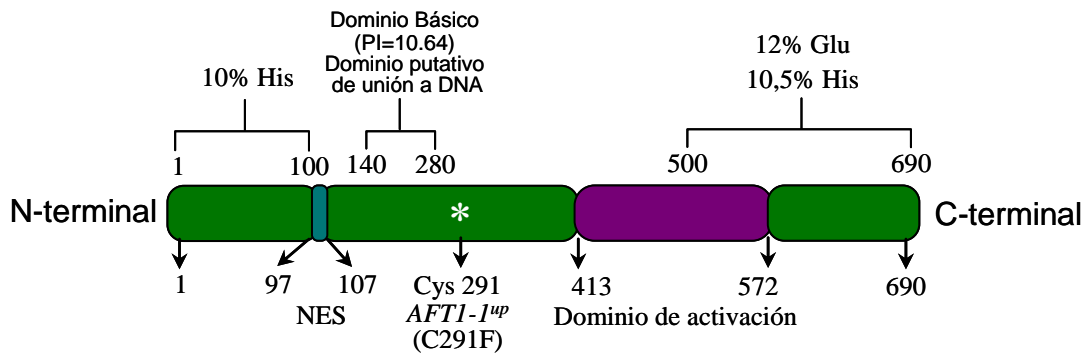


Figura 1. Esquema de la secuencia Aft1p—representación esquemática del activador transcripcional Aft1p, donde se aprecian los dominios de esta proteína. NES representa la señal responsable de la localización nuclear de la proteína. En la región N-terminal se localiza el dominio putativo que reconocería e interacciona con la región consenso T/CG/ACACCC del promotor de los genes del regulón de hierro. En la región C-terminal se halla el dominio responsable de la activación de la transcripción, el cual además se cree que sería responsable de la interacción con Grx3p y Grx4p. Este dominio se solapa con una región rica en residuos glutamina (12%) e histidina (10,5%) (Fragiadakis, et al., 2004).

1.4. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA UTILIZACIÓN Y EL ALMACENAMIENTO DE HIERRO EN LEVADURA

Como se ha observado a lo largo de este capítulo, la respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* a la privación de hierro conlleva la activación e inducción de diferentes vías implicadas en la adquisición del metal. No obstante, esta regulación transcripcional también implica la regulación negativa sobre un conjunto de genes en respuesta a la falta del metal. En este sentido, en condiciones de deficiencia de hierro las proteínas Cth1p y Cth2p son responsables de la remodelación transcripcional a la baja de varios genes involucrados en rutas metabólicas que requieren un alto consumo de hierro. Los niveles de mRNA de Cth2p responden directamente a la disponibilidad de hierro y a los activadores transcripcionales *AFT1* y *AFT2* (Puig, et al., 2005). La manera como Cth2p ejerce su regulación es reconociendo la región 5'-UUAUUUAUU-3' dentro de la 3'UTR de los mRNA e induciendo la degradación de los mismos. Se ha observado que genes como *HEM15*, *ACO1*, *SDH2* y *SDH4* son fuertemente regulados por Cth2p. Lo cual, indicaría que en una situación de baja disponibilidad de hierro *Saccharomyces cerevisiae* estaría limitando aquellas rutas metabólicas que presentan una alta demanda de hierro, tal es el caso del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Otro gen que también se encontró fuertemente regulado por Cth2p es *CCCI*. Este es un transportador que está localizado en la vacuola y cuya función esta relacionada con la internalización de hierro y manganeso desde el citosol a la vacuola (Li, et al., 2001). Este estudio ha establecido que la vacuola de la levadura funciona como un sitio de almacenamiento de hierro. En una situación de baja disponibilidad del metal la célula “down-regula” la expresión de esta proteína, ya que de lo contrario la actividad de este transportador exacerbaría aún más la depleción de hierro en el citosol. Varias observaciones dan sustento a esta función de Ccc1p, como lo es que la delección de *CCCI* induce un aumento de la sensibilidad a un incremento del hierro externo. Además, se sabe que la sobreexpresión provoca un incremento del contenido de hierro en la vacuola y una disminución del hierro citosólico (Li, et al., 2001). La figura 2 muestra las diferentes rutas que utiliza la levadura frente a una situación de baja disponibilidad de hierro en el medio

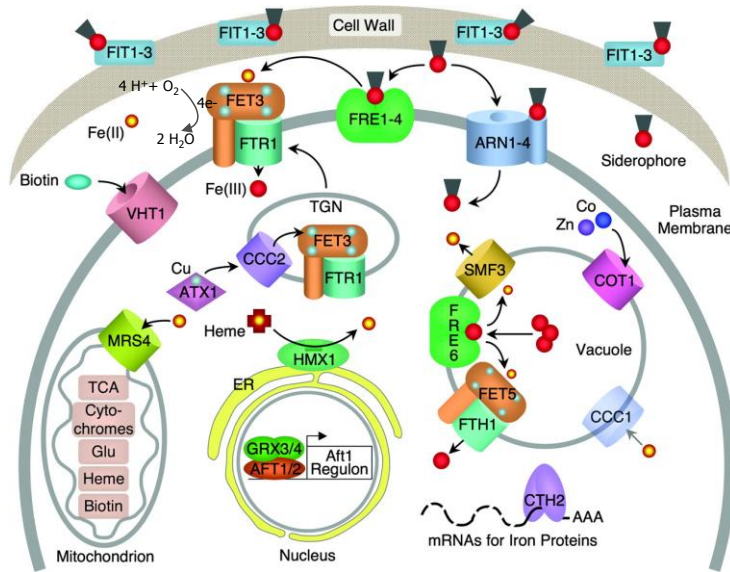


Figura 2. La respuesta de *S. cerevisiae* a la privación de hierro—se muestran las proteínas bajo la regulación transcripcional de Aft1. También se muestran aquellas que presentan una regulación negativa como: Ccc1p, proteínas del ciclo TCA, citocromo, síntesis de glutamato, hemo y biotina (Philpott and Protchenko, 2008).

1.5. BIOGÉNESIS DE LOS CENTROS HIERRO-AZUFRE (Fe-S) EN LEVADURA

Los centros Fe-S son pequeños cofactores inorgánicos. Se cree que fueron los primeros cofactores en la evolución de las biomoléculas (Huber, et al., 2003; Wächtershäuser, 2007). Estos centros presentan propiedades electroquímicas versátiles, con un rango de potencial reductor de -500 mV hasta +300 mV. Esta versatilidad les permite cumplir roles como: catalizador de reacciones químicas, transportador de electrones en reacciones redox, sensores, reguladores y como estabilizadores de la estructura de las proteínas. Los centros Fe-S más simples poseen una geometría de rombo tipo 2Fe-2S y de cubo tipo 4Fe-4S (Beinert, 2000; Beinert, et al., 1997). Estos centros son coordinados a las proteínas en motivos que no están altamente conservados. Sin embargo, algunos motivos consenso han sido identificados, ellos incluyen los motivos $CX_4CX_2CX_{\sim 30}C$ de unión de 2Fe-2S ferredoxinas en plantas y mamíferos y $CX_2CX_2CX_{\sim 20-40}C$, el cual fue originalmente caracterizado como motivo de unión para las 4Fe-4S ferredoxinas. La mayoría de estos centros son lábiles y pueden ser destruidos bajo condiciones de estrés oxidativo (Lill and Mühlhoff, 2008). Desde que al inicio de los años 60 se describieron las primeras ferredoxinas, el número de proteínas Fe-S identificadas hasta hoy no ha dejado de crecer.

Los mecanismos implicados en la biogénesis de estos centros empezaron a ser descritos por primera vez unos 20 años atrás. Desde entonces se han descrito tres sistemas bacterianos completos de síntesis de estos clusters que son: NIF (*nitrogen fixation*), ISC (*iron-sulfur cluster*) y SUF (*mobilization of sulfur*). En levaduras y organismos no fotosintéticos superiores la maquinaria homóloga a la ISC bacteriana se restringe a la mitocondria. Estudios realizados hasta la fecha indican que todo el proceso de biosíntesis mitocondrial es asistido por un complejo de 15 proteínas (Figura 3) (Lill and Mühlenhoff, 2008). Mas recientemente se han ido describiendo más miembros que corresponden a una maquinaria de exportación esencial para el funcionamiento de las proteína Fe-S citosólicas y nucleares. También existe una maquinaria de síntesis denominada CIA (*cytosolic iron-sulfur protein assembly*), que está presente en el citosol de los eucariotas.

Es importante resaltar que la mayoría de los estudios funcionales relacionados con la biosíntesis de centros hierro-azufre en eucariotas se han realizado en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Estos estudios han permitido entender que es un proceso complejo y que además está muy bien regulado. Este nivel de especialización ha sido desarrollado por la célula debido a la toxicidad y reactividad inherentes del hierro y el azufre en su estado elemental. El proceso de biosíntesis en levadura se lleva a cabo exclusivamente en la mitocondria y podrían dividirse dos grandes eventos, uno anterior y otro posterior a la formación del centro Fe-S en una proteína denominada Isu1 (scaffold). Estos eventos se detallan a continuación:

1. El primer paso de la biosíntesis consiste en el ensamblaje del centro en ISU1. Esta proteína es una de las mas conservadas en la evolución, ortólogos de la misma se hallan presentes en muchas bacterias (Schilke, et al., 1999; Tokumoto, et al., 2004) y la mayoría de los eucariotas (Schilke, et al., 1999). Se ha descrito que contiene tres residuos de cisteína altamente conservados, los cuales son críticos para el ensamblaje *de novo* del centro Fe-S (Yuvaniyama, et al., 2000). Ese mismo estudio sentó las bases del concepto de proteína scaffold (andamio, según traducción literal), aplicado a las proteínas de este tipo similares a la IscU bacteriana. El ensamblaje de centro Fe-S en Isu1p depende de manera crítica del complejo desulfurasa Nfs1-Isd11. Nfs1 es muy similar a su contraparte bacteriano IscS que actúa como donador de azufre a la maquinaria ISC. Esta proteína pertenece a la familia de la piridoxal 5'-fosfato aminotransferasas, que convierten cisteína en alanina con la consecuente liberación de

un grupo S^0 . Una cisteína bien conservada en la región C-terminal realiza un ataque nucleofílico al grupo γ -sulfidril (SH) de la cisteína provocando la sustracción del grupo γ -SH de la cisteína y generando un persulfuro (-SSH) en la cisteína del centro activo de Nfs1. Subsecuentemente este grupo -SSH es transferido a Isu1 en una reacción que depende de Isd11. Por otro lado, el movimiento de hierro del citosol hasta Isu1 aún no ha sido totalmente dilucidado. Se sabe que el hierro debe ingresar a la mitocondria en la forma Fe^{2+} y requiere un potencial de membrana (Lange, et al., 1999). Mrs3-4 son dos transportadores homólogos pertenecientes a la familia de transportadores de solutos localizados en la membrana interna de la mitocondria (Wiesenberger, et al., 1991). Se ha descrito que serían responsables de la internalización del hierro. Estos transportadores conjuntamente con Yfh1 se cree que serían los responsables de proveer el hierro necesario para la biosíntesis (Zhang, et al., 2006). Mas adelante se discutirá con más detalle acerca del posible papel de frataxina en este proceso. El flujo de electrones necesario para el ensamblaje de los centros en Isu1 es transferido por la ferredoxina 2Fe-2S Yah1, la cual recibe estos electrones de la ferredoxina reductasa Arh1 y la molécula de NADH. (Mühlenhoff, et al., 2003). Este potencial redox sería necesario para la reducción del S^0 presente en la cisteína a S^{2-} presente en el centro Fe-S. También se ha sugerido que parte de este potencial sería empleado para la fusión de dos centros 2Fe-S para dar lugar al 4Fe-4S (Chandramouli, et al., 2007; Unciuleac, et al., 2007)

2. Un segundo paso de la biosíntesis comprendería la liberación del centro Fe-S unido a Isu1, su posterior transferencia a la apoproteína receptora y el ensamblaje del mismo en la apoproteína mediante su coordinación a aminoácidos específicos que funcionan como ligandos. Hasta la fecha se conocen cuatro proteínas específicas que asistirían este proceso, la glutaredoxina monotiólica Grx5, la chaperona de la familia Hsp70 Ssq1, la cochaperona de tipo DnaJ Jac1 y el factor intercambiador de nucleótidos Mge1 (Andrew, et al., 2006; Dutkiewicz, et al., 2004; Dutkiewicz, et al., 2003; Rodriguez-Manzaneque, et al., 2002; Vickery and Cupp-Vickery, 2007). Isu1 presenta un sitio de interacción el cual se ha descrito como el tripéptido PVK, dicho tripéptido es el lugar de interacción entre Isu1 y la chaperona Ssq1. Esta interacción se cree provoca la disociación del centro Fe-S de Isu1, lo cual favorece su transferencia a las apoproteínas. Esta interacción es modulada por un ciclo de hidrólisis de ATP en el cual intervendría Jac1, la cual es la cochaperona de Ssq1. La

interacción con Jac1 estimularía la actividad ATPasa Ssq1. Mge1 funcionaría en este complejo intercambiando las uniones a ADP por otras a ATP, este intercambio produce un reinicio del ciclo. El esquema general de la biosíntesis de centros Fe-S se muestra en la figura 3.

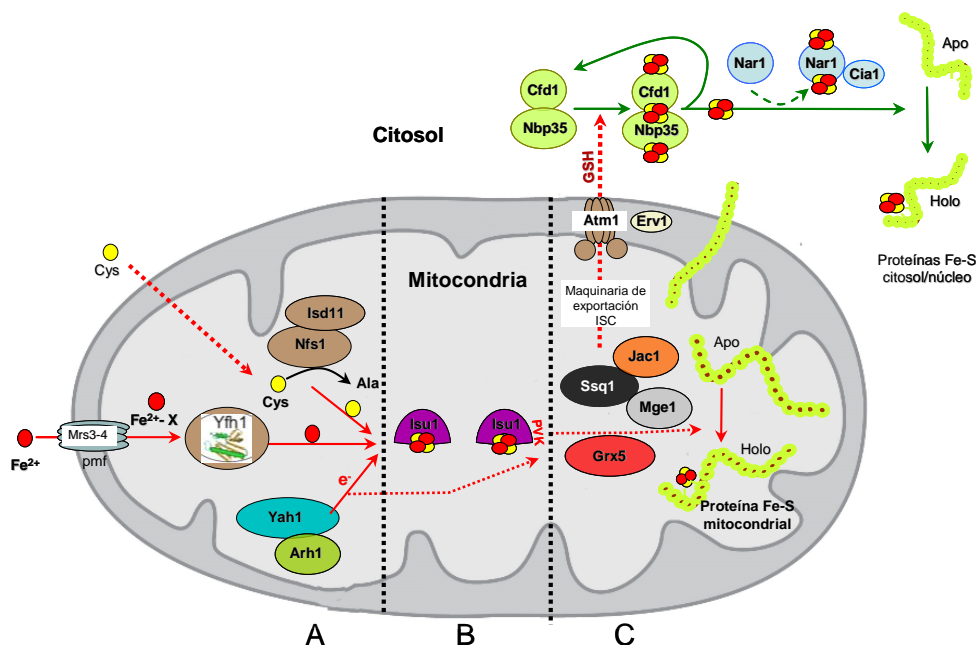


Figura 3. Biosíntesis de Centros Fe-S en *Saccharomyces cerevisiae*—Esquema donde se muestra el proceso, el cual se ha dividido en tres fases. A, representa la fase que ocurre “down-stream” del ensamblaje en Isu1, en esta fase los transportadores Mrs3-4 y se supone que Yfh1, proveerían el hierro. Mientras que Nfs1 y su proteína accesoria Isd11, proveerían el azufre producto de la actividad desulfurasa de este complejo sobre la cisteína. Los electrones o el potencial redox serían aportados por la ferredoxina Yah1 y su reductasa Arh1 en la membrana. Se ha descrito que Yfh1 interaccionaría físicamente formando un complejo con Nfs1, Isd11 y Isu1. B, Un centro Fe/S transitorio es ensamblado en Isu1. C, Se produce la formación de otro complejo entre Isu1-Fe/S, Ssq1, Jac1 y Mge1 en un sitio de unión provisto por el tripéptido PVK de Isu1. Grx5 cumpliría su función en este paso. La proteína precursora codificada en el núcleo y sintetizada en el citosol, es traslocada a la mitocondria en forma desplegada. Después de ser procesada y plegada, entonces adquiere el centro Fe-S por acción de las chaperonas y glutaredoxina. También se muestra la maquinaria de exportación ISC y la maquinaria CIA implicadas en el proceso de ensamblaje de los centros en el citosol. Estos centros formarán parte de la proteínas Fe-S citosólicas y nucleares. (Adaptado de Stemmler, et al., 2010; Lill and Mühlhoff, 2008)

Existe una maquinaria de exportación ISC, la cual se ha relacionado con el transporte de los componentes necesarios para la maduración de las proteínas Fe-S citosólicas y nucleares. Los miembros de esta maquinaria son: a) el transportador de tipo ABC Atm1, el cual está ubicado en la membrana interna. b) La proteína Erv1, ubicada en el espacio intermembrana y c) la molécula de GSH (Kispal, et al., 1999; Lange, et al., 2001; Sipos, et al., 2002) (figura 2). El conocimiento de la implicación de esta maquinaria en la maduración de las proteínas Fe-S citosólicas surgió cuando se describió que el mutante Atm1 presentaba auxotrofia por la leucina. Al profundizar las investigaciones de este fenotipo se encontró que presentaba un

defecto específico en la maduración de la enzima Leu1, una proteína Fe-S citosólica. Esta cepa mostraba importantes defectos en las proteínas Fe-S citosólicas y nucleares, sin embargo las mitocondriales no estaba afectadas (Kispal, et al., 1999).

En cuanto a la maquinaria CIA, se ha establecido que sería la responsable de asistir el ensamblaje y maduración de las proteínas Fe-S citosólicas y nucleares. Está formada por cuatro componentes: Cfd1, Nbp35, Nar1 y Cia1, los cuales están muy conservados en los eucariotas. Se ha descrito que la maquinaria CIA es esencial para el mantenimiento de la viabilidad celular (Balk, et al., 2005; Balk, et al., 2004; Hausmann, et al., 2005; Roy, et al., 2003). En un primer paso el centro Fe-S es transitoriamente ensamblado en un complejo formado por Cfd1 y Nbp35, el cual funcionaría como proteína scaffold (en este paso es requerida la maquinaria mitocondrial ISC). Seguidamente el centro Fe-S es transferido a la apoproteína receptora mediante la asistencia de Nar1 y Cia1. Se ha descrito que sería necesaria la formación de los complejos Nbp35-Nar1 y Nar1-Cia1, mediante interacción directa, para que se lleve a cabo este paso (Lill and Mühlhoff, 2008)

1.6. RELACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO CON LA SÍNTESIS DE CENTROS Fe-S EN *Saccharomyces cerevisiae*

Los mecanismos moleculares que le permiten a Aft1p sensar los niveles de hierro intracelular constituyen uno de los aspectos que despierta gran interés en numerosos grupos en todo el mundo. Se sabe que las células de *S. cerevisiae* con defectos en la maquinaria de síntesis y exportación de centros Fe-S presentan una desregulación de la homeostasis del hierro. Estas células presentan una inducción constitutiva de la transcripción de genes relacionados con la adquisición del hierro y una marcada acumulación de este metal dentro de la mitocondria (Chen, et al., 2004; Foury and Talibi, 2001; Kispal, et al., 1999; Li, et al., 1999). Se ha descrito que en mamíferos esta acumulación de hierro está asociada fuertemente con el establecimiento de ciertas patologías (Lill and Mühlhoff, 2008). El regulón de hierro comprende un conjunto de ≈ 30 genes (tabla 1), cuyos productos están implicados en procesos tales como: la adquisición de hierro: *FET3*, *FTR1*, *FRE1* y *FRE2*; la adquisición de sideroforos: *ARN1-4* y *FIT1-3* y la redistribución del hierro intracelular a la vacuola y la mitocondria: *FET5*, *FTH1* y *MRS4*. Todos estos genes son regulados directamente por el activador de la transcripción *AFT1* (además posiblemente también por *AFT2*) (Rutherford and Bird, 2004). Aft1p, como se ha detallado en apartados anteriores, se trasloca hacia el núcleo

en células deficientes de hierro, mientras que se localiza en el citosol en una situación de suficiencia del metal (Yamaguchi-Iwai, et al., 2002). Se encontró que Aft1p no responde directamente a una disminución de hierro en el citosol. Esta afirmación se soporta en el hecho que levaduras deficientes en miembros de la maquinaria citosólica CIA son incapaces de inducir el regulón. Sin embargo, Aft1p responde directamente a una señal proveniente de la mitocondria que involucra las proteínas Fra1, Fra2 y Grx3-4 (Kumánovics, et al., 2008; Pujol-Carrion, et al., 2006; Rutherford, et al., 2005). Se ha descrito que en ausencia del complejo Fra2-Grx, Aft1p exhibe una activación constitutiva independiente del contenido de hierro celular (Rutherford, et al., 2001). También se ha observado que el movimiento citosol-núcleo de Aft1p es dependiente del complejo Fra2-Grx y que se encuentra en la misma vía de señalización que involucra a la maquinaria mitocondrial de ensamblaje y exportación de los centros Fe-S mitocondrial (Chen, et al., 2004; Rutherford, et al., 2005). Estos resultados indicarían que *Saccharomyces cerevisiae* emplea el correcto funcionamiento del proceso de biosíntesis para regular la actividad transcripcional de Aft1p. Esta hipótesis es sustentada por varios estudios que han descrito que mutaciones en genes relacionados con este complejo mitocondrial, como *SSQ1*, *JAC1*, *ATM1*, *NFU*, *YAH1*, *ARH1*, *ISU1-2*, *NFS2*, *YFH1*, *ERV1* (Chen, et al., 2002; Jensen and Culotta, 2000; Lill and Kispal, 2000), conducen a una activación constitutiva del regulón de hierro (Lill, et al., 1999). Este fenotipo es similar al observado en ausencia del complejo Fra2-Grx (antes mencionado) y recientemente se ha establecido que una situación en la que se destruye el centro Fe-S formado entre Grx3p y Grx4p también provocaría la activación constitutiva del regulón de hierro (Mühlenhoff, et al., 2010). Todas estas observaciones en conjunto son consistentes con una vía de señalización que involucraría a Aft1p, los centros Fe-S mitocondriales y el complejo formado por Fra2-Grx3 y Grx4.

1.7. ENFERMEDADES HUMANAS PROVOCADAS POR MUTACIONES DE GENES DE LA SÍNTESIS DE CENTROS Fe/S: LA LEVADURA COMO MODELO DE ESTUDIO

Como ya se ha mencionado, *Saccharomyces cerevisiae* ha servido como un importante organismo experimental para revelar la función de numerosos genes. También ha tenido un importantísimo impacto en el establecimiento de los mecanismos moleculares de un gran número de enfermedades humanas. De hecho, esto se ha conseguido ya que hasta un 30% de los genes clonados hasta ahora, que se sabe están implicados en enfermedades humanas,

poseen sus ortólogos en levadura (Foury, 1997). En este sentido, los estudios realizados en los últimos años en la síntesis de centros Fe-S en levaduras y en sus contrapartes humanos, ha sentado las bases que han permitido determinar que un número importante de estos componentes (maquinarias ISC y CIA) están directamente relacionados con ciertas enfermedades humanas (Tabla 2). Además, estos estudios han contribuido a establecer la existencia de una conexión entre este proceso biosintético y el metabolismo del hierro tanto en este sencillo eucariota como en humanos. Es razonable pensar que esta conexión no es casual, ya que, como ya se ha mencionado anteriormente, los centros hierro-azufre están involucrados en una diversidad de procesos esenciales para el desarrollo y mantenimiento de casi todas las funciones indispensables para el mantenimiento de la vida tal y como las conocemos hoy. Es cierto que la mitocondria de las células humanas es más compleja que la de la levadura (esta incluye mas de 200 proteínas adicionales). Sin embargo, existe un alto nivel de similitud en los procesos de biogénesis y función mitocondrial, lo cual hace de *Saccharomyces cerevisiae* un excelente modelo para el estudio de la fisiopatología mitocondrial humana (Barrientos, 2003). En este sentido, el estudio tanto de las bases moleculares como de los mecanismos de la patogénesis de muchos desordenes mitocondriales esta tomando ventaja del paradigma de la levadura. Esta aportación hecha por *Saccharomyces cerevisiae* se justifica en la flexibilidad y utilidad que aporta este eucariota, por lo que su empleo para el estudio de los desordenes mitocondriales en humanos indudablemente continuará en el futuro.

En este contexto, hasta la fecha se han reportado un número de patologías humanas directamente relacionadas con mutaciones en las proteínas como Frataxina (su ortólogo es *YFHI* en levadura), *GLRX5* (ortólogo de *GRX5* de levadura) *ISCU* (ortólogo de *ISU1-2*) y *ABCB7* (ortólogo de *ATMI* de levadura). Como se ha visto, todos estos genes tienen su contraparte en levadura. En la tabla 2 se muestra un resumen de las enfermedades humanas relacionadas con genes pertenecientes a la maquinaria ISC más importantes descritas hasta ahora.

Tabla 2. Enfermedades relacionadas con genes implicados en la síntesis de centro Fe-S y sus ortólogos en *Saccharomyces cerevisiae*.

Patología	Etiología	Signos clínicos	Hallazgos moleculares
Ataxia de Friedreich	Expansión de GAA que provoca disminución de los niveles de mRNA de <i>FRX</i> (ortólogo Yfh1)	Ataxia progresiva, miocardiopatía hipertrófica, Diabetes, muerte \approx 40 años	Deficiencia de aconitasa, complejos I-III, \downarrow mtDNA en corazón y músculos, \uparrow mtFe en corazón, hígado y bazo
Anemia Sideroblástica	Mutación puntual en <i>GLRX5</i> (ortólogo Grx5). Homocigótica. Defectos de plegamiento que reduce los niveles de mRNA	Anemia microcítica, hepatoesplenomegalia	Sideroblastos anillados, \uparrow tinción de hierro en eritroblastos y macrófago. \downarrow actividad Aconitasa en mononucleares periféricos
Miopatía por deficiencia de <i>ISCU</i>	Mutación intrónica en <i>ISCU</i> (ortólogo <i>ISU1</i>). Defectos de plegamiento que reduce los niveles de mRNA	Intolerancia severa al ejercicio. Falta de aliento y taquicardia, acidosis láctica, inflamación muscular, mio-globinuria	Deficiencia del complejo II y aconitasa en músculo esquelético, \uparrow inclusiones de Fe en biopsia de músculo esquelético
Anemia sideroblástica con ataxia por deficiencia de <i>ABC7</i>	Mutación en <i>ABC7</i> (ortólogo <i>ATM1</i>). hereditaria y ligada al cromosoma X	Ataxia, anemia microcítica hipocrómica	Deficiencia de Xantin oxidasa y aconitasa citosólica. No hay afectación de complejo II

2. ATAXIA DE FRIEDREICH (FRDA)

Desde que en el año 1863 el Profesor de Medicina Nicholaus Friedreich describió por primera vez una enfermedad caracterizada clínicamente por ataxia y atrofia degenerativa de la medula espinal a nivel de la columna posterior, se ha discutido mucho sobre la etiología de esta enfermedad. Hoy en día se conoce como ataxia de Friedreich a una enfermedad autosómica recesiva, la cual es la más común de las ataxias de inicio a temprana edad entre individuos caucásicos. En la enfermedad además del desarrollo de neuropatía también se manifiesta una cardiomiopatía hipertrófica y diabetes mellitus (Campuzano, et al., 1996). Los primeros síntomas generalmente aparecen cercanos a la pubertad, con lo que esto pudiera coincidir con un incremento de la actividad hormonal y por ende metabólica. Además, hoy se conoce que esta enfermedad humana está causada por una importante disminución de la expresión de la proteína mitocondrial denominada frataxina que es codificada por el gen *FRX*.

2.1. FRATAXINA: UNA PROTEÍNA MUY CONSERVADA

Frataxina es una proteína muy conservada a lo largo de la evolución, se halla presente desde bacterias (proteobacterias y no en arqueobacterias) hasta humanos (Figura 4) (Gibson, et al.,

1996). En *Saccharomyces cerevisiae* *YFH1* es el ortólogo de Frataxina. Esta se ha descrito como una proteína de bajo peso molecular, soluble en la matriz y asociada a la membrana interna mitocondrial. Esta localización se basó en estudios de microscopía inmunofluorescente. Además se sabe que presenta una secuencia en el extremo N-terminal que sería responsable de esta localización (Campuzano, et al., 1996). Frataxina sería sintetizada en el citosol como una forma precursora de aproximadamente 25 KDa. Seguidamente, durante su internalización en la matriz de la mitocondria sería procesada con dos cortes, los cuales darían lugar a una forma intermedia y una forma madura (Pandolfo, 2009). La proteína posee una región que presenta la mayor homología entre organismos, la cual se encuentra ubicada en el extremo C-terminal. Esta secuencia presenta una identidad de 25% y una similitud del 70%, entre los diferentes ortólogos. Por esta razón se cree que esta región sería esencial para la función de la proteína (Gibson, et al., 1996).

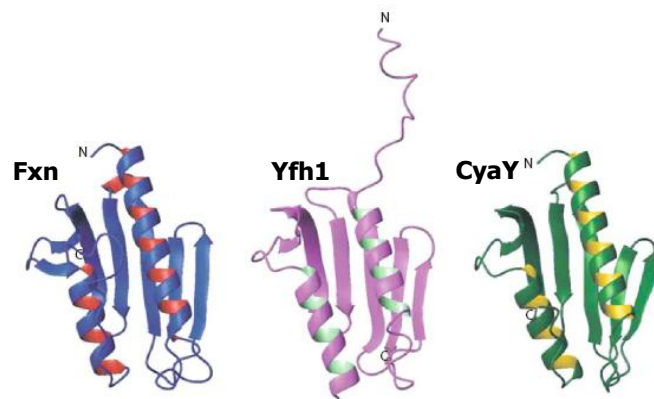


Figura 4. Estructura de hojas- β y hélice- α de tres ortólogos de frataxina—Comparación de tres estructuras tridimensionales frataxina. Se observa el grado de similitud entre las formas, humana (FRX, Protein databank número 1eKg), levadura (Yfh1, 2fq1) y bacteriana (CyaY, 1ew4). (Fuente: V. Irazusta, tesis doctoral)

La resolución de la secuencia y estructura de la proteína ha supuesto un gran avance en el entendimiento de la ataxia de Friedreich, ya que ha permitido sustentar aún más la homología que existe entre las diferentes especies. Este hecho ha sentado las bases para el desarrollo de técnicas bioquímicas y genómicas en la levadura, las cuales han aportado un mayor entendimiento de las bases moleculares de la enfermedad. En este sentido, estos avances se basan principalmente en dos aproximaciones: a) un mapeo de los genes responsables de la enfermedad en humanos y b) un gran impulso en la investigación con el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* (Knight, et al., 1999). Si bien este eucariota se halla distante de los seres humanos, el gen responsable de esta patología, así como las rutas metabólicas en los que se cree estaría implicada su función, están muy bien conservados a lo largo de la escala evolutiva.

2.2. BASES MOLECULARES DEL DÉFICIT DE FRATAXINA EN HUMANOS

Como ya se mencionó anteriormente, en la FRDA se aprecia una significativa disminución de la expresión de frataxina en los individuos afectados, esto se debe a una mutación localizada en la región proximal del cromosoma 9. Dicha mutación produce una hiperexpansión del triplete GAA en el primer intrón del gen de la frataxina (Della Nave, et al., 2008). Esta expansión produce una sustancial reducción de la expresión de la proteína. El número normal de repeticiones del triplete GAA es de aproximadamente 40, mientras que en la enfermedad se presentan de 70 a más de 1.000, siendo el rango más frecuente entre 600 y 900. En individuos heterocigotos no se observan manifestaciones clínicas. Asimismo, existen mutaciones que afectan a unos pocos aminoácidos que provocan la pérdida de la función de la proteína. Sin embargo, este tipo de mutaciones son muy raras. Como ya se ha demostrado en modelos animales es necesaria la presencia de una cantidad residual de expresión de la proteína para que el embrión pueda sobrevivir durante el desarrollo (Pandolfo and Pastore, 2009). El transcrito más abundante de este gen tiene un tamaño de 1.3 Kb y posee 5 exones numerados del 1 al 5a. También existe un transcrito minoritario que presenta un exón alternativo 5b del que no se conoce si tiene una función significativa (Campuzano, et al., 1996). La proteína transcrita contiene 210 aminoácidos. Presenta un péptido señal en el extremo N-terminal que dirige la proteína a la mitocondria. El gen *FXN* se expresa en todos los tejidos pero con distintos niveles, lo cual puede ser explicado en parte, por el contenido mitocondrial de los mismos. En adultos el mRNA de la proteína es más abundante en el corazón, espina dorsal, el hígado, músculo esquelético y páncreas (Campuzano, et al., 1996)

2.3. ACERCA DE LA POSIBLE FUNCIÓN DE FRATAXINA

2.3.1. Implicación en la síntesis de centros Fe-S

La pregunta sobre la función de esta pequeña proteína es uno de los cabos sueltos en el estudio del metabolismo del hierro en *Saccharomyces cerevisiae*. Como ya se ha mencionado en anteriores apartados, frataxina es una proteína que se ha ubicado en la matriz mitocondrial y se cree que desde allí estaría llevando a cabo su función. La hipótesis más aceptada entre la comunidad científica ubica su función directamente en la síntesis de centros Fe-S. Sin que esta sea la única función atribuida a la proteína hasta la fecha.

Uno de los argumentos que ubica frataxina en la síntesis de Fe-S es el hecho que la proteína está ampliamente distribuida a lo largo de la evolución, encontrándose ortólogos de ésta en humanos, plantas, moscas, peces, hongos y bacterias (proteobacterias pero no en arqueobacterias), lo cual sugiere que la función de esta proteína es esencial para estos organismos. Ha sido precisamente en bacterias donde se iniciaron los estudios de la síntesis Fe-S, cuando se describió la presencia de los tres operones implicados en el ensamblaje de los centros Fe-S definidos como: *nif*, *suf* e *isc*. Si bien frataxina no forma parte de ninguno de estos operones, se le ha asociado fuertemente con el complejo *isc*, lo cual sugeriría una hipótesis de evolución en paralelo (Gibson, et al., 1996). Uno de los argumentos que sustentan esta hipótesis es que frataxina interacciona físicamente con el complejo de formación de centros Fe-S formado por Isu1p/Nfs1p (Gerber, et al., 2003). Se ha descrito que esta interacción involucraría la unión de frataxina a Isu1p a través de la superficie de hojas- β de frataxina (Figura 5). Esta interacción también se verificó mediante experimentos de pull-down (Wang and Craig, 2008). Además también se ha descrito que dicha interacción es dependiente de hierro y que es inhibida por la presencia de quelantes (Gerber, et al., 2003). Otra evidencia argumentada a favor de la implicación de Yfh1 en la síntesis de centros Fe-S es que en ausencia de esta proteína se observa una importante disminución de la actividad de enzimas Fe-S y un incremento del hierro en la mitocondria (Mühlenhoff, et al., 2002).

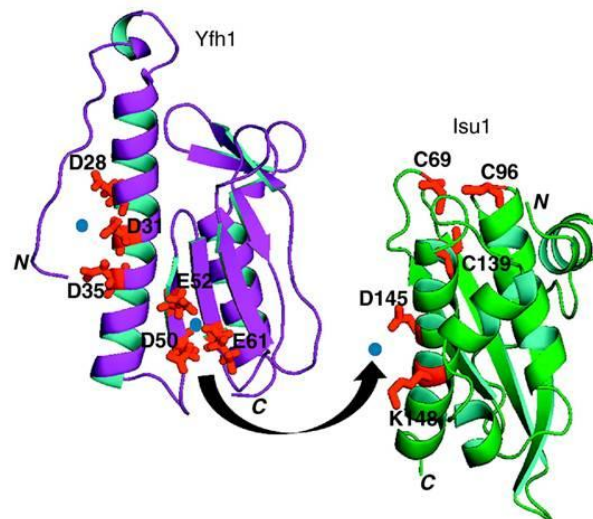


Figura 5. Yfh1p interacciona con hierro y con Isu1—Detalles de los residuos implicados y los dominios de unión a dos átomos de Fe^{2+} en Yfh1 (PDB #2GA5). También se muestra el sitio activo rico en residuos Cys de Isu1p (modelo de estructura), en el que también se muestra un putativo sitio de unión a Fe^{2+} en la región C-terminal. La flecha indica la transferencia del Fe^{2+} entre las dos proteínas. ● Representa el Fe^{2+} (Subramanian, et al., 2011).

Sin embargo, también se han encontrado evidencias que indicaría que la función de frataxina no es indispensable en este proceso. En este sentido, se ha descrito que la expresión de la ferritina mitocondrial humana (mtF) en el mutante nulo $\Delta yfh1$ era capaz de rescatar el fenotipo de deficiencia respiratoria observado en este mutante (Campanella, et al., 2004). También se ha encontrado que el mutante $\Delta yfh1$ cultivado en presencia de un quelante de hierro (batofenantrolina), era capaz de recuperar la actividad de succinato deshidrogenasa casi totalmente (Duby, et al., 2002). Además Chen y Kaplan, 2000 observaron que la sobreexpresión del transportador *CCCI* en un mutante condicional *YFHI* permitía recuperar la capacidad de la células de crecer en fuentes de carbono no fermentables mediante la limitación de la acumulación de hierro en el interior de la mitocondria y una situación de estrés oxidativo (Chen and Kaplan, 2000). Esta tesis pretende aportar información suficiente que demostraría que Yfh1 no es esencial para el ensamblaje de los centros Fe-S en *Saccharomyces cerevisiae*.

Uno de los puntos más controvertidos sobre un posible papel de Yfh1p como metalochaperona de Isu1p en la biosíntesis es el hecho de que la interacción de Yfh1p con hierro no se produce de la forma canónica, como ocurre en otras proteínas que unen metales, como por ejemplo las metalochaperonas de cobre. Estas proteínas de unión a cobre funcionan uniéndose al metal por interacciones de alta afinidad (Rosenzweig, 2002). Sin embargo, la interacción de frataxina con el hierro tiene una afinidad relativamente baja. Ello quizá se deba a que la coordinación del hierro es incompleta. En parte esto se atribuye al hecho de que la unión ocurre en la superficie de la proteína en lugar de una cavidad. Adicionalmente, también se ha mencionado que la debilidad de la unión estaría condicionada por el hecho de que los aminoácidos que la unen al metal son primariamente aquellos que contienen residuos carboxilatos, en lugar de cisteínas e histidinas (Pastore, et al., 2007).

2.3.2. Interacción de Yfh1 con hierro: posible función en el almacenamiento/detoxificación

Numerosos estudios han mostrado que frataxina es capaz de interactuar con iones de hierro *in vitro*, esta interacción involucra la superficie de carboxilatos del área α -helix 1/ β (Stemmler, et al., 2010). Algunos análisis llevados a cabo con monómeros de Yfh1p han demostrado que la proteína es capaz de unir dos átomos de hierro con una afinidad de 2,5-5

μM . Esta unión también ha sido verificada en otros ortólogos de la proteína, sin embargo se han observado ciertas diferencias en la estequiometría de unión y en la afinidad de la misma. Por ejemplo, el ortólogo de la proteína en humanos es capaz de interactuar con seis átomos de hierro con una $K_d = 12\text{-}55 \mu\text{M}$ (Yoon and Cowan, 2003), el de *E. coli* interactúa con dos átomos y con una $K_d = 4 \mu\text{M}$ (Bou-Abdallah, et al., 2004) y el de *Drosophila* lo hace con un átomo y una $K_d = 6 \mu\text{M}$ (Kondapalli, et al., 2008). En esta misma línea, se han llevado a cabo experimentos en los que se han mutado ciertos aminoácidos específicos para intentar validar *in vivo* la capacidad de la proteína de interacción con el hierro observada *in vitro*, pero estos experimentos no han arrojado resultados concluyentes. Este hecho se ha atribuido en parte a la dificultad debida a la misma naturaleza de esa unión, la cual ocurre en la superficie de la proteína. También al hecho que, la interacción es mediada por múltiples aminoácidos, en contraste con las interacciones clásicas de otras metalochaperonas (Rosenzweig, 2002). En este sentido, alteraciones puntuales en alguno de estos residuos ácidos presentes en dicha superficie, tienen efectos marginales. No obstante, en una proteína en la que se han sustituido múltiples residuos ácidos por alanina, se observó que la capacidad de unión a hierro estaba muy comprometida. Una versión alterada de la proteína en la que los aminoácidos Asp⁸⁶, Glu⁹⁰, Glu⁹³, Asp¹⁰¹ y Glu¹⁰³ fueron reemplazados por alanina, presentó una significativa disminución tanto de la interacción con hierro al ser analizada mediante titulación de triptófano fluorescente, como de la actividad de las enzimas Fe-S (Correia, et al., 2010).

Otro punto adicional a la interacción directa con el metal, que estaría apuntando también en la dirección de una posible función relacionada con el almacenaje de hierro, es soportado por algunos estudios que han mostrado que ortólogos de frataxina son capaces de oligomerizar en presencia de altas concentraciones de hierro (Figura 6). La exposición del homólogo bacteriano y de levadura a un exceso molar de 20 veces más hierro elemental que los niveles fisiológicos inducen la oligomerización que da lugar a una estructura de forma y composición de tipo ferritina (Park, et al., 2002; Park, et al., 2003). Sin embargo, existen dos puntos controversiales con respecto a esta capacidad de oligomerización en levadura y bacterias. Por un lado, se sabe que esta oligomerización no ocurre en el ortólogo humano (Adinolfi, et al., 2002). Por otro lado, la sustitución por alanina de los residuos carboxilatos Asp⁸⁶, Glu⁹⁰ y Glu⁹³, los cuales están implicados en la interacción con Fe, revierte totalmente la capacidad de oligomerización de Yfh1; sin que esto comporte ninguna alteración significativa en el fenotipo de este triple mutante *in vivo* (Aloria, et al., 2004). Tampoco se han observado

efectos deletéreos ni en la síntesis de centros Fe-S ni en la homeostasis del hierro. Estos datos han llevado a la conclusión que la capacidad de oligomerización observada en frataxina probablemente no es necesaria para el papel de la proteína en la síntesis de Fe-S (Aloria, et al., 2004). Sin embargo, estos resultados no excluyen la posible implicación de la proteína en el almacenamiento/detoxificación del metal. Cabe la posibilidad que esta función permanezca en levaduras, ya que no existe una ferritina mitocondrial, mientras que en mamíferos no sería necesaria debido a que existe una ferritina encargada de cumplir esta función (Levi, et al., 2001).

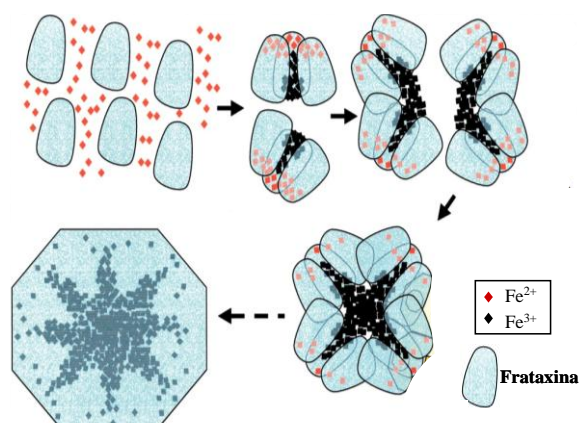


Figura 6. Posible mecanismo de oligomerización de Yfh1p—Experimentos *in vitro* han mostrado que la exposición de la proteína a un exceso de Fe^{2+} induce la oligomerización de la proteína en una estructura de tipo ferritina (Park, et al., 2003).

2.3.3. Posible función como reguladora de la síntesis de centros Fe-S

Otra de las hipótesis surgidas recientemente describe la posibilidad de que el ortólogo de bacteria (*CyaY*) participaría en el ensamblaje de los centros Fe-S como un inhibidor (dependiente de hierro) de la formación de los cluster. Esta función la llevaría a cabo a través de una interacción con la desulfurasa IscS. Esta interacción involucraría la superficie de interacción con hierro de *CyaY*, la cual está bien conservada. *CyaY* funcionaría como un sensor de hierro encargado de la regulación de la tasa de formación de los centros Fe-S en función de las necesidades de incorporación de estos centros en las apoproteínas receptoras (Figura 7). En este sentido, en ausencia de *CyaY* se desregularía la síntesis de estos, lo cual provocaría un incremento del hierro y un situación de estrés oxidativo (Adinolfi, et al., 2009). En esta misma línea, otro estudio discutió sobre la posibilidad que frataxina contribuiría a prevenir el daño oxidativo inducido por el hierro ya que se encargaría del mantenimiento del

adequando balance del pool de hierro en un estado soluble, no toxico y biodisponible para las rutas de biosintesis (Bou-Abdallah, et al., 2004)

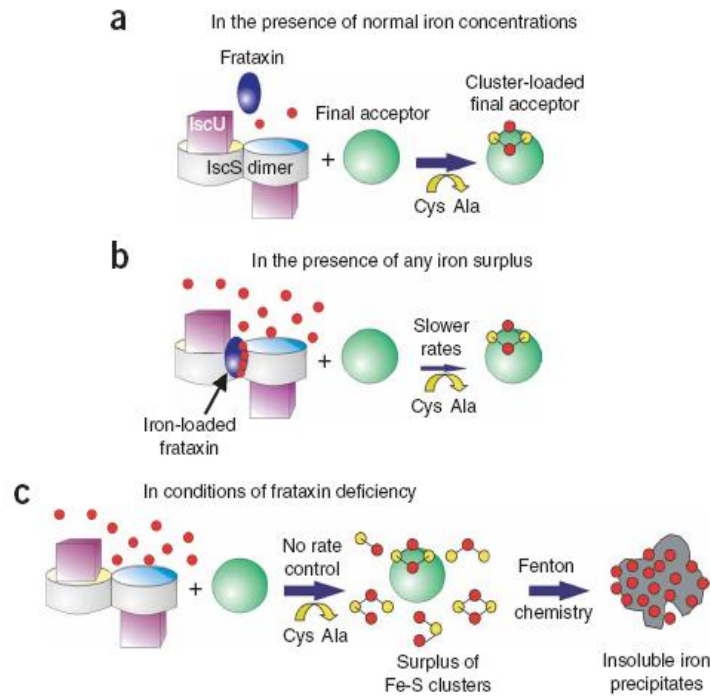


Figura 7. Modelo de la función reguladora de frataxina en bacterias—(a) En una situación de suficiencia de Fe, los centros Fe-S serían ensamblados en el complejo IscS-IscU y transferidos a las proteínas receptoras. (b) En presencia de un exceso de Fe, en comparación con el número de proteínas receptoras, frataxina sentiría este exceso e inhibiría la formación del complejo IscS-IscU, disminuyendo el ritmo de formación de los centros. En ausencia de frataxina, la formación de los clusters sería constante independientemente de las proteínas receptoras. Se genera así, un exceso de centros Fe-S que serían altamente inestables, generando un incremento del estrés vía reacción de Fenton y finalmente formando agregados insolubles (Adinolfi, et al., 2009).

2.3.4. Otras funciones descritas

Dentro de otras posibles funciones de frataxina en humanos, se ha descrito que esta proteína podría participar en diversos aspectos del metabolismo intracelular del hierro (Figura 8). Entre estos aspectos se pueden destacar: se ha asociado a frataxina con el control del transporte mitocondrial de hierro (Babcock, et al., 1997), también se ha descrito que podría ser dador de hierro a la ferroquelatasa en el último paso de la biosíntesis de los grupos hemo (Yoon and Cowan, 2004), participar en la biosíntesis de los centros Fe-S (Yoon and Cowan, 2003), en la reconstitución de la holo-aconitasa (Bulteau, et al., 2005; Bulteau, et al., 2004) y en el almacenamiento de hierro (Cavadini, et al., 2002). Además, se ha propuesto que podría formar parte o interactuar con miembros de la cadena respiratoria, estando involucrada en la transferencia de electrones a la ubiquinona (Gonzalez-Cabo, et al., 2005).

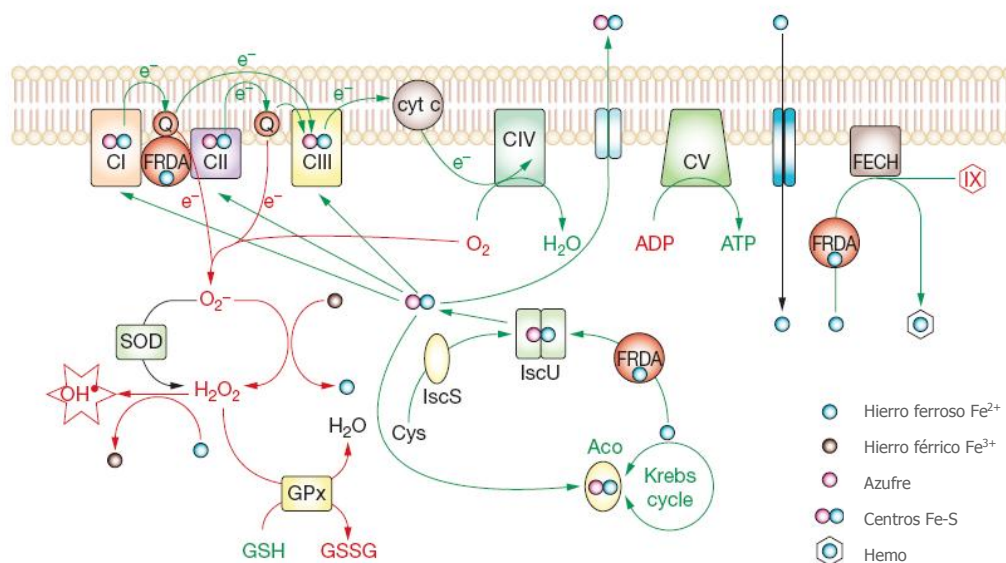


Figura 8. Otras funciones propuestas para frataxina y su posible papel en el estrés oxidativo en FRDA— Las flechas y el texto en color verde indican las moléculas y las rutas que aparecen afectadas en el déficit de frataxina. Las flechas y el texto en color rojo indican las moléculas y rutas que incrementan su actividad en deficiencia de frataxina (Pandolfo, 2008).

3. ESTRÉS OXIDATIVO

El cambio del ambiente en la tierra con la aparición de los organismos fotosintéticos comportó que la atmósfera se transformara de reductora a oxidante. Este cambio obligó a los organismos que se desarrollaban en estas nuevas condiciones a elaborar complejos mecanismos para utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones. Dicha utilización comporta un reto para la célula. En este sentido, la paradoja de la respiración es que el aire necesario para vivir es también una fuente de toxinas letales. El costo de un catabolismo aeróbico es la producción de daño oxidativo a ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos (Benzie, 2000). Este daño se conoce como estrés oxidativo y es el resultado de los efectos causados por un grupo de moléculas denominadas en conjunto especies reactivas del oxígeno (ROS, por reactive oxxygen species). Estas son también comúnmente denominadas radicales libres, sin embargo este último término abarca un número aun mayor de estas especies las cuales se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados (Toledano, et al., 2003; Halliwell B, 1989). Las células en general, producen de manera permanente y natural estas moléculas con electrones desapareados que aparecen como subproductos de la reducción incompleta del oxígeno. El efecto perjudicial de la molécula de oxígeno viene dado por la presencia de un par de electrones desapareados que le confiere una alta reactividad. Las especies reactivas del oxígeno están compuestas por el oxígeno singulete (1O_2), el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (Figura 9).

Como ya se ha mencionado la generación de ROS es un proceso natural, solo se puede hablar de estrés oxidativo cuando existe un desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos detoxificantes o antioxidantes propios de la célula. Esta situación de desequilibrio es la que en última instancia desencadenará el daño celular.

	O_2	\rightleftharpoons	$O_2^{\bullet-}$	\rightleftharpoons	H_2O_2	\rightleftharpoons	OH^{\bullet}	\rightleftharpoons	H_2O
Potencial de Reducción (V)			0,94		0,32		2,31		
Tiempo de vida Media T1/2 (seg)			10^{-6}		10^{-5}		10^{-9}		
Concentración in vivo (M)			10^{-10}		10^{-7}		10^{-15}		

Figura 9. Especies reactivas del oxígeno (ROS)—Estos radicales son sub-productos de la reducción incompleta del oxígeno en las células. Se muestra el potencial redox de cada una de ellas, así como la vida media y la concentración en la que se encuentran en las células (Giorgio, et al., 2007).

Existen otros tipos de radicales libres que se diferencian de las ROS en que son derivadas de elementos diferentes del oxígeno. Las especies derivadas del nitrógeno (NOS) son unas de las mas importantes, entre ellas encontramos: el óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Este último se genera de la rápida y espontánea reacción del NO^{\bullet} con el radical $O_2^{\bullet-}$. Representa la especie más reactiva de las NOS debido a que fácilmente difunde a través de las membranas empleando los canales iónicos y es capaz de reaccionar con la mayoría de los componentes celulares. Las proteínas son especialmente susceptibles a sus efectos perjudiciales. Se ha descrito que el peroxinitrito es capaz de provocar la nitrosilación de grupos como el sulfidrilo de las cisteínas, también puede nitrar los residuos tirosina o triptófano y es capaz de oxidar los residuos metionina, lo cual desencadena importantes daños e incluso pérdida de la actividad de las enzimas (Pacher, et al., 2007).

3.1. ORIGEN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO

En *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones fisiológicas la pérdida de electrones de la cadena de transporte electrónico mitocondrial constituye la principal fuente de producción de ROS. La principal especie reactiva generada durante este proceso es el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual es relativamente abundante en la célula (Bouveris and Cadenas, 1989). El anión superóxido no es fuertemente reactivo, pero es capaz de reaccionar directamente con algunas proteínas (Gardner and Fridovich, 1991). Como se observa en la figura 10, es a nivel de la

ubisemiquinona que forma parte de la NADH deshidrogenasa donde se genera la mayor cantidad de $O_2^{\bullet-}$. Se ha descrito que el complejo citocromo bc1 también es responsable de la generación de una importante cantidad de este anión (Dröge, 2002).

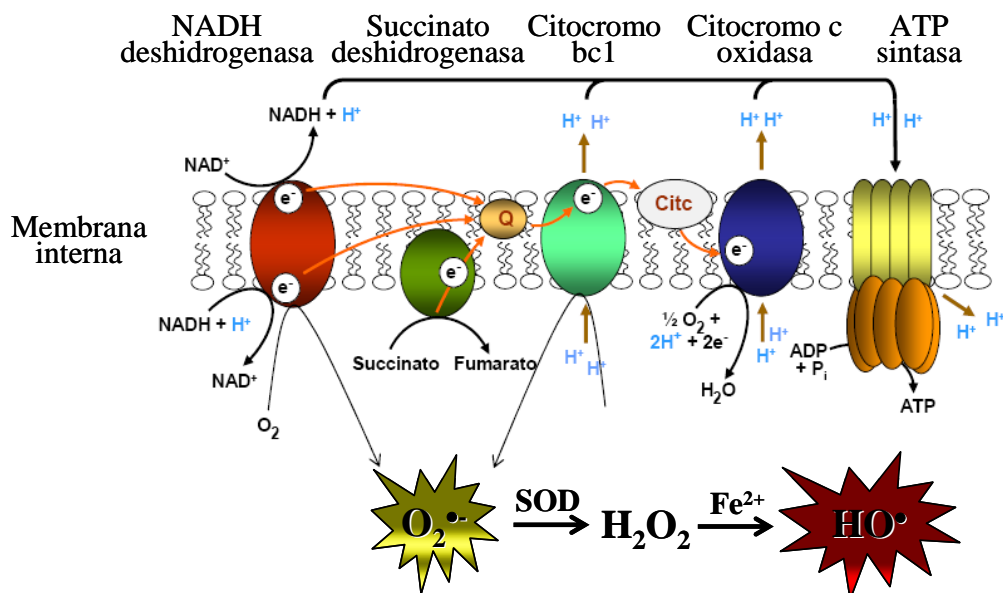


Figura 10 Producción de especies reactivas del oxígeno a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae*—El flujo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana crea un gradiente de electrones que tiene como receptor final la molécula de oxígeno generando el anión superóxido, el cual por acción de las enzimas SOD es dismutado a H_2O_2 . Este en presencia de metales de transición puede, a través de la reacción de Fenton, generar el altamente reactivo radical hidroxilo (adaptado de la tesis de M.M. Molina-Navarro).

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es producido principalmente durante la detoxificación del anión superóxido catalizada por las superóxido dismutasas (SOD), aunque también se ha descrito que se genera en cantidades significativas durante la oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas. Una de las características más resaltantes de esta especie es su capacidad para difundir a través de la mayoría de las membranas biológicas y localizarse en todos los compartimientos celulares. Es la especie reactiva del oxígeno más abundante y a pesar de no ser la más reactiva sus efectos son deletéreos debido a que es capaz de generar el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el cual es extremadamente reactivo. El radical hidroxilo puede ser generado a través de la reacción de Fenton. Dicha reacción requiere como catalizador un ión de un metal de transición como el hierro ferroso (Fe^{2+}), aunque también puede ser catalizada por el cobre (Halliwell and Aruoma, 1991). Estos iones ferrosos reaccionan con el H_2O_2 provocando su fisión homolítica que genera el radical hidroxilo, un ión OH^- y la oxidación del hierro a su estado férrico (Fe^{+3}). Este Fe^{+3} puede ser a su vez reducido a Fe^{2+} por el anión superóxido con lo cual se genera un ciclo. Dicho ciclo, involucra la acción combinada del ión

superóxido y el H_2O_2 , se ha denominado reacción de Haber-Weiss (Tabla 3). El radical hidroxilo generado en este proceso reacciona de manera indiscriminada con la mayoría de los metabolitos y macromoléculas y en muchos casos genera otros radicales en el proceso (Halliwell and Gutteridge, 1984)

Tabla 3. Principales reacciones implicadas en la generación de las especies reactivas del oxígeno.

Reacción	Reactantes	Producto
Dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ (SOD)	$2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^{\bullet-}$	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Fenton	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{Fe}^{3+} + \text{HO}^{\bullet} + \text{OH}^-$
Haber-Weiss	$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{O}_2 + \text{HO}^{\bullet} + \text{OH}^-$

Adicionalmente, se ha descrito que en *Saccharomyces cerevisiae* las fuentes exógenas de producción de ROS también juegan un papel importante. En este sentido las más resaltantes incluyen aquellas situaciones en la que la célula se halla expuesta a compuestos químicos oxidantes. También la exposición a radiaciones ionizantes como la radiación UV, X y γ , las cuales son capaces de generar especies como: $\text{O}_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} y $^1\text{O}_2$. Estas radiaciones pueden inducir directamente el daño del DNA o indirectamente mediante la generación de una situación de estrés oxidativo, fototoxicidad y fotosensibilidad (Zagarese, et al., 2001).

3.2. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Como ya se ha mencionado anteriormente, la utilización del oxígeno durante la fosforilación oxidativa conlleva la generación de especies reactivas del oxígeno como subproductos de este proceso. De allí que los sistemas biológicos han desarrollado las llamadas defensas antioxidantes que cumplen la función de prevenir y/o neutralizar estos intermediarios tóxicos del oxígeno. Esta primera línea de defensa se ha extendido y diversificado ampliamente en los sistemas biológicos, constituyéndose en numerosos grupos que cumplen igualmente diversas y altamente efectivas funciones (Benzie, 2000). Sin embargo las defensas antioxidantes no son infalibles, por ejemplo, en levaduras la acumulación de daño causado por las ROS ha sido relacionada con envejecimiento (Reverter-Branchat, et al., 2007). Mientras que en humanos los efectos de las ROS se han visto asociados con enfermedades crónicas como el cáncer, Alzheimer, Parkinson, ataxia de Friedrich e incluso la enfermedad coronaria (Spector, 2000).

Saccharomyces cerevisiae posee dos grandes complejos de defensas antioxidante. Por un lado se encuentra la primera línea de defensa antioxidante constituida por los llamados sistemas no enzimáticos, el cual esta conformado por un grupo de metabolitos capaces de funcionar como sistemas tamponadores y contener un eventual incremento de la oxidación. El otro complejo está constituido por los sistemas enzimáticos. Estos a su vez se agrupan en dos subgrupos bien definidos, que son: los que directamente eliminan las llamadas ROS y los que se encargan de mantener el adecuado equilibrio redox indispensable para la viabilidad celular. En la tabla 4 se muestran los sistemas de defensa antioxidante mas importantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 4. Defensas antioxidantes más importantes en *S. cerevisiae* (adaptado de Zagarese, et al., 2001)

Función	Gen(es)	Localización ^Ω	Papel en la célula
<i>METABOLITOS</i>			
<i>ANTIOXIDANTES</i>			
Glutación	-	General	Buffer redox, excreción de xenobióticos
Ubiquinona	-	Mit, RE y Mem	Soluble en lípidos. Componente de CRM
D-ritroascorbato	-	Cit?	Antioxidante polar
<i>SISTEMAS ENZIMÁTICOS</i>			
Catalasas	<i>CIT1, CTA1</i>	Cit, Per	↓H ₂ O ₂ formando H ₂ O + O ₂
Superóxido dismutasa	<i>SOD1 y SOD2</i>	Cit, Mit y Nuc?	↓O ₂ ^{•-} formando H ₂ O ₂ + O ₂
SOD chaperona	<i>CCS1</i>	Cit	Necesaria para incorporar Cu en SOD1
Tioredoxinas	<i>TRX1, TRX2</i>	Cit	Asimilación de deoxiribonucleotido y fosfato, tiol-reductasa, control redox
Glutaredoxinas (GRX) di-tiol	<i>GRX1, GRX2</i>	Cit, Nuc	Actividad tiol reductasa dependiente de glutación
Otra GRX di-tiol	<i>GRX8</i>	Cit	↓Actividad GRX, inducida por arsénico
Glutaredoxinas mono-tiol	<i>GRX3, GRX4, GRX5</i>	Cit Nuc Mit	Protección frente daño redox. Metabolismo del Fe
Otras GRX mono-tiol	<i>GRX6, GRX7</i>	RE, Golgi	Estrés oxidativo, función se solapa
Peroxiredoxinas, Tioredoxina peroxidasa	<i>AHP1, PRX2, TSA1</i>	Cit, Mit	Actividad peroxiredoxina y tioredoxina-peroxidasa
Sulfiredoxina	<i>SRX1</i>	Cit, Nuc	Reduce modificaciones cisteína-sulfínico en residuos de Tsa1p y Ahp1p
Glutación peroxidasa	<i>GPX1, GPX2</i>	Cit/Mem	Reducción de hidroperóxidos e hidroperóxidos lipídicos
Fosfolípido-hidroperóxido GSH peroxidasa	<i>GPX3/ORP1</i>		
<i>SISTEMAS ENZIMATICOS</i>			
Citocromo c peroxidasa	<i>CCP1</i>	Mem iner mit	Reducción de H ₂ O ₂ en la mitocondria
Síntesis de glutación	<i>GSH1, GSH2</i>	Cit	Síntesis completa de GSH
Glutación reductasa	<i>GLR1</i>	Cit	Reducción de GSSG a GSH
Enzimas de la ruta Pentosa fosfato y otras rutas	<i>ZWF1, GND1, TAL1, TKL1-2, RPE1</i>	Cit	Generación NADPH para reducción de GSSG, GRX y TRX
	<i>ALO1, ARA2</i>	Mem ext mit?	Síntesis de D-eritroascorbato

Continuación tabla 4 (viene de la página anterior)

Función	Gen(es)	Localización ^Ω	Papel en la célula
<i>ENZIMAS DE UNIÓN A METALES</i>			
Metalotioneinas	<i>CUP1, CRS5</i>	Cit	Unión a cobre, múltiples genes en este locus, también unen Cd ²⁺
<i>Factores y reguladores de la transcripción</i>			
Yap1p	<i>YAP1</i>	Cit/Nuc	Estrés oxidativo, xenobioticos, cadmio
Skn7p	<i>SKN7</i>	Nuc	Factor de transc. auxiliar, funciona con Yap1 para ciertos estreses oxidativos. También actúa en la osmo-regulación
Msn2/4	<i>MSN2, MSN4</i>	Cit/Nuc	Factor de transc. general. Responde a la ruta PKA, estrés térmico, osmótico y oxidativo. Respuesta a falta de nutrientes
Proteína de unión a Yap1	<i>YBP1</i>	Cit	Involucrada en la localización nuclear de Yap1p
Proteína activada por Hemo	<i>HAP1</i> <i>HAP2-5</i>	Nuc Nuc	Regulación de las función respiratoria
Activador de la unión a metales	<i>MAC1</i>	Nuc	Regulador de genes relacionados con la homeostasis del Fe y Cu. Inducción de <i>CTT1</i> frente a H ₂ O ₂
Cup2p	<i>ACE1/CUP2</i>	Nuc	Factor de transcripción de unión a Cu. Activa <i>CUP1</i> en exceso de Cu

^ΩCit: citosol; Mit: mitocndria; RE: retículo endoplásmico; Per: peroxisoma; Nuc: núcleo; Mem: membrana; ?: desconocida o por determinar

3.2.1. SISTEMAS NO ENZIMÁTICOS

3.2.1.1. Glutación (GSH)

Este pequeño tripéptido (γ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina) es uno de los antioxidantes de bajo peso molecular de mayor importancia para la célula, además es considerado como un reservorio de cisteína (Rouhier, et al., 2008). En condiciones normales el ambiente intracelular es altamente reductor, favoreciendo la existencia de GSH en una relación de GSH/GSSG de entre 30:1 a 100:1. Se sabe que el mantenimiento de dicha relación es muy importante para el adecuado balance redox de la célula (Hwang, et al., 1992). Las síntesis de glutación es llevada a cabo por los genes *GSH1* y *GSH2* cuyos productos son la γ -glutamylcisteina sintetasa y la glutación sintetasa respectivamente. El glutación es el principal buffer redox de la célula, esta función la cumple a través de dos vías: por un lado, formando parte de complejos enzimáticos en los que participa como donador de electrones (glutación peroxidasa y glutaredoxina). Por otro lado, el GSH también está implicado en la prevención de la oxidación irreversible de grupos tioles de las proteínas por estrés oxidativo (formación de ácidos sulfínico y sulfónico). Esta función la lleva a cabo a través de un proceso conocido

como glutationilación, que es un tipo de modificación post-traducciona que consiste en la formación de un disulfuro mixto entre un residuo Cys de una proteína y la molécula de GSH (Rouhier, et al., 2008). Sin embargo, el papel que cumple esta pequeña molécula es más complejo aún. Se ha observado que la mutación del gen *GSH1* provoca un significativo incremento del envejecimiento cronológico e incrementa la apoptosis (Madeo, et al., 1999), e interesantemente otro trabajo mostró que este mutante presentaba una deficiencia en la maduración de las proteínas con centro Fe-S citosólicas y un incremento significativo del hierro mitocondrial (Sipos, et al., 2002).

3.2.1.2. Otros metabolitos antioxidantes

Existen otros antioxidantes no enzimáticos en la levadura cuya importancia frente al estrés oxidativo es menor en comparación con el papel del GSH, entre estos tenemos: el ácido ascórbico, el cual se encuentra en la levadura a niveles muy bajos para tener una importancia biológica. Sin embargo, se ha identificado ácido eritroascórbico tanto en *S. cerevisiae* como en *Cándida albicans*. Las propiedades antioxidantes de este ácido son muy similares a las del ácido ascórbico (Huh, et al., 1998; Jamieson, 1998). Por otro lado también se encuentran las poliaminas que son compuestos nitrogenados alifáticos que actúan principalmente atrapando especies reactivas como el radical superóxido. En este sentido la delección del gen *SPE2*, implicado en la síntesis de poliaminas, provoca hipersensibilidad a las células al crecer en aerobiosis (Balasundaram, et al., 1991; Balasundaram, et al., 1993). También se le ha atribuido un papel en la protección frente al estrés oxidativo a la ubiquinona. Esta proteína está localizada en la membrana interna de la mitocondria donde ejerce su función de transportar electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y donde en su forma ubisemiquinona puede promover la generación de superóxido por parte del complejo III. Pero, a pesar de este efecto pro-oxidante, se ha observado que la ubiquinona en su forma reducida (ubiquinol-10) puede actuar como una molécula antioxidante. Podría tener un efecto protector frente a la peroxidación lipídica provocada por radicales alquilo y peroxil que podría afectar las membranas biológicas (Radi, et al., 1997).

3.2.2. SISTEMAS ENZIMATICOS

3.2.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Son enzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) generando H_2O_2 y O_2 .

Saccharomyces cerevisiae posee dos genes que codifican para dos enzimas SOD, que son: *SOD1* y *SOD2*.

3.2.2.1.1. Cu/Zn SOD

Esta proteína es el producto del gen *SOD1*, dicha enzima se localiza principalmente en el citosol, sin embargo se ha descrito que una pequeña fracción de la enzima se localiza en el espacio intermembrana de la mitocondria. Es por ello que también se le relaciona de manera directa con la defensa contra los aniones $O_2^{\bullet-}$ que se escapan de la cadena respiratoria y difunden hacia este espacio (Sturtz, et al., 2001). CuZn-SOD posee una secuencia altamente conservada a lo largo de la evolución. Es un dímero formado por dos subunidades con un sitio activo en cada una de ellas. Este centro contiene un ión de cobre y otro de zinc. La unión de los iones metálicos se realiza de manera independiente, siendo el Zn no esencial para la dismutación del superóxido pero cumple un papel fundamental en la estabilidad térmica de la proteína. En cuanto al cobre, se conoce que la chaperona Ccs1p es esencial para la inserción del metal en la forma apo de la proteína. También se ha reportado que Ccs1p participaría en la formación de un puente disulfuro intermolecular necesario para la maduración de la forma activa de la proteína (Furukawa, et al., 2004). En ausencia de este puente disulfuro se ha observado agregados de la proteína que inducen su degradación (Sturtz, et al., 2001). La actividad de Sod1p es esencial durante la fase estacionaria de *Saccharomyces cerevisiae*, Aunque se conoce menos acerca de su papel frente al estrés oxidativo en fases tempranas del crecimiento. Se ha reportado que la cepa deficiente en este gen presenta importantes defectos de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Longo, et al., 1996). Adicionalmente se ha visto que Sod1p es muy importante en la protección contra los oxidantes externos generadores de superóxido, como la menadiona y el paracualto (Gralla and Valentine, 1991; Liu, et al., 1992). Recientemente se encontró que un mutante $\Delta sod1$ presentaba elevados niveles de hierro quelatable. También se demostró que la pérdida de actividad Sod1 contribuía en la inactivación de las enzimas de unión a magnesio en una cepa $\Delta yfh1$ (Irazusta, et al., 2010).

3.2.2.1.2. Mn-SOD

Esta proteína es el producto del gen *SOD2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Se localiza en la matriz de la mitocondria (Culotta, et al., 2006). En eucariotas la forma activa de Sod2p es un tetrámero formado de subunidades de aproximadamente 21 kDa, a cada monómero se une

específicamente a un átomo de manganeso. La inserción del manganeso en Sod2p es un proceso complejo y requiere la localización de la enzima en la mitocondria. El polipéptido se sintetiza en la proximidad de la membrana externa de la mitocondria, donde es traslocado hacia la matriz del organelo. Para que se lleve a cabo la traslocación del polipéptido es necesario que éste se halle completamente desplegado. Una vez en la mitocondria se produce la inserción del manganeso. En este paso intervendría una metalochaperona específica de manganeso que aún no ha sido definitivamente identificada. Sin embargo, en un screen genético realizado para identificar genes relacionados con la internalización de manganeso a la mitocondria se identificó la proteína Mtm1p como un componente clave en la inserción del metal en Mn-SOD (Luk, et al., 2003). Mtm1 es un miembro de la familia de transportadores de tipo MCF relacionados con el transporte de aminoácidos (Robinson and Kunji, 2006). Como se puede observar en la figura 11, el proceso de traducción, traslocación e incorporación del cofactor en Sod2p ocurren de manera simultánea, lo cual facilita la correcta inserción del manganeso en el sitio activo (Ginsberg, et al., 2003; Luk, et al., 2005). En cuanto a la disponibilidad del manganeso en la célula, y específicamente en la mitocondria, se ha descrito que en el proceso de adquisición de este metal juega un papel esencial el transportador Smf2p. Esta proteína es un miembro de la familia de transportadores de metales Nramp conjuntamente con Smf1p y Smf3p. Estos transportadores están conservados desde bacterias hasta los mamíferos (Gunshin, et al., 1997). Sobre la localización de Smf2p, no se ha encontrado evidencias de una localización en la membrana plasmática, sin embargo se sabe que esta proteína reside en vesículas intracelulares (Luk and Culotta, 2001). También se encontró que Smf2p es crítico para la activación de Sod2p por manganeso. Al analizar un mutante nulo para el transportador (*Δsmf2*), se encontró que presentaba niveles muy bajos de manganeso intracelular y de actividad Mn-SOD. Este déficit de actividad fue atribuido a la falta del cofactor y al hecho que en una situación de baja disponibilidad de manganeso, el hierro sería capaz de desplazar al manganeso en el sitio activo de la enzima, lo cual desencadenaba en una inactivación de Mn-SOD. Interessantemente, este trabajo también mostró que la adición de manganeso a dosis no tóxicas era capaz de restaurar la actividad de Mn-SOD (Luk and Culotta, 2001). En la figura 12 se muestra el proceso adquisición del manganeso, así como el proceso de síntesis e internalización del polipéptido de Sod2p desde los ribosomas.

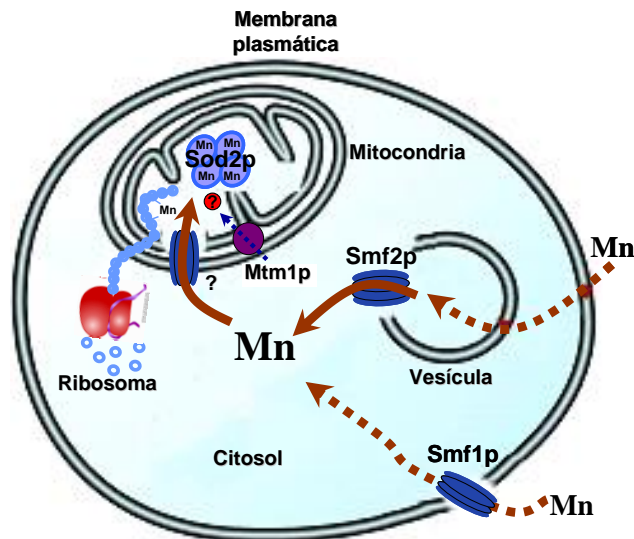


Figura 11 Esquema de la internalización de Mn y su incorporación en Sod2—La traducción, traslocación a la matriz mitocondrial e inserción del metal en Mn-SOD ocurren simultáneamente. El polipéptido sintetizado *de novo* entra a la mitocondria completamente desplegado para permitir la inserción del manganeso. Una vez unida al manganeso y completada su entrada dentro de la matriz mitocondrial el polipéptido es plegado para adoptar su estructura cuaternaria. El transportador mitocondrial Mtm1p es necesario para la correcta inserción del manganeso, en su ausencia puede ocurrir una interacción de hierro con Sod2. El manganeso mitocondrial es incorporado a la célula a través de vesículas intracelulares, donde el transportador Smf2p es esencial. También se ha descrito que el transportador Smf1p estaría implicado en la internalización del metal. (Adaptado de (Culotta, et al., 2006b; Luk and Culotta, 2001)).

3.2.2.1.3. Catalasa

En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos genes que codifican para dos enzimas con actividad catalasa bien diferenciadas, que son: *CTA1* y *CTT1*. Ambas enzimas poseen un grupo hemo que es empleado para reducir el H_2O_2 . Cta1p es el producto del gen *CTA1*, es una enzima que se localiza en los peroxisomas y la mitocondria. En los peroxisomas Cta1p cumpliría la función de eliminar el peróxido de hidrógeno generado durante la beta oxidación de los ácidos grasos (Hiltunen, et al., 2003). Mientras que en la mitocondria esta enzima se le relaciona con la detoxificación del peróxido generado durante la respiración mitocondrial (Petrova, et al., 2004). Por otro lado Ctt1p es la otra enzima catalasa encontrada en la levadura, se localiza en el citoplasma. La función de esta forma citosólica está aún por definir, sin embargo se le ha relacionado con la defensa frente diversos estreses, como el oxidativo, osmótico y frente a la carencia de nutrientes (Davidson, et al., 1996). La deleción simple no pareciera tener efectos notables en el crecimiento. Sin embargo la doble deleción induce la hipersensibilidad frente a peróxido durante la fase estacionaria, lo cual puntualiza la cooperatividad de ambas enzimas y su importancia frente al peróxido exógeno (Izawa, et al., 1996).

3.2.2.1.4. Peroxiredoxinas (PRX)

Son una familia de enzimas altamente conservadas a lo largo de la evolución. También son denominadas tioredoxina peroxidasa o tiolperoxidasa ya que reciben electrones de la tioredoxina. Se caracterizan por su capacidad de reducir peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos, generando agua o el correspondiente alcohol (Rhee, et al., 1999). *Saccharomyces cerevisiae* posee cinco PRX localizadas en diversos compartimientos subcelulares (Park, et al., 2000). Todos los miembros de esta familia poseen una cisteína conservada en el extremo N-terminal, la cual es esencial para la oxidación de los peróxidos que detoxifican. Adicionalmente pueden tener una segunda cisteína, por esto son clasificadas en Prxs 1-Cys y 2-Cys. Las PRX 1-Cys son monómeros que emplean una única cisteína en su centro activo, en este grupo encontramos la proteína de localización mitocondrial mTPx. Las otras cuatro Prxs de *Saccharomyces cerevisiae* pertenecen al grupo de las PRX 2-Cys. Estas a su vez se subdividen en aquellas cuyas dos cisteínas están conservadas (PRX típicas) y las que sólo la cisteína localizada en el extremo N-terminal está conservada (PRX atípicas). Ambos subgrupos requieren la formación de un puente disulfuro entre ambos residuos tiol para su actividad catalítica. Tres de estas enzimas PRX 2-Cys se localizan en el citoplasma: Tsa1p (cTPxI), Tsa2p (cTPxII) y Ahp1p (cTPxIII), mientras que Dot5p (nTPx) se localiza en el núcleo. Se ha descrito que las cinco PRX de la levadura presentan actividad tioredoxina peroxidasa, siendo Tsa1p la que posee mayor actividad (Park, et al., 2000). También se ha visto que la PRX Tpx1 de *Schizosaccharomyces pombe* (homólogo de Tsa1), actúa no sólo como detoxificadora de H₂O₂ durante el metabolismo aerobio, sino que estaría también implicada en vías de transducción de señal inducidas por peróxido de hidrógeno (Jara, et al., 2007; Jara, et al., 2008). Adicionalmente, se ha descrito que, en general, las peroxiredoxinas tienen capacidad de reducir peroxinitritos (Rhee, et al., 2005).

3.2.2.1.5. Glutación transferasas (GST)

Son un grupo de enzimas bien conservadas evolutivamente, catalizan la conjugación de GSH con sustratos electrófilos facilitando así su eliminación al hacerlos mas solubles y menos reactivos (Hayes, et al., 2005). En la levadura encontramos dos GST denominadas clásicas que son: Gtt1p y Gtt2p. En cuanto a la implicación de estas enzimas en la protección frente a estrés, se ha descrito que los niveles de Gtt1p se incrementan frente a estrés osmótico y en presencia de xenobióticos, así como también en la transición a la fase post-diauxica. Ninguna

de estas proteínas es esencial, sin embargo la doble delección de las GSTs disminuye la termotolerancia de la levadura durante la fase estacionaria del crecimiento (Choi, et al., 1998).

Adicionalmente *Saccharomyces cerevisiae* presenta tres GST pertenecientes a la clase omega, que son las: Gto1p, Gto2p y Gto3p. Estas tres enzimas se caracterizan por presentar actividad 1-Cys tiol transferasa tanto *in vitro* como *in vivo*, también poseen actividad dehidroascorbato reductasa y dimetilarsénico reductasa *in vitro*. Sin embargo no presentan actividad glutatión transferasa (Garcerá, et al., 2006). Gto2p y Gto3p se localizan en el citosol, mientras que Gto1p está localizada en los peroxisomas donde estaría implicada en el metabolismo de los aminoácidos sulfurados (Barreto, et al., 2006).

3.2.2.1.6. Sufiredoxinas

La oxidación de cisteínas a ácido sulfínico o sulfónico se consideró una modificación irreversible de este residuo en las proteínas. No fue sino hasta principios de la década pasada cuando se identificó una enzima capaz de interaccionar y reducir una cisteína modificada a ácido sulfínico en la peroxiredoxina Tsa1p de levadura (Biteau, et al., 2003). Esta proteína se denominó sulfiredoxina (Srx) y se ha identificado en eucariotas superiores (Woo, et al., 2003). Sin embargo este trabajo demostró que estas proteínas eran capaces solo de mantener el equilibrio tiol/ácido sulfínico exclusivamente en las Prxs clásicas 2-Cys. En este sentido a estas proteínas se les relacionan con la regulación del equilibrio redox en situaciones de exceso de H₂O₂.

3.2.2.1.7. Metionina sulfóxido reductasa (MSR)

La oxidación de residuos de metionina (Met) es mediada por varios oxidantes biológicos tales como: peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, ozono, peroxinitrito e hipoclorito. También puede ser atacada por sistemas oxidantes catalizados por metales. En las células esta oxidación puede ser reparada por el sistema metionina sulfóxido reductasa. *Saccharomyces cerevisiae* posee dos enzimas con esta actividad, que son: MrsA y MrsB. Para llevar a cabo su actividad este sistema emplea la tioredoxina como donador de electrones. Se ha descrito que la ausencia de dichas enzimas provoca hipersensibilidad frente a las ROS (Moskovitz, et al., 1997).

3.2.2.1.8. Sistema Tioeredoxina (TRX)

Las tioeredoxinas son enzimas diméricas de bajo peso molecular, que poseen dos cisteínas en su centro activo, el cual posee el motivo Cys-Gly-Pro-Cys. Forma parte de un sistema que está compuesto por la TRX, la flavoproteína tioeredoxina reductasa (TrxR) y NADPH. Esta enzima posee actividad tiol-oxidoreductasa, lo que significa que es capaz de reducir puentes disulfuro de proteínas diana, a partir de los residuos de cisteína reducidos presentes en su centro activo. La TRX fue descrita inicialmente por Peter Reichard en 1964 como donador de electrones de la ribonucleótido reductasa de *E. coli*. En 1975 se resolvió su estructura tridimensional a partir de su forma cristalizada en complejos con iones cúpricos, lo que permitió describir el hoy universalmente conocido como plegamiento tipo tioeredoxina (Holmgren, et al., 1975), el cual es el motivo estructural más abundante. El estudio del mecanismo de acción y la cinética de actividad de esta enzima la caracterizan como la reductasa de disulfuros más potente de la célula, siendo su eficiencia en condiciones fisiológicas, equivalente a la del agente reductor ditioneitol (Holmgren, 1985). El plegamiento tipo TRX consiste en cuatro láminas β flanqueadas por tres hélices α , en el cual existe un motivo N-terminal tipo $\beta\alpha\beta$ y un motivo C-terminal tipo $\beta\beta\alpha$ (figura 12).

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* presenta tres genes que codifican para tres tioeredoxinas, que son: *TRX1*, *TRX2* y *TRX3*. *TRX1* y *TRX2* se localizan en el citosol, donde conjuntamente con la tioeredoxina reductasa Trr1p conforman el sistema tioeredoxina citosólico (Chae et al, 1994). Por otro lado también existe un sistema mitocondrial en el que participan *TRX3* y la tioeredoxina reductasa Trr2 (Pedradas et al, 1999). La caracterización del mutante de *E. coli* nulo en Trx1 resultó en la identificación del sistema glutaredoxina, el cual es dependiente de GSH y también puede funcionar como donador de electrones para la ribonucleótido reductasa (Holmgren, 1985). El sistema GRX presenta varias funciones solapadas con el sistema TRX y se tratará con más detalle en el siguiente apartado.

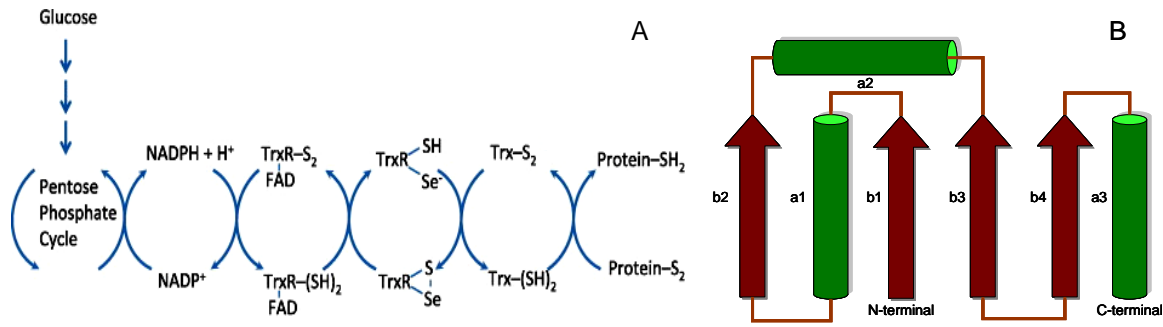


Figura 12. Reacciones redox catalizadas por TRX—A, el sistema TRX comprende la tioredoxina reductasa (TrxR), tioredoxina (Trx) y NADPH. La fuente de electrones del sistema es la molécula de NADPH, la cual es mayormente producida en la ruta de las pentosas fosfato. La forma oxidada de la tioredoxina (Trx-S₂) es reducida por la TrxR en una reacción que es dependiente de NADPH. B, esquema del dominio TRX, donde se representa la nomenclatura de cada una de las subregiones (Holmgren, 1989).

3.2.2.1.9. Glutaredoxinas (GRX)

Las glutaredoxinas son una familia de oxidoreductasas descritas inicialmente en *E. coli* como donadoras de hidrógeno dependientes de GSH para la ribonucleótido reductasa. Forman parte del denominado sistema glutaredoxina, conformado por éstas, el glutatión, el NADPH y la glutatión reductasa. En este sistema los electrones necesarios para la función redox son transferidos desde el NADPH hacia las glutaredoxinas a través del glutatión, que se oxida. La reacción se completa con la reducción del glutatión por la glutatión reductasa (Grant, et al., 1996; Holmgren, 1989). Las GRX utilizan dos mecanismos catalíticos diferentes que involucran una o dos cisteínas conservadas para resolver puentes disulfuro entre dos grupos tiol de una proteína o para reducir disulfuros mixtos entre una proteína y el glutatión. Dichos mecanismos se denominan monotiólico y ditiólico respectivamente. Así mismo, en función de las cisteínas presentes en el centro activo, las glutaredoxinas se clasifican en las sub-familias monotiólicas (1-Cys GRX) y ditiólicas (2-Cys GRX) (Figura 13).

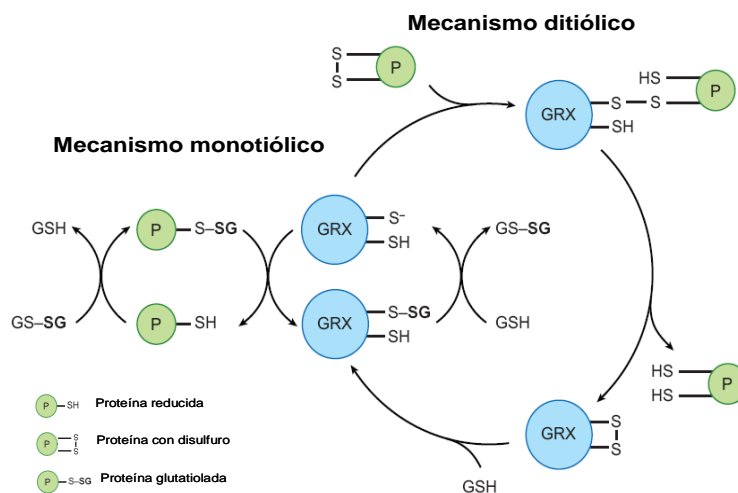


Figura 13. Mecanismo de acción de las glutaredoxinas—Representación esquemática del mecanismo de reacción de las glutaredoxinas 1-Cys y 2-Cys. Las GRX emplean el GSH como donador de electrones. El GS-SG producido durante la reducción de la GRX es finalmente reducido por la glutatión reductasa (Herrero, et al., 2010).

3.2.2.1.9.1. GRX Ditiólicas

Saccharomyces cerevisiae expresa dos glutaredoxinas ditiólicas que son productos de los genes *GRX1* y *GRX2*. Ambas GRX presentan el sitio activo conservado CPYC (Luikenhuis, et al., 1998). El mecanismo de acción de estas Grx les permite resolver puentes disulfuro, lo cual implica la formación de un disulfuro transitorio entre la GRX y la proteína. Sin embargo, se han descrito mutantes en una de las cisteínas del centro activo, las cuales pueden ser activas empleando el mecanismo monotiólico. La función de *GRX1* y *GRX2* se relaciona directamente con la defensa frente a las especies reactivas del oxígeno. Comparten un 64% de identidad y un 85% de similitud entre ellas, sin embargo su función es parcialmente redundante. Grx1p confiere protección frente al anión superóxido e hidroperóxidos, mientras que Grx2p es fuertemente específica en la protección frente a hidroperóxidos (Luikenhuis, et al., 1998). Los niveles de expresión de ambas proteínas se incrementan de manera similar frente a hidroperóxidos. Sin embargo la expresión de Grx1 es mayor frente a otros tipos de estrés, como el osmótico y térmico. Mientras que se ha visto que la expresión de Grx2p es más necesaria para la entrada en la fase estacionaria que la de Grx1p (Grant, et al., 2000). Estas diferencias se podrían explicar, al menos parcialmente, en base a la diferente localización de ambas enzimas. Ambas proteínas están presentes en el citosol, pero una fracción de Grx2p se localiza en la mitocondria (Pedrajas, et al., 2002). Esta localización de Grx2p es posible debido a la presencia de un codón de iniciación ATG alternativo dentro de la

pauta de lectura, lo cual resulta en una proteína con un segmento en el N-terminal que contiene información para la localización mitocondrial. Sin embargo la tasa de importación de Grx2p a la mitocondria es relativamente baja debido a características estructurales del péptido señal o también debido a que la posible secuencia de reconocimiento por Tom20 (complejo translocasa de la membrana externa mitocondrial responsable del reconocimiento e importación de todas las proteínas dirigidas a la mitocondria), se haya en el extremo de la secuencia mitocondrial (Porras, et al., 2006). Otro factor que influye en la regulación de la transcripción de estos genes es la presencia de elementos de tipo STRE en el promotor. La secuencia (CCCCT) se encuentra una vez en el promotor de *GRX1*, mientras se han descrito dos de estos elementos en el de *GRX2*. En este sentido, estas proteínas al presentar la secuencia STRE son reguladas por los factores de transcripción Msn2p y Msn4p en condiciones de estrés oxidativo (Gasch, et al., 2000). Los mutantes sencillos para estas GRX no presentan sensibilidad frente a estrés térmico, metales pesados o estrés osmótico, sin embargo, son hipersensibles a estrés oxidativo. La pérdida de *GRX1* confiere sensibilidad a todos aquellos agentes oxidantes generadores de $O_2^{\bullet-}$, mientras que la cepa deficiente en *GRX2* es sensible a H_2O_2 (Luikenhuis, et al., 1998).

Recientemente se ha descrito en la levadura una nueva glutaredoxina ditiólica denominada Grx8. Empleando una proteína de fusión a *GFP*, se le ha ubicado en el citosol. Además, se ha descrito que células deficientes en esta GRX no son más sensibles a estrés oxidativo (Eckers, et al., 2009)

3.2.2.1.9.2. GRX monotiólicas (CGFS)

Saccharomyces cerevisiae posee cinco 1-Cys GRX monotiólicas. Tres de ellas (Grx3, 4 y 5) poseen en su centro activo el motivo CGFS (Bellí, et al., 2002; Rodríguez-Manzaneque, et al., 1999). Este subgrupo de GRX esta bien conservado a lo largo de toda la escala evolutiva. Las otras dos (Grx6 y 7) presentan el motivo C(S/P)YS. En el mecanismo monotiólico una cisteína de la proteína diana reacciona con el glutatión generando un disulfuro mixto. En este caso la cisteína localizada en el centro activo en la región N-terminal de la GRX reacciona con el disulfuro mixto, forma un puente disulfuro con la molécula de glutatión y liberando la proteína diana en forma reducida. Finalmente la GRX glutatiolada es reducida por otra molécula de glutatión. Uno de los rasgos que las distingue funcionalmente de las 2-Cys GRX es la manera como interaccionan con el GSH, lo cual explicaría las diferencias bioquímicas

que existen entre ambos tipos de proteínas. En este sentido, las 1-Cys GRX no son activas en ensayos tiol reductasa frente a HED, lo cual sugiere que estas proteínas son incapaces de desglutacionar pequeños sustratos S-tiolados (Fernandes, et al., 2005; Tamarit, et al., 2003). Sin embargo se ha descrito que Grx5 podría emplear una segunda cisteína C117 ubicada en el extremo C-terminal de la GRX. Lo cual implicaría que formaría un puente disulfuro intramolecular posterior a la glutatilación de la GRX, que requeriría un agente reductor aun no caracterizado para devolver a GRX5 a su forma reducida (Tamarit, et al., 2003). A nivel estructural Grx5p presenta un único dominio, mientras que Grx3p y Grx4p presentan un dominio TRX en el extremo N-terminal, seguido de un dominio GRX (Rodríguez-Manzaneque, et al., 1999). Estas últimas se localizan constitutivamente en el núcleo, a pesar de que no presentan una señal de localización nuclear. Se ha descrito que el dominio TRX estaría implicado en dicha localización (Lopreiato, et al., 2004; Molina, et al., 2004). A pesar de que la función específica que cumplirían estas proteínas aún es totalmente conocida, de manera genérica se les relaciona con la resistencia a estrés oxidativo. Mas recientemente se han realizado estudios en los que se les relaciona con el mecanismo utilizado por la levadura para sensar el hierro intracelular a través del factor transcripcional Aft1p, en un proceso que además involucra la colaboración de las proteínas reguladoras Fra1/2 (Kumánovics, et al., 2008; Ojeda, et al., 2006; Pujol-Carrion, et al., 2006). Sin embargo, la función de estas proteínas pareciera ser más compleja aún. Primero, se ha descrito que ambas GRX tendrían una localización citosólica/nuclear dependiendo de la función que estarían cumpliendo (Mühlenhoff, et al., 2010). Ambas glutaredoxinas serian necesarias para proveer el pool de hierro lábil citosólico necesario para el funcionamiento de todas las proteínas que utilizan hierro y las rutas metabólicas que demandan el metal (Figura 14B). Esta función sería adicional a la función de sensar los niveles de hierro y se soporta en el hecho que la delección de Grx3/4 provoca una fuerte disfunción de enzimas Fe-S tanto citosólicas como mitocondriales, deficiencia de enzimas que contienen hemo y de otras enzimas que contiene hierro (Hausmann, et al., 2008; Ihrig, et al., 2010). Mientras que la activación de Aft1 *per se* no produce este efecto en la célula. En este sentido, la pérdida de funcionalidad de las proteínas que dependen del hierro en el mutante $\Delta grx3-4$ repercute en procesos esenciales para la célula como la síntesis de DNA y la funcionalidad ribosomal, lo cual explicaría la pérdida de viabilidad de este mutante. Esto plantea dos funciones diferentes para Grx3/4 en la regulación de la entrada del metal y la biodisponibilidad del mismo para las diferentes rutas metabólicas. Ambas funciones se encontrarían íntimamente relacionadas al centro 2Fe-2S que éstas unirían formando un homodímero y empleando GSH como ligando. Este centro serviría

como cofactor de estas enzimas. También se ha observado que la destrucción de este centro provoca un fenotipo similar al observado con la depleción de ambas GRX (Mühlenhoff, et al., 2010). Otro trabajo publicado recientemente demostró que ambas glutaredoxinas monotiólicas eran capaces de formar un heterodímero con Fra2, el cual es más estable que el homodímero formado entre ambas GRX (Figura 14A). Se ha hipotetizado sobre la posibilidad que este complejo [2Fe-2S]-Fra2-Grx3/4 sea el candidato que promovería la modificación dependiente de hierro de Aft1. Es posible que [2Fe-2S]-Fra2-Grx3/4 formen un complejo estable con Aft1 que induzca su exportación nuclear. Otra posibilidad sería que el complejo [2Fe-2S]-Fra2-Grx3/4 transfiera el centro Fe-S a Aft1 (Li, et al., 2009). Sin embargo, otros estudios no han detectado un centro Fe-S estable unido a esta proteína (Rutherford, et al., 2005)

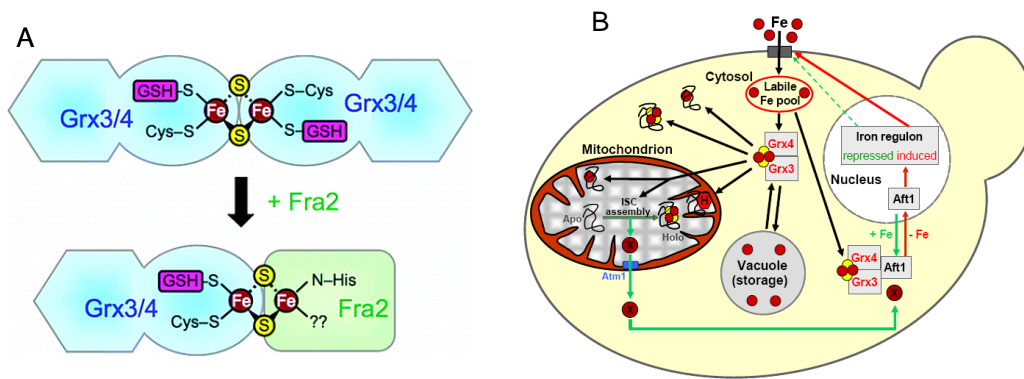


Figura 14. Las glutaredoxinas Grx3p y Grx4p funcionan como sensores y en la distribución del hierro en *Saccharomyces cerevisiae*—A, modelo en el que Grx3 y Grx4 formarían un homodímero con un centro 2Fe-2S empleando GSH como ligando. Estas dos glutaredoxinas serían capaces de formar un heterodímero con Fra2 a través de un centro 2Fe-2S. B, Modelo en el que el centro Fe-S unido a Grx3-4 actúa como sensor de los niveles de hierro citosólico. Una vez internalizado el hierro, ambas glutaredoxinas mediarían el movimiento del metal desde el pool citosólico (hipotético) hacia los diferentes compartimientos subcelulares, como las mitocondrias para la síntesis de centros Fe-S y hemo (flechas negras) (Lill, et al 2009). El centro Fe-S ligado a las GRX es esencial para cumplir esta función (círculos rojos y amarillos). La regulación de la entrada de hierro y su redistribución involucraría a Aft1p, Grx3-4 y una hipotética molécula señalizadora (X) que es exportada de la mitocondria por Atm1 y que sensa el status del hierro mitocondrial (flechas rojas y verdes). Aft1 es traslocada al núcleo en respuesta a: 1) falta de hierro, 2) ausencia de Grx3-4 y 3) ausencia del señalizador “X”. Allí activa la transcripción del regulón de hierro.(Li, et al., 2009; Mühlenhoff, et al., 2010)

En cuanto a Grx5, es la 1-Cys GRX localizada en la matriz de la mitocondria de la levadura. Estructuralmente difiere de las otras dos 1-Cys GRX en que presenta un único dominio glutaredoxina. A esta enzima se le ha relacionado más estrechamente con la defensa frente al estrés oxidativo. Sin embargo, es su implicación en la síntesis de centros Fe-S en la mitocondria, la función más estudiada de esta proteína. Como se ha dicho, este es un proceso altamente especializado y regulado que en *Saccharomyces cerevisiae* tiene lugar en las mitocondrias. Se sabe que mutantes deficientes en Grx5 tienen dificultades para crecer en condiciones respiratorias, presentan un incremento muy importante del contenido de hierro

celular y deficiencia de actividad de enzimas con centros Fe-S, como aconitasa y succinato deshidrogenasa (Rodríguez-Manzaneque, et al., 1999; Rodríguez-Manzaneque, et al., 2002). También se ha observado que este mutante presenta un incremento en los niveles carbonilación y de daño oxidativo específico de proteínas (Rodríguez-Manzaneque, et al., 1999). Además, los defectos observados en el mutante $\Delta grx5$ pueden ser suprimidos por la sobreexpresión de algunas de las proteínas de la maquinaria ISC, como la chaperona de tipo Hsp70/Dnak Ssq1 y la potencial proteína scaffold Isa2, lo cual sugiere una implicación directa de Grx5p en la síntesis o reparación de los centros Fe-S (Rodríguez-Manzaneque, et al., 2002). Muhlenhoff *et al.*, demostraron que la depleción de Grx5 induce una sobrecarga de hierro en la proteína scaffold Isu1. Este resultado implicaría que la glutaredoxina es necesaria para el siguiente paso de la síntesis, es decir, la transferencia del centro Fe-S preformado a la apoproteína receptora (Muhlenhoff, et al., 2003). Estudios estructurales de bioinformática han precedido la formación de complejos estables y específicos entre Grx5 y otros componentes de la maquinaria ISC mitocondrial (Alves, et al., 2004; Vilella, et al., 2004). Un estudio mostró que la deficiencia del homólogo en pez cebra de Grx5 (a este mutante se le denominó Shiraz), causaba un tipo de anemia hipocrómica. Este fenotipo era causado por un fallo en la síntesis de centros Fe-S que provocaba la disrupción de la biosíntesis de hemo (Wingert, et al., 2005). En este mismo sentido, recientemente se ha reportado un caso de un tipo de anemia sideroblástica microcítica con sobrecarga de hierro. Se describió que era causada por una mutación homocigótica que silencia la expresión del gen *GLRX5* (homólogo en humanos de Grx5) al interferir con el correcto splicing del primer intrón del gen, lo cual provoca una disminución de la expresión del mismo (Camaschella, et al., 2007). La falta de *GLRX5* provoca una acumulación de hierro en células humanas (Ye, et al., 2010). Finalmente, varios estudios han demostrado claramente no sólo la implicación de Grx5 en la síntesis de centros Fe-S, sino también que el papel que desempeña la glutaredoxina está altamente conservado, ya que homólogos en varias especies, como: *E. coli*, *Synechocystis*, *Arabidopsis thaliana*, pez cebra y humanos, son capaces de revertir el fenotipo de *GRX5* en levadura (Cheng, et al., 2006; Molina-Navarro, et al., 2006; Wingert, et al., 2005).

Sin embargo, cabe destacar que el papel exacto que cumpliría esta GRX en el proceso de biosíntesis de centros Fe-S es aún desconocido, así como también lo son las posibles dianas sobre las que ejercería esta función. En este trabajo se plantea abordar el estudio de la función

de Grx5 en el proceso de síntesis de centros Fe-S, además se pretende encontrar posibles dianas directas para esta GRX.

3.2.2.1.9.3. Otras glutaredoxinas (C[P/S]YS)

El análisis del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* reveló la existencia de dos secuencias cuyos productos son homólogos a las glutaredoxinas ditiólicas clásicas, Grx1p y Grx2p. Dichos genes se identificaron como *YDL010* e *YBR014c*, cuyos productos han sido denominados Grx6p y Grx7p. Estas proteínas han sido clasificadas como glutaredoxinas monotiólicas. Sin embargo, la secuencia del módulo GRX es más parecido al de las ditiólicas que al típico motivo de las monotiólicas, con su secuencia CGFS (Mesecke, et al., 2008). Grx6p presenta un centro activo CSYS, mientras que Grx7p presenta uno de tipo CPYS (Figura 15). A diferencia de las GRX 1-Cys, ambas glutaredoxinas purificadas son activas en el ensayo de deglutatiolación de HEDS. La Grx6p purificada de *E. coli* está unida a dos centros Fe-S los cuales son necesarios para la formación de la forma tetramérica de la proteína. Sin embargo, este centro no está presente en Grx7p. El análisis de la secuencia primaria de ambas proteínas indica que contienen un dominio putativo transmembrana en el extremo N-terminal y que estarían localizadas en las membranas de las vesículas secretoras. Este dominio sugiere que ambas GRX estarían relacionadas con la regulación redox del ambiente oxidante de los compartimientos de la maquinaria secretora. Mas específicamente, Grx6p se distribuiría entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi, mientras que Grx7p se localizaría únicamente en el aparato de Golgi (Izquierdo, et al., 2008).

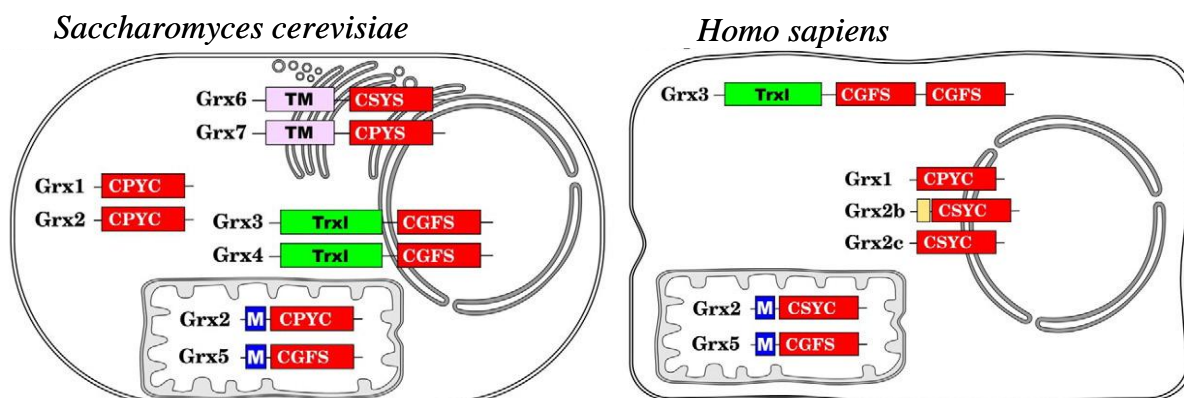


Figura 15. El Sistema Glutaredoxina—Representación esquemática de la localización intracelular y el dominio estructural de las glutaredoxinas en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. El dominio glutaredoxina se muestra en rojo e incluye la secuencia de aminoácidos del centro activo. Abreviatura: M: péptido señal mitocondrial; TM: Dominio transmembrana; Trx1: Dominio tipo tioredoxina (Lillig, et al., 2008).

4. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE *Saccharomyces cerevisiae* FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

Esta respuesta está mediada principalmente por Yap1p. Es el factor de transcripción mas importante en la respuesta frente a estrés oxidativo de la levadura (Kuge and Jones, 1994). Controla la expresión de la mayoría de los genes que codifican para antioxidantes celulares y componentes de las rutas de mantenimiento de la integridad redox de la célula (Carmel-Harel, et al., 2001; Lee, et al., 1999). Yap1p es un factor de transcripción AP-1 de tipo leucina-zipper (bZip) que interacciona específicamente con la región denominada “Yap1p Recognition Element” (YRE) ubicada en el promotor de los genes diana (Lee, et al., 1999). Sin embargo, se han reportado genes dianas de Yap1p que no contienen dicha región, lo cual sugiere la existencia de un sitio de reconocimiento alternativo. El mecanismo de activación de este factor frente a la exposición a oxidantes está mediado por su localización subcelular, específicamente por la regulación de su exportación del núcleo (Figura 16). La importación de Yap1p al núcleo no está mediada por estrés oxidativo, sino que es constitutiva y depende de la importina Pse1p (Isoyama, et al., 2001). En una situación basal, Yap1p se localiza en el citosol debido a la eficiente actividad de la proteína Crm1p, que es la exportina nuclear de Yap1p (Culotta, et al., 2006a; Kuge, et al., 2001; Yan, et al., 1998). La exposición a oxidantes como la diamida y los hidroperóxidos bloquean la exportación nuclear de Yap1p debido a que inhiben la interacción de éste con Crm1p, lo cual provoca la acumulación de Yap1p en el núcleo. La inhibición del complejo Yap1p-Crm1p es provocada por una alteración conformacional de la región de exportación nuclear de Yap1p (*nuclear export signal*). La manera como el incremento del estrés induce este cambio de conformación de Yap1 se debe a la formación de un puente disulfuro entre la cisteína Cys³⁰³ del extremo N-terminal (N-CRD, cytein-rich domains) y la cisteína Cys⁵⁹⁸ del extremo C-terminal (C-CRD). Se conoce que la formación de este puente disulfuro intramolecular no es provocado directamente por hidroperóxidos, sino que existe una proteína encargada de sensar y translucir la señal a Yap1. Esta función es realizada por la Gpx3 peroxidasa mediante la formación de un disulfuro intermedio Yap1p-Gpx3p (Delaunay, et al., 2002), el cual finalmente es resuelto con la subsiguiente formación de un disulfuro en Yap1p.

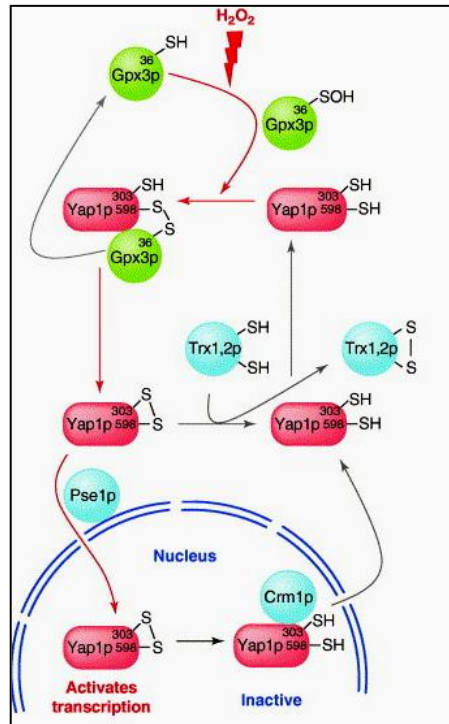


Figura 16. Mecanismos de activación de Yap1p frente estrés inducido por H_2O_2 —Las flechas rojas señalan el cambio de localización subcelular de Yap1p y la activación de la transcripción de genes involucrados en la respuesta a estrés. Se indican los residuos Cys de Yap1p y Gpx3p involucrados en la detección y traducción de la respuesta frente a estrés oxidativo. Las tioredoxinas Trx1p y Trx2p son responsables del mantenimiento de la forma reducida de Yap1p. Pse1p y Crm1p son responsables de la importación y exportación, respectivamente, de Yap1 del núcleo. La flecha gris muestra el mecanismo de inactivación de Yap1p cuando el estímulo que provoca la respuesta desaparece (Temple, et al., 2005).

Adicionalmente, se ha descrito que Yap1p presenta un mecanismo alternativo de respuesta frente estrés. Este mecanismo estaría implicado en la respuesta frente a diamida, oxidantes electrófilos y sería también el responsable en respuesta a metales pesados. Es independiente de Gpx3 y no involucra la formación de disulfuro entre las regiones CRD (Azevedo, et al., 2003; Delaunay, et al., 2000). En este mecanismo solamente es necesaria la formación de un disulfuro intra-CRD que involucraría las cisteínas Cys⁵⁹⁸, Cys⁶²⁰, Cys⁶²⁹ (Kuge, et al., 2001). Sin embargo, la forma como los dos diferentes mecanismos de activación afectan la interacción Yap1-Crm1 no está todavía bien establecida.

4.1. OTROS FACTORES TRANSCRIPCIONALES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA A ESTRÉS

4.1.1. *SKN7*

Esta proteína es otro factor de transcripción que activa la respuesta frente a estrés oxidativo. Al igual que Yap1p posee un dominio rico en leucinas de tipo bZip. Se encuentra

constitutivamente localizado en el núcleo (Raitt, et al., 2000) y se sabe que frente a estrés oxidativo se uniría a la secuencia consenso GGC(C/T)GGC de los genes diana (Tsuji, et al., 2004). Este factor de transcripción forma parte de un sistema conjuntamente con la proteína sensora Sln1. Frente a un estímulo de estrés oxidativo externo esta proteína se fosforila en un residuo histidina y seguidamente transfiere este grupo fosfato a un residuo aspartato de Skn7, produciendo su activación (Brown, et al., 1993; Ota and Varshavsky, 1993). *TRX2* y *TRR1* se identificaron como los primeros genes regulados por Skn7p frente a condiciones oxidantes (Machado, et al., 1997). Estos genes también son regulados por Yap1 lo cual indica cierta convergencia funcional entre ambos factores en la respuesta a estrés oxidativo. No son redundantes, se ha demostrado que el doble mutante *YAP1 SKN7* es hipersensible a estrés en comparación con los mutantes simples (Krems, et al., 1996). Sin embargo, se ha encontrado que no todos los genes que regulan ambos factores coinciden. En este sentido se han establecido tres diferentes regulones de genes implicados frente a estrés, que serían: los controlados de manera independiente por Yap1p o Skn7p y aquellos cuyo control es coordinado conjuntamente por ambos transactivadores (Lee, et al., 1999).

4.1.2. *MSN2/MSN4*

Msn2p es otro factor de transcripción importante en *S. cerevisiae*, es parcialmente redundante con Msn4p (41% de identidad). La delección simple no parece provocar ningún fenotipo, mientras que resultan mas severos los defectos del doble mutante (Martínez-Pastor, et al., 1996). Son reguladores importantes en la expresión de genes de la respuesta a estrés. Ambas proteínas presentan dos dominios Cys₂His₂ de tipo “*zinc finger*” en el extremo C-terminal y reconocen e interaccionan con la región consenso CCCCT (STRE, *stress response element*) (Estruch, 2000) en el promotor del gen diana. Esta región aparece en múltiples genes implicados en la respuesta a estímulos ambientales incluida la respuesta a estrés (Moskvina, et al., 1998). Sin embargo estos dos genes están también relacionados con la respuesta a diversos estreses como: la falta de nutrientes, estrés osmótico y choque térmico (Schmitt and McEntee, 1996). La activación de ambos factores es atribuida a su acumulación en el núcleo en estas situaciones de estrés. Esta localización nuclear es down-regulada por la proteína kinasa A (PKA) y los niveles de AMP cíclico y son up-regulados por estrés (Görner, et al., 1998).

II. OBJETIVOS

1. Establecer los efectos primarios y secundarios de la falta de *YFHI*.
2. Identificar los mecanismos moleculares implicados en la sobrecarga de hierro provocada por la deficiencia en *YFHI*.
3. Establecer las causas responsables de la inactivación de las enzimas Fe-S en mutantes deficientes en *YFHI*.
4. Identificar los mecanismos moleculares implicados en la inactivación de las enzimas SOD en los mutantes deficientes en *YFHI* y su relevancia en el fenotipo celular.
5. Determinar los efectos del déficit de *YFHI* sobre la actividad metabólica y el crecimiento de las células.
6. Identificar qué rutas metabólicas adicionales que se encuentren afectadas por la falta de *YFHI*.
7. Establecer paralelismos entre los fenotipos observados en los mutantes condicionales *tetO-YFHI* y *tetO-GRX5*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (tanto silvestre como sus mutantes isogénicos) utilizados en este estudio se muestran a continuación (tabla 5)

Tabla 5—Lista de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y sus mutantes isogénicos.

Nombre	Genotipo relevante	Comentarios y origen
W303-1A	<i>MATa ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1</i>	Cepa silvestre.
W303-1B	<i>MATa ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1</i>	Cepa silvestre.
MML298	W303-1A <i>yfh1::kanMX4</i>	Interrupción del gen <i>YFH1</i> en W303-1A, Dr. E. Herrero
MML348	W303-1A <i>aft1-Δ5::URA3</i>	Interrupción del gen <i>AFT1</i> en W303-1A, Dr. E. Herrero
BQS100	W303-1A <i>aft1-Δ5::URA3 yfh1::kanMX4</i>	Interrupción de los genes <i>AFT1</i> y <i>YFH1</i> , Irazusta <i>et al.</i>
MML830	W303-1A <i>tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Integración de pCM244 en W303-1A, Dr. E. Herrero.
<i>tetO₂-YFH1</i>	W303-1A <i>tetO2-YFH1::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Sustitución de promotor de <i>YFH1</i> in MML830. Este estudio
BQS099	W303-1A <i>tetO7-YFH1::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Sustitución de promotor de <i>YFH1</i> in MML830. Este estudio
<i>tetO₇-YFH1</i>	W303-1A <i>tetO7-YFH1::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Espora proveniente del cruce de BQS099 x W303-1B. Este estudio
BQS202	<i>tetO2-YFH1 YFH1-3HA::natMX4</i>	Marcaje del gen <i>YFH1</i> con 3HA. Este estudio
BQS203	<i>tetO7-YFH1; YFH1-3HA::natMX4</i>	Marcaje del gen <i>YFH1</i> con 3HA. Este estudio
BQS204	W303-1A <i>YFH1-3HA::natMX4</i>	Marcaje del gen <i>YFH1</i> con 3HA. Este estudio
BQS206	<i>tetO7-YFH1; SMF2-3HA::hphNT1</i>	Marcaje del gen <i>SMF2</i> con 3HA. Este estudio
BQS207	MML298 <i>SMF2-3HA::hphNT1</i>	Marcaje del gen <i>SMF2</i> con 3HA. Este estudio
BQS208	W303-1A <i>SMF2-3HA::hphNT1</i>	Marcaje del gen <i>SMF2</i> con 3HA. Este estudio
BQS212	MML348 <i>SMF2-3HA::hphNT1</i>	Marcaje del gen <i>SMF2</i> con 3HA. Este estudio
BQS213	BQS100 <i>SMF2-3HA::hphNT1</i>	Marcaje del gen <i>SMF2</i> con 3HA. Este estudio
MML313	<i>MATa grx5::kanMX4 (pMM117[tTA tetO7-GRX5])::URA3 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Espora del cruce de MML289 × MML312. Dr. E. Herrero

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1. Condiciones de cultivo—Se seleccionó el medio rico YPG (3% glicerol) como medio preferente para el cultivo de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en este estudio. Alternativamente en algunos experimentos se emplearon otros medios selectivos como: medios sintéticos (SC), los cuales contenían 2% glucosa o 3% glicerol según los requerimientos, además de los aminoácidos correspondientes a las

auxotrofias que presenta la cepa. La composición de cada uno de los medios se detalla a continuación:

YPD 2%		SC glucosa 2%	
Glucosa	2%	Glucosa	2%
Extracto de levadura	1%	YNB (yeast nitrogen base)	6,7g/l
Peptona	2%	Drop-out	1,32g/l

YPC 3%		SC glicerol 3%	
Glicerol	3%	Glicerol	3%
Extracto de levadura	1%	YNB (yeast nitrogen base)	6,7g/l
Peptona	2%	Drop-out	1,32g/l

La composición expresada en g/l del “Drop-out” empleado en este estudio se muestra en la siguiente tabla:

Aminoácido	g/l	Aminoácido	g/l	Aminoácido	g/l
Adenina	0,5	Glutamina	2,0	Metionina	4,0
Alanina	2,0	Glicina	2,0	Prolina	2,0
Arginina	2,0	Fenilalanina	2,0	Serina	2,0
Asparragina	2,0	Histidina	2,0	Treonina	2,0
Ácido aspártico	2,0	Inositol	2,0	Triptófano	2,0
Ácido glutámico	2,0	Isoleucina	2,0	Tirosina	2,0
Ácido para-aminobenzóico	0,2	Leucina	4,0	Uracilo	2,0
Cisteína	2,0	Lisina	4,0	Valina	2,0

Los cultivos líquidos de levadura se incubaron en un agitador orbital de calor seco a 180 r.p.m. y temperatura constante de 30°C. También se emplearon placas de cultivo, las cuales se prepararon en las mismas condiciones que el medio líquido y con las mismas proporciones, pero con la adición de 2% agar. Dichas placas se incubaron en una estufa a 30°C.

2.2. Cultivo de bacterias (*Escherichia coli*)

La cepa de *E. coli* empleada fue la *DH5 α* , cuyo genotipo es: *supE44 DlacU169 f80 hsdR17recA `endA1 gyrA96 thi-1relA*. Estas bacterias se cultivaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Ausubel et al., 1989) con una concentración de ampicilina de 0,05 mg/ml según los requerimientos. La composición del medio fue la siguiente:

LB	
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
Triptona	5 g/l

Los cultivos líquidos se hicieron crecer a 37°C en agitador orbital a 200 r.p.m., mientras que las placas con medio sólido (contenían 2% de agar), se dejaron en una estufa de calor seco a la misma temperatura.

2.3. Medidas de tiempos de generación

Para determinar el tiempo de generación de los cultivos de *S. cerevisiae* se hicieron crecer las células en medio YPG, luego se diluyeron hasta a una densidad óptica (OD₆₀₀) inicial de 0.05 en placas de 24 pozos de 1 ml (Falcon). Las placas fueron incubadas en el lector de placas (*PowerWave XS, Biotek*) con agitación orbital a 30°C durante 48 horas. Estas se cubrieron con una membrana transpirable (*Breathe Easy Sealing Membrane*). Los datos fueron obtenidos por el programa Gen 5.1.6 (*Biotek*) y se calcularon los tiempos de generación en la fase exponencial de los cultivos utilizando el programa Excel de Microsoft.

3. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO

La medición del consumo de oxígeno se realizó empleando un equipo *Hansatech Oxygen Electrode Disc (Hansatech Instruments)*. El funcionamiento de este equipo se basa en el electrodo de Clark, en donde el oxígeno de la muestra difunde a través de una solución electrolítica hacia el cátodo donde es reducido, lo cual produce un cambio de intensidad de corriente entre el ánodo y el cátodo. Este cambio es directamente proporcional a la presión parcial de oxígeno (PO).

El protocolo utilizado se muestra a continuación:

- Se calibró el equipo utilizando agua milliQ pobre en oxígeno (obtenida al desplazarlo utilizando nitrógeno) y agua con niveles ambientales de oxígeno.
- Se procedió a medir el contenido de oxígeno en 1 ml de medio de cultivo YPG fresco durante un periodo de 5-10 minutos.
- Se recogió 1 ml de cultivo de levaduras a una OD₆₀₀ de 0,5 (1x10⁷ células) mediante una centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de medio fresco, esta preparación se intrdujo en la cubeta de medición del aparato.
- Se obtuvo la disminución del oxígeno por minuto de la muestra (nmols O₂/minuto). A este valor obtenido se le restó el correspondiente al consumo obtenido del medio libre de células.

4. METODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Para la obtención de extractos proteicos se emplearon 5-7 OD₆₀₀ de células de levadura. Estas se rompieron mediante agitación en un *fast-Prep. FP120 (Thermo Savant)* en presencia de bolas de vidrio. Cada extracción se realizó en presencia de distintos tampones en función del propósito para el que se requiriese la muestra, estos fueron:

- Para SDS-PAGE—usualmente la extracción se realizaba empleando un tampón 25-50 mM Tris-HCl, aunque también se empleó un tampón imidazol pH 7,5. Además, se adicionaron inhibidores de proteasas* y SDS (dodecilsulfato sódico) entre 4-6 %.

*Inhibidores de proteasas: 1mM fluoruro de fenilmetil sulfonil (PMSF), 0,1 mM N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) y 1 μM pepstatina A.

- Para Actividades enzimáticas—Las condiciones de extracción fueron similares a las anteriores con la excepción de SDS. Para actividades aconitasa, superoxido dismutasas y citrato sintasa se empleó como tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Mientras que para succinato deshidrogenasa se utilizó un tampón imidazol.

- Para 2DE SDS-PAGE—se empleó un tampón 8 M Urea, 25 mM Tris-HCl pH 8 para la disrupción de las células, posteriormente se agregó igual volumen de una solución que contenía 8 M Urea, 8 % CHAPS (3-[(3 colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato) y 50 mM DTT (ditiotreitól).

4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la cuantificación de la concentración de proteína en las diferentes muestras se emplearon diferentes métodos. Preferentemente se utilizó el *Bio-Rad protein assay (Bio-Rad)*, el cual esta basado en el método de Bradford. La curva patrón se realizó con albúmina serica bovina (BSA)

En aquellos casos en los que durante el proceso de extracción de las proteínas se utilizaba SDS o algún otro reactivo que provocara interferencia con el método de Bradford, se utilizaba un método fluorimétrico (Qubit™, *Invitrogen*®). En este caso también se utilizó una curva patrón interna del equipo, preparada según las indicaciones del fabricante y en una concentración de SDS similar a la presente en la muestra. Alternativamente y en algunos experimentos puntuales se utilizó la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop.

4.3. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

4.3.1. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Es un tipo de electroforesis que utiliza el SDS como detergente iónico. Con este detergente se consigue la desnaturalización de las proteínas lo que permite una separación por peso molecular más eficiente. Esto se consigue debido a que la migración es proporcional al peso molecular de la proteína (Laemmli, 1970). El SDS se une a las cadenas polipeptídicas adicionando una carga negativa neta que es proporcional a la masa de cada molécula incorporada. Para mantener las condiciones desnaturalizantes durante todo el proceso, el SDS es incorporado en las muestras, en los tampones de los geles y el tampón de migración. Para romper los puentes disulfuro (inter e intra proteínas) se emplearon agentes reductores en la muestra como el DTT o el β -mercaptoetanol. La separación de las proteínas se llevó a cabo

empleando el sistema Mini-protean 3 (Bio-Rad) para electroforesis monodimensional (1D) y el sistema Protean II para bidimensional (2D). La composición de los geles y el tampón de migración se detallan a continuación:

Gel Separador	
Tris-HCl pH 8,8	375 mM
Acrilamida/bisacrilamida (30:0,8)	7-15% (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
Persulfato amónico	0,005% (w/v)
TEMED	0,025% (v/v)

Gel Concentrador	
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
Acrilamida/bisacrilamida (30:0,8)	5% (w/w)
SDS	0,1% (w/v)
Persulfato amónico	0,005% (w/v)
TEMED	0,025% (v/v)

Tampón de migración	
Tris-HCl pH 8,8	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1% (w/v)

La intensidad de corriente empleada para la migración de las proteínas fue 15 mA/gel en el gel concentrador y de 20-25 mA en el gel separador.

4.3.2. Electroforesis bidimensional (2DE)

La técnica se emplea para separar las proteínas primero según su punto isoeléctrico (pI) mediante isoelectroenfoque (IEF) y en una segunda separación según su peso molecular. Para separar las proteínas en la primera dimensión se emplean tiras IPG (por sus siglas inglesas

Immobilized pH Gradient). En estas tiras, los anfólitos crean un gradiente de pH que permite a las proteínas migrar hacia el cátodo o el ánodo dependiendo de su pI (Figura 17). Las proteínas son “inmovilizadas” en aquella región de la tira donde su carga neta es igual a cero (forma zwitteriónica). Para la desnaturalización y completa solubilización de las proteínas de la muestras se empleó urea y el detergente switteriónico CHAPS. Además se utilizó DTT como agente reductor. Finalmente para la separación en la segunda dimensión se empleó un sistema SDS-PAGE.

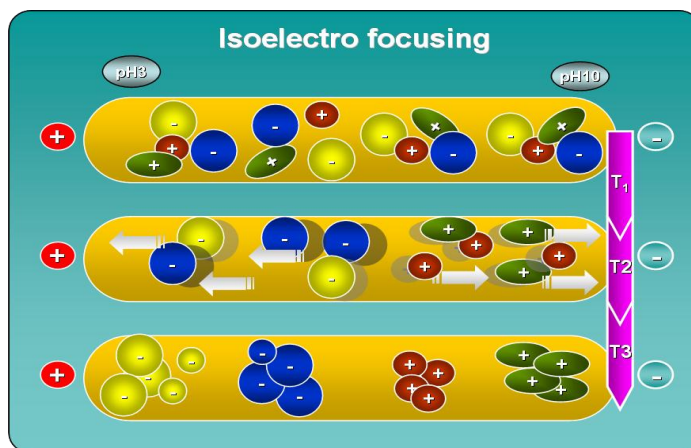


Figura 17. Representación del isoelectroenfoque de las proteínas en la tira—Para conseguir una separación adecuada, se emplean anfólitos para crear un gradiente de pH que permite separar las proteínas a través del punto isoeléctrico (pI). T1, T2 y T3 es la representación de los tiempos de cada uno de los pasos de la separación.

Protocolo empleado para la 2DE se detalla a continuación:

4.3.2.1. Isoelectroenfoque (primera dimensión)

- Se colocaron las tiras en cubeta de rehidratación y se añadieron las proteínas disueltas en el tampón de rehidratación (RHB). Para las tiras de 7 cm se cargaban de 40 a 60 μg de proteína en 150 μl de RHB y para las de 18 cm de 50 a 300 μg de proteína en 340 μl de RHB.
- Se realizó la rehidratación durante 16 horas en un equipo *Protean IEF cell* (Bio-Rad) a una temperatura de 20°C.
- El programa empleado en el equipo para llevar a cabo el isoelectroenfoque fue:

250 V	Inc. rápido	15min
-------	-------------	-------

Tiras de 7 cm			10.000 V	Grad. lineal	5h
250 V	Incremento rápido	15min	10.000 V	Inc. rápido	60.000 V.h
6.000 V	Gradiente lineal	5h	500 V	Grad. lineal	2 h
6.000 V	Incremento rápido	24.000 V.h			
500 V	Gradiente lineal	2 h			

Una vez terminado el IEF las tiras se congelaron a -20°C .

4.3.2.2. Segunda dimensión

- Se equilibró cada tira 15 minutos con el tampón equilibrador I, se retiró el exceso de este tampón y se añadió el tampón equilibrador II 15 minutos.
- Se colocaron las tiras sobre una SDS-PAGE y se fijaron con una solución de agarosa 0,5%.
- Se cargaron los geles en la cubeta de electroforesis adecuada y se procedió a realizar la migración de las proteínas.
- La intensidad de corriente empleada y el tiempo de migración dependieron del tamaño de los geles, pudiendo ser de unos 90 minutos en el caso de los geles 8 cm hasta 12-14 horas para los geles de 18 cm.

La composición de los tampones utilizados fue la siguiente:

Tampón de Rehidratación (RHR)		Tampón equilibrador I	
Urea	8 M	Tris-HCl pH 8,8	375 mM
CHAPS	4 % (w/v)	Urea	6 M
DTT	50 mM	SDS	2 % (w/v)
Amfolitos (Biolytes)	0,5 % (v/v)	DTT	130 mM
Azul de bromofenol	0,00125% (w/v)	Glicerol	20 % (w/v)
Tampón equilibrador II			
Tris-HCl pH 8,8	375 mM		

Urea	6 M
SDS	2 % (w/v)
Iodacetamida	135 mM
Glicerol	20 % (w/v)

4.3.3. Electroforesis no desnaturalizante

Este tipo de electroforesis, también llamada electroforesis nativa, se empleó para realizar la actividad SOD (superóxido dismutasa). En ella no se emplea ningún tipo de detergente ni agente reductor. Con esto se consigue mantener las proteínas, tanto en la muestra como en el gel, en condiciones nativas. Las condiciones de extracción y migración de las proteínas se detallan en los apartados 4.1 y 4.3.1.

4.4. OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS

Esta técnica de fraccionamiento subcelular se empleó para obtener una fracción enriquecida en mitocondrias a partir de cultivos de levadura. La metodología requiere la completa digestión de la pared de la levadura utilizando la enzima liticosa o zimoliasa, luego se obtiene la fracción mitocondrial por fraccionamiento con sorbitol y sucesivas centrifugaciones. El protocolo para el fraccionamiento se detalla a continuación:

- Se obtuvo 1 gramo de levaduras (peso húmedo) y se lavó con H₂O fría.
- Se agregó 2 ml de solución reductora.
- Se incubó 30 minutos a 30°C a 600 r.p.m. en un thermomixer (*epENDORF*), seguido de una centrifugación de 4 minutos a 3.500 r.p.m.
- Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 5,3 ml de tampón A.
- Posteriormente se centrifugó 4 minutos a 3.000 r.p.m.
- Se resuspendió el pellet en 2 ml de tampón A y 7000 U de liticosa/zimoliasa.
- Se incubó 60 minutos a 30°C (600 r.p.m. Thermomixer), seguido de una centrifugación a 5.000 r.p.m por 7 minutos a 4°C.
- Se resuspendió el pellet en 600 µl de tampón A y 1.800 µl de tampón B.

- Se realizó una sonicación 20 segundos a 3 micras (SoniPrep 150, *Braun Biotech*) a 4°C, seguida de una centrifugación de 10 minutos a 2.000 x g a 4°C.
- Se tomó el sobrenadante y se centrifugó 10 minutos a 10.000 r.p.m a 4°C. La fracción mitocondrial queda en el pellet.
- Se resuspendió el pellet en 400 µl de 25 mM fosfato de sodio pH 7.0. Este paso permitió lavar y romper la membrana externa de las mitocondrias. Se dividió en 4 tubos y se centrifugó 10 minutos a 12.000 r.p.m.
- El pellet corresponde a la matriz mitocondrial. Se congeló en nitrógeno líquido y se reservó a -80°C.

Una variación de este protocolo fue utilizada para las pruebas de cuantificación de manganeso mitocondrial e inmunoprecipitación de Yfh1, el procedimiento fue el siguiente:

- Posteriormente a la centrifugación a 5.000 r.p.m. por 7 minutos del protocolo anterior, se procedió a resuspender el pellet resultante con 2 ml de tampón C que además contenía inhibidores de proteasas. Se rompieron los esferoplastos con un potter-tissue grind (*Kimble kontes, ref 885301-007*) haciendo 3 ciclos de disrupción a 4°C.
- Luego se centrifugó a 3.000 r.p.m. por 3 minutos. El sobrenadante correspondió al extracto total.
- Posteriormente el extracto total se centrifugó a 13.000 r.p.m x 10 minutos. El pellet contenía las mitocondrias, mientras que en el sobrenadante estaban contenidas las proteínas citosólicas.
- Se realizaron 2 lavados al pellet con 1 ml de tampón C.

Soluciones empleadas:

Tampón A		Tampón B	
Fosfato sódico pH 7	25 mM	Fosfato sódico pH 7	25 mM
	Tris-HCl pH 7,4		10 mM
Sorbitol	2 M	Sorbitol	200 mM
	Sucrosa		0,32 M
MgCl ₂	1 mM	MgCl ₂	1 mM
	EGTA		1 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM

4.5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE Yfh1p

Para este experimento se utilizaron 200 μ g de proteínas provenientes de extractos proteicos de mitocondrias y citosol, los cuales se obtuvieron según el procedimiento descrito en el apartado 4.5. Para este experimento se utilizó la cepa BQS204. Para la inmunoprecipitación se empleó una columna μ MACS™ (Miltenyi Biotec) preparada para la fijación de proteínas marcadas con el epítipo HA. El procedimiento se realizó según las instrucciones del fabricante. Las proteínas obtenidas en la elución final fueron posteriormente separadas por SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa siguiendo los protocolos estándar y finalmente inmunodetectadas empleando anticuerpos anti-HA.

4.6. TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS O “WESTERN BLOT”

Este método permite la detección de las proteínas a través de una separación inicial por SDS-PAGE, tras la cual, las proteínas son transferidas a una membrana de PVDF o nitrocelulosa. La membrana con las proteínas transferidas es entonces incubada con anticuerpos específicos también llamados anticuerpos primarios. Posteriormente a la incubación con el primario, se procede a una segunda incubación con un anticuerpo secundario, el cual lleva conjugada la enzima peroxidasa. Esto permite la detección por quimioluminiscencia al incubar la membrana con un sustrato de peroxidasa.

El protocolo utilizado para la inmunodetección de proteínas se muestra a continuación:

- En un primer paso se realizó la separación de los extractos proteicos por SDS-PAGE (las condiciones se mencionan en los apartados 4.1 y 4.3.1).

- Seguidamente se llevó a cabo la transferencia de proteínas del gel a la membrana utilizando un sistema semi-seco (Hoeffer Semiphor). Se aplicó una intensidad de corriente de 1 mA/cm² durante una hora.
- Luego se bloqueó la membrana durante una hora empleando el tampón de bloqueo que contenía 0,2% de reactivo de bloqueo (I-block, Tropic), diluido en PBS y 0,1% tween 20. Se incubó a temperatura ambiente o alternativamente toda la noche a 4°C.
- Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo primario por una hora, seguida de sucesivos lavados de 5 minutos con TBST y contenía 5% de la solución de bloqueo.
- A continuación se incubó con el anticuerpo secundario por una hora, seguido de sucesivos lavados con TBST durante 5 minutos.
- Finalmente se realizó la incubación con el sustrato de peroxidasa.

La adquisición y cuantificación de la imagen, en aquellos casos que fuera necesaria, se realizó empleando el equipo *Chemidoc (Biorad)*.

Tabla 6. Listado de anticuerpos primarios empleados en este estudio

Anticuerpo primario	Dilución	Origen
Anti-aconitasa	1:4000	Dr. Lill, Marburg, Alemania
Ani-DNP	1:5000	DAKO, ref.V0401
Anti-hsp60	1:4000	Stressgen
Anti-HA	1:2500	Roche, ref. 1867423
Anti-porina	1:1000	Molecular Probes, ref. A6449
Anti- α -kgd2	1:2000	(Cabisco, et al., 2000)
Anti-sdh2	1:1000	Dr. E. Herrero
Anti-tdh1	1:7000	Dr. Pedro Moradas, Portugal
Anti-Mn SOD	1:2000	Stressgen (SOD-111)
Anti-Cu/Zn SOD	1:2000	Chemicom (AB1237)
Anti-flag	1:1000	Sigma, ref. F3165

Tabla 7. Listado de anticuerpos secundarios empleados en este estudio

Anticuerpo secundario	Dilución	Origen
Anti-goat	1:25.000	Termo scientific, ref. 10549
Anti-rabbit	1:40.000	Pierce, ref 31460
Anti-mouse	1:40.000	Pierce, ref 31430

La composición de los tampones utilizados fue la siguiente:

Tampón de transferencia	
Tris-HCl	480 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,0375 %
Metanol	10 %

Tampón TBST	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	125 mM
Tween-20	0,1% (v/v)

Tampón PBS	
Na ₂ HPO ₄	5,8 mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,7 mM
NaCl	6,8 mM

4.7. DETECCIÓN DE GRUPOS CARBONILO EN PROTEÍNAS

La formación de grupos carbonilos es el resultado de la oxidación de las cadenas laterales de algunos aminoácidos. Existen diferentes reactivos que se emplean para la detección de los grupos carbonilo, en este trabajo hemos utilizado la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Este compuesto una vez unido a los grupos carbonilo puede detectarse empleando anticuerpos anti-DNP. El protocolo empleado para la derivatización de los grupos carbonilo fue introducido por Levine (Levine, et al., 1994). El esquema de formación y detección de estos grupos se muestra en la figura 18.

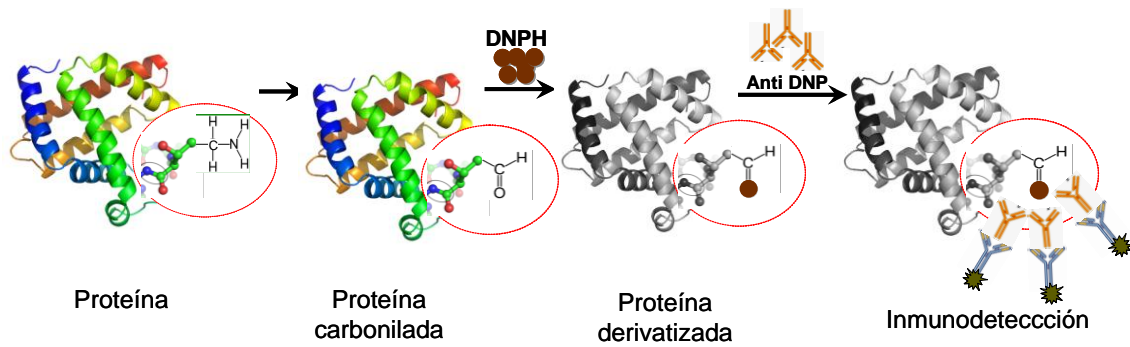


Figura 18. Detección de la formación de carbonilos en una proteína—Las modificaciones inducidas por la carbonilación pueden ser detectadas empleando anticuerpos específicos frente a estos grupos. La técnica de detección esta basada en el westrn blot, con lo que se le denomina oxy-blot (Levine, et al., 1994)

El protocolo para la detección de carbonilos de detalla a continuación:

- Se obtuvieron los extractos de proteína como se indica en el apartado 4.1 para SDS-PAGE. La concentración de proteína se ajustó a un valor de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en todas las muestras.
- Se calentó 3 minutos a 100°C y luego se llevaron a temperatura ambiente.
- Se realizó la derivatización agregando un volumen de solución de DNPH e incubando 10 minutos a 25°C.
- Finalmente se agregó un volumen de la solución de neutralización y se mezcló bien por vortex. Esta solución incrementa el pH hasta ≈ 7 lo cual detiene la derivatización.

Estos extractos fueron cargados en SDS-PAGE para la resolución e inmunodetección de las proteínas carboniladas. Las soluciones utilizadas se mencionan a continuación:

Solución de DNPH	
DNPH	100 mM
Ácido trifluoroacético (TFA)	10% (v/v)

Solución de neutralización	
Tris-HCl	2 M
Glicerol	30% (w/v)
β -mercaptoetanol	15% (v/v)

4.8. MÉTODOS DE TINCIÓN DE PROTEÍNAS

4.8.1. Azul brillante de Coomassie (CBB)—es una técnica de tinción total de proteínas. Se empleó cuando la concentración de proteína total en el gel/membrana era elevada (10-30 μg) (Fairbanks, et al., 1971). El protocolo empleado fue el siguiente:

- Se sumergió el gel en la solución de tinción una vez acabada la electroforesis durante un tiempo mínimo de 30 minutos

Solución de coloración de Coomassie	
Ácido acético glacial	10% (v/v)
Azul brillante de Coomassie R-250	0,01% (w/v)
Isopropanol	25% (v/v)

- Posteriormente se realizó la decoloración del gel. Este proceso se llevo a cavo durante al menos 30 minutos.

Solución de decoloración de Coomassie	
Ácido acético glacial	10% (v/v)
Isopropanol	25% (v/v)

4.8.2. Tinción de plata—Esta tinción se empleó para teñir geles tanto mono como bidimensionales. Este es un método 50-100 veces más sensible que el azul de Coomassie. Se emplearon kits comerciales de *Amersham Bioscience*® y de *Sigma*®.

4.8.3. Tinción fluorescente con *SyproRuby*—Este es un método de tinción por fluorescencia para proteína total que tiene una sensibilidad similar a la plata. Se realizó haciendo una fijación inicial en una solución de 10% metanol y 7% acético durante una hora y luego se sumergió el gel en la solución de *Sypro Ruby* (*Bio-Rad*®) durante al menos 3 horas. Esta técnica tiene, entre otras ventajas, el hecho de ser compatible con métodos de identificación por espectrometría de masas.

4.9. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes de los geles teñidos con azul de Coomassie y con plata se obtuvieron en un densitómetro GS800 (*Bio-Rad*®). Para la tinción con *Sypro Ruby* se empleó un *Versa Doc MP4000*. El análisis y cuantificación de las imágenes obtenidas se realizó con los software *Quantity One* y *PDQuest*, ambos de *Bio-Rad*®.

4.10. PURIFICACIÓN DE GRX5 RECOMBINANTE DE *Escherichia coli*

Esta proteína fue purificada siguiendo el protocolo descrito previamente (Tamarit, et al., 2003). De este modo se obtuvo la proteína con una pureza aproximada de 99% (verificado mediante SDS-PAGE) y una concentración de 14,5 mg/ml. El protocolo de esta purificación se detalla en la figura 19. La proteína obtenida en este procedimiento se empleó para realizar búsquedas de posibles dianas de esta glutaredoxina. Para esto se utilizó una aproximación de búsqueda de interacciones proteína-proteína fijando a Grx5 en una columna.

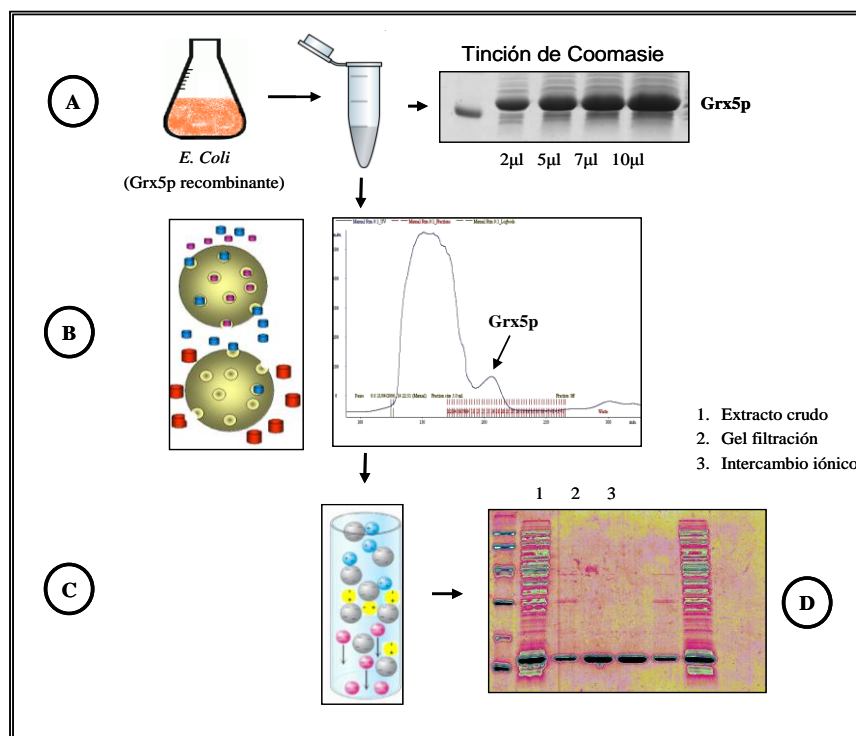


Figura 19. Esquema del proceso de purificación de Grx5p—A, se partió de un cultivo de *E. coli* transformado con el plásmido pMM192 (Tamarit, et al., 2003). La expresión de Grx5p recombinante se indujo mediante la adición de IPTG. Se verificó el nivel de inducción de la proteína en el extracto mediante electroforesis y posterior tinción con Coomassie blue (derecha del panel). B, El extracto proteico se inyectó en una columna de gel filtración y se recogieron las fracciones que contenían Grx5p. De esta forma se obtuvo la proteína a un 90% de pureza. C, las fracciones provenientes del paso anterior se inyectaron en una columna de intercambio iónico. De esta columna se obtuvo Grx5 con un grado de pureza de 99%. D, tinción con azul de Coomassie de un gel en el que se cargaron muestras recogidas en los diferentes pasos de la purificación.

4.11. FIJACIÓN Y BÚSQUEDA DE INTERACCIONES DE Grx5 EN COLUMNA SEPHAROSE™- ACTIVADA CON CNBr

Para estas interacciones se empleó una columna CNBr-Sepharose™ activada (GE Healthcare, ref. 17-0430-01). A esta columna se fijó la proteína Grx5 purificada según el protocolo mencionado en el apartado anterior. Para la fijación se hizo reaccionar un volumen determinado de la proteína purificada con la columna activada. Con esto se consiguió que los grupos amino primarios de la proteína se fijen a la matriz. Esto genera una inmovilización muy eficiente y con una buena estabilidad química. Esta columna se incubó con extractos mitocondriales.

Los protocolo de preparación de la columna y de incubación con los extractos mitocondriales, se detallan a continuación:

4.11.1. Preparación de la columna—Para este procedimiento se emplearon mini-columnas (*Pierce, Thermo Scientific*) como se indica a continuación:

- Se mezcló 50 mg de CNBr Sepharose con 500 µl de tampón A, luego se lavó con 10 ml de tampón A y se eliminó el exceso de tampón.
- Se agregaron 175 µl de tampón B, luego este volumen se dividió en dos mini-columnas.
- A una mini-columna se agregó 15 µl de Grx5 purificada (14,5 mg/ml).
- A otra mini-columna se agregó 15 µl de un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8 y 0,5M NaCl. Esta columna se empleó como control.
- Se incubó 2 horas a 4°C en agitación, luego se filtró y se midió la absorbancia del filtrado a 260/280 nm en un Nanodrop para determinar el % de fijación de la proteína a la columna.
- Posteriormente se lavó con 350 µl de tampón B, se eliminó y se añadió 500 µl de tampón D. Este se dejó 2 horas a 4°C en agitación. Luego se eliminó.
- Se realizaron 3 tratamientos ácido/base alternando 100 mM acetato de sodio pH 4 y NaCl 0,5M con 100 mM Tris-HCl pH 8 y 0,5M NaCl.
- Finalmente se dejó la columna en 100 mM Tris-HCl pH 8 y 0,5M NaCl a 4°C.

4.11.2. Incubación de la columna con los extractos mitocondriales

- Se recuperó la columna y se lavó con 4 ml de un tampón 25 mM Tris-HCl pH 8 / 12,5 mM NaCl y 20 mM DTT.
- Seguidamente se lavó con 10 ml de 25 mM Tris-HCl pH 8 y 12,5 mM NaCl para tratar de eliminar el exceso de DTT.
- Posteriormente se utilizó un tubo de las mitocondrias obtenidas según el protocolo descrito en el apartado 4.5. Se le agregó 100 µl de 50 mM Tris-HCl pH 8 y 25 mM NaCl y se sonicó a una fuerza 10 micras (SoniPrep 150) por 10 segundos. Finalmente se centrifugó a 12.000 r.p.m durante 10 minutos para quedarse con el sobrenadante. Este sobrenadante corresponde al extracto de proteínas mitocondriales.
- Se agregó 50 µl de este extracto a cada columna, se incubó por 30 minutos a 4° y posteriormente se eliminó el filtrado.
- Se realizó un lavado con 5 ml de 25 mM Tris-HCl pH 8 / 0,02 % Tween y 5% SDS.
- Finalmente se realizó la elución con un tampón que contenía 20 mM DTT.

La composición de los tampones utilizados fue la siguiente:

Tampones	
Tampón A:	1 mM HCl
Tampón B: Carbonato de Sodio pH 8,3	100 mM
Tampón C: Tris-HCl pH 8 / NaCl	100 mM / 0,5M
Tampón D: Tris-HCl pH 8	100 mM
Tampón E: Acetato de Sodio pH 4 / NaCl	100 mM / 0,5M

5. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

5.1. ELECTROFORESIS DE DNA—En esta técnica el DNA es separado en función de su tamaño. La separación se consigue aplicando un campo eléctrico a las moléculas de DNA cargadas electronegativamente. La separación se lleva a cabo en un gel de

0,8% agarosa. El factor más importante que condiciona la separación es el tamaño de las moléculas de DNA, pero también puede tener efecto la conformación de las mismas; por lo que las moléculas lineales migran de manera más eficiente. Otro factor a considerar es el voltaje, en general, un mayor voltaje implica una mayor velocidad de migración. Pero esto puede provocar sobrecalentamiento y pérdida de resolución. El voltaje aplicado era de 1 a 10 V/cm.

Una vez separados los fragmentos de DNA, los geles se tiñen mediante tinción fluorescente para realizar la visualización. La más común de estas tinciones empleadas fue la de bromuro de etidio. Además, actualmente existen otras tinciones como el SYBER Green (*Invitrogen*) o el SYBER Safe. Todos estos métodos se basan en el principio que el reactivo se intercala entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y emite fluorescencia al ser expuesto a luz ultravioleta.

El protocolo empleado en este estudio se detalla a continuación:

- Se preparó una solución de agarosa 0,8% en un tampón TAE, el cual se calentó hasta ebullición para lograr la completa disolución de la agarosa.
- Se usó TAE en la cubeta como tampón de electroforesis.
- Se cargaron las muestras mezcladas con el tampón de carga y además se cargó un marcador de DNA (DNA 1Kb, *Invitrogen*).
- Se aplicó un voltaje de 90V durante un tiempo que varió de 45-60 minutos
- Finalmente, se tiñó el gel y se visualizó en un transiluminador a una λ de 354 nm.

La composición de las soluciones empleadas se muestra a continuación:

Tampón Tris-Acético-EDTA (TAE)	
Tris pH 8,5	40 mM
Ácido acético glacial	20 mM
EDTA	2 mM

Loading Buffer (LB) 5X	
Ficoll	15% (w/v)
Na ₂ EDTA pH 8	100 mM
Azul de Bromofenol	0,25% (w/v)

5.2. PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*—Para este procedimiento se utilizó la cepa *DH5 α* , la cual fue sometida a un tratamiento con CaCl_2 para obtener las células competentes (Maniatis, et al., 1989). Estas células permitieron amplificar los plásmidos utilizados en este estudio. El proceso de transformación en bacterias consiste en someter a dichas células a un choque térmico con lo que se consigue la entrada del DNA plasmídico.

El protocolo seguido para la transformación se muestra a continuación:

- Se prepararon 200 μl de células *DH5 α* .
- Se agregaron 50 ng de DNA plasmídico.
- La mezcla se incubó en hielo 10 minutos (esto permite al DNA fijarse a la pared).
- Se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos (se desestructura la pared y el DNA entra a la célula). Luego se enfrió en hielo durante 1 minuto.
- Posteriormente se agregaron 900 μl de medio LB y se incubó 1 hora a 37 °C a 350 r.p.m. en un Thermomixer.
- Se centrifugó 2 minutos a 5000 r.p.m.
- Se extrajeron 800 μl del sobrenadante y el pellet se resuspendió en LB y se sembró en una placa de medio LB con ampicilina.
- Se dejó crecer en una estufa a 37 °C. Se seleccionó una colonia aislada y se resembró en otra placa de medio LB.

Estas colonias quedaron listas para realizar el aislamiento del plásmido y para el procedimiento que sigue a continuación.

5.3. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS A PARTIR DE CULTIVOS DE *E. COLI*—Las bacterias se hicieron crecer durante 16 horas a 37 °C en medio LB con ampicilina. El DNA de los plásmidos replicados en *Escherichia coli* se extrajo utilizando el kit comercial *Mini Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel)* y aplicando el protocolo sugerido por el fabricante.

El protocolo de este kit consistió en tres etapas:

- A) Resuspensión de las bacterias y lisis alcalina en presencia de SDS.
- B) Unión del plásmido a la membrana de sílice contenida en la columna donde se eliminan todos los elementos diferentes al plásmido.
- C) Elución del plásmido.

5.4. AMPLIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO—Para obtener los plásmidos para realizar la clonación de los genes de levadura se realizó un primer paso en el que se amplificaron los plásmidos purificados en el apartado anterior. Para esta metodología nos apoyamos en la reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) para amplificar de manera exponencial este fragmento de DNA plasmídico bicatenario. Este fragmento es inicialmente desnaturalizado y seguidamente polimerizado gracias a la capacidad de la enzima Taq polimerasa de funcionar a elevadas temperaturas. Para la amplificación se usan dos oligonucleótidos seleccionados para que limiten la región de amplificación y sean complementarios a la secuencia de DNA molde.

5.5. TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE

5.5.1 Sustitución de promotor de *YFHI*

Para la sustitución del promotor endógeno del gen *YFHI* se emplearon los plásmidos pCM224 y pCM225 (respectivamente para el *tetO₂* o *tetO₇*). Estos plásmidos se diferencian entre ellos en el número de cajas del transactivador que presentan. El *tetO₂* posee 2 cajas mientras que el *tetO₇* tiene 7. En este sentido, a mayor número de cajas mas fuerte es la actividad del promotor, con lo cual el promotor *tetO₇* se comporta como un sobreexpresor. El DNA del plásmido se utilizó como molde para la amplificación mediante PCR del cassette de sustitución. Los oligonucleotidos empleados contenían 40 bp homologos a la secuencia de *YFHI* seguido por la secuencia del MSC (Multi Cloning Site). Estos oligonucleótidos fueron diseñados de tal forma que el oligo 1 fuera homólogo a una región aproximadamente 100-200 bp upstream del codón de iniciación (sin incluirlo) de *YFHI*. Mientras que el oligo 2 debía incluir el codón de iniciación (Bellí, et al., 1998). El esquema del funcionamiento del promotor regulable se muestra en la figura 20.

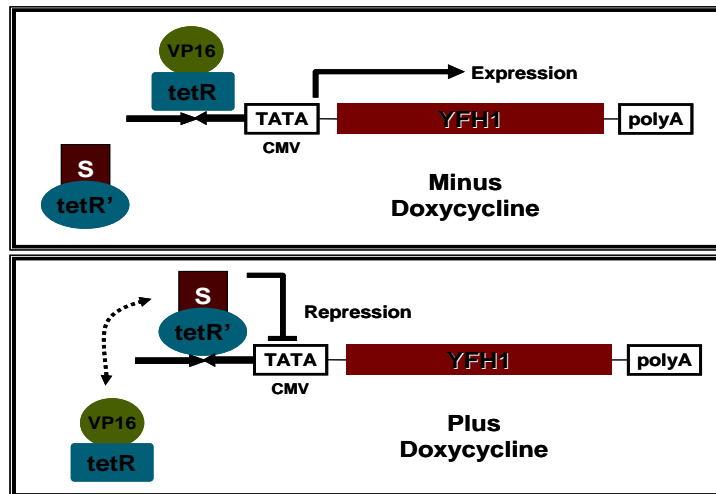


Figura 20. Esquema del funcionamiento del promotor regulable por doxiciclina (*tetO*)—El sistema de activación/represión permite la expresión del gen en ausencia de doxiciclina. Una vez adicionada la doxiciclina se produce el bloque de la expresión del gen.

5.5.2 Amplificación de los plásmidos pCM224 y pCM225.

Reactivos	volumen	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
Tampón de reacción (10x)	5 µl	94	4
dNTP's (2,5 mM)	4 µl	94	½
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	50	¾
Oligonucleótido 1 (100 mM)	2,5 µl	68	4
Oligonucleótido 2 (100 mM)	2,5 µl	94	½
DNA plasmídico	1 µg	50	¾
H ₂ O milli Q hasta	50 µl	68	5
		68	10

} 15 ciclos

Oligonucleótidos empleados:

● Oligonucleótido 1:

5'—CAT CGC ACT TGA CAA ATT TCA AAA AAC CGT ATT CAG TGA TCA GCT
GAA GCT TCG TAC GC 3'

● Oligonucleótido 2:

5'—CAC TCT ATC TTC TCG CTT AGT TTT TTT TGA AAT ACT ATC TTT GCA TAG
GCC ACT AGT GGA T 3'

} 10
ciclos

5.6. MARCAJE CON EPÍTOPO HA (3XHA)

Esta técnica consiste en introducir en el extremo C-terminal de la proteína de interés la secuencia YPYDVPDYA. Dicho nonapéptido es derivado de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza y se introdujo repetida 3 veces. Esta repetición permite incrementar la eficiencia de la detección mediante anticuerpos anti-HA. En este trabajo se marcaron los genes de *S. cerevisiae* *YFH1* y *SMF2* con este epítipo. Se contaba con dos plásmidos, uno con selección para NAT y el otro para higromicina b. Empleando estos plásmidos se obtuvieron las proteínas de fusión Yfh1-HA y Smf2-HA respectivamente.

5.6.1. Amplificación del plásmido pCYC106 (Selección con NAT)

Reactivos	volumen	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
Tampón de reacción (10x)	5 µl	95	5
dNTP's (10 mM)	1,5 µl	95	¼
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl	52	½
Oligo foYfh1 (10 µM)	2,5 µl	68	3
Oligo reYfh1(10 µM)	2,5 µl	68	7
DNA plasmidico	1 µg		} 25 } ciclos
Enhancer (10x)	5µl		
H ₂ O milli Q hasta	50 µl		

Oligonucleótidos empleados:

● Forward: fo Yfh1

5'—ACT TAC TGA AGA AGT TGA GAA GGC CAT TTC TAA AAG CCA ACG TAC
GCT GCA GGT CGA C 3'

● Reverse: Re Yfh1

5'—AAG GAA GAG AGA CTC TAA CTA TGA AAT AGA TTG GAT GCG TCA TCG
ATG AAT TCG AGC TCG 3'

5.6.2. Amplificación del plásmido pYM24 (Selección con hygromicina b)

Reactivos	volumen	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
Tampón de reacción (10x)	5 µl	95	3-4
dNTP's (2 mM)	8,75 µl	95	¼
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl	54	¼
Oligonucleotido S3 (10 µM)	3,2 µl	68	2'40''
Oligonucleotido S2 (100 µM)	3,2 µl	95	½
DNA plasmidico	1 µg	54	½
H ₂ O milli Q hasta	50 µl	68	2' 40''
			(+20 seg/ciclo)

Oligonucleotidos empleados:

● Oligonucleotido S3:

5'—TGA ACT TTT ATA TGT TAC TGG GCT TTAC TAC GGG CAA AGA AGT ACA
CCT CCG TAC GCT GCA GGT CGA C 3'

● Oligonucleotido S2:

5'—ATT CTT GGA TAA AAT GTA TAC TTA TAC TAG TCT AAA GAA TTG TTA
TAT TAA TCG ATG AAT TCG AGC TCG 3'

} 20
ciclos

5.7. MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA

Esta técnica se llevó a cabo para incorporar en las levaduras los productos de PCR. En este estudio se realizaron transformaciones para tres propósitos diferentes: a) sustitución del promotor endógeno del gen *YFHI* b) marcaje de proteínas con epítopos y c) incorporar de plásmidos de expresión o fragmentos lineales de DNA.

El protocolo empleado para las opciones a) y b) se muestra a continuación:

- Se partió de un volumen de 10 ml de cultivo a una OD₆₀₀ de 0,5-07.
- Las células se lavaron con 20 ml de H₂O MilliQ estéril.
- Posteriormente se centrifugaron 3 minutos a 3.000 r.p.m.
- El pellet de células se resuspendió en 1 ml de H₂O MilliQ estéril.
- A continuación se centrifugó 3 minutos a 3.000 r.p.m.

- Se realizó un lavado con 1 ml de TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) / 0,1M Acetato de Litio (LiAc) pH 7,5.
- Se centrifugó 3 minutos a 3.000 r.p.m.
- El pellet de células se resuspendió en 500 μ l de TE /0,1M LiAc pH 7,5.
- Luego se realizó la siguiente mezcla:
 - { 50 μ l de la suspensión de células
 - { 20 μ l de ssDNA de espermatozoos de salmón
 - { 1 μ g de DNA del plásmido (aproximadamente)
- Se agregaron 300 μ l de 40% polietilenglicol (PEG)/ TE /0,1M LiAc pH 7,5.
- Se Incubó 30 minutos a 30°C en agitación suave.
- Se aplicó un choque térmico 15 minutos a 42 °C.
- Posteriormente una centrifugación de 2 minutos a 3.000 r.p.m.
- Se aplicó un lavado con 1 ml de TE.
- Se realizó una nueva centrifugación 3 minutos a 3.000 r.p.m.
- Se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendió el pellet de células y se sembró en las placas adecuadas para los requerimientos y selecciones empleadas para cada transformación.
- Seguidamente se incubaron a 30°C.
- Finalmente se plaquearon las colonias en los medios con los antibióticos apropiados para la selección de las colonias y se realizaron las comprobaciones oportunas para verificar la correcta inserción del epítipo utilizado.

Para la opción c) se siguió el método rápido con acetato de litio (Gietz and Sugino, 1988) y se plaquero las células en medio selectivo (dependiendo de la auxotrofia o el marcador empleado). Dichas placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas.

5.8. CRUZAMIENTO DE CEPAS POR ESPORULACIÓN

Esta técnica parte de la base que *S. cerevisiae* presenta además de la división celular por gemación un tipo de reproducción sexual, es decir, posee dos tipos sexuales: a y α , determinados por dos alelos heterocigotos: *MATa* y *MAT α* . Cuando se cultiva una mezcla de cada cepa haploide (*MATa* y *MAT α*), se formará un cigoto que dará lugar a su vez a células diploides *MATa/MAT α* . Estos diploides pueden esporular si se cultivan en condiciones de

limitación de nutrientes (placas de esporulación). Durante la esporulación, la célula diploide se divide por meiosis dando lugar a cuatro células haploides que quedan contenidas dentro de un saco denominado asca. Estos sacos pueden romperse mediante digestión enzimática y utilizando un microscopio con micromanipulador es posible recuperar de manera independiente cada uno de los cuatro productos haploides (esporas). Cada una de las cuatro esporas se coloca sobre una placa de Petri con medio de cultivo y una vez que estas crecen y forman una colonia, se pueden transferir a placas conteniendo los medios de cultivo pertinentes que permitan determinar el fenotipo de cada una de las cuatro esporas (Sherman, 2002).

En este trabajo se realizó el cruzamiento de la cepa *tetO₇-YFHI (MAT_a)* con la cepa salvaje W303-1B (*MAT_α*). La cepa *tetO₇-YFHI* contiene el gen *kanMX4*, por lo tanto es resistente a geneticina. La selección de los haploides formados durante la esporulación se realizó en placas con geneticina (gen).

El protocolo se detalla a continuación:

5.8.1. Formación de cigotos diploides y esporulación

- Se hicieron crecer en una placa de YPD las cepas *MAT_a* y *MAT_α* seleccionadas para el cruzamiento durante 24 horas a 30°C.
- Se realizó un *patch* mezclando la cepa *MAT_a* y *MAT_α* en la placa de YPD.
- Se dejó crecer a 30°C para la formación de cigotos. A las 6 horas de incubación se sembró en una placa SC + gen y se incubó a 30°C durante 36-40 horas. En este paso ya es posible distinguir colonias grandes (posibles diploides).
- Se resuspendieron unas 3 colonias grandes en 20 µl de H₂O estéril y se verificó al microscopio la morfología típica de las células diploides.
- Se sembraron los diploides en *patch* en placas de YPD y se incubaron a 30°C durante 24-48 horas.
- Se tomó cada *patch* de células y se trasladó a la placa de esporulación.
- Se cerró la placa y se colocó dentro de una bolsa en la estufa a 25°C durante 7-10 días.

5.8.2. Selección de las esporas y separación de las células haploides

- Se verificó la formación de las esporas al microscopio.
- Se preparó la siguiente mezcla, 50 μ l de 1M sorbitol con 2,5 μ l de liticasa (10 mg/ml), en un tubo de 1,5 ml estéril.
- Se agregaron las células esporuladas con un asa o palillo estéril.
- Se procedió a incubar a 30°C por 10 minutos.
- La digestión se detuvo introduciendo el tubo en hielo y agregando lentamente 150 μ l de H₂O estéril.
- Se comprobó la digestión de las tétradas (cuatro esporas) en el microscopio.
- Con un asa de siembra, se traspasaron 5-10 μ l de la suspensión de esporas y se esparcieron en la superficie de una placa de YPD.
- Se procedió a la separación de cada espora utilizando un micromanipulador (*Singer MSM Model 300*).
- Las placas se incubaron en una estufa a 30°C durante 5 días.

5.8.3. Selección de células haploides

- Se seleccionó y diluyó cada colonia haploide en 100 μ l de PBS estéril.
- Se sembró 2 μ l de cada dilución en dos placas diferentes: una placa de YPD donde crecieron todas las colonias y otra placa de YPD con geneticina donde crecieron sólo las que eran resistentes a geneticina. Aquellos clones que crecieron en ambas placas fueron los seleccionados.

5.9. OTROS PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

- 5.9.1. Sobreexpresión de Mrs4**—Para la sobreexpresión de esta proteína se utilizó un plásmido multicopia (JK1489) marcado con FLAG en el extremo C-terminal. Este plásmido fue insertado en el vector pCM185 (Garí, et al., 1997), para obtener un plásmido final bajo el control de un promotor regulable por doxiciclina. Seguidamente se utilizó este plásmido para transformar la cepa salvaje W303 siguiendo los métodos de amplificación y transformación ya mencionados en los apartados anteriores. La evolución de la expresión de la

proteína de fusión Mrs4-FLAG se realizó por western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

5.9.2. Plásmido pFet3-LacZ y pCCC1-LacZ: Estos plásmidos multicopia se utilizaron como reporteros para evaluar la actividad del sistema de alta afinidad de captación de hierro (Fet3p/Ftr1p) y el transporte de hierro desde el citosol hacia la vacuola de la levadura (Ccc1). Ambos plásmidos fueron gentilmente cedidos por el Dr. Jerry Kaplan (University of Utah). Para la construcción del plásmido FET3-LacZ se utilizó una región del promotor del gen la cual se fusionó al vector YEp354 que contiene la secuencia del gen LacZ de *E. coli* (Li and Kaplan, 2001). Por otro lado, para la construcción del plásmido CCC1-LacZ se utilizó, al igual que en el anterior, una región del promotor de este gen fusionada al gen LacZ. Ambos plásmidos se utilizaron como reporteros de la actividad de los genes ya descritos.

Para la amplificación, purificación y transformación de las cepas de levadura seleccionadas con estos plásmidos se siguieron los protocolos ya descritos en apartados anteriores.

6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE RNA

6.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *YFHI* POR NORTHERN BLOT—Las muestras de RNA total para el análisis por northern blot fueron purificadas, separadas electroforéticamente y transferidas a una membrana de nylon cargada positivamente según una metodología descrita previamente (Bellí, et al., 1998). Para fijar el RNA a la membrana de nylon se empleó luz UV. La fijación de consigue exponiendo la membrana en un equipo Stratalinker 1800 (*Stratagen*), en el se aplicaron 12000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$. La correcta fijación de los RNAs se verificó en un transiluminador UV convencional observando los rRNAs. Posteriormente a la fijación se lavó la membrana con un tampón (1 % SDS, 20 mM Na_2HPO_4 pH 7.2 y 1 mM EDTA) a una temperatura de 65 °C. Seguidamente se realizó la pre-hibridación por 1 hora a 65 °C en una solución de bloqueo (20% SDS, 0.5% reactivo de bloqueo (*Boehringer*), 250 mM Na_2HPO_4 pH 7.2 y 1 mM EDTA). Posteriormente se realizó la hibridación durante 16 horas (toda la noche) con 2,5 ng/ml de la sonda desnaturalizada

(digoxigenin-dUTP). Esta sonda se generó mediante PCR del DNA genómico utilizando oligonucleotidos específicos. La inmunodetección se llevó a cabo utilizando el anticuerpo anti-DIG y siguiendo las instrucciones del fabricante (*Boehringer*). Para desarrollar la quicioluminiscencia se empleó CMP-Star como sustrato. Finalmente la señal emitida se captó utilizando un equipo Lumi-Imager™ (*Roche*).

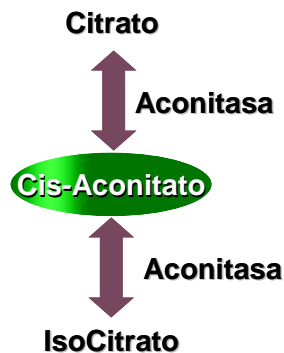
6.2. EXTRACCIÓN DE RNA Y REAL-TIME PCR CUANTITATIVA—El RNA total fue extraído empleando el kit comercial *RNeasy Kit*™ (*Qiagen*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente se empleó 1 µg del RNA total de cada una de las muestras para sintetizar 50 ng de cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa. Este cDNA fue utilizado para realizar cada Real-Time PCR. El ensayo se llevó a cabo en un equipo iCycler (Bio-Rad) empleando el reactivo de Taqman® (*Applied Biosystems*). La cuantificación se realizó con el programa informático iCycler IQ Real-Time detection system (version 2.3, Bio-Rad). Como control interno se utilizó la proteína actina (*ACT1*). Los primers empleados para la amplificación de los genes *FET3*, *CCCI* y *ACT1* fueron obtenidos a través de Applied Biosystems (*TaqMan Gene Expression Assays, Custom*). Los rangos de expresión relativa correspondiente a cada gen fueron calculados en base al valor de ΔC_p . Para corregir la eficiencia se realizaron múltiples repeticiones (Pfaffl, 2006).

6.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (MICROARRAYS)—Para este análisis se emplearon células del mutante *tetO₇-YFH1* crecidas en fase exponencial ($OD_{600}=0,4-0,8$). Se utilizó una cantidad de células equivalente a 20 OD_{600} . Se compararon células tratadas con doxiciclina durante 10 horas con células de este mismo mutante sin tratamiento. El análisis se llevo a cabo en la Universidad Autónoma de Barcelona. El análisis del DNA mediante microarrays se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente (Viladevall, et al., 2004).

7. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

7.1. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

7.1.1. Aconitasa—La enzima aconitasa forma parte del ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarboxílicos). Contiene un centro Fe-S que en su forma funcional es 4Fe-4S. Esta enzima cataliza la isomerización del citrato en isocitrato, tras la formación de intermediario cis-aconitato.



La actividad se ensayó siguiendo el protocolo descrito previamente (Robinson, et al., 1987), en el cual se mide la extinción del cis-aconitato. El protocolo se detalla a continuación:

- Se extrajeron las proteínas rompiendo las levaduras con tampón 50 mM Tris-HCl pH 8 + inhibidores de proteasas (IP) y luego se centrifugó 3 minutos a 10.000 r.p.m. para obtener el sobrenadante.
- Mezcla de reacción:

$$\left\{ \begin{array}{l} 500 \mu\text{l de tampón } 40 \text{ mM Tris-HCl y } 50 \text{ mM NaCl pH } 7,4 \\ 4 \mu\text{l de cis-aconitato } 7 \text{ mg/ml} \\ 4\text{-}8 \mu\text{l de extracto proteico} \end{array} \right.$$

Se Midió la disminución de la absorbancia a 240nm por 1 minuto a 25°C en cubeta de cuarzo. Una unidad de enzima ACO se define como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de cis-aconitato por minuto. El coeficiente de extinción molar (ϵ) del cis-aconitato es de $4,28 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

7.1.2. Succinato deshidrogenasa (SDH)—Esta enzima es una flavoproteína ya que contiene una molécula de FAD unida covalentemente. Esta molécula de FAD es el aceptor de electrones de la reacción. En general, la función bioquímica del

FAD es oxidar los alcanos (como el succinato) a alquenos (como el fumarato). Esta enzima presenta un centro Fe/S y en levadura está formada por cuatro subunidades (Sdh1p, Sdh2p, Sdh3p, Sdh4p). Forma parte del complejo II de la cadena de transporte de electrones, donde cataliza la transferencia de electrones a la ubiquinona (Oyedotun and Lemire, 2004). El ensayo mide la formación de formazán a partir del reactivo INT, el cual se utiliza como aceptor de electrones (Munujos, et al., 1993).

El protocolo se detalla a continuación:

- Extracción de proteínas con 100µl de tampón 50 mM Imidazol-HCl / 2mM EDTA pH 6,5 + IP, luego se centrifugó 5 minutos a 3.000 r.p.m.
- Mezcla de reacción:
 - { 900 µl de Solución A
 - { 100 µl de succinato 200 mM
 - { 5-10 µl de extracto proteico
- Mezcla de reacción inespecífica:
 - { 900 µl de Solución A
 - { 100 µl de H₂O
 - { 5-10 µl de extracto proteico

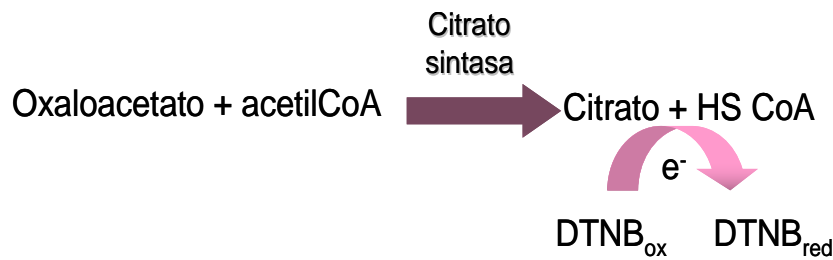
La solución A contenía:

- { 100 mM Tris-HCl pH 8,3
- { 10 mM EDTA
- { 1 mg/mL INT (Iodonitrotetrazolium chloride)
- { 12 mg/ml Cremophor (Sigma®)

La absorbancia se midió a 500 nm durante 5 minutos a 25°C. La medida de la actividad se obtiene tomando la fracción lineal de la recta, descartando la subida inicial. Se descuenta el valor de la actividad inespecífica ensayada en las mismas condiciones. Una unidad de actividad SDH se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol de formazán por minuto ($\epsilon_{\text{formazán}}=19,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

7.1.3. Citrato sintasa—Esta enzima cataliza la síntesis de citrato a partir de acetil coenzima A (acetilCoA) y oxaloacetato. En esta reacción se utiliza el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) como donador de electrones (Munujos, et al., 1993). *Saccharomyces cerevisiae* posee dos isoenzimas Cit1p y Cit2p. El ensayo

se realizó a pH 8,1. En estas condiciones tan sólo Cit1p (isoenzima mitocondrial) es activo.



En una cubeta de polipropileno se preparó la siguiente mezcla de reacción:

A) Ensayo específico

- 960 μl Tris-HCl 200 mM pH 8
- 10 μl acetilCoA 10 mM
- 10 μl DNTB 10 mM
- 10 μl oxalacetato 50 mM
- 5-10 μl extracto proteico

B) Se preparó un blanco en el que no se agregó el oxaloacetato.

La medida de actividad viene dada por el incremento de la absorbancia a 412 nm por minuto a 25 °C y se obtiene de la diferencia entre el valor obtenido de la muestra y el correspondiente al blanco. Una unidad de citrato sintasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un μmol de DTNB por minuto. El coeficiente de extinción molar (ϵ) del DTNB es $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

7.1.4. Actividad β -galactosidasa—Este ensayo emplea el gen LacZ como reportero.

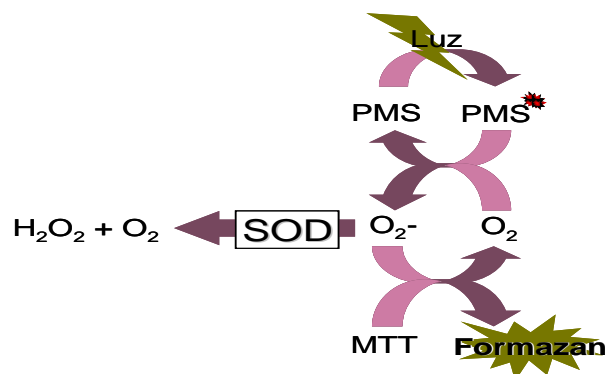
El gen codifica para la enzima β -galactosidasa de *E. coli*. Esta enzima cataliza la hidrólisis de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG). El ensayo se realiza en placas de micro-elisa de 96 pozos de fondo plano durante 10 minutos y a una temperatura constante de 25 °C (Guarente, 1983). La actividad específica se viene expresada como los nmoles de ONPG hidrolizados por minuto dividido por la cantidad de proteína total del extracto de proteínas ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$)

El protocolo de este ensayo se detalla a continuación:

- Se partió de un cultivo de SC glicerol de 10 ml a una OD₆₀₀ de 0.7-1.0, con lo que utilizamos aproximadamente unas 10 OD de células.
- Se centrifugaron las células 3 minutos a 3500 r.p.m., se eliminó el medio y luego se lavó con 1ml de tampón-Z.
- Se eliminó el tampón y resuspendió en 0,2 ml de tampón-Z (en este paso se pueden congelar en N₂ y luego a -20 °C, el ensayo es estable varios días).
- Las células se rompieron empleando bolas de vidrio en un agitador (*Fast-Prep. MP Biomedicals*) a 4 °C.
- Luego se centrifugaron a 13000 r.p.m. por 5 minutos y se transfirió el lisado a un nuevo tubo.
- Se preparó la siguiente mezcla en cada posición de la placa de 96: pozos
 - 2-10 µl de extracto
 - 190 – 198 µl Buffer-Z
 - 40 µl de ONPG/Z Assay buffer
- Se realizó la lectura de la absorbancia en el equipo de lectura de placas de 96 pozos (*PowerWave XS, Biotek*) con agitación orbital.

7.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN GEL (ZIMOGRAMA)

7.2.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)—El principio del ensayo es la conversión del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a un precipitado azul (formazán) cuando se reduce por acción del ión superóxido. La eliminación del superóxido evitará la formación del precipitado formazán y aparecerán en el gel bandas claras que corresponden a la actividad SOD. El metasulfato de fenazina (PMS) es un compuesto que genera superóxido al ser excitado por la luz. El ensayo se realizó según el método descrito previamente (Manchenko, 1994).



El protocolo de esta actividad se presenta a continuación:

- Se preparó un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (según apartado 4.4).
- Se obtuvieron los extractos proteicos (apartado 4.1).
- Fueron cargados de 15 a 30 μg de proteína por carril. La migración se realizó a 15-20 mA a 4°C.
- Se incubó el gel en la solución de tinción en presencia de una fuente de luz y con una agitación suave. Las bandas de actividad SOD aparecieron como zonas claras sobre un fondo oscuro.
- Se lavó el gel con agua milliQ y se capturó la imagen en el densitómetro.
- Finalmente se cuantificó y analizó dicha imagen con el programa *Quantity-One* (Bio-Rad®).

Para la detrmnacion de la actividad SOD mediante zimogramas se contruyó una curva con un extracto proteico con concentraciones conocidas, a partir de esta curva se realizaron los cálculos para las cuantificaciones.

8. DETERMINACIÓN DE METALES

8.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO INTRACELULAR—El método empleado para la determinación del contenido de hierro fue una adaptación para levadura (Tamarit, et al., 2006) del método colorimétrico descrito previamente (Fish, 1988). El hierro presente en la muestra primero es extraído y luego reducido. Finalmente el hierro es quelado con batofenantrolina, lo cual provoca un cambio en la absorbancia que es medido espectrofotométricamente.

El protocolo de esta determinación se presenta a continuación:

- Se partió de un pellet de 5 OD's (2×10^8 de células) lavado con H₂O milliQ.
- Se resuspendió en ácido nítrico al 3% (v/v).
- Se incubó a 98°C durante 12 h en agitación constante.
- Se centrifugó 5 minutos a 10.000 r.p.m.

- A 400 μl del sobrenadante se le adicionaron 160 μl de ascorbato de sodio 38 mg/ml y 126 μl de solución de acetato de amonio (solución saturada y diluida 1/3).
- Se midió la diferencia entre la absorbancia a $\lambda=535\text{nm}$ y $\lambda=680\text{ nm}$.
- Se adicionó BPS para que quede a una concentración final de 34 $\mu\text{g/ml}$.
- Se obtuvo una nueva medida de la diferencia de absorbancia entre $\lambda=535$ y $\lambda=680$ nm. Se restó a este valor el obtenido antes de la adición de BPS.
- En paralelo se realiza un blanco con todos los reactivos del ensayo. El valor obtenido en estos se sustrae al valor obtenido de las muestras.

Para expresar los resultados en concentración molar, el número y volumen celular medio de las células se determinó utilizando un contador de células y partículas *Coulter Z2* (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

8.2. Determinación del contenido de manganeso intracelular—Esta cuantificación fue realizada utilizando la técnica de absorción atómica en horno de grafito en un equipo *Varian SpectrAA* con corrector Zeeman. Las células fueron resuspendidas en ácido nítrico como se indica en el apartado 7.1. Se tomaron 200 μl del sobrenadante obtenido y se enviaron al Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona, donde fueron analizados. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/l}$ de muestra (ppb).

IV. RESULTADOS

1. CAPITULO 1 : DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DEL ESTUDIO Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DOXICICLINA *Per Se* EN LA LEVADURA

1.1. SELECCIÓN DEL MEDIO Y LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS LEVADURAS

Para definir las condiciones de cultivo óptimas en las que se realizarían los experimentos planteados en este trabajo, se analizaron y compararon un conjunto de marcadores mitocondriales en células W303 crecidas en los medios de cultivo YPD e YPG. El medio YPD contiene 2% de glucosa, que en *Saccharomyces cerevisiae* promueve un fuerte efecto represor de la actividad mitocondrial. Los marcadores evaluados en cada una de estas condiciones se muestran en la figura 21A y fueron: los niveles de las proteínas mitocondriales aconitasa (Aco1), α -ceto-glutarato deshidrogenas (Kgd2) y porina (Por1) mediante western blot. También se evaluaron las actividades de las enzimas mitocondriales aconitasa y citrato sintasa (Figura 21B y C). Así mismo, se realizó la medida del consumo de oxígeno, empleando para ello células crecidas en cada uno de los medios a evaluar. Para obtener esta medida se empleó un electrodo de Clark. Como se puede observar en la figura 21, todos los marcadores analizados se encontraron significativamente incrementados en las células crecidas en YPG. Este hecho estaría confirmando una fuerte represión de la actividad mitocondrial en las células crecidas con una alta concentración de glucosa.

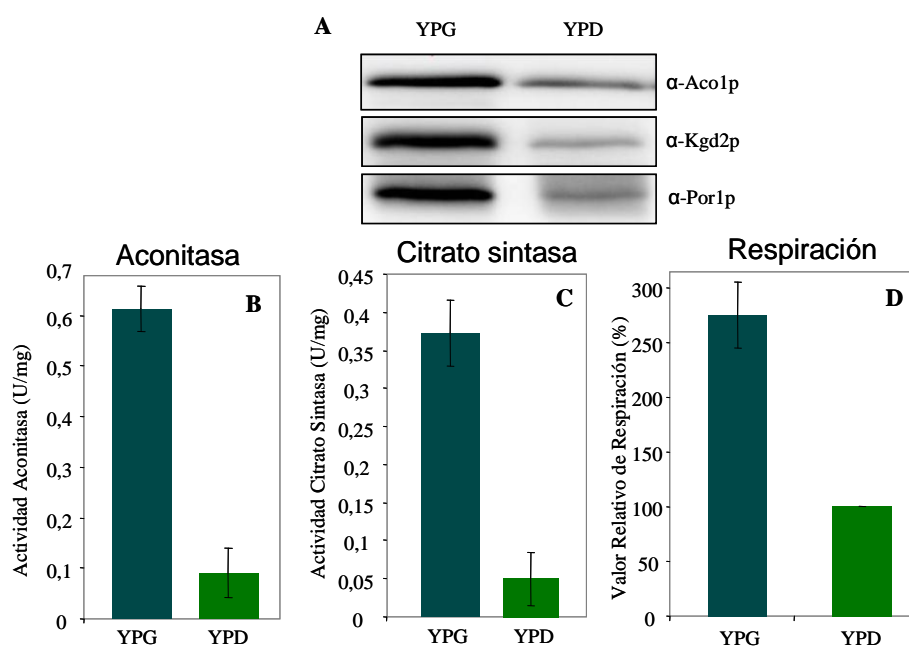


Figura 21. Comparación de marcadores mitocondriales en la cepa W303 crecida en medio YPD e YPG— A, Las células fueron crecidas paralelamente en ambos medios y recogidas en fase exponencial de crecimiento. Se realizó la extracción de las proteínas y se cuantificaron las proteínas aconitasa (Aco1), α -ceto-glutarato deshidrogenasa (α -Kgd2) y porina (Por1). En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección. Se ensayaron las actividades de las enzimas mitocondriales aconitasa (B) y citrato sintasa (C). D, se realizó la medida del consumo de oxígeno en la cepa W303 crecida en cada uno de los medios evaluados. Los datos están expresados como medias \pm la desviación estándar (DE) de al menos tres experimentos diferentes.

Basándonos en estos resultados y teniendo en cuenta que tanto Yfh1p como Grx5p son proteínas localizadas en la matriz mitocondrial, decidimos seleccionar el medio YPG como medio preferente para realizar los estudios que se detallarán a lo largo de este trabajo. Sólo se emplearon medios de cultivo diferentes del YPG en situaciones muy puntuales y siempre haciendo clara referencia a este cambio en las condiciones de cultivo.

1.2. EVALUACIÓN DE LOS POSIBLES EFECTOS DE LA DOXICICLINA *per se* EN LA CEPA SALVAJE W303

En este estudio se empleó un sistema *tetO*, el cual permite bloquear la expresión de un gen empleando un antibiótico (doxiciclina); este sistema será detallado posteriormente. En este sentido, se planteó la necesidad de verificar los posibles efectos que pudiera tener la doxiciclina en la cepa salvaje de *S. cerevisiae*. Se evaluaron una serie de marcadores que posteriormente serían utilizados en el estudio. Esto permitió descartar cualquier posible efecto artefactual debido a la adición del antibiótico en el curso del estudio planteado. Se comparó la cepa salvaje W303 no tratada, con la misma cepa tratada con doxiciclina. Para ello se realizaron pruebas en las que se hicieron crecer las células en medio YPG. Seguidamente se trataron las levaduras con doxiciclina durante periodos de tiempo de 14 y 24 horas. Dichas células se recogieron siguiendo los procedimientos ya descritos anteriormente y se procedió a realizar la medición de los siguientes parámetros: actividad aconitasa, niveles de hierro celular (figura 22A) y la cuantificación de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) por *western blot* (figura 22B). No se encontraron cambios significativos en los parámetros analizados al comparar las células tratadas y no tratadas. Estos resultados coinciden con los encontrados en un estudio en el que se evaluó el efecto del tratamiento con doxiciclina en la expresión global de genes en la levadura (Wishart, et al., 2005), e indican que el tratamiento con doxiciclina no estaría provocando cambios significativos en esta cepa.

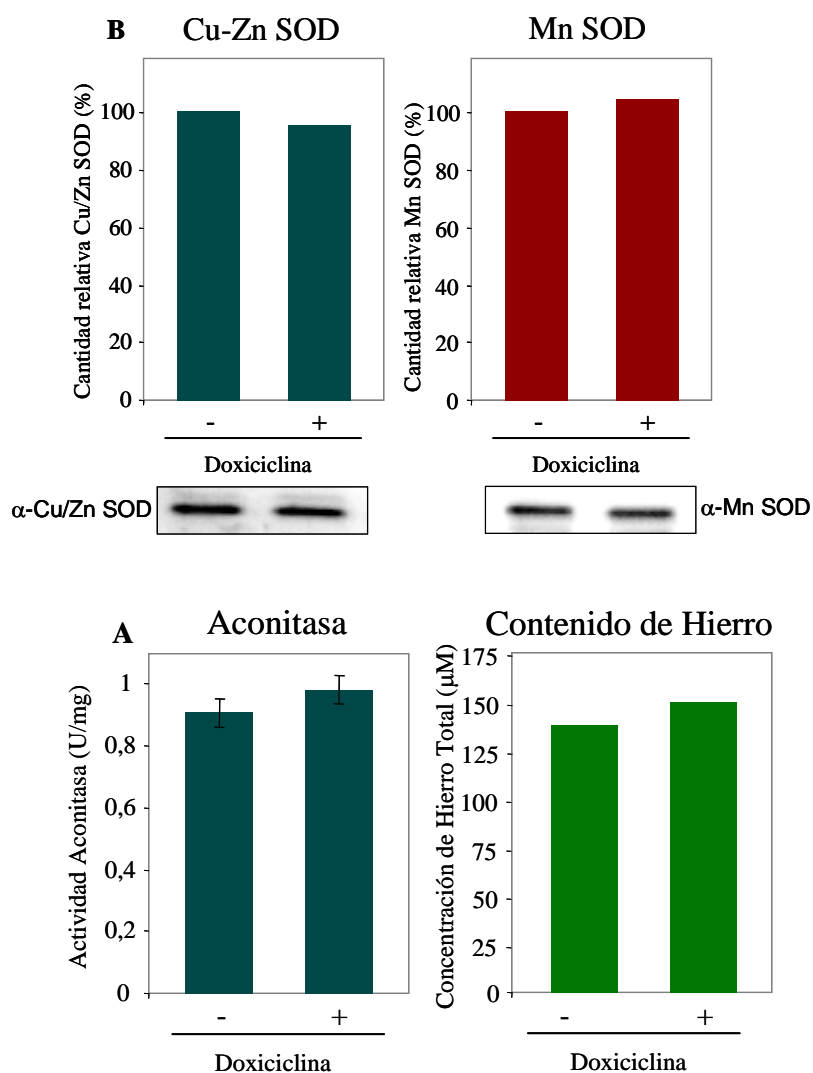


Figura 22. Evaluación del efecto de la doxiciclina en la cepa W303—Se evaluaron los posibles efectos del tratamiento con 2 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina durante 14 horas en la evolución de la actividad de la enzima aconitasa y los niveles de hierro intracelular en la cepa salvaje (A). También se cuantificaron los niveles de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) por western blot al tratar las células con doxiciclina durante 24 horas. En cada carril se cargaron 15 μg de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección (B). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados.

Una vez definidas las condiciones de crecimiento señaladas en el apartado 1.1 y hecha la verificación de la inocuidad del tratamiento con doxiciclina en las condiciones experimentales, el siguiente paso fue proceder a la obtención de las cepas mutantes que permitirían el abordaje metodológico adecuado para realizar el estudio de la posible función de Yfh1p en *Saccharomyces cerevisiae*. En este sentido se procedió a la sustitución de promotor endógeno de *YFHI* por un promotor regulable por doxiciclina (promotor *tetO*) y el posterior análisis de los acontecimientos que acompañan la depleción de Yfh1p en levadura.

**2. CAPITULO 2: CONSTRUCCION DEL LOS MUTANTES CONDICIONALES EN
YFHI: EVALUACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MUTANTES**

2.1. SUSTITUCIÓN DEL PROMOTOR ENDÓGENO DE *YFH1* POR UN PROMOTOR REGULABLE POR DOXICICLINA (*tetO*)

El interés en utilizar este tipo de promotores se debió principalmente a que los mismos permiten una eficiente represión del gen que se desea estudiar. Una de las aplicaciones más interesantes de esta tecnología es la posibilidad de estudiar la función de proteínas esenciales para la célula, así como también aquellas cuya depleción provoca un fuerte fenotipo que dificulta una definición clara de las consecuencias directas de la falta de dicha proteína. En este contexto es muy difícil abordar el problema mediante el uso de mutantes nulos. En nuestro grupo hemos trabajado extensamente en el estudio de la función de *YFH1* utilizando el mutante nulo ($\Delta Yfh1$), pero hasta ahora la mayor dificultad se ha relacionado precisamente con esa imposibilidad de diferenciar claramente las causas y las consecuencias de la falta del gen. Es por ello que se seleccionó el abordaje del problema mediante el uso del mutante condicional. Algunas de las ventajas de esta tecnología, frente a otras más extendidas (promotores *MET* y *Gal*), es el hecho que los cambios introducidos en las condiciones de cultivo son prácticamente insignificantes. La represión con este promotor se consigue aplicando una dosis muy baja de doxiciclina (2 $\mu\text{g/ml}$), por lo que no se requieren cambios importantes en la composición del medio durante todo el experimento. En cuanto al efecto del antibiótico sobre las células, como se ha señalado anteriormente, se han realizado estudios globales de expresión génica en cepas de levadura crecidas en medios con concentraciones de doxiciclina similares a las empleadas en este estudio y no se han encontrado cambios significativos en la expresión de los genes analizados (Wishart, et al., 2005). En este mismo sentido, un análisis de expresión génica (microarrays) realizado en nuestro grupo, en el cual se trató una cepa *wild type* con 4 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina, no mostró cambios importantes en la expresión génica de dicha cepa (Rodriguez-Colman, et al., 2010). En este trabajo se han utilizado dos tipos de promotor: *tetO*₂ y *tetO*₇. Como ya se ha descrito en el apartado 5.5.1 de materiales y métodos, ambos promotores difieren entre sí en el número de cajas de activación/represión del transactivador. Esto implica que el promotor *tetO*₇ presenta un mayor nivel de expresión que el *tetO*₂, pero por otro lado, la represión que se consigue con el primero es más eficiente que la del *tetO*₂ una vez se aplica la doxiciclina al medio.

Una vez obtenidos los transformantes, estos se evaluaron en un primer término haciéndolos crecer en placas que contenían el antibiótico geneticina, que en este caso es el marcador para

la selección de los clones. Posteriormente se realizó una comprobación de la sustitución del promotor endógeno en el gen *YFH1*, mediante una amplificación por PCR.

2.2. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA Y PROTEÍNA EN LOS MUTANTES CONDICIONALES *tetO-YFH1*

Se evaluaron los niveles mRNA de cada una de las cepas transformadas con los promotores empleando la técnica de northern blot. Simultáneamente se analizó el comportamiento de los promotores antes y después de la adición de doxiciclina durante un intervalo de tiempo de 7 horas. Como se puede observar en la figura 23A, al evaluar la intensidad de señal quimioluminiscente, los niveles de mRNA de *tetO₂-YFH1* fueron similares a los de la cepa salvaje. Estos niveles disminuyeron hasta un 10 % después de la adición de doxiciclina (Figura 23A, izquierda del panel). Por otro lado, los niveles de mRNA de *tetO₇-YFH1* fueron aproximadamente 10 veces mayores que el *wild type*. Dichos niveles tras el tratamiento con doxiciclina disminuyeron hasta alcanzar un nivel prácticamente indetectable (Figura 23A, derecha del panel). También se presentan como controles los niveles del transcrito de *YFH1* en W303 y $\Delta yfh1$ (Figura A, centro del panel)

Seguidamente, para determinar si el incremento en la expresión génica observada en los mutantes condicionales estaba asociada a un incremento del nivel de proteína se emplearon las cepas BQS202, BQS203 y BQS204 generadas en nuestro laboratorio (ver Tabla 5). Dichas cepas expresan una versión de Yfh1p marcada con el epítipo HA. Los niveles de Yfh1-HA se detectaron empleando anticuerpos específicos anti-HA siguiendo los métodos ya descritos en apartados anteriores. El análisis de Yfh1p muestra la presencia de tres formas bien distinguidas de la proteína (figura 23B). La banda de menor peso molecular (aproximadamente 27 kDa) corresponde a la forma madura de la proteína, mientras que las dos formas de mayor peso molecular representan formas inmaduras. En lo que se refiere a la forma madura, y por tanto funcional de la proteína, se observaron niveles similares entre el mutante *tetO₂-YFH1* y la cepa salvaje. Por otro lado el mutante *tetO₇-YFH1* presentó niveles mayores que la cepa parental (ligeramente superiores al doble). En ambas cepas mutantes se observó una acumulación significativa de las dos formas inmaduras, siendo más importante en el mutante *tetO₇-YFH1*. No resulta sorprendente la presencia de estas formas inmaduras de Yfh1. Un artículo publicado recientemente muestra la presencia de tres formas claramente distinguidas de la proteína (un precursor, una intermediaria y la forma madura), en cultivos de

células humanas (Condò, et al., 2010). Por tanto, el análisis por *western blot* ha mostrado que el incremento en los niveles de proteína de los mutantes con respecto al W303, se correlaciona con los mayores niveles de expresión ya observados previamente por *northern blot*.

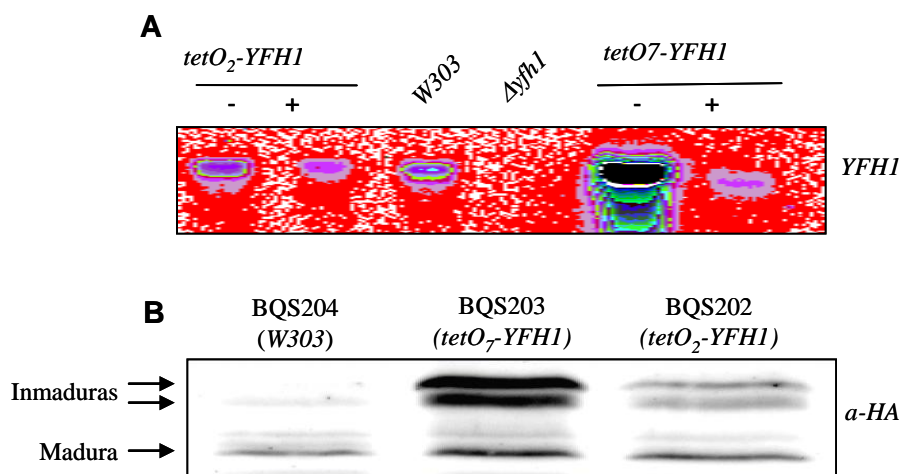


Figura 23. Evaluación de los niveles de mRNA y proteína en los mutantes condicionales YFH1—Se evaluaron los niveles de mRNA en los mutantes condicionales *tetO₂* y *tetO₇-YFH1* por northern blot, además se utilizó la cepa salvaje (W303) y el mutante nulo (*Δyfh1*) como controles. También se evaluó la evolución del mRNA en los mutantes condicionales después de 7 horas de tratamiento con doxiciclina (2 μg/ml) (A). Paralelamente se evaluaron por western blot los niveles de la proteína marcada con HA, se compararon estos niveles entre los mutantes condicionales y en la cepa W303 (B). La banda de menor peso molecular (Mw) representa la forma madura, mientras que las dos de mayor Mw corresponderían a las formas inmaduras de la proteína. En cada carril se cargaron 30 μg de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección.

Como se ha podido observar, los niveles iniciales de expresión de *YFH1* son distintos en estos dos mutantes. Por un lado, el mutante *tetO₂-YFH1* presenta niveles cercanos a la cepa salvaje y por ende pudieran considerarse más fisiológicos. Por otro lado, el mutante *tetO₇-YFH1* tiene mayores niveles iniciales de mRNA y proteína, por lo que se comporta como un sobreexpresor. Por tanto y en base a estas observaciones, se decidió emplear al mutante *tetO₂-YFH1* para evaluar el comportamiento de la cepa durante tiempos cortos (0, 4, 8, 14 y 24 horas). Mientras que el mutante *tetO₇-YFH1*, al tener mayores niveles de proteína iniciales, nos serviría para observar los efectos de la depleción de *YFH1* a tiempos más largos (0, 4, 8, 14, 24, 48, 72 horas).

Seguidamente y para realizar la validación de los mutantes generados, se midieron dos importantes parámetros que posteriormente fueron utilizados durante el estudio, estos fueron: el contenido celular de hierro y la actividad de aconitasa. Esto se hizo con el fin de constatar

que la sustitución del promotor de *YFH1* no afectaba estos parámetros. Como se puede observar en la figura 24, al comparar ambos mutantes con la cepa parental, no se encontraron diferencias importantes en el contenido celular de hierro y tampoco en la actividad enzimática analizada.

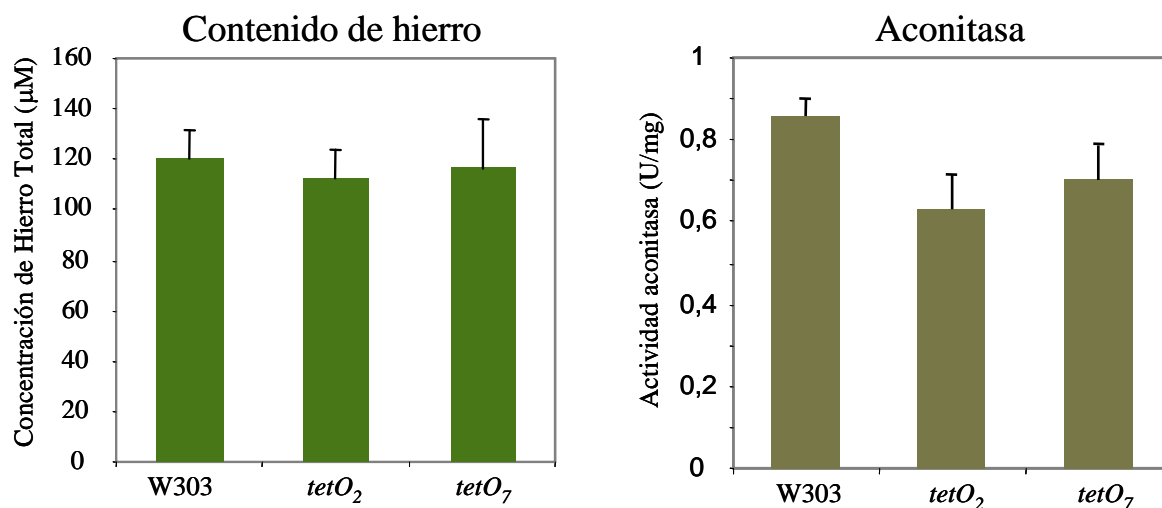


Figura 24. Análisis del contenido de hierro y actividad aconitasa en W303—Se comparó el contenido celular de hierro de ambos mutantes condicionales con el correspondiente a la cepa salvaje. Además se cuantificó la actividad de la enzima aconitasa. No se observaron variaciones significativas entre las cepas mutantes y el control. Los resultados están expresados como medias \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

2.3. EVALUACIÓN DE LA REPRESIÓN DE *Yfh1p* DURANTE EL TRATAMIENTO CON DOXICICLINA EN EL MUTANTE CONDICIONAL

Para evaluar los niveles de la proteína, una vez bloqueada la expresión del gen, es conveniente tener en cuenta que esta medida va a depender principalmente del tiempo de vida media de la proteína. La vida media de una proteína depende a su vez de varios factores entre los que se pueden destacar la estabilidad del mRNA, las modificaciones post-traduccionales y también la velocidad de recambio de dicha proteína (genéricamente conocido como *turn-over*). En este apartado abordamos dos de estos aspectos. Por un lado, como ya se ha mostrado en la figura 23A, los niveles del mensajero de *Yfh1p* disminuyen rápidamente después del bloqueo de la expresión del gen, lo cual estaría indicando que la estabilidad de este mRNA está por debajo de las 7 horas. Por otro lado, para evaluar la estabilidad de la proteína se realizaron tratamientos con doxiciclina a diferentes tiempos en la cepa BQS203. Esta cepa derivada de *tetO₇-YFH1*, expresa una versión de *Yfh1p* marcada con el epítipo HA. De este modo se obtuvo una cinética de bloqueo de la expresión de la proteína durante un período de 24 horas.

Esto permitió conocer la evolución de Yfh1p después del tratamiento con doxiciclina. Como se puede observar en la figura 25, los niveles de la proteína se vuelven prácticamente indetectables al cabo de 8 horas de tratamiento. Estos datos de los niveles de proteína se correlacionan bastante bien con los obtenidos al medir los niveles de mRNA y estarían en conjunto sugiriendo que el tiempo de vida media de esta proteína sería bastante corto. Paralelamente se utilizó la proteína porina como un control general del contenido mitocondrial. No se encontraron cambios significativos en este marcador durante las 24 horas de tratamiento.

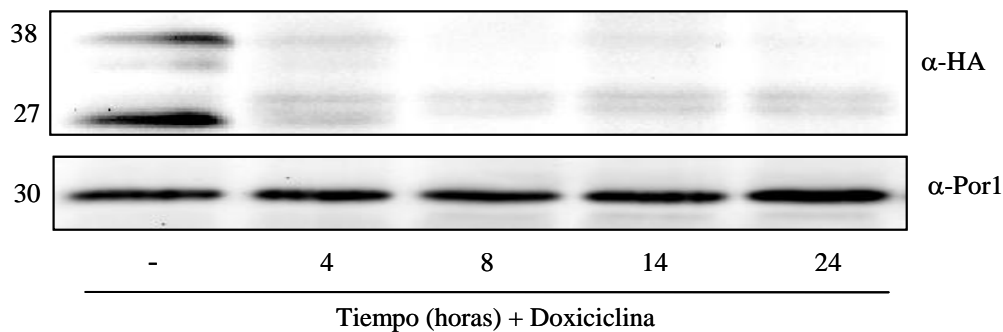


Figura 25. Evaluación de los niveles de Yfh1p durante 24 horas—Se siguió la evolución de Yfh1p-HA después del tratamiento con doxiciclina durante 24 horas. Se observó que el tratamiento con doxiciclina provocaba una disminución significativa de los niveles de la proteína tanto de la forma madura como de las formas inmaduras de mayor peso molecular. La señal de la proteína fue prácticamente indetectable después de ocho horas de tratamiento. Se muestra también Por1 como marcador del contenido de mitocondrias. En cada carril se cargaron 30 μ g de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección.

3. CAPITULO 3: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Yfh1p EN EL CONTENIDO CELULAR DE HIERRO Y EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Fe/S ACONITASA Y SUCCINATO DESHIDROGENASA

3.1. LA FALTA DE Yfh1p EN *Saccharomyces cerevisiae* SE CORRELACIONA CON UN INCREMENTO EN LOS NIVELES DE HIERRO

En *S. cerevisiae* como se ha mencionado anteriormente, Aft1p juega un papel central en la activación de genes directamente implicados en la incorporación de hierro desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Este proceso es llevado a cabo por un conjunto de genes que en levadura son colectivamente denominados “regulón del hierro”. Dichos genes intervienen esencialmente en dos procesos: la solubilización del hierro y su posterior transporte a través de las membranas. Ambos grupos de genes son regulados de manera coordinada en respuesta a las necesidades de hierro de la célula. Es decir, los niveles de mRNA de los genes relacionados con el transporte de sideróforos, las ferrireductasas, y el sistema de alta afinidad de adquisición de hierro, son regulados de forma directa y coordinada por el factor de transcripción Aft1p (Yun, et al., 2000a). Hasta la fecha se han realizado muchos estudios para explicar a través de qué mecanismos responde este factor a la privación de los niveles de hierro. Así como también, se intenta entender los mecanismos moleculares a través de los cuales éste estaría llevando a cabo el proceso de regulación. Adicionalmente, se conoce que Aft1p también actúa de manera coordinada con otros factores de transcripción, permitiendo una regulación más afinada del regulón. Sin embargo, la forma como este factor de transcripción es capaz de sensar la baja disponibilidad de hierro en *Saccharomyces cerevisiae* no está del todo clara.

Con el fin de analizar los efectos iniciales de la falta de Yfh1p, se midió el contenido de hierro en los mutantes *tetO₂* y *tetO₇* crecidos con y sin doxiciclina durante un período de tiempo de 0 a 24 horas. Los cultivos eran mantenidos siempre en fase exponencial mediante diluciones en medio fresco. Como se observa en la figura 26A, las células de ambos mutantes presentan un comportamiento similar, apreciándose una progresiva acumulación de hierro a lo largo de estas 24 horas del experimento. Dicho aumento es ya evidente a las 8 horas y se incrementa hasta aproximadamente 4 veces el valor inicial después de 24 horas de tratamiento. Seguidamente se decidió prolongar el tratamiento en el mutante *tetO₇*. Para ello se midió el contenido celular de hierro de *tetO₇-YFH1* hasta 72 horas. Se observó que las células alcanzaron unos niveles máximos de acumulación a las 72 horas donde los valores de hierro fueron 10 veces superiores al de las células no tratadas (Figura 26B).

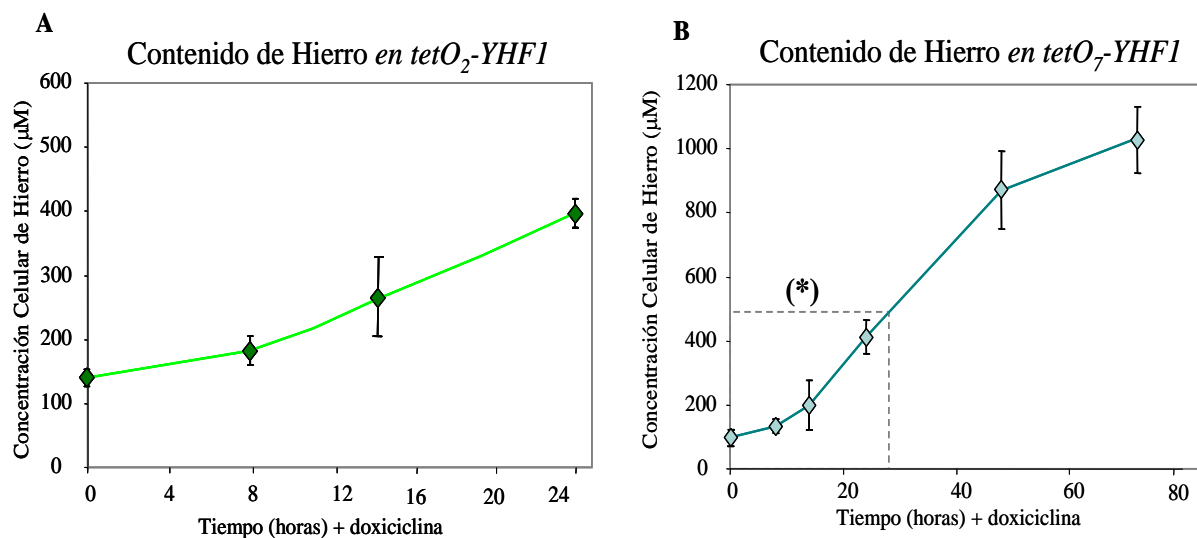


Figura 26. Cuantificación del contenido celular de hierro en los mutantes condicionales—Los mutantes *tetO₂* y *tetO₇-YFH1* fueron cultivadas en medio YPG con y sin la adición de doxiciclina durante los intervalos de tiempo indicados en las figuras. Se recolectaron las células y se realizó la cuantificación de los niveles de hierro. El gráfico de rombos verdes representa al mutante *tetO₂* y los de color azul representan al *tetO₇-YFH1*. Se observa un incremento progresivo en los niveles de hierro celular en ambos mutantes. Este incremento alcanza un valor de aproximadamente 4 veces los niveles basales al cabo de 24 horas del tratamiento con doxiciclina (en A y en el cuadro inferior marcado con el símbolo (*)) en B). También se analizó la evolución del contenido de hierro a tiempos más largos (hasta 72 horas) en el mutante *tetO₇-YFH1*. Se encontró una profunda acumulación de hierro en estas células. Los experimentos mostrados representan la media \pm la desviación estandar de 3 experimentos independientes

El incremento en los niveles de hierro durante la depleción de Yfh1p es un hallazgo ya observado anteriormente (Babcock, et al., 1997). Así mismo, en un trabajo previo de nuestro grupo se describió que la cepa deficiente en este gen ($\Delta yfh1$) presentaba un incremento de 2 veces y media en los niveles de hierro comparado con la cepa salvaje W303 (Irazusta, et al., 2006). Este hecho estaría indicando que el fenotipo de acumulación de hierro ya descrito para $\Delta yfh1$ es reproducido por los mutantes condicionales presentados en esta sección.

3.2. EVALUACIÓN DE UNA POSIBLE VÍA MOLECULAR RESPONSABLE DEL PROCESO DE ACUMULACIÓN DE HIERRO EN LA LEVADURA DEFICIENTE EN Yfh1p: IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE ALTA AFINIDAD (*FET3/FTR1*)

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los primeros hallazgos observados en el mutante condicional fue la temprana acumulación de hierro. Para evaluar los mecanismos moleculares involucrados en este hallazgo inicial, se decidió medir los niveles de expresión del transcrito de *FET3*. De esta forma se estaría midiendo de manera indirecta la activación del regulón de hierro, ya que como se ha mencionado anteriormente, este gen es regulado a

nivel transcripcional por Aft1. Para medir estos niveles se empleó la técnica de qRT-PCR. De esta forma se obtuvieron los valores relativos de expresión de *FET3* después de un tratamiento con doxiciclina de 4 horas. Se utilizó como valor de referencia el correspondiente a la misma cepa sin tratamiento y como control se utilizaron los valores de expresión relativa correspondientes a actina (*ACT1*). Como se muestra en la figura 27, los niveles de expresión del transcrito de *FET3* se hallan significativamente aumentados tanto en el *tetO₂* como en el *tetO₇-YFH1*. Este hallazgo estaría indicando que el sistema de alta afinidad de adquisición de hierro (*FET3/FTR1*) estaría activo en las primeras horas de depleción de Yfh1p y constituye un indicio inequívoco de la activación del regulón de hierro vía Aft1p.

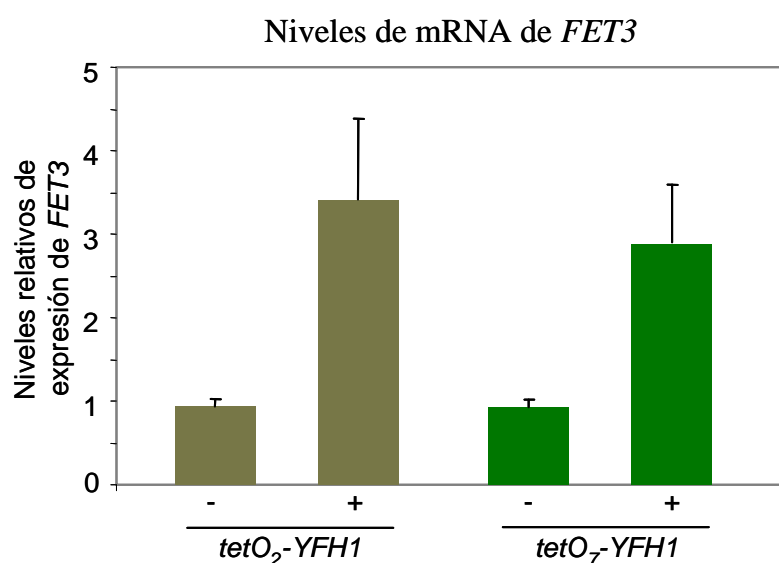


Figura 27. Cuantificación de los niveles del transcrito de *FET3* en los mutantes condicionales—Para evaluar la evolución de *FET3* en los mutantes *tetO₂* y *tetO₇-YFH1*, se utilizaron células cultivadas en YPG y tratadas con doxiciclina durante 4 horas. La determinación se realizó empleando la técnica qRT-PCR. Se encontró que los niveles de mRNA de *FET3* se hallaban significativamente elevados en ambos mutantes. Los valores representados expresan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para validar los resultados obtenidos por *qRT-PCR*, se decidió emplear una metodología alternativa. En este caso se utilizó un plásmido multicopia para medir la actividad LacZ acoplada al promotor del gen *FET3* (*FET3p-LacZ*), el cual serviría como reportero. Este método ya ha sido utilizado previamente para mostrar que mutaciones en algunos genes relacionados con la síntesis de centros Fe-S (*NFS1*, *ISU1* y *GSH2*) provocan la activación del regulón de hierro. Dicha activación ha sido medida indirectamente como un incremento en la actividad del promotor de *FET3-LacZ* (Kumánovics, et al., 2008). Como se muestra en la figura 28, en la cepa *tetO₇-YFH* existe incremento significativo de la actividad *FET3-LacZ* a tiempos muy cortos. Durante las primeras 2 horas de tratamiento con doxiciclina se puede observar un aumento importante de la actividad de dicho promotor. Por tanto, esta tecnología

permitió validar de forma concluyente la activación de *FET3* obtenida con la medida del transcrito

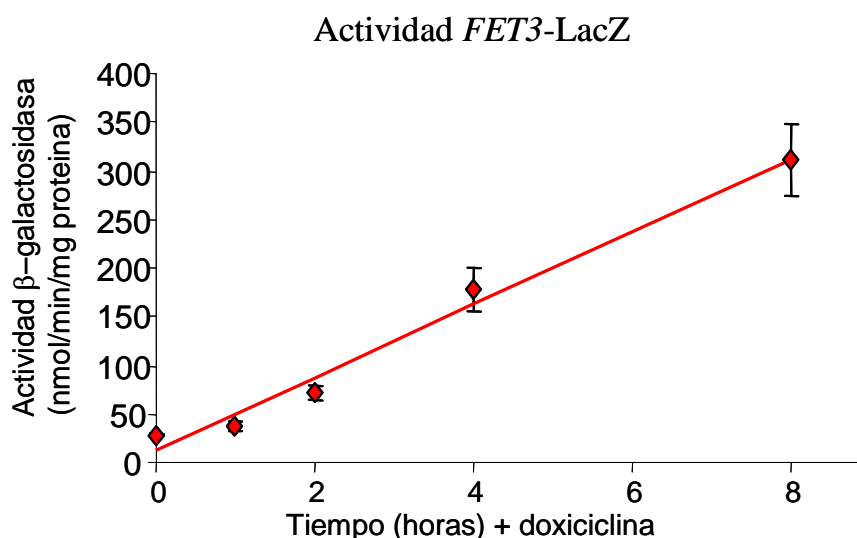


Figura 28. Cuantificación de la actividad LacZ de *FET3*—Esta actividad se midió en extractos proteicos provenientes de células del mutante *tetO₇-YFH1* crecidas en SC-Glicerol. El ensayo de actividad se realizó en placas de 96 pozos. Se compararon células tratadas con doxiciclina con otras sin tratamiento, estas últimas se emplearon como control del nivel basal del promotor. Se observó un incremento significativo de la actividad del promotor durante el desarrollo de la determinación. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Cabe destacar la importancia de este hallazgo relacionado con la activación del regulón de hierro, debido a que como se podrá observar en apartados posteriores, éste hecho constituye uno de los eventos primarios a la falta de Yfh1p.

3.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE CONDICIONAL FRENTE A LA DEPLECIÓN DE Yfh1p

Otra confirmación de que efectivamente el sistema de alta afinidad de adquisición de hierro se encontraba activo se obtuvo cuando se evaluó la expresión global de genes en la cepa mutante *tetO₇-YFH1* tratada con doxiciclina. La evaluación de la expresión génica se realizó mediante microarrays siguiendo un protocolo estándar (Viladevall, et al., 2004). Se encontró que la depleción de Yfh1p en las células tratadas durante 10 horas con doxiciclina, provocaba la inducción de un conjunto de 7 genes directamente relacionados con la adquisición de hierro y cobre (Tabla 8). Estos genes pertenecen al denominado regulón de hierro y se conoce que su expresión se haya directamente bajo el control transcripcional de Aft1p (Kaplan and Kaplan, 2009). Al evaluar estos genes, se encontró que presentaron un nivel de inducción de al menos 2 veces comparado con la cepa sin tratamiento (Tabla 8). Este resultado confirma con mayor fuerza la activación observada con el análisis de los niveles de mRNA y actividad LacZ de

FET3 mostrados en la sección anterior y es la prueba definitiva de que ambos genes *FET3/FTR1*, quienes conforman el sistema de alta afinidad, se encontraban claramente inducidos.

Tabla 8. Genes implicados en el metabolismo del hierro y cobre que responden directamente a Aft1p y que se encontraron “up-regulados” en el mutante *tetO₇-YFH1* tratado 10 horas con doxiciclina.

Gen	Inducción	Función ^ψ
<i>FTR1</i>	3,10 ± 0,57	Permeasa de hierro de alta afinidad implicada en el transporte del hierro a través de la membrana plasmática. Forma un complejo con Fet3p. Su expresión es regulada por los niveles de hierro.
<i>FET3</i>	3,70 ± 0,42	Oxidoreductasa dependiente de O ₂ necesaria para la asimilación de hierro a través del sistema de alta afinidad. Esta implicada en la resistencia frente a la toxicidad por cobre. Pertenece a la familia de las multicobreoxygenasas integrales de membrana
<i>FIT2</i>	2,10 ± 0,85	Manoproteína incorporada a la pared de la levadura a través de un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esta implicada en la fijación de los complejos sideróforo-hierro en la pared celular
<i>GGC1</i>	2,80 ± 1,13	Transportador GTP/GDP de la mitocondria, es esencial para el mantenimiento del genoma mitocondrial, esta implicado en el transporte de hierro; es miembro de la familia de transportadores mitocondriales
<i>SIT1</i>	2,50 ± 0,42	Transportador de ferrioxamina B. Es miembro de la familia de los transportadores ARN que reconocen específicamente los complejos sideróforo-hierro; la transcripción de este gen es inducida durante la privación de hierro y la transición a la fase diauxica. Es posiblemente diana de fosforilación de Cdc28p
<i>FRE1</i>	2,50 ± 0,71	Reductasa de hierro/cobre, encargada de reducir el hierro quelado por los Sideróforos y oxidar el cobre en un paso previo a su incorporación a través de los transportadores; su expresión es inducida por niveles bajos de hierro y cobre
<i>FRE7</i>	2,05 ± 0,07	Putativa ferrireductasa similar a Fre2p; su expresión es inducida por niveles bajos de cobre

^ψ Función de los genes según base de datos: www.yeastgenome.org

3.4. EVALUACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE Yfh1p

Como ya se ha mencionado, el análisis de los resultados obtenidos hasta esta sección demostró que uno de los efectos primarios de la falta de Yfh1p es la activación del regulón de hierro. Dicha activación en este mutante se estaría produciendo a través de un mecanismo aún por definir y que además, como se verá en el apartado siguiente, difiere del mecanismo canónico de activación dependiente de la síntesis de Fe-S. Se decidió evaluar una hipótesis planteada recientemente como una vía para explicar la activación del regulón de hierro. Varios trabajos han descrito la existencia de un pool de frataxina extramitocondrial en distintos tipos celulares (Acquaviva, et al., 2005; Condò, et al., 2006). Otro trabajo publicado ha mostrado una forma citosólica de frataxina que cumple una función en la regulación de la forma citosólica de aconitasa en mamíferos (IRP1). Frataxina estaría implicada en el mantenimiento del centro Fe-S de aconitasa en su forma 4Fe-4S. En ausencia de frataxina, se

vería afectado dicho centro 4Fe-4S convirtiéndose en 3Fe-4S, lo que provocaría la activación de la forma IRP de aconitasa (Condò, et al., 2010). Para investigar la posibilidad de que una regulación de este tipo estuviera ocurriendo con Aft1 en nuestro modelo, se decidió en primer lugar investigar la posible existencia de una forma extramitocondrial de Yfh1. Para este propósito, se realizó el fraccionamiento subcelular de la cepa BQS204 (descrito en materiales y métodos). Dicha cepa expresa una versión de Yfh1p marcada con el epítipo HA. Se analizó mediante *western blot* la existencia de Yfh1p-HA en las fracciones mitocondrial y citosólica empleando anticuerpos específicos anti-HA. Se utilizaron como marcadores mitocondriales las proteínas Hsp60p y Por1p, para excluir cualquier contaminación mitocondrial del citosol. Mientras que gliceraldehido 3P-deshidrogenasa sirvió como marcador citosólico. Como se puede observar en la figura 29A, sólo se observó la presencia de una forma mitocondrial de Yfh1p. Sin embargo, este hallazgo no excluiría la posibilidad de que la fracción citosólica de la proteína fuese tan minoritaria que estuviera por debajo del rango de detección de un *western blot* convencional. Para excluir esta posibilidad se recurrió a una columna de anticuerpos HA unidos a una matriz magnética (MACS, *Miltenyi Biotec*), para inmunoprecipitar la proteína marcada con HA. Esta tecnología permitió enriquecer ambas fracciones e incrementar la sensibilidad del ensayo de inmunodetección. Una vez más, como se puede observar en la figura 29B, sólo se encontró una forma mitocondrial de la proteína. Este hecho excluiría la posibilidad de la existencia de una forma citosólica de la proteína, al menos en nuestras condiciones experimentales.

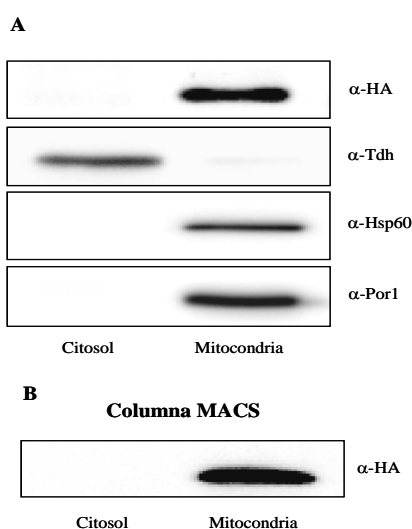


Figura 29. Evaluación de la localización subcelular de Yfh1p—A, Se prepararon fracciones subcelulares de citosol y mitocondrias de la cepa BQS204 crecida en YPG. Se realizó la separación por SDS-PAGE e inmunodetección de las proteínas señaladas. B, Se realizó la inmunoprecipitación de las fracciones citosólica y mitocondrial en una columna de matriz magnética MACS. Los eluidos provenientes de la columna se separaron por SDS-PAGE y se inmunodetectaron empleando anticuerpos específicos anti-HA.

Como se ha podido observar en los resultados obtenidos en este apartado, no parecería probable, al menos en estas condiciones experimentales, la existencia de una forma citosólica de Yfh1p. Este hecho excluiría la posibilidad de una regulación directa de Aft1p por frataxina en la levadura. Este resultado coincide con lo descrito por otros autores anteriormente, quienes ya han cuestionado la existencia de una forma extra-mitocondrial de esta proteína (Schmucker, et al., 2008).

3.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Yfh1p EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Fe/S

Para evaluar el efecto de la depleción de Yfh1 en la síntesis de los centros Fe/S, se decidió utilizar como marcadores del funcionamiento de este proceso dos importantes enzimas Fe/S mitocondriales que fueron: aconitasa y succinato deshidrogenasa. Se midieron las actividades de ambas enzimas mediante métodos espectrofotométricos. Como ya se había mencionado anteriormente se utilizó el mutante *tetO₂-YFH1* para evaluar el efecto de la depleción de la proteína durante las primeras 24 horas de tratamiento (0, 4, 8, 14 y 24 horas). Mientras que con el mutante *tetO₇-YFH1* se evaluaron los efectos más tardíos de dicha depleción (0, 8, 14, 24, 48, 72 horas). Al monitorizar la actividad de aconitasa, se encontró que ésta se mantuvo estable durante las primeras horas de tratamiento con doxiciclina en ambos mutantes (figuras 30A y 30B señalada con (*), rombos verdes). Tampoco se observaron cambios significativos en la expresión de aconitasa, al evaluar los niveles de proteína por *western blot*. Al observar el comportamiento de succinato deshidrogenasa, se encontró que al igual que para aconitasa, la enzima no presentó una significativa disminución de la actividad durante las primeras 24 horas del tratamiento con doxiciclina en ambos mutantes (Figura 30A y 30B, rombos rojos).

Posteriormente se procedió a evaluar el comportamiento de ambas enzimas en el mutante *tetO₇-YFH1* sometido a un tratamiento con doxiciclina más prolongado (72 horas). Se pudo entonces observar una disminución significativa de la actividad de ambas enzimas (Figura 30B). Paralelamente a las actividades, se determinó el contenido de cada una de estas proteínas mediante *western blot*. Como se puede observar en la parte izquierda de la figura 30B, se produce una disminución progresiva de la cantidad de aconitasa a partir de las 24 horas de tratamiento. También se observa que succinato deshidrogenasa a las 48 horas presentó unos niveles de proteína prácticamente indetectables (Figura 30B, derecha del panel). Se utilizó la cuantificación de porina como un control general del contenido mitocondrial. No se encontraron cambios significativos en este marcador durante los tiempos

de tratamiento con doxiciclina. Es importante destacar que la disminución en la cantidad específica de ambas proteínas se correlaciona bien con la pérdida de actividad enzimática observada.

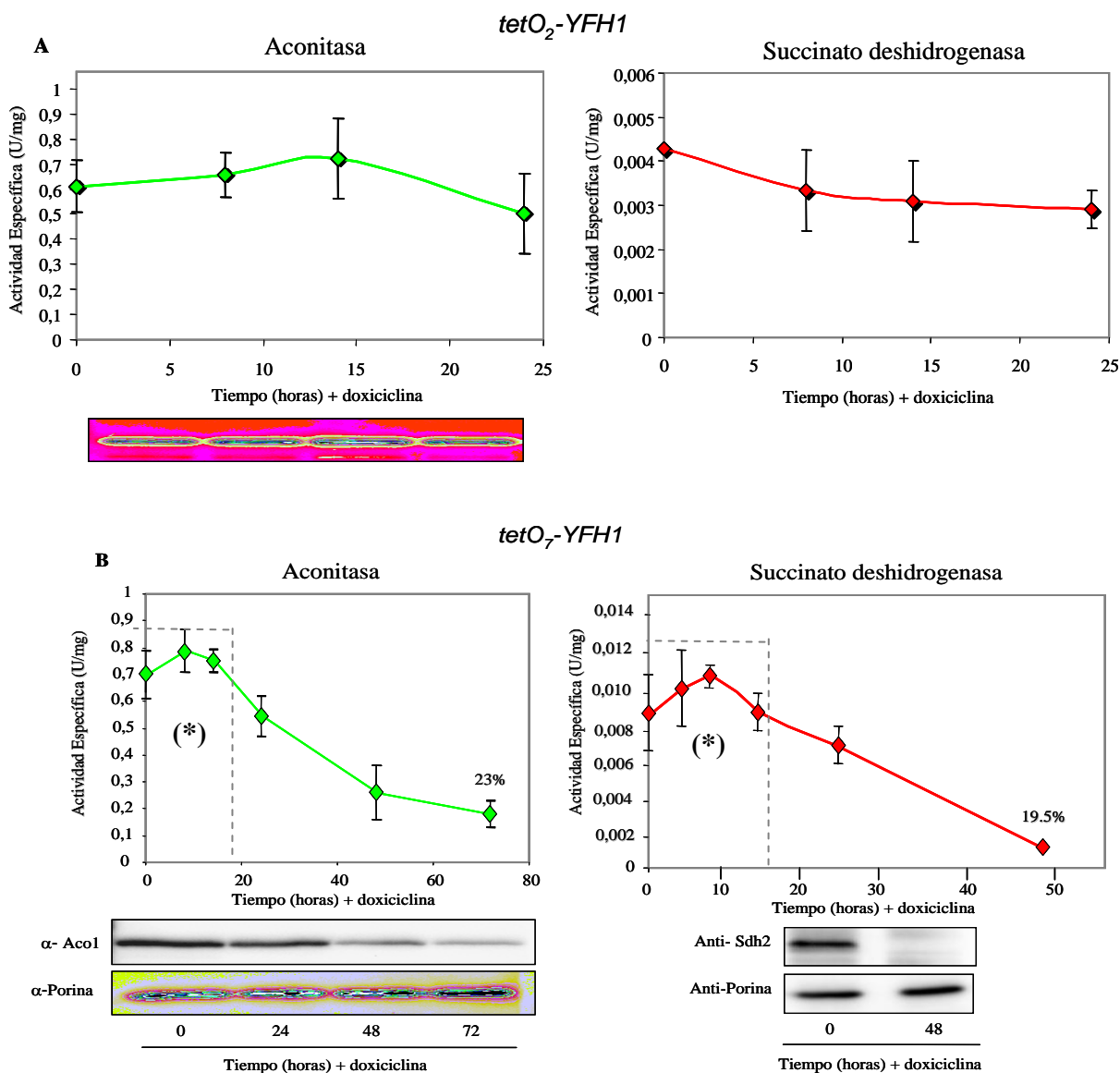


Figura 30. Evolución de las proteínas con centros Fe/S en los mutantes condicionales *tetO₂* y *tetO₇-Yfh1*— Se evaluaron las actividades y los niveles de proteína de las enzimas aconitasa (línea verde) y succinato deshidrogenasa (línea roja) en ambos mutantes. Se evaluó el mutante *tetO₂-YFH1* durante las primeras 24 horas de tratamiento con doxiciclina (A). En estas primeras horas no se observaron diferencias importantes en estas dos enzimas Fe/S. También se realizó la evaluación de ambas enzimas en el mutante *tetO₇-YFH1* durante un periodo de hasta 72 horas (B). (*) No se observó un cambio significativo en estas primeras horas. Se obtuvo una disminución significativa tanto en actividad como en contenido de ambas enzimas a tiempos más largos de tratamiento. Se utilizó porina (Por1) como control del contenido de mitocondrias. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección. Los resultados están expresados como medias \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Este efecto sobre aconitasa observado en el mutante condicional *tetO₇-YFH1* ya había sido descrito en un estudio previo en el que se evaluó un mutante condicional de Yfh1p empleando

un promotor *MET*. Se describió que la depleción de Yfh1p en este mutante, inducía una pérdida en la actividad de aconitasa que se acompañaba de una significativa disminución en el contenido de la enzima (Chen, et al., 2002). En este caso, sin embargo, no se analizaban los tiempos iniciales.

3.6. LA INACTIVACIÓN DE ACONITASA SE PRODUCE A TRAVÉS DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE HIERRO

Los resultados obtenidos hasta esta sección indican que el mutante condicional *YFHI* presenta un incremento en los niveles de hierro que ocurre en paralelo con la depleción de Yfh1p. Además, ha quedado demostrado que este incremento en la adquisición de hierro es una respuesta de la célula mediada por Aft1p. Sin embargo, esta activación ocurre desde las primeras horas de la depleción de Yfh1p sin que aún exista una afectación de aconitasa. La pérdida de actividad aconitasa se observa en este mutante más allá de las 24 horas de tratamiento. Lo cual, sugiere que esta falla en esta enzima sería el resultado de una serie de eventos secundarios inducidos por la falta de Yfh1p. Se decidió evaluar el posible papel de la sobrecarga de hierro en esta inactivación. *MRS3/4* son genes que codifican para dos proteínas mediadoras en el transporte de los átomos de Fe^{2+} a través del espacio intermembrana mitocondrial. Estos transportadores son redundantes y funcionan en condiciones de bajo contenido de hierro citosólico, por lo tanto son de alta afinidad. Se sabe que el transportador *MRS4* juega un papel importante en la sobrecarga de hierro mitocondrial observada en el mutante deficiente en frataxina (Foury and Roganti, 2002). Se decidió evaluar si la sobrecarga de hierro en la mitocondria, con los efectos pro-oxidantes que este metal induce, estaría contribuyendo al déficit de aconitasa. De este modo se conseguiría relacionar la desregulación del metabolismo del hierro con la inactivación de aconitasa. Para esto se sobreexpresó el transportador *MRS4* en la cepa salvaje *W303* empleando un plásmido multicopia que expresa una versión de *MRS4* marcada con el tag *FLAG* y bajo un promotor *tetO* regulable por doxiciclina. Se obtuvieron células transformadas con *MRS4-FLAG* y con el vector vacío, las cuales se evaluaron antes y después de tratarlas con doxiciclina. Adicionalmente se realizó la inmunodetección de las proteínas Aco1p, Por1p y Mrs4p-*FLAG* empleando anticuerpos específicos. Como se puede observar en la figura 31A, las células transformadas con el plásmido *MRS4-FLAG* presentan un descenso significativo de la actividad aconitasa (50%), cuando se comparan con la cepa transformada con el vector vacío. Este efecto es totalmente revertido cuando se tratan las células con 2 μ g/ml doxiciclina. La figura 31B muestra los

niveles de Mrs4p-FLAG y como se puede observar, la señal de la proteína es indetectable después del tratamiento con doxiciclina. Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión de aconitasa y porina en estas células.

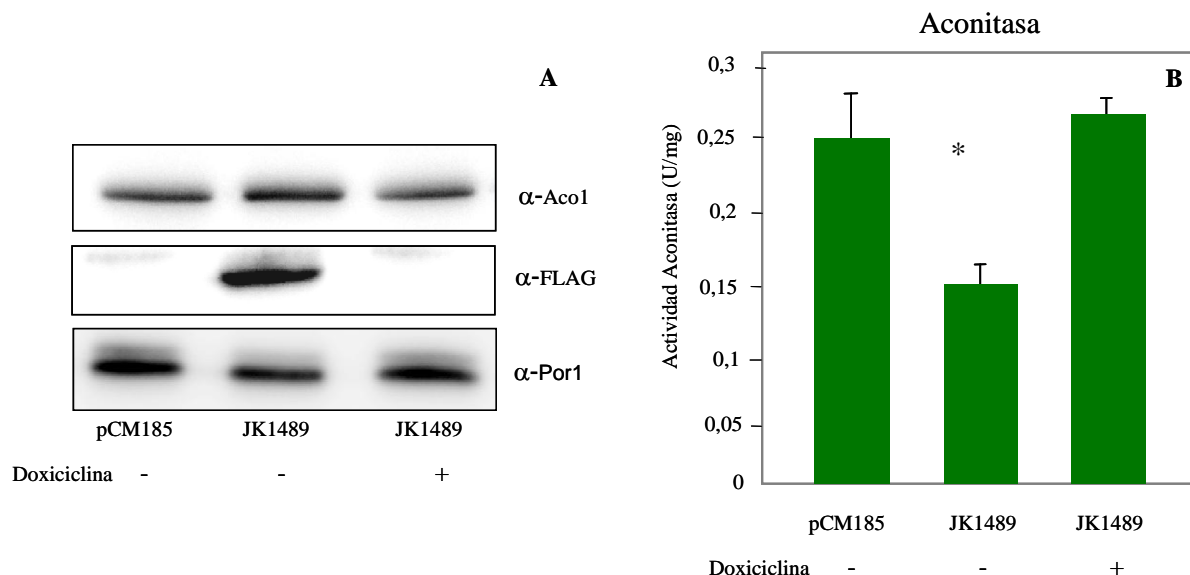


Figura 31. La sobreexpresión de Mrs4p promueve la inactivación de aconitasa—se transformó la cepa salvaje W303 con el plásmido JK1489 que contiene el gen *MRS4* marcado con el tag FLAG en el extremo c-terminal. También se transformó con el vector vacío pCM185. Estas células se cultivaron en medio SC-glucosa con y sin tratamiento con doxiciclina. A, Se realizó la inmunodetección de aconitasa, Mrs4-FLAG y porina, empleando anticuerpos específicos. Se cargaron 15 μ g de proteínas totales en cada carril. Se realizó la comprobación de la cantidad de proteínas cargadas en el gel, tiñendo la membrana de PVDF con Coomassie blue al finalizar la inmunodetección. B, Se midió la actividad aconitasa en extractos totales. Se encontró una disminución significativa de la actividad de esta enzima en la cepa que sobreexpresa Mrs4 (* $p < 0.05$). Los datos representan la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

En este punto, haciendo una breve sinopsis de los datos obtenidos hasta esta sección, se ha podido observar que la inactivación de las enzimas Fe-S se produce a tiempos largos. Estos datos indican que la depleción de Yfh1p estaría provocando, como consecuencias inmediatas, la activación del regulón de hierro (vía Fet3p/Ftr1p) y que este proceso estaría ocurriendo de una manera independiente del status de la síntesis de centros Fe-S.

En las secciones posteriores se detallarán los acontecimientos que ocurren posteriormente a la depleción de Yfh1 y a la activación del regulón. Entre los aspectos más resaltantes que se abordarán merece una mención distinguida los relacionados con las enzimas SOD, debido al importante papel que cumplen estas enzimas en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno en la célula.

4. CAPITULO 4: ANALISIS DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Yfh1p SOBRE LAS ENZIMAS SOD: IMPLICACIÓN EN EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL EFECTO SOBRE ACONITASA

4.1. LA DEPLECIÓN DE Yfh1p ESTA RELACIONADA CON UNA INDUCCIÓN DE LAS ENZIMAS SOD Y UNA SUBSIGUIENTE PÉRDIDA DE ACTIVIDAD DE AMBAS ENZIMAS

Experimentos realizados en el grupo han demostrado que la cepa deficiente en el gen *YFHI* muestra una significativa deficiencia de actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) (Irazusta, et al., 2006). Además esta inactivación se encuentra íntimamente relacionada con un incremento significativo del estrés oxidativo en este mutante (Irazusta, et al., 2006; Irazusta, et al., 2010). Este hecho despertó gran interés en el grupo debido a que se desconocían los mecanismos moleculares implicados en la disminución de la actividad de estas enzimas. Para profundizar en estas observaciones, el primer paso consistió en verificar el estado de ambas enzimas en los mutantes. Por un lado, se realizó la cuantificación de los niveles de proteínas por *western blot*. Las células se cultivaron en medio YPG con y sin tratamiento con doxiciclina a diferentes tiempos, finalmente se recolectaron las levaduras. Por otro lado, se midió en ambos mutantes condicionales la actividad de Cu/Zn-SOD y Mn-SOD empleando zimogramas de geles nativos teñidos. Una vez más se empleó el mutante *tetO₂-YFHI* para evaluar la evolución de las enzimas SOD a tiempos cortos. Mientras que tomamos ventaja de *tetO₇-YFHI* para realizar las observaciones a tiempos más prolongados. Como se puede observar en las figuras 32C y D, al evaluar el contenido de ambas enzimas se observa una significativa inducción tanto de Cu/Zn-SOD como de Mn-SOD. Este comportamiento es similar en ambos mutantes durante las primeras 24 horas. Sin embargo, al evaluar la actividad de estas enzimas se observaron comportamientos distintos. En el mutante *tetO₂-YFHI* no se producía un efecto significativo en la actividad durante las primeras 24 horas. Sin embargo, una estimación de la actividad específica, representada por una relación entre la actividad y el nivel de inducción observados, permite deducir que una fracción de estas enzimas está inactiva (Figura 32A). Por otro lado, al evaluar los efectos de la depleción de *YFHI* en el mutante *tetO₇-YFHI* a tiempos mas prolongados, se observó que la actividad Cu-Zn-SOD presentó inicialmente un incremento moderado, aunque luego los niveles disminuyeron progresivamente (32B). Del mismo modo que en el anterior, al observar la evolución de la actividad específica de esta enzima, se observa que esta se halla significativamente disminuida. El comportamiento de Mn-SOD resulta aún más interesante debido a que en esta enzima se aprecia una disminución importante de la actividad a partir de las 24 horas. Dicha actividad es un 25% de la actividad inicial pasadas 72 horas de tratamiento con doxiciclina. Adicionalmente, al calcular la actividad específica de la enzima, como en los casos anteriores,

se puede apreciar una caída más dramática de la actividad, la cual se queda en un 15% del valor inicial después de 72 horas (Figura 33).

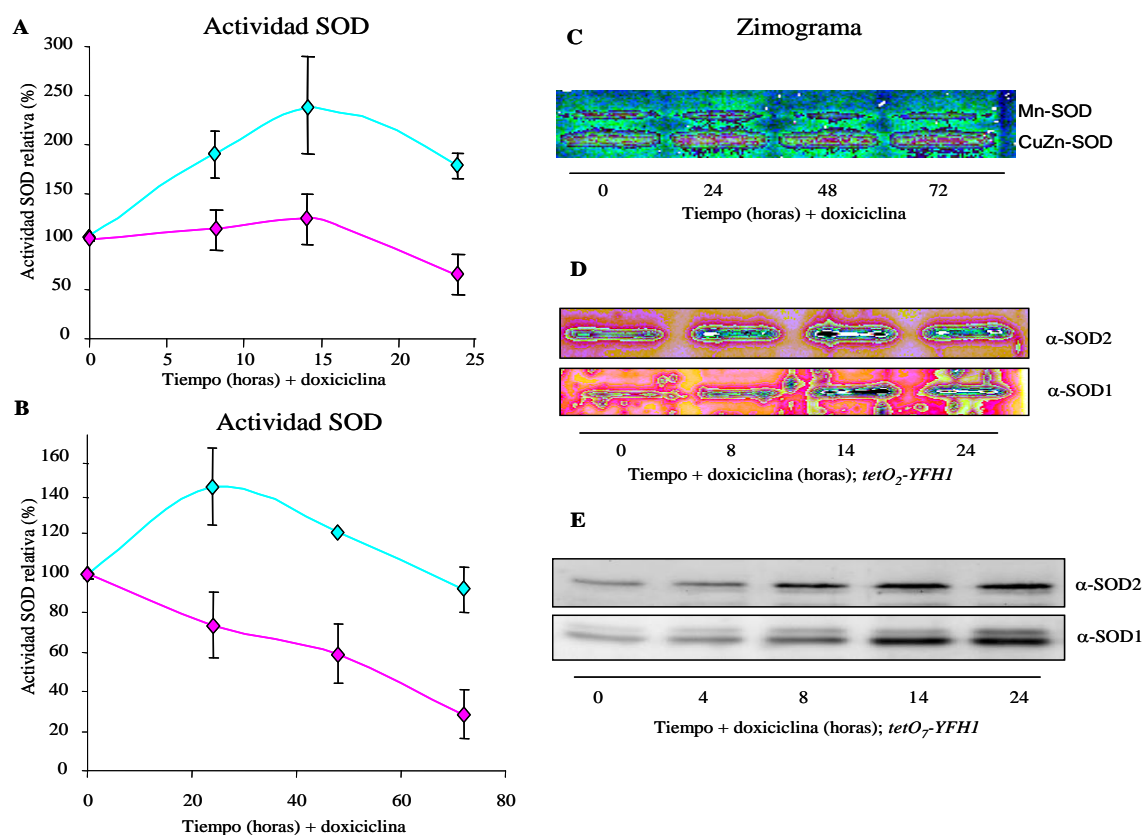


Figura 32. Evolución de la actividad superóxido dismutasa en los mutantes condicionales—Estas actividades se analizaron en los mutantes *tetO₂* y *tetO₇-YFH1* mediante zimograma a diferentes tiempos de tratamiento con doxiciclina. El valor relativo de actividad (A y B) se obtuvo mediante densitometría de los zimogramas (mostrado en C). Para la cuantificación se empleó la actividad a tiempo 0 como referencia del 100% de actividad. D y E, análisis por *western blot* de Sod1p y Sod2p provenientes de extractos celulares totales. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección. Los resultados están expresados como medias \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

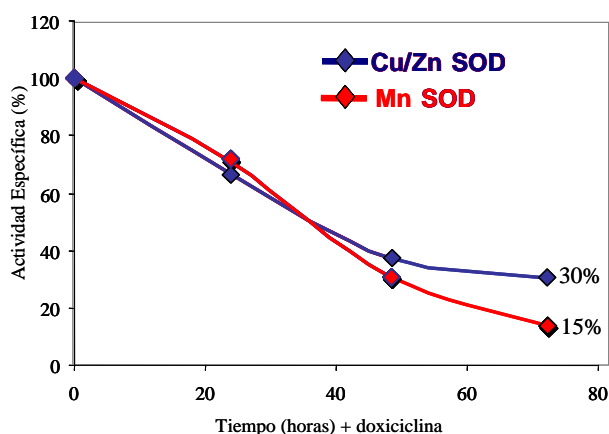


Figura 33. Estimación de la actividad específica superóxido dismutasa—El gráfico representa la relación entre la actividad relativa obtenida mediante zimograma y la cantidad relativa de proteína analizada mediante *western blot* a diferentes tiempos de tratamiento en el mutante *tetO₇-YFH1*. Tanto para el zimograma como para el análisis por *western blot* se empleó como referencia para el valor relativo de 100% el correspondiente al tiempo 0 de tratamiento con doxiciclina.

4.2. EVALUACION DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA INACTIVACIÓN DE Mn-SOD

Como se ha podido observar en el apartado anterior, la pérdida de actividad SOD en el mutante condicional constituye uno de los hallazgos más relevantes, ya que este hecho permitiría entender mejor el fenotipo observado en este mutante. En este sentido, esta pérdida de actividad pudiera explicarse a través de diferentes mecanismos que, como se podrá ver a lo largo de este trabajo, guardan estrecha relación entre sí. Para profundizar en uno de los posibles mecanismos involucrados se procedió a evaluar el efecto que podría estar ejerciendo el hierro en la actividad de las enzimas SOD. Tal como se ha discutido anteriormente, este mutante presenta un significativo incremento en los niveles de hierro intracelular al ser deplecionado de Yfh1p. Este incremento podría estar provocando un desequilibrio en el metabolismo de otros metales, específicamente manganeso y cobre que representan los principales cofactores de las enzimas Mn-SOD y Cu/Zn-SOD respectivamente. En este sentido, una de las posibles causas que explicarían un descenso de la actividad Mn-SOD sería un déficit del cofactor, tal como ya se había demostrado anteriormente con el mutante $\Delta yfh1$ (Irazusta, et al., 2006). Cabe destacar que en este punto se prestó especial atención a la Mn-SOD debido a su localización en la mitocondria, ya que como es conocido, es en este organelo donde se genera la mayor concentración de especies reactivas del oxígeno y donde se produce mayor acumulación de hierro en ausencia de Yfh1p. Para evaluar la internalización de manganeso por la levadura utilizamos el mutante *tetO₇-YFH1* con el fin de cuantificar el manganeso intracelular a diferentes tiempos de tratamiento con doxiciclina. Como se puede observar en la figura 34A, se encontró que durante las primeras 24 horas de tratamiento con el antibiótico, los niveles de manganeso se mantuvieron sin variaciones significativas. Es a partir de las 48 horas de tratamiento cuando se observa una disminución significativa (Figura 34A).

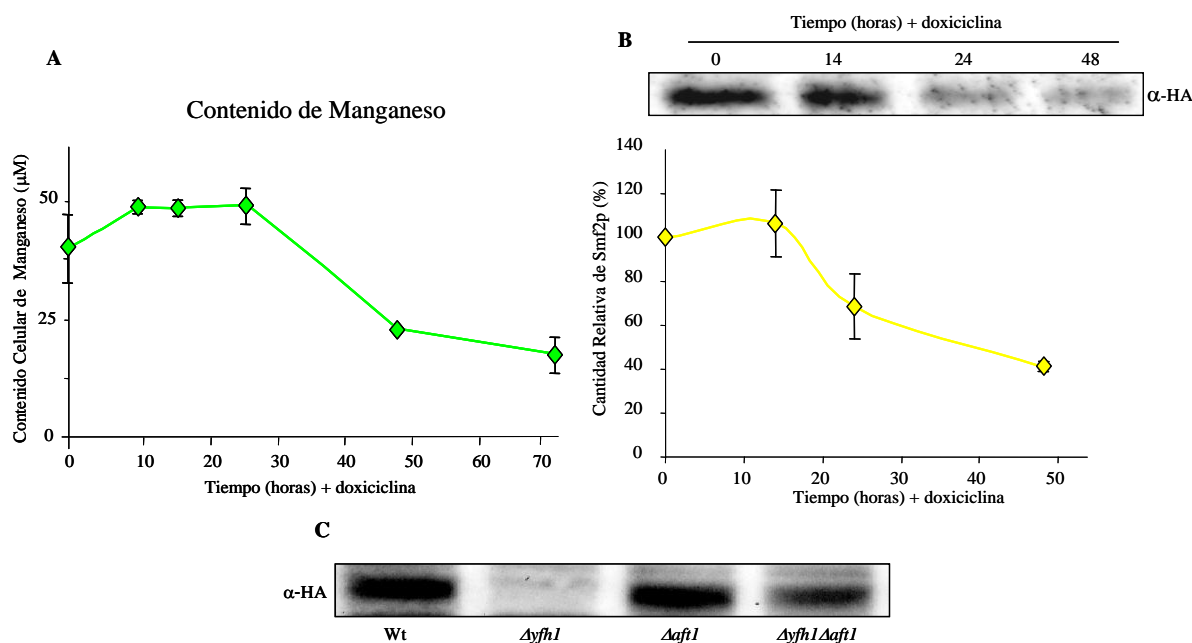


Figura 34. Evaluación del contenido de manganeso celular—Se evaluó la evolución de los niveles de manganeso celular en el mutante *tetO₇-YFH1*, grafico de rombos verdes (A). Las células fueron cultivadas en medio YPG con y sin la adición de doxiciclina durante los intervalos de tiempo indicados en las figuras. B, Cuantificación mediante *western blot* de los niveles del transportador de manganeso Smf2p-HA (rombos amarillos). C, Del mismo modo que el anterior, se compararon los niveles de la proteína entre la cepa salvaje y los mutantes simples *Δyfh1*, *Δaft1* y el doble mutante *Δyfh1Δaft1* (también marcadas con HA). En cada carril se cargaron 15 µg de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección. Los datos representan la media ± la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Como ya se ha mencionado anteriormente, nuestro interés se centró en conocer los mecanismos moleculares involucrados en esta disminución del contenido de manganeso. Una de las posibles explicaciones que se decidió investigar fue evaluar el status de Smf2p, el cual como se ha mencionado en apartados anteriores, es un transportador de membrana necesario para la internalización de manganeso en la levadura. Se procedió a evaluar los niveles de esta proteína mediante *western blot*. Para ello, se empleó una cepa derivada del mutante condicional *tetO₇-YFH1*, que expresa una versión de Smf2p marcada con el tag HA. Se encontró que los niveles de la proteína disminuían de manera significativa al tratar la cepa con doxiciclina durante 48 horas (Figura 34B). Además se encontró que esta disminución correlacionaba muy bien con la disminución de los niveles de manganeso celular observados en el experimento anterior.

Estos hallazgos relacionados con la bajada del manganeso en el mutante condicional, coinciden con lo ya publicado por el grupo en el mutante nulo *Δyfh1* (Irazusta, et al., 2006). Nuestra hipótesis es que sería el exceso de hierro observado en *tetO₇-YFH1* el responsable del

desequilibrio en el metabolismo del manganeso. Este desequilibrio se estaría produciendo a través de un efecto directo sobre el transportador Smf2p. Se decidió por tanto, verificar los niveles del transportador en una situación similar de acumulación de hierro ($\Delta yfh1$) y en otra donde se previniera esta acumulación ($\Delta yfh1 \Delta aft1$). Resultados previos publicados también por el grupo, indican que el doble mutante $\Delta yfh1 \Delta aft1$ no presenta acumulación de hierro (Irazusta, et al., 2008). También se empleó la cepa *wild type* para verificar los niveles fisiológicos de expresión de Smf2p en nuestras condiciones experimentales y la cepa $\Delta aft1$ como control de la expresión del transportador en este mutante. Como se puede observar en la figura 34C, se encontró que Smf2p se expresa a niveles muy bajos en el mutante $\Delta yfh1$ comparado con la cepa salvaje. Este hallazgo explicaría la disminución observada previamente en los niveles de manganeso de este mutante. Por otro lado, se puede observar que la delección de $\Delta aft1$ en la cepa $\Delta yfh1$ es capaz de rescatar casi totalmente el fenotipo asociado con Smf2p en el mutante $\Delta yfh1$. Este resultado es muy trascendente debido a que da mayor consistencia a lo observado en el mutante $tetO_7$ -YFH1 en la figura 34B y en conjunto indica que la acumulación de hierro está directamente implicada en la disminución de la expresión de Smf2p y en consecuencia de los niveles de manganeso.

4.3. INCREMENTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MUTANTE CONDICIONAL $tetO_7$ -YFH1

Como se ha observado en los capítulos anteriores la deficiencia de Yfh1p posterior al tratamiento con doxiciclina es acompañada de una serie de acontecimientos relevantes, como son, un incremento de los niveles de hierro y la inducción de las enzimas SOD que se acompaña de la subsiguiente pérdida de actividad de las mismas. Estos acontecimientos observados de manera global sugieren que en este mutante se estaría produciendo una pérdida de las defensas antioxidantes, lo cual se acompaña de un incremento del estrés oxidativo endógeno. Es lógico pensar que dicho estrés estaría afectando los diferentes componentes de la célula. Como ya se ha señalado, las proteínas constituyen unas de las dianas más sensibles a los efectos perjudiciales de dicho estrés, las cuales pueden sufrir modificaciones que en algunos casos pueden llegar a ser irreversibles y que derivarían en última instancia en la pérdida de la funcionalidad de dicha proteína y su degradación. En este sentido, la carbonilación de algunos aminoácidos de estas proteínas constituye una de las modificaciones irreversibles generadas por el incremento del estrés oxidativo. Además es un parámetro muy

utilizado en proteómica como indicador del daño oxidativo a las proteínas. Es por ello que se decidió evaluar el nivel de carbonilación en el mutante *tetO₇-YFH1* a diferentes tiempos de tratamiento con doxiciclina. Para cuantificar el nivel de carbonilación se empleó la detección mediante el reactivo 2,4-dinitrofenilhidazina como ya se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. Esta técnica permite realizar la detección de carbonilos de una forma razonablemente sencilla y con una reproducibilidad aceptable. Debido a esto es un procedimiento de referencia en nuestro grupo (Irazusta, et al., 2008; Reverter-Branchat, et al., 2004; Tamarit, et al., 1998) y ha sido utilizada por diferentes grupos de investigación para medir el daño oxidativo en las proteínas (Buss, et al., 1997; Davies, et al., 2001; Levine and R, 2006; Levine, 2006; Robinson, et al., 1999). Como se puede observar en la figura 35A, existe un incremento significativo del nivel de carbonilación en la cepa tratada con doxiciclina. Complementariamente, como se puede observar en la figura 35B, se presenta la cuantificación relativa obtenida a partir del oxi-blot. Esta cuantificación se obtuvo empleando el programa *Quantity one* (Bio-Rad). Como se puede apreciar el nivel de daño oxidativo inducido a las proteínas en este mutante se incrementa significativamente, alcanzando a las 72 horas un nivel de carbonilación que es aproximadamente 3 veces superior al valor de referencia.

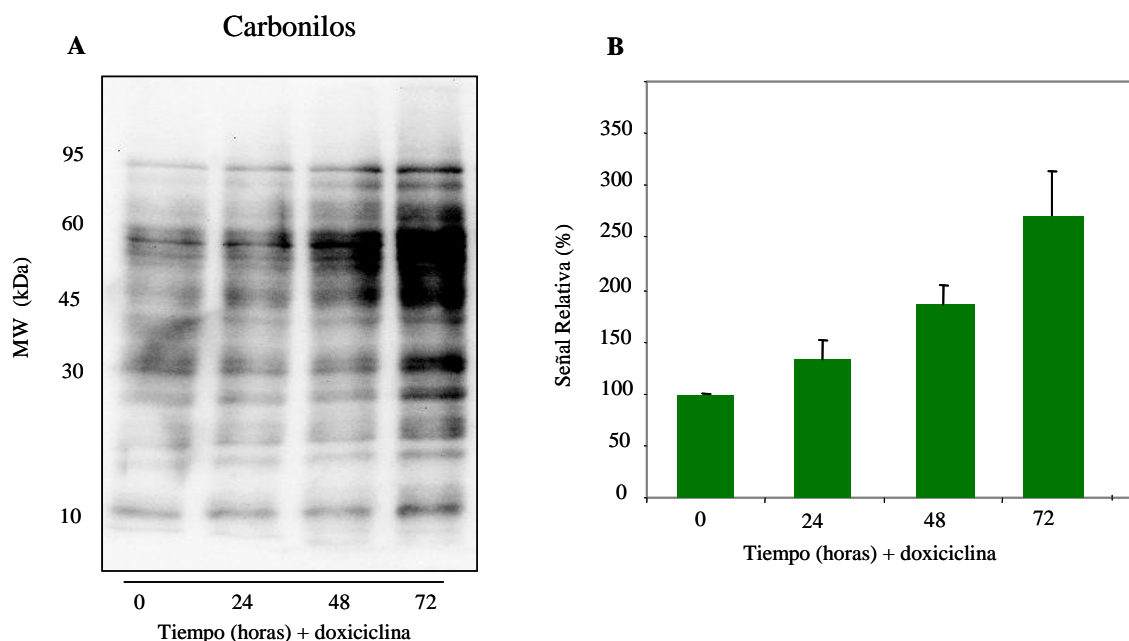


Figura 35. La depleción de Yfh1p se acompaña de un incremento del daño oxidativo—A, Detección de proteínas carboniladas en el mutante *tetO₇-YFH1* mediante western blot utilizando anticuerpos específicos anti-DNP. B, el nivel de carbonilación relativa se obtuvo al cuantificar la señal quimioluminiscente correspondiente a cada carril del *western blot*. Se asignó como valor de referencia de 100% a aquel correspondiente al tiempo 0 de tratamiento con doxiciclina. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

4.4. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON Mn EN LA ACTIVIDAD DE Mn-SOD Y ACONITASA

Se ha podido observar en los apartados anteriores que en el mutante condicional *tetO₇-YFH1* existe una disminución de la actividad Mn-SOD debido a un déficit del cofactor de la enzima. También se ha señalado que esta pérdida de la capacidad antioxidante provoca un incremento del daño oxidativo a proteínas vía carbonilación. Tomando en conjunto estas dos interesantes observaciones, es razonable pensar que este incremento sustancial del estrés pudiera explicar la inactivación de aconitasa y plantearía la posibilidad de que si de alguna forma se consigue recuperar la actividad de Mn-SOD, sería posible disminuir el nivel de estrés y prevenir esta pérdida de actividad estrés-dependiente de aconitasa. Para evaluar esta hipótesis se procedió a suplementar los cultivos de YPG, en los que crecen las células, con una dosis de 50 µg/ml de manganeso (Irazusta, et al., 2006). De este modo y de forma análoga a como se han realizado los experimentos anteriores, se obtuvieron células tratadas con doxiciclina y con doxiciclina y manganeso. Como se puede observar en la figura 36A cuando se suplementa el medio de cultivo con manganeso se previene significativamente la inactivación de Mn-SOD a las 48 horas de tratamiento. Este incremento de la actividad Mn-SOD en el medio suplementado es capaz de prevenir también parcialmente la inactivación de aconitasa, comparada con el nivel de actividad del cultivo tratado sólo con doxiciclina (Figura 36B).

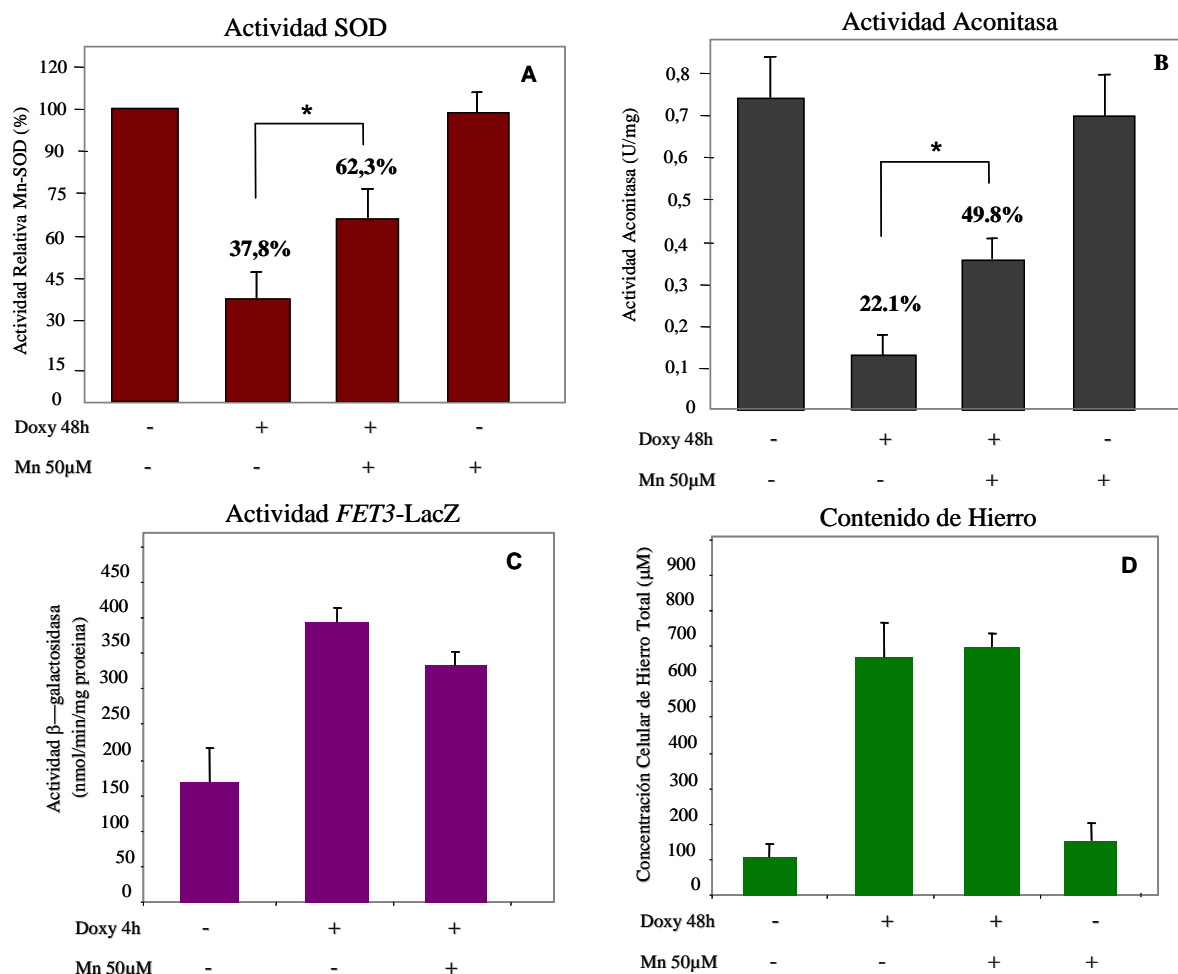


Figura 36. Efecto de la suplementación con manganeso en la actividad Mn-SOD y aconitasa—A, se evaluó la actividad Mn-SOD mediante zimogramas en geles nativos en células crecidas con doxiciclina y con doxiciclina y manganeso. B, evaluación del efecto de la recuperación de la actividad SOD sobre la actividad aconitasa (enzima Fe/S), * $p < 0,05$. C y D, controles del efecto de la adición de manganeso sobre el contenido de hierro y la actividad *FET3-LacZ* en el mutante condicional *tetO₇-YFH1*. Los resultados están expresados como medias \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Adicionalmente y con el fin de descartar cualquier efecto artefactual que pudiera estar produciendo el manganeso, se procedió a realizar dos tipos de controles. En primer lugar se evaluó el nivel de hierro en las células crecidas en las diferentes condiciones experimentales para descartar que un incremento de manganeso afectara de algún modo la adquisición de hierro. Como se puede observar en la figura 36C no se observan cambios significativos en el contenido de hierro entre las tratadas sólo con doxiciclina o aquellas tratadas con doxiciclina y manganeso. Por otro lado, como se muestra en la figura 36D, también se evaluó la actividad del promotor *FET3-LacZ* en las diferentes condiciones experimentales. Como en el caso anterior no se observó ningún efecto importante en esta actividad.

5. CAPITULO 5: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Yfh1p EN EL METABOLISMO DE LA LEVADURA Y SU REPERCUSION EN EL CRECIMIENTO DE LA CELULA

5.1. LA DEPLECIÓN DE Yfh1p INDUCE UN FALLO DE LA CAPACIDAD RESPIRATORIA EN LA LEVADURA

Como se ha podido observar, la disminución progresiva de la expresión de Yfh1p en la levadura desencadena una serie de efectos directamente relacionados con la capacidad oxidativa de la célula. Es conveniente resaltar que las células se cultivaron en un medio que requiere la utilización de la maquinaria mitocondrial oxidativa para obtener la energía necesaria para el crecimiento. Acontecimientos bien caracterizados como la pérdida de actividad aconitasa y succinato deshidrogenasa (esta última forma parte del complejo II de la cadena respiratoria) estarían apuntando inequívocamente en esta dirección. Para verificar esta hipótesis, se decidió evaluar la capacidad respiratoria del mutante condicional *tetO7-YFH1* tomando como referencia el consumo de oxígeno. Para esto se empleó el electrodo de Clark. Se evaluaron células crecidas en medio YPG durante un periodo de 48 horas. Se comparó el consumo de oxígeno de células tratadas con doxiciclina a diferentes tiempos con aquellas crecidas en ausencia del antibiótico. Como se puede observar en la figura 37A, el consumo de oxígeno permanece constante durante las primeras 14 horas de tratamiento con doxiciclina. A las 24 horas se puede verificar que se produce una significativa y progresiva pérdida de la capacidad respiratoria en estas células. Es interesante destacar que esta pérdida de la capacidad respiratoria se correlaciona con la pérdida de funcionalidad de las enzimas aconitasa y el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial y sugiere que ambos procesos estarían ocurriendo de forma paralela.

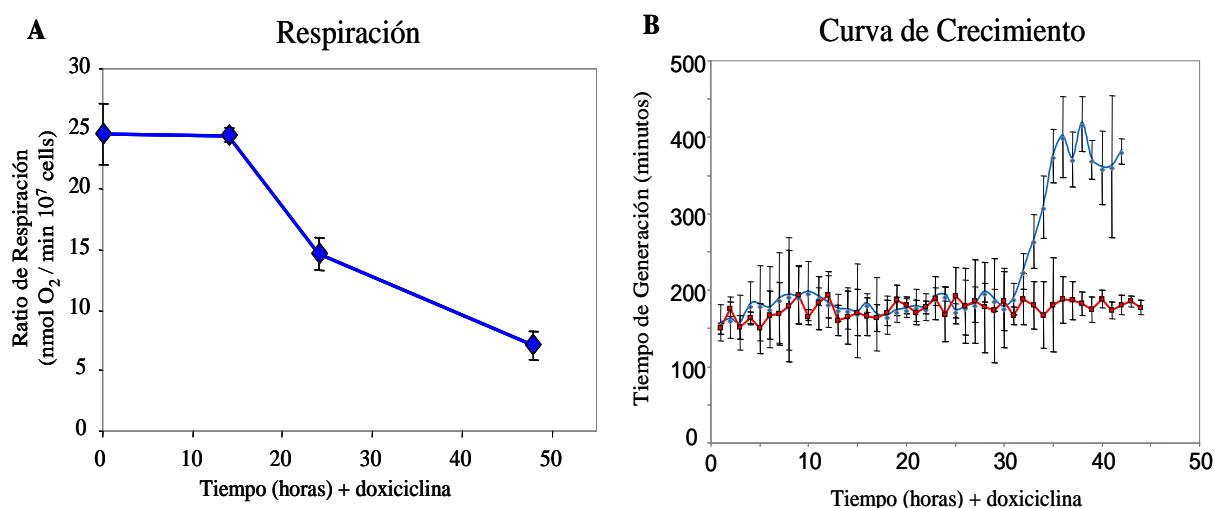


Figura 37. Pérdida de la capacidad respiratoria e incremento del tiempo de generación—A, medida del consumo de oxígeno en el mutante condicional durante un periodo de 48 horas de tratamiento con doxiciclina. Para obtener esta medida se empleó el electrodo de Clark. B, evaluación del tiempo de generación en placas de 24 pozos conteniendo 1 ml de medio YPG. Se comparó el crecimiento de la cepa sin tratamiento con doxiciclina versus la cepa tratada. El ensayo se monitorizó durante un intervalo de tiempo de 48 horas. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Seguidamente se decidió evaluar de qué forma esta pérdida de funcionalidad mitocondrial estaría influyendo en el crecimiento de las células en el medio YPG. Para ello se realizaron curvas de crecimiento de cultivos tratados y no tratados con doxiciclina en placas de 24 pozos, tal como se describe en el apartado de materiales y métodos. De forma similar al experimento anterior, las células se monitorizaron durante 48 horas. En la figura 37B se puede observar un incremento significativo del tiempo de generación de las células a las 30 horas de tratamiento. Este incremento coincide con la pérdida de actividad de las proteínas Fe/S y de la función respiratoria observada en el experimento anterior. Como se ha podido observar en este apartado, los acontecimientos descritos coinciden en la escala temporal de aparición, hecho que hace intuir que estarían interrelacionados y globalmente apuntan en la dirección de una afectación general de la capacidad respiratoria de las células.

5.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE *Saccharomyces cerevisiae* FRENTE A LA PERDIDA DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA

5.2.1. Análisis de proteínas cuya expresión se encontró disminuida

Los resultados presentados en la sección anterior apuntan a que las células deprivadas de frataxina presentan un fallo en la capacidad de utilizar la respiración para obtener energía. Basándonos en este hecho, es razonable pensar que de alguna forma la levadura debería activar mecanismos compensatorios para intentar revertir este fallo que afecta directamente el crecimiento del microorganismo en estas condiciones. En este sentido, durante el desarrollo de los experimentos relacionados con los zimogramas de actividad SOD, se encontró al evaluar los niveles de proteína total cargada en los geles nativos, que existía una banda que disminuía significativamente durante el tratamiento con doxiciclina. Se decidió investigar a que proteína o proteínas correspondía esta banda y ulteriormente conocer la posible explicación que justificara esta disminución. En la figura 38A, se puede observar la tinción con azul de Coomassie de las proteínas separadas en un gel nativo en condiciones control y tras 48 horas de tratamiento. También se presenta la cuantificación densitométrica de dicha banda durante una cinética de 72 horas. Como se puede observar se produce una disminución progresiva de la cantidad de esta banda que alcanza un valor de 31,9% del valor inicial en el punto de las 72 horas. Para esta cuantificación se empleó el punto de 0 horas como referencia de 100%.

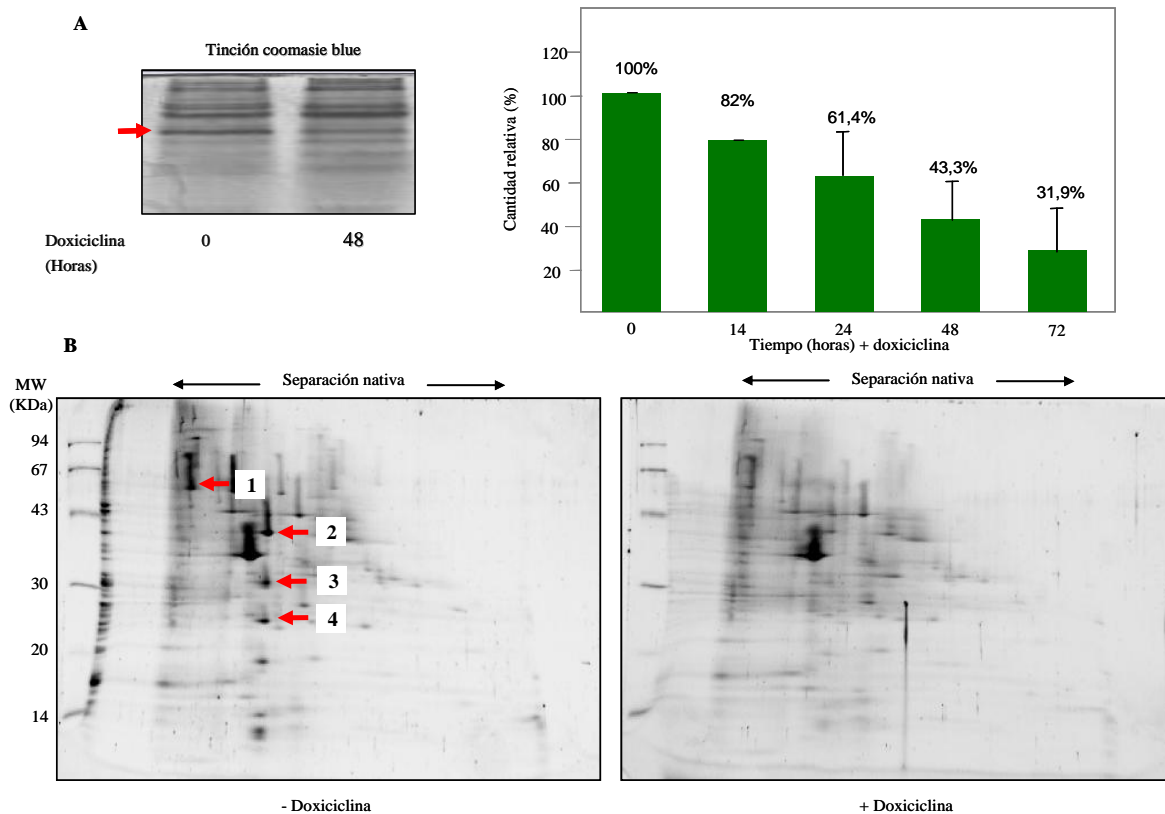


Figura 38. Análisis de proteínas cuya expresión disminuye en el mutante condicional—A, imagen de un gel nativo teñido con azul de Coomassie. Se analizó una banda cuya expresión se encontró significativamente disminuida a las 48 horas de tratamiento con doxiciclina. A la derecha del panel se muestra la cinética de cuantificación de dicha banda durante un tratamiento de 72 horas. B, Separación bidimensional de un extracto proteico de células del mutante *tetO₇-YFH1*. La primera dimensión se realizó en condiciones nativas, mientras que la segunda se realizó en condiciones desnaturalizantes. Se comparó un gel sin tratamiento (izquierda) con otro tratado con doxiciclina durante 24 horas (derecha). Los resultados están expresados como medias \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Para separar mejor las bandas localizadas en la 1D y así lograr diferenciar a que proteínas correspondía cada banda, se realizó un gel bidimensional en el que la separación de las proteínas se hizo primero en condiciones nativas y posteriormente por SDS-PAGE convencional. Como se puede observar en la figura 38B, se muestran dos gels teñidos con plata. Se comparó el gel de la izquierda proveniente de extractos de células sin tratamiento con doxiciclina, con el de la derecha que representa células tratadas con doxiciclina durante 24 horas. Señalizados con números se pueden observar un conjunto de proteínas que disminuyen de manera significativa su expresión en estas condiciones. Seguidamente se seleccionaron estos spots, se digirieron con tripsina y se procedió a realizar la identificación por huella de masas peptídicas, tras un análisis mediante MALDI-TOF. El spot n°1 corresponde a la enzima mitocondrial aldehído deshidrogenasa (Aldh4p). Esta es una enzima requerida para el crecimiento en etanol durante la fase diauxica y es reprimida por la glucosa (Navarro-Aviño, et al., 1999). Además también se identificaron los spots numerados como 2,

3 y 4, los cuales fueron identificados como diferentes formas de la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh2p) (Tabla 9). Esta enzima al igual que Aldh4, está relacionada con la utilización del etanol/glicerol y su expresión también es reprimida cuando la célula emplea la glucosa como única fuente de energía (Bennetzen and Hall, 1982; Young and Pilgrim, 1985).

Tabla 9. Proteínas identificadas por huella de masas peptídicas—Se indica el nombre de las proteínas identificadas, el gen, el o los spots correspondientes, el score obtenido al realizar la identificación en la base de datos y la cobertura de dicha identificación.

Proteína	Spot	Gen	Localización	MASCOT Score	Covertura
Aldehído deshidrogenasa	1	<i>ALD4</i>	Mitocondria	243	59,3
Alcohol deshidrogenasa	2	<i>ADH2</i>	Citosol	111	40,9
Alcohol deshidrogenasa	3	<i>ADH2</i>	Citosol	90	25
Alcohol deshidrogenasa	4	<i>ADH2</i>	Citosol	61	35,7

5.2.2. Estudio de la respuesta transcriptómica del mutante *tetO₇-YFH1*

Con el fin de analizar, si otros genes reprimibles por glucosa podían estar afectados en el mutante condicional *tetO₇-YFH1*, se realizó un análisis transcriptómico mediante microarrays de dicho mutante tratado con doxiciclina durante 10 horas. Dicho análisis reveló que existían 70 genes cuya expresión aumentaba mientras que existían 121 cuya expresión disminuía al menos a la mitad. Se decidió evaluar estos genes “down-regulados” e interesantemente, se encontró que 23 de los genes que apreciaban como reprimidos en este mutante coincidían con un grupo de 40 genes cuya expresión es fuertemente reprimida por glucosa (Young, et al., 2003) (Tabla 10). Además, el análisis mas detallado de estos genes mostró que 20 de los mismos coinciden con genes cuya expresión depende del regulador transcripcional *ADRI*, es decir, que en ausencia de *ADRI* dichos genes están fuertemente “down-regulados” (Young, et al., 2003). También se comparó la expresión de éstos con la correspondiente a otros factores de transcripción que también estarían implicados en la activación de dichos genes, como son *SNF1* y *CAT*. Sin embargo, este análisis mostró que la mayor coincidencia correspondía a *ADRI*. Estos resultados parecen indicar que existe una ruta metabólica relacionada con la utilización de fuentes de carbono no fermentables, como el etanol y el glicerol, claramente afectada. Resumiendo esta parte del trabajo, los resultados observados en esta sección parecen indicar que este mutante estaría señalizando una vía alternativa para tratar de prepararse para compensar un fallo en la capacidad respiratoria, promoviendo un cambio hacia un metabolismo más fermentativo. Es bastante probable que el incremento del tiempo de

generación observado en la figura 37B, sea el reflejo de la incapacidad de este mutante para sostener el crecimiento empleando la respiración como fuente de energía.

Tabla 10. Análisis de la expresión de los 40 genes que son mas fuertemente reprimidos por glucosa en *tetO₇-YFH1*—DR/R representa el ratio de expresión de los genes indicados en ausencia (DR) o presencia (R) de glucosa (Young, et al., 2003); YFH1-on/yfh1-off representa el ratio de expresión encontrado en el mutante *tetO₇-YFH1* no tratado con doxiciclina vs el tratado durante 10 horas. *ADR1/adr1* representa el ratio de expresión de dichos genes en ausencia o presencia de *ADR1*. En verde se muestran los genes que presentaron un cambio en el nivel de expresión mayor a 2 veces. De forma análoga, también se muestra la respuesta de estos genes en mutantes deficientes de los factores de transcripción *SNF1* y *CAT8*.

RF	Gene	DR/R	YFH1 on/yfh1 off	ADR1/adr1	SNF1/spf1	CAT8/cat8
YLR377C	FBP1	130	1,3	0,8	36	7,4
YKL217W	JEN1	98	3,4	3,3	28	2,1
YGR236C	SPG1	92	5,0	15	5	0,5
YKR097W	PCK1	92	1,5	1,4	180	3,6
YJR095W	SFC1	78	0,9	1,1	170	6,2
YIL057C	RGI2	77	4,0	16	8,9	0,8
YMR107W	SPG4	75	2,3	2,3	18	0,5
YCR010C	ADY2	72	5,6	20	32	9,3
YDR384C	ATO3	55	3,7	6,4	2	4,6
YPL276W	FDH2	50	8,0	64	5,1	1,8
YPR001W	CIT3	50	6,1	10	1,4	0,7
YGL205W	POX1	44	5,0	55	0,8	2,3
YPR002W	PDH1	44	2,0	2,1	1,1	1
YAL054C	ACS1	43	8,3	9	30	3,5
YOR388C	FDH1	35	10,0	52	4,6	1,8
YKL187C	YKL187C	34	0,8	2,7	6,2	3,2
YDR256C	CTA1	34	7,7	16	7,6	3,3
YKR009C	FOX2	33	3,1	16	2,4	1,5
YGR067C	YGR067C	33	1,7	0,9	39	7,1
YNL195C	YNL195C	29	2,7	3	7,7	0,8
YER065C	ICL1	28	1,4	0,4	77	20
YER024W	YAT2	26	2,4	0,6	5,6	2
YGR243W	FMP43	26	2,4	2,8	6,1	0,6
YAR035W	YAT1	25	1,9	0,9	7,4	1,5
YMR206W	YMR206W	25	2,4	1,2	5,9	1
YIL160C	POT1	22	4,3	14	1,5	0,4
YPR150W	YPR150W	22	3,3	4,3	2	1,3
YLR174W	IDP2	21	1,1	0,9	16	2,5
YLR126C	YLR126C	21	0,8	7,7	1,5	1
YBR050C	REG2	21	1,9	1,5	42	5
YEL008W	YEL008W	21	NS	1,1	7,5	1,5
YPR006C	ICL2	21	4,0	7	4	2,1
YHL032C	GUT1	20	3,3	2,4	6,8	2,3
YHR139C	SPS100	19	1,1	0,5	1	0,7
YPR151C	YPR151C	18	1,5	3,8	1,9	1,2
YLR267W	BOP2	17	3,4	0,4	0,9	0,1
YNR002C	FUN34	16	NA	1	1,3	0,6
YNL009W	IDP3	15	1,3	5	2	1,6
YNL013C	YNL013C	15	0,8	3	1,6	0,1
YER179W	DMC1	14	0,9	7	1,8	0,9

6. CAPITULO 6: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Grx5p EN EL MUTANTE CONDICIONAL *tetO₇-GRX5*: PAPEL DE Grx5p EN LA SINTESIS DE CENTROS Fe-S EN LA LEVADURA.

BUSQUEDA DE POSIBLES SUSTRATOS DE Grx5p.

6.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Grx5p SOBRE EL HIERRO CELULAR

La evaluación del mutante condicional *tetO7-GRX5* permitiría conocer si los efectos observados en el mutante condicional *tetO7-YFH1* se producían de forma específica en este mutante o si obedecían a una situación común a ambos mutantes. Para ello se decidió realizar un estudio comparativo. Como ya se ha mencionado anteriormente, esta proteína al igual que Yfh1p, se ha descrito como posible miembro de la maquinaria biosintética mitocondrial ISC. Es importante resaltar que esta glutaredoxina fue inicialmente descrita y caracterizada en este departamento por los grupos del Dr. Enric Herrero y Dr. Joaquim Ros (Rodríguez-Manzaneque, et al., 2002; Rodríguez-Manzaneque, et al., 1999). La cepa utilizada en este trabajo para desarrollar el estudio de *GRX5* fue gentilmente cedida por el Dr. E. Herrero (MML313, ver tabla 1). Dicha cepa es un mutante condicional *tetO7-GRX5* derivado de la cepa W303 al igual que el mutante condicional de *YFH1*.

Como una primera aproximación se procedió a medir el contenido celular de hierro de la cepa MML313 en una cinética de tratamiento con doxiciclina de 14 horas. En estudios previos se había analizado el comportamiento de esta cepa a tiempos mayores (Rodríguez-Manzaneque, et al., 2002). Como se puede observar en la figura 39A, se produce un incremento rápido de los niveles de hierro en esta cepa. Durante las primeras 4 horas la cepa ya presenta un incremento del 50% del contenido de hierro. Si se observa el intervalo correspondiente a las 14 horas se aprecia un incremento que sería de unas 3.7 veces del valor inicial. Seguidamente se evaluó la actividad del promotor del gen *FET3* acoplada a LacZ en las células del mutante MML313. Se observó que el tratamiento con doxiciclina durante 8 horas provocaba un significativo aumento en la actividad de este promotor cuando se comparaban estas células con la misma cepa sin tratar con doxiciclina (Figura 39C). Este hallazgo estaría indicando que el regulón de hierro estaría activo, lo cual está provocando un incremento en la expresión de los genes del sistema de alta afinidad de incorporación de hierro (*FET3/FTR1*). Así mismo, este resultado coincide con los resultados encontrados en el mutante condicional Yfh1 ya descritos en secciones anteriores.

Posteriormente se evaluaron los niveles de expresión de Grx5p durante el tratamiento con doxiciclina. Se encontró que durante las primeras 2 horas de tratamiento ya es posible observar que los niveles de la proteína son prácticamente indetectables. También se muestra

un *western blot* anti-porina como control del contenido general de mitocondrias. En este *western blot* no se observan cambios significativos en los niveles de porina (Figura 18B).

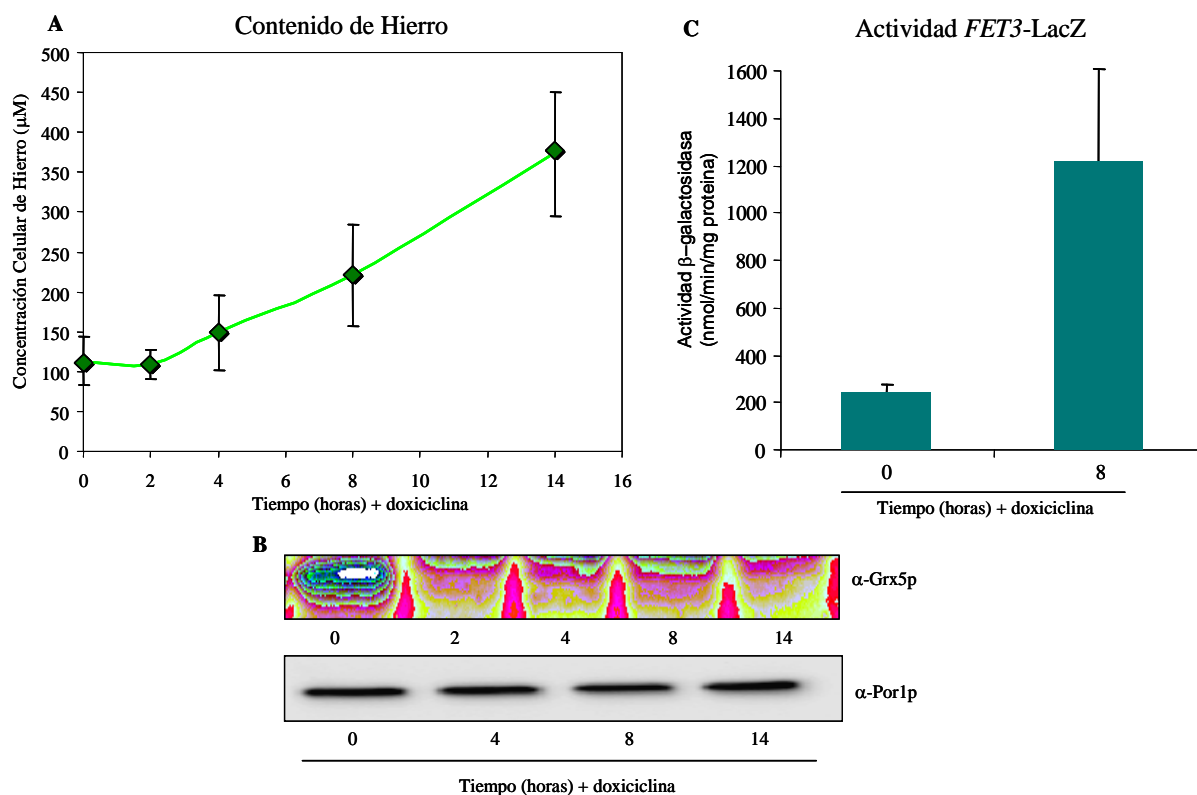


Figura 39. Incremento de los niveles de hierro en la cepa deficiente en Grx5p—A, incremento de los niveles de hierro en la cepa MML313 durante el tratamiento con doxiciclina por 14 horas. B, cuantificación del contenido de Grx5p mediante *western blot* en el que se utilizaron anticuerpos específicos contra esta proteína. Se observa una represión muy rápida de la proteína, ya que a las 2 horas de tratamiento con doxiciclina los niveles de la proteína son prácticamente indetectables. Se utilizó Por1p como control del contenido de mitocondrias en estas células. En cada carril se cargaron 15 µg de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección. C, se midió la actividad del promotor de Fet3p acoplado a LacZ en extractos proteicos provenientes del mutante MML313 crecidas en medio SC glicerol. Se compararon células tratadas con doxiciclina durante 8 horas con células no tratadas. Los datos representan la media ± la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Un aspecto a tener en cuenta en esta aproximación es el hecho que al igual que como se ha descrito para *YFHI*, los estudios llevados a cabo con *GRX5* se han realizado en condiciones respiratorias (medio YPG). Lo cual, como se ha demostrado en secciones anteriores, produce un incremento en el contenido y actividad mitocondrial. Este análisis sólo es posible debido a que MML313 es una cepa condicional, ya que el mutante $\Delta grx5$ es incapaz de crecer en las condiciones estrictamente respiratorias que exige el medio YPG.

6.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE Grx5p EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Fe/S

Se hicieron crecer en YPG y en paralelo células con y sin la adición de doxiciclina durante un período de tiempo total de 14 horas. Se colectaron a intervalos de 0, 2, 4, 8 y 14 horas de tratamiento. Con estas células se procedió a realizar una cinética de actividad para las enzimas Fe-S aconitasa y succinato deshidrogenasa. Por lo que respecta a aconitasa, como se puede observar en la figura 40A al tratar con doxiciclina, en este mutante se produce una pérdida de actividad a partir de las primeras horas de tratamiento. Específicamente transcurridas 2 horas se observa una pérdida del 15% de actividad. Cuando se evalúa el intervalo correspondiente a las 14 horas de tratamiento se encuentra que la actividad ha caído hasta un 21% del valor inicial. Posteriormente se procedió a evaluar los niveles de proteína por *western blot* empleando anticuerpos específicos contra aconitasa (anti-Aco1). Se encontró que no se produjeron cambios significativos en los niveles de esta proteína durante las 14 horas del estudio (Figura 40C). Adicionalmente para controlar la evolución del contenido general de mitocondrias se empleó como referencia la cuantificación de Por1. Como se puede observar en la figura 40C no se encontraron cambios significativos en el contenido de esta proteína.

A continuación se procedió a evaluar la actividad de succinato deshidrogenasa. Como se puede observar en la figura 40B esta enzima presenta un comportamiento similar al encontrado para aconitasa. Al evaluar el punto correspondiente a las 2 horas de tratamiento se puede apreciar una rápida disminución de la actividad succinato deshidrogenasa. En este punto la enzima ya presenta una pérdida de actividad de un 30%. Cuando se evalúa la actividad en el punto correspondiente a las 14 horas de tratamiento se aprecia que la actividad ha descendido hasta un 33% de la actividad inicial.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el mutante condicional de *YFHI*, en el que se encontró que la pérdida de actividad de las enzimas mitocondriales aconitasa y succinato deshidrogenasa se relacionaba con una pérdida en la capacidad respiratoria de la célula, se decidió evaluar el consumo de oxígeno en la cepa MML313. Como se ha podido observar, esta cepa presenta una significativa pérdida de la actividad de estas dos enzimas indispensables para la eficiente utilización de la respiración como ruta metabólica de obtención de energía. Como se aprecia en la figura 40D existe una significativa pérdida de la capacidad respiratoria, ya que al medir el consumo de oxígeno de las células del mutante

MML313 tratadas con doxiciclina durante 24 horas se encontró una disminución hasta un valor de 36,7% del consumo de oxígeno. Para esta determinación se empleó como valor de referencia de 100% el correspondiente a células sin tratamiento con doxiciclina.

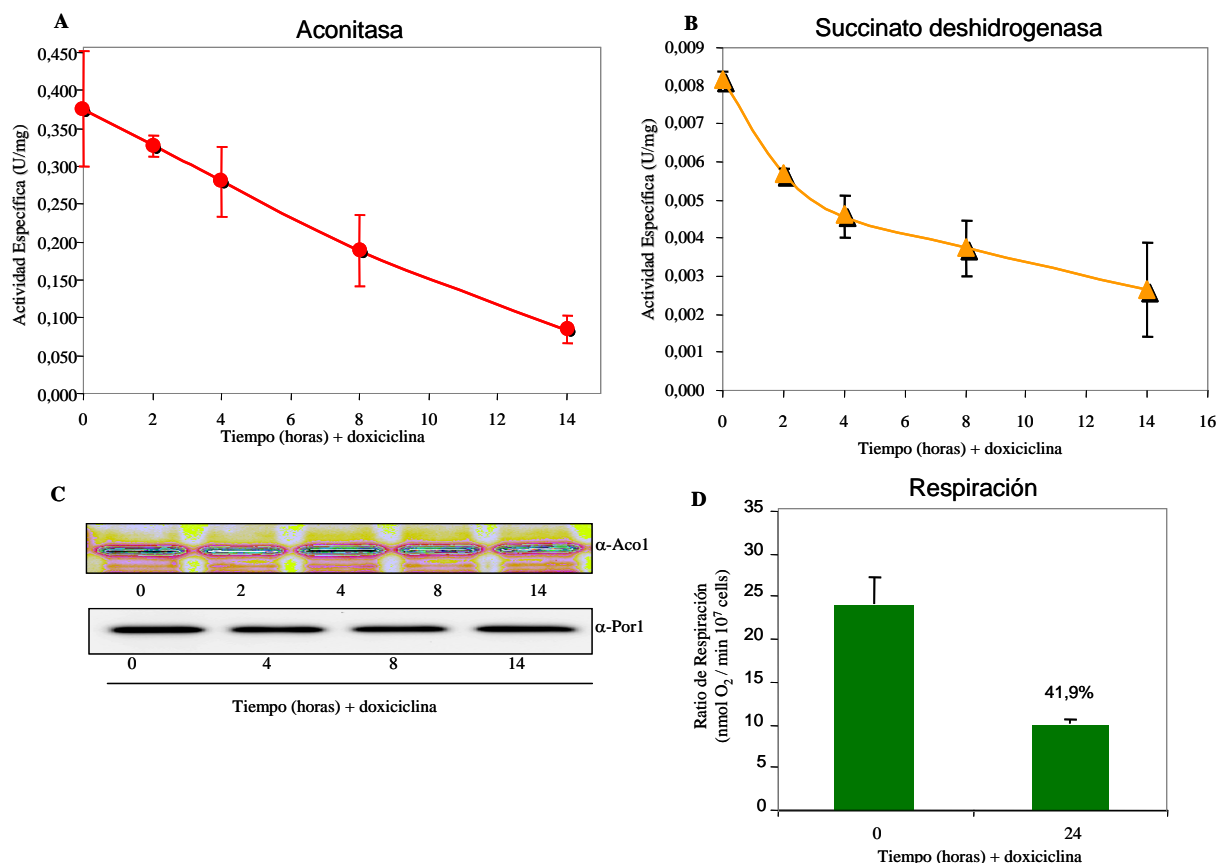


Figura 40. Evaluación de las enzimas Fe-S aconitasa y succinato deshidrogenasa—A, Se midió la actividad de aconitasa en el mutante MML313 crecido en YPG y tratado con doxiciclina durante 14 horas (círculos rojos). B, se determinó la actividad succinato deshidrogenasa en células tratadas con doxiciclina durante 14 horas (triángulos naranja). C, Se cuantificó el contenido de Aco1 y Por1 utilizando anticuerpos específicos (*western blot*). En cada carril se cargaron 15 μ g de proteínas provenientes de extractos totales. D, se muestra el consumo de oxígeno de este mutante tras 24 horas de tratamiento con doxiciclina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Como ya se ha mencionado en secciones anteriores, numerosos estudios han descrito que el adecuado funcionamiento de las proteínas que forman la maquinaria biosintética denominada ISC, es una condición necesaria para el adecuado funcionamiento de enzimas como aconitasa y succinato deshidrogenasa. Como se ha podido observar el mutante condicional MML313 presenta claramente dicho fenotipo. Tomando en cuenta los resultados descritos hasta esta sección, resulta conveniente destacar el hecho que se ha encontrado que dos putativos miembros de esta maquinaria mitocondrial presentan comportamientos claramente diferenciados. Por un lado, como ya se ha discutido en apartados previos, la depleción de Yfh1p en el mutante condicional, ha demostrado tener un efecto secundario sobre las enzimas

Fe-S; mientras que el análisis del condicional Grx5p demuestra un efecto primario sobre estas proteínas. Estos datos indicarían que la posible función de Grx5p coincidiría con la hipótesis canónica de las proteínas ISC. Sin embargo, abre una interrogante muy interesante sobre el papel que tendría Yfh1p en este proceso.

Seguidamente se mostrarán experimentos adicionales realizados en el mutante MML313, los cuales pretenden aportar más información que permita comprender el papel que esta proteína podría estar cumpliendo en este complejo proceso, y al mismo tiempo establecer una comparativa con los resultados ya observado en Yfh1p.

6.3. LA DEPLECIÓN DE Grx5 PROVOCA LA INDUCCIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD: ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE Mn-SOD

En un estudio previo realizado en el grupo de Bioquímica del Estrés Oxidativo se encontró que la cepa $\Delta Grx5$ presentaba bajos niveles de actividad Mn-SOD (Irazusta, et al., 2006). Una vez mas este hallazgo previo despertó el interés en conocer la naturaleza de esta inactivación. Como ya se ha señalado en el mutante condicional *YFHI* se observó un efecto sobre las enzimas SOD que aparece secundariamente. Es por esto que se decidió verificar si este fenotipo en las enzimas SOD era común en otra proteína relacionada con la maquinaria ISC. La primera aproximación aplicada fue verificar los niveles de expresión de las proteínas SOD empleando anticuerpos específicos (*western blot*). Como se puede observar en la figura 41B, se produce una significativa inducción de ambas enzimas SOD. Los rombos de color azul representan la cuantificación relativa de la inducción de CuZn-SOD, mientras que los de color rojo corresponden a Mn-SOD. Se aprecia un incremento significativo en los niveles de estas proteínas a las 14 horas de tratamiento con doxiciclina. En este punto el incremento en la expresión de las mismas es cercano a 3 veces en relación con los niveles basales. Este hallazgo estaría indicando un incremento en los sistemas antioxidantes en este mutante.

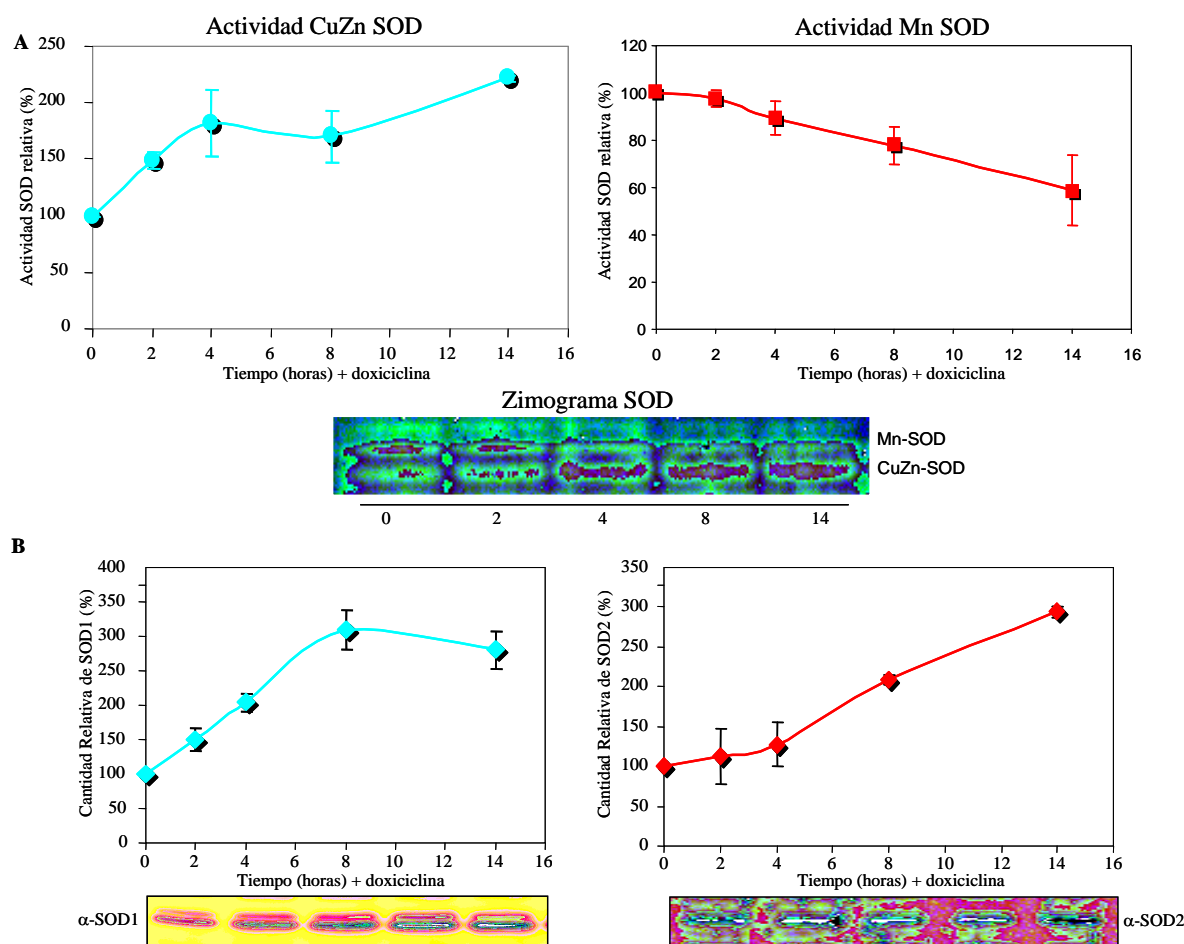


Figura 41. Evaluación de las enzimas antioxidantes SOD en el mutante MML313—A, evaluación de la actividad SOD en gel nativo (zimograma). La obtención de los extractos y la separación de las proteínas se realizaron en condiciones nativas. Se cargaron 20 μ g de proteínas en cada carril y la cuantificación se realizó empleando un densitómetro. B, cuantificación de los niveles de SOD1 y SOD2 por *western blot*. Se cargaron 15 μ g de extractos proteicos en cada carril y las membranas de PVDF fueron teñidas con azul de Coomassie al final de la cuantificación para verificar que hubiera la misma cantidad de proteína en cada carril. Los resultados están expresados como medias \pm la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Seguidamente se procedió a realizar la cuantificación de la actividad SOD mediante un zimograma de actividad en gel nativo. Como se puede observar en la figura 41A, se produce un incremento de la actividad CuZn-SOD durante las 14 horas del análisis. En el punto correspondiente a las 14 horas se aprecia una actividad que corresponde al doble de la actividad a tiempo cero. Sin embargo cuando se observa la actividad específica se puede apreciar que existe una pequeña fracción (aproximadamente un 20%) de dicha actividad que se estaría perdiendo (Figura 42, rombos azules). Al observar el comportamiento de Mn-SOD se aprecia que esta actividad se encuentra significativamente disminuida, ya que en este punto presenta un 60% de la actividad inicial. Al evaluar la actividad específica se aprecia una pérdida de actividad mayor a un 80% (Figura 42, círculos rojos). Estos datos indicarían que la

célula estaría presentando una pérdida de la capacidad antioxidante, que estaría afectando de manera mas notoria a la SOD mitocondrial.

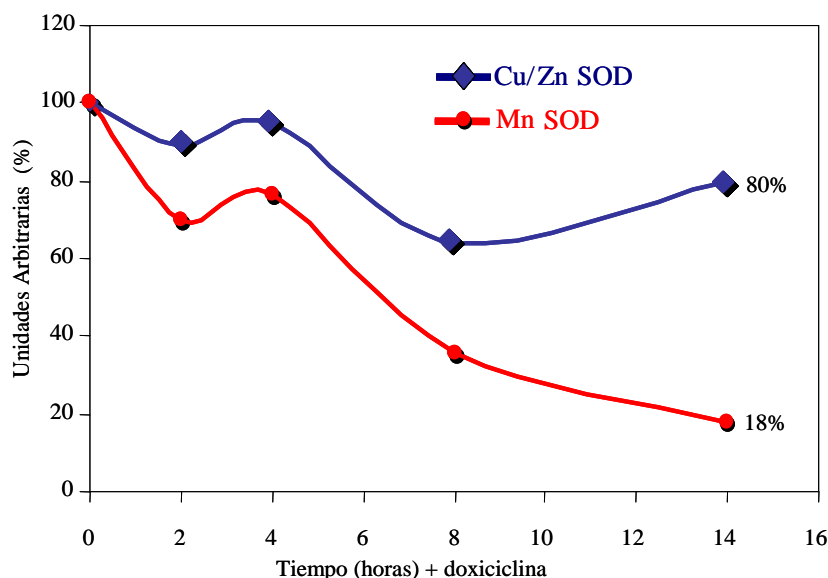


Figura 42. Actividad específica en MML313 tratado con doxiciclina durante 14 horas—El gráfico representa la relación entre la actividad relativa obtenida mediante zimograma y la cantidad relativa de proteína analizada mediante *western blot* a diferentes tiempos de tratamiento en el mutante MML313. Tanto para el zimograma como para el análisis por *western blot* se empleó como referencia para el valor relativo de 100% el correspondiente al tiempo 0 de tratamiento con doxiciclina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

6.4. LA EVALUACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE Smf2p EN LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD Mn-SOD

Siguiendo las pistas obtenidas con el mutante condicional de *YFH1*, se planteó como hipótesis para responder a la pérdida de actividad Mn-SOD en MML313, una posible implicación del transportador Smf2p. Como ya se ha mencionado, el análisis realizado en *Yfh1p* reveló una “down-regulación” del transportador que desemboca en la falta de disponibilidad del cofactor, en este caso manganeso, el cual es indispensable para la actividad de la enzima. En primer lugar se realizó la determinación del contenido celular de manganeso durante una cinética de tratamiento con doxiciclina de 14 horas. Como se puede observar en la figura 43A, no se encontró un cambio significativo del contenido de manganeso celular. A la vista de este resultado se decidió evaluar directamente el transportador. Para ello se generó un mutante derivado de la cepa MML313 que expresa una versión de Smf2p marcada con el tag HA. Se planteó evaluar este transportador a un período mas largo de tratamiento con doxiciclina. Fue entonces cuando se encontró que existía una disminución significativa de este transportador, que alcanzaba un 50% del valor inicial a las 48 horas de tratamiento (Figura 43B).

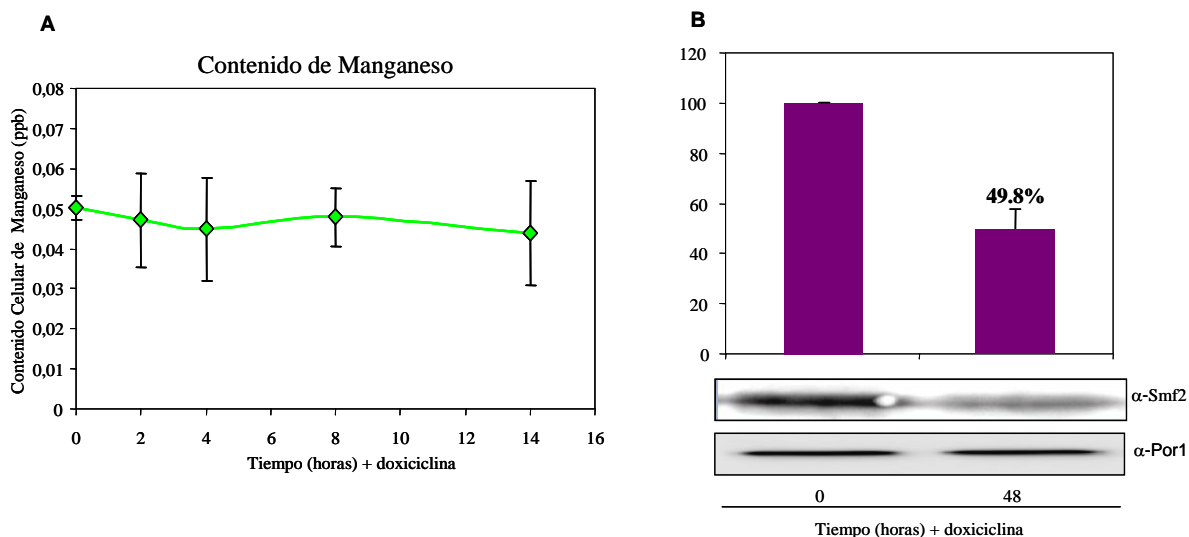


Figura 43. Análisis de los niveles de manganeso y del transportador Smf2p en MML313—A, se analizaron los niveles de manganeso celular en el mutante MML313 durante 14 horas. Para esta determinación se compararon células sin tratamiento con células tratadas durante 14 horas con doxiciclina. B, Cuantificación de los niveles de Smf2p-HA mediante *western blot* en células tratadas con doxiciclina durante 48 horas. Se muestra la cuantificación relativa de la proteína en la que se empleó el tiempo 0 como referencia de 100% de nivel de expresión. Se utilizó un western anti-Por1 como control general del contenido mitocondrial. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína, el control de carga se realizó mediante una tinción CBB de la membrana posterior a la detección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Este resultado estaría indicando que al igual que en el caso del mutante condicional de Yfh1, en MML313 se estaría produciendo una pérdida de la actividad Mn-SOD debida a la falta del cofactor (manganeso). Esta disminución de los niveles de manganeso sería la consecuencia de una disminución de la expresión de Smf2p que es mediada por la acumulación de hierro.

6.5. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE Grx5p EN COLUMNA

Otra parte interesante de este estudio y que despertó nuestro interés consistió en intentar conocer que proteínas podrían ser dianas directas de Grx5p. Varios estudios han descrito la implicación de esta glutaredoxina monotiólica en la biosíntesis de centros Fe-S en diferentes modelos experimentales, los cuales incluyen desde levadura hasta humanos (Camaschella, et al., 2007; Rodríguez-Manzaneque, et al., 2002; Wingert, et al., 2005). Esta homología funcional es un indicador claro de que el papel de esta glutaredoxina en el proceso está altamente conservado a lo largo de la escala evolutiva. Sin embargo, hasta la fecha aún no se conoce el papel específico que cumpliría Grx5p en el proceso biosintético. Se ha sugerido en varios estudios que su papel se relacionaría con la transferencia del centro Fe-S, recién formado, desde la proteína scaffold Isu1p a las apoproteínas. También se ha descrito que

estaría implicada en la maduración del cluster en las proteínas receptoras (Mühlenhoff, et al., 2003; Rodríguez-Manzaneque, et al., 2002). Para intentar dar respuesta a esta cuestión se planteó la búsqueda de interacciones proteína-proteína como una metodología de búsqueda de posibles dianas. Para esto se empleó la proteína Grx5p purificada tras su expresión en *E. coli* empleando una metodología descrita previamente (Tamarit, et al., 2003). Dicha purificación se realizó mediante métodos cromatográficos descritos en el apartado de materiales y métodos. Tras su purificación, se inmovilizó la proteína en una columna *CNBr-Sepharose*TM activada. Seguidamente se procedió a incubar dicha columna con extractos mitocondriales obtenidos mediante fraccionamiento subcelular de la cepa salvaje *W303*. Posteriormente se aplicaron sucesivos lavados a la columna. Es importante destacar que la elución final de las proteínas posibles candidatas a interactuar con Grx5p en la columna, se realizó empleando DTT como agente reductor. En este sentido, esta aproximación restringe la búsqueda a aquellas proteínas que estuvieran asociadas a Grx5p por una unión que involucrara grupos tiol. Esto tiene sentido si se tiene en cuenta que probablemente la función de Grx5p estaría relacionada con mantenimiento/regulación del estado redox de grupos tioles de sus posibles sustratos. El esquema que resume el protocolo de las interacciones se muestra en la figura 44.

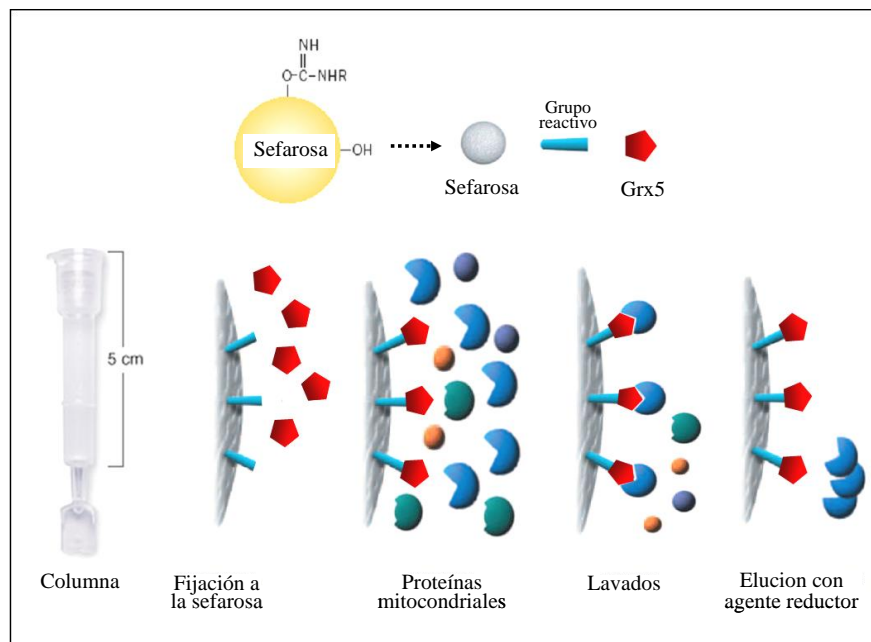


Figura 44. Evaluación de las interacciones proteína-proteína de Grx5p un una columna de sefarosa—Se fijó la proteína en la matriz de sefarosa y se incubó con el extracto de proteínas mitocondriales. Finalmente se realizó la elución de las proteínas empleando 20 mM del agente reductor DTT.

En la figura 45A se observa la separación de las proteínas eluidas de la columna y separadas en un gel SDS-PAGE. Para obtener una resolución mayor de las bandas obtenidas en la electroforesis 1D, se procedió a realizar la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional en geles de 7 x 7 cm (Figura 45B). Al igual que en el caso anterior se procedió a la tinción del gel con plata. En ambas separaciones las imágenes fueron adquiridas en un densitómetro GS-800 y analizadas mediante el programa *PDQuest*. Las bandas y spots seleccionados fueron digeridos con tripsina y se identificaron por huella de masas peptídicas empleando un espectrómetro de masas *MALDI-TOF*. Para analizar los péptidos obtenidos en los espectros se empleó la base de datos *MASCOT*. Las proteínas identificadas se muestran en la tabla 11. Tres de estas proteínas son de localización mitocondrial (Aconitasa, la chaperona Ssc1 y Peroxiredoxina 1), mientras que una de ellas era de localización citosólica (Factor de Elongación 2).

Seguidamente, se empleó un análisis por *western blot* como una vía alternativa para validar con más fuerza el hallazgo de la posible interacción de aconitasa con Grx5p. Para este propósito se cargó el eluido obtenido de la columna de Grx5-sefarosa y se separó por SDS-PAGE, seguidamente se transfirió a una membrana PVDF y se realizó la inmunodetección empleando anticuerpos específicos anti-Aco1. Este experimento se realizó utilizando también columnas Grx5-sefarosa que contenían las formas mutantes de Grx5 en las cisteínas C60S y C117S. Estos mutantes difieren de la proteína endógena en que presentan una sustitución de la cisteína 60 y la 117 por una serina respectivamente. En la figura 45C se aprecia que aconitasa se detecta en el eluido proveniente de la columna-Grx5. También se observó que en los mutantes puntuales continuaba existiendo esta interacción. Sin embargo, al realizar la cuantificación de la señal obtenida por *western blot*, se observó que ésta representaba un 50% del valor observado en la forma salvaje de Grx5p.

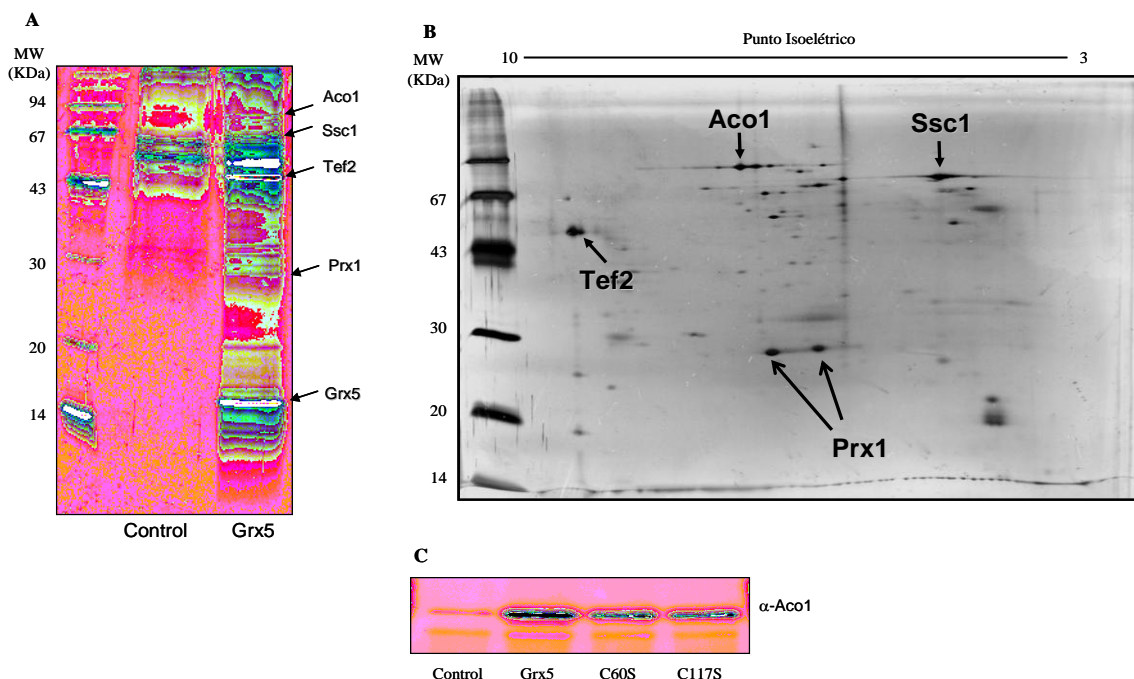


Figura 45. Interacciones de Grx5p en una columna de CNBr-Sepharose—A, Separación mediante SDS-PAGE del eluido proveniente de la columna una vez incubado con el agente reductor DTT. Se realizaron en paralelo las interacciones con Grx5p y se empleó como control una resina vacía. B, separación por electroforesis bidimensional del eluido de la columna. Se utilizaron tiras no lineales cuyo intervalo comprendía el rango de 3 a 10 en la escala de pH. Las flechas indican las proteínas identificadas. C, Inmunodetección con anticuerpos específicos anti-Aco1 de los eluidos obtenidos de las interacciones en columna. Para este análisis se empleó la proteína Grx5p wild type y las proteínas mutadas C60S y C117S.

Tabla 11. Proteínas identificadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF)—A, Proteínas eluidas de la columna-Grx5p, separadas en un gel monodimensional e identificadas empleando la tecnología de la huella peptídica. Se identificaron 3 proteínas, de éstas 2 correspondían a proteínas mitocondriales y una era de localización ribosomal (citoplasmática). B, Proteínas identificadas en una separación 2DE, la cual permitió verificar las obtidas en la 1DE y adicionar la identificación de una peroxiredoxina mitocondrial.

	Proteína	Gen	Localización	Score MASCOT	Coertura (%)
A)	Aconitasa	<i>ACO1</i>	Mitocondria	89	11
	Chaperona de la familia HSP70	<i>SSC1</i>	Mitocondria	70	14
	Factor de elongación	<i>TEF2</i> (eEF1A)	Citosol (Ribosomas)	60	35

	Proteína	Gen	Localización	Score MASCOT
B)	Aconitasa	<i>ACO1</i>	Mitocondria	93
	Chaperona de la familia HSP70	<i>SSC1</i>	Mitocondria	320
	Peroxiredoxina	<i>PRX1</i>	Mitocondria	105
	Peroxiredoxina	<i>PRX1</i>	Mitocondria	96
	Factor de elongación	<i>TEF2</i> (eEF1A)	Citosol (Ribosomas)	63

V. DISCUSIÓN

1. LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE *YFHI* INDUCE LA ACTIVACIÓN DEL REGULÓN DE HIERRO A TRAVÉS DE UNA VIA DEPENDIENTE DE *AFTI* E INDEPENDIENTE DE LA SÍNTESIS DE CENTROS Fe-S EN *Saccharomyces cerevisiae*

A pesar de que ha pasado más de una década desde que se publicaron los primeros trabajos donde se describió que el déficit de frataxina era responsable de la patología denominada ataxia de Friedreich (Campuzano, et al., 1996), hoy aún no existe un consenso entre los investigadores sobre la función de esta proteína, aún cuando diversos grupos en todo el mundo realizan un trabajo intenso empleando diferentes modelos experimentales. La función que más se adaptaría a todo lo descrito hasta ahora sobre frataxina, implica su participación en la homeostasis del hierro. En un principio, esta función se circunscribió a la mitocondria donde se supone formaría parte de la maquinaria de síntesis de centros Fe-S, esto por lo menos en levadura. Sin embargo, trabajos más recientes en mamíferos, han discutido sobre la existencia de una forma extramitocondrial de frataxina que estaría implicada en la regulación de la homeostasis del hierro a través de una interacción directa con la proteína IRP1 (Condò, et al., 2010). Parece claro que la pérdida de esta proteína se relaciona con la desregulación del metabolismo del hierro, un incremento del estrés oxidativo y un fallo en la función mitocondrial. Estas características parecen constituir un fenotipo consenso, ya que se han encontrado en la mayoría de los modelos de déficit de frataxina estudiados hasta ahora. La mayoría de estos trabajos indican que un incremento descontrolado del hierro está estrechamente relacionado con el incremento de las especies reactivas del oxígeno. Dicho incremento sería el responsable del daño a diversas biomoléculas, siendo algunas de las más sensibles las proteínas con centros Fe-S como aconitasa y los complejos I, II, y III de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos defectos han sido observados tanto en levaduras como en diversos modelos experimentales y en pacientes afectados por la enfermedad (Babcock, et al., 1997a; Foury, 1999; Foury and Cazzalini, 1997; Rotig, et al., 1997). En este sentido, los resultados presentados en esta tesis indican que el papel de Yfh1p no estaría directamente relacionado con la biosíntesis de centros Fe-S y además, aporta una explicación al déficit de las enzimas Fe/S en este modelo experimental.

Una de las primeras consideraciones derivadas de los resultados obtenidos fue la importancia de la selección de las condiciones de cultivo más adecuadas. Como se ha podido apreciar en los resultados descritos en el capítulo 1.1, la selección del tipo de medio de cultivo es un

factor clave en función de hacia donde se dirige el estudio que se plantea realizar, ya que existe una marcada diferencia en el comportamiento de la misma cepa dependiendo de la composición de dicho medio. Estas primeras consideraciones resultan fundamentales si se tiene en cuenta que hasta la fecha la mayoría de los estudios que se han realizado para caracterizar la posible función de la proteínas mitocondrial Yfh1p, se han llevado a cabo en medio YPD 2%. En este medio se observa una fuerte represión de la actividad mitocondrial, de forma que las rutas metabólicas empleadas para obtener energía a partir de este azúcar son mayoritariamente fermentativas. Tan sólo una pequeña parte de la glucosa es oxidada a CO₂. Dicha represión se produce debido a tres importantes factores que se estarían produciendo casi de manera simultánea. Por un lado, se produce la “down-regulación” de la síntesis de componentes de la cadena respiratoria, mientras que por otro se observa una inhibición de la actividad de enzimas de los ciclos de Krebs y del glioxilato. Paralelamente se observa un incremento de la expresión de enzimas relacionadas con la glicólisis. Todos estos cambios son conocidos colectivamente con el nombre de efecto Crabtree. En este sentido, estudios realizados sobre este fenómeno en las levaduras *Candida utilis* (Crabtree negativa) y *S. cerevisiae* (Crabtree positiva), han remarcado el papel efector que tiene la fructosa 1,6-bifosfato (F16bP) en la represión del metabolismo oxidativo antes mencionada (Díaz-Ruiz, et al., 2008). Este comportamiento de las levaduras frente a la fuente de carbono hace énfasis sobre lo fundamental de seleccionar un medio de cultivo respiratorio para poder observar efectos importantes sobre el metabolismo mitocondrial. En esta situación, las mutaciones con un fenotipo de incompetencia respiratoria constituiría el principal obstáculo. Sin embargo, este estudio ha mostrado que la utilización de mutantes condicionales es una herramienta adecuada para llevar a cabo este tipo de estudios.

Otra de las conclusiones derivadas de este trabajo es la confirmación que en *Saccharomyces cerevisiae* el metabolismo del hierro se encuentra estrechamente relacionado con las mitocondrias, una idea ya suscrita por numerosos estudios llevados a cabo hasta ahora. De forma mas concreta, como ya se ha mencionado, se sabe que en las mitocondrias de la levadura se lleva a cabo la biosíntesis y ensamblaje de los centros Fe-S (Lill, et al., 1999) y que en condiciones respiratorias este proceso, conjuntamente con la síntesis de hemo, son responsables de un incremento de hasta cinco veces en la demanda de hierro (Kaplan, et al., 2006). En concordancia con lo mencionado anteriormente, los resultados mostrados en la figura 22, demuestran que durante el crecimiento en condiciones respiratorias existe un incremento importante en los niveles de las proteínas mitocondriales como aconitasa (enzima

Fe-S), citrato sintasa y porina. Este incremento de la actividad y cantidad de enzimas clave para la respiración y de una proteína estructural como porina, estarían indicando que existe una mayor actividad mitocondrial. También se encontró que existe un mayor consumo de oxígeno en dichas células. Partiendo de estas observaciones, es lógico pensar que existe una mayor demanda de hierro por parte de la levadura en medios con fuentes de carbono no fermentables, para sostener la demanda de los componentes necesarios para la obtención de energía. Otra de las observaciones que se deriva de los resultados obtenidos, es la confirmación de que todo el proceso de biogénesis mitocondrial de los centros Fe-S es un proceso altamente controlado por la célula.

En este contexto de crecimiento respiratorio no resultaría difícil imaginar que quizá esta alta demanda de hierro por la célula y la elevada reactividad del metal, fuera una de las razones evolutivas que estimuló a las primeras células eucariotas a emplear el metabolismo del hierro en la mitocondria como un indicador de la “buena salud de la homeostasis del metal”. Los resultados obtenidos en esta tesis parecen coincidir con la idea que, efectivamente como se ha hipotetizado, el activador transcripcional *AFT1* es capaz de sensar un producto del metabolismo del hierro mitocondrial que provoca su movilización al núcleo (Kaplan, et al., 2006), lo cual, induce la expresión de los genes del regulón de hierro. Los datos obtenidos indican que existe una activación clara y temprana del regulón tras la depleción de Yfh1p. La figura 27 muestra que los niveles de mRNA de Fet3p, tanto en *tetO₂* como *tetO₇-YFH1*, a las cuatro horas de bloqueo de la expresión de *YFH1* son aproximadamente tres veces mayores a los niveles de la cepa sin tratamiento. Este resultado quedó probado suficientemente al evaluar la actividad del promotor de Fet3p acoplado a LacZ en la cepa *tetO₇-YFH1* a las 4 horas de tratamiento con doxiciclina. Dicha actividad estaba incrementada al doble del valor de la cepa sin tratamiento (Figura 28). Este resultado de actividad LacZ fue la confirmación de lo observado con los niveles de mRNA. También se cuantificaron los niveles de hierro y se encontró que este incremento en la actividad del sistema de alta afinidad de adquisición de hierro (*FET3/FTR1*), provocaba un incremento importante en los niveles intracelulares del metal en los mutantes *tetO₂* y *tetO₇-YFH1* (Figura 26). Estos resultados apuntan a que la falta de Yfh1p provoca la activación de Aft1p y la entrada masiva de hierro a través del sistema de alta afinidad Fet3p/Ftr1p. En este mismo sentido, el análisis transcriptómico realizado a este mutante también mostró que un grupo de 7 genes pertenecientes al regulón de hierro presentaban una clara inducción de su expresión (tabla 8). Entre estos genes se encuentran *FET3* y *FTR1*. Estos resultados constituyen una tercera verificación de la activación del

regulón de hierro en el mutante *tetO₇-YFH1*, a través de un método independiente. Además estos resultados son consistentes con observaciones realizadas anteriormente en las que se describía que la falta de Yfh1p en el mutante nulo ($\Delta yfh1$) provocaba la activación del regulón de hierro (Foury and Talibi, 2001) y un incremento en los niveles de hierro intracelular (Irazusta, et al., 2006). En este sentido, Chen, et al., en 2002, también observaron que la disminución de la expresión de Yfh1 impactaba directamente en los niveles de mRNA de *FET3* del mutante condicional MET-*YFH1*.

Los resultados mostrados en ambos mutantes (*tetO₂* y *tetO₇-YFH1*), indican que tras el tratamiento con doxiciclina se produce una rápida represión de *YFH1*, que a su vez, provoca una rápida disminución de los niveles de la proteína (Figura 25). En esta situación, las células disparan una señal que es interpretada como una falta de disponibilidad de hierro en la mitocondria. Dicha señal resulta en la activación del regulón de hierro, lo cual provocaría la entrada masiva del metal. La explicación canónica, asumida hasta ahora por la mayoría de los investigadores, indica que la falta de Yfh1p impacta directamente el proceso de biosíntesis de centros Fe-S. Este efecto directo sobre los centros Fe-S constituiría el efector de la activación del regulón de hierro vía Aft1p. De hecho, esta es una de las asunciones que soportan la hipótesis que coloca a Yfh1p directamente como donadora de hierro para la síntesis de centros Fe-S. Sin embargo, los resultados obtenidos con las actividades de las enzimas Fe-S aconitasa y succinato deshidrogenasa mostrados en la figura 30, indican que la biosíntesis de centros Fe-S no se haya afectada, al menos, durante las primeras 24 horas de depleción de Yfh1p. Ambas enzimas no muestran una pérdida importante de actividad durante estas primeras horas. Mientras que los niveles de proteína se mantienen estables. De hecho como se comentará mas adelante, no existe una afectación importante del crecimiento de estas células en estas primeras horas. El efecto sobre las enzimas Fe-S aparece cuando se mantienen los cultivos creciendo en presencia del antibiótico más allá de las 24 horas.

Tomando en conjunto los resultados relacionados con la activación de Aft1p y el efecto sobre los centros Fe/S, se observa de forma clara que el efecto primario de la disminución de Yfh1p en estos mutantes es la activación del regulón de hierro. Además, esta activación no depende directamente de la actividad de los centros Fe-S, debido a que en las primeras horas de tratamiento no existe un efecto directo sobre aconitasa y succinato deshidrogenasa, mientras que ya existe una importante acumulación de hierro. Este resultado es uno de los más interesantes de este trabajo y constituye un punto importante en el estudio de este mutante,

debido a que deja en un plano secundario la implicación de Yfh1p en la biosíntesis Fe-S y reabre la discusión sobre el papel que esta proteína estaría cumpliendo en el metabolismo del hierro de *Saccharomyces cerevisiae*. Este cuestionamiento acerca de la implicación de esta pequeña proteína en la biosíntesis de centros Fe-S es un tema que despierta cada vez más interés. Varios trabajos ya han argumentado en contra de esta implicación directa de frataxina en este proceso (Adinolfi, et al., 2009; Campanella, et al., 2004b; Ding, et al., 2007). Así mismo, desde un punto de vista evolutivo, debe tenerse en cuenta que se ha descrito que la familia de proteínas a la que pertenece Yfh1/frataxina no forma parte del operón ISC (Gibson, et al., 1996). De hecho CyaY, el gen bacteriano con más homología con Yfh1p/frataxina, no está presente en la mayoría de las bacterias y la delección de este gen en las bacterias que lo expresan no produce un fenotipo (Lia, et al., 1999). En el apartado siguiente se discutirá con mayor detalle sobre la pérdida de actividad de las proteínas Fe-S en los mutantes *tetO-YFH1*.

2. CAUSAS DE LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Fe-S: EXISTE UNA RELACIÓN CON EL INCREMENTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Los resultados discutidos en la sección anterior demuestran que la falta de frataxina no es la responsable directa de la pérdida de actividad aconitasa y succinato deshidrogenasa. En este contexto, ¿cual sería la explicación a esta disminución de actividad y cantidad? Esta pregunta constituyó el punto de partida para intentar conocer cuales serían las razones de esta pérdida. Lo primero que se evaluó fue el impacto de la sobrecarga de hierro mitocondrial sobre la actividad de las enzimas Fe/S. Seguidamente se planteó conocer a través de qué mecanismos ese exceso del metal promovería dicha pérdida. Estas dos cuestiones se abordaron de la siguiente manera:

2.1. La acumulación de hierro en la mitocondria promueve la inactivación de proteínas con centros Fe-S

Se utilizó la enzima aconitasa como indicador del funcionamiento de los centros Fe/S, ya que esta enzima es una de las proteínas Fe/S más abundantes y se ha descrito que su centro 4Fe-4S es muy sensible al estrés oxidativo (Wallace, et al., 2004). La manera de observar una afectación directa sobre esta enzima fue utilizar como modelo una situación de acumulación de hierro en el interior de la mitocondria inducida por la sobreexpresión, mediante un promotor *tet*, del transportador mitocondrial de hierro Mrs4p en la cepa *wild type*. En estas condiciones se encontró que esta sobrecarga de hierro provocaba una disminución de la

actividad de aconitasa en un 50% y que esta pérdida de actividad era prevenida al disminuir la expresión del transportador aplicando doxiciclina (Figura 31). Este experimento demostró que la sobrecarga de hierro tiene un impacto directo en la pérdida de actividad de aconitasa. Sin embargo, este hecho abrió un nuevo interrogante: ¿de que manera el hierro provocaría esta pérdida de actividad, sabiendo que esta enzima necesita este metal para su actividad? Una respuesta razonable a esta pregunta se haya en la misma naturaleza del metal. Como ya se ha discutido anteriormente, el hierro a través de la reacción de Fenton es capaz de catalizar la producción del radical hidroxilo, la cual constituye la especie reactiva del oxígeno más reactiva y dañina. Este radical podría dañar el centro activo (4Fe-4S) de aconitasa, convirtiéndolo a formas inactivas en los mutantes *tet-YFH1*. Es bastante razonable pensar que la mayor parte del metal acumulado se estaría movilizandohacia la mitocondria, al mismo tiempo que se observaría una disminución en la exportación de hierro de ésta hacia el citosol. Este fenotipo ya ha sido descrito por otros autores (Chen and Kaplan, 2000). Además, se sabe que la inducción de Mrs4p en el mutante *YFH1* contribuye de manera decisiva a la acumulación de hierro en este organelo (Foury and Roganti, 2002). Así mismo, se ha podido observar que los niveles del transcrito del transportador vacuolar de hierro *CCCI* eran la mitad de los niveles basales en el mutante *tetO7-YFH1* (datos no mostrados). Esto sugiere que se estaría produciendo la “down-regulación” de *CCCI* en una situación de entrada de gran cantidad de hierro en la célula, lo que indicaría que el metal se está movilizandomasivamente hacia la mitocondria. Se sabe que es precisamente en las mitocondrias donde el exceso de hierro puede provocar mas daño debido a la alta tasa de producción de ROS ya que la cadena de transporte electrónico libera una parte de los electrones que se transportan, los cuales van a formar radicales como $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en el interior de la mitocondria (Turrens, et al., 1985). Es más, la pérdida de función de la mitocondria debida a daño oxidativo, se ha relacionado con un incremento descontrolado de los niveles de hierro en este organelo. Se sabe que este exceso del metal en el interior de la mitocondria puede afectar el genoma mitocondrial. Existen diversas razones que soportarían la implicación de este daño en la pérdida de funcionalidad mitocondrial y de la viabilidad celular, como lo son: (i) la mitocondria genera la mayoría de las ROS, de hecho, esta liberación de electrones es responsable del al menos el 90% de las ROS generadas en la mayoría de las células. (ii) La mitocondria es intrínsecamente rica en hierro, mucho del cual puede ser fácilmente liberado por oxidantes, por ejemplo, el contenido en los centros Fe/S. Se sabe que el H_2O_2 no puede reaccionar fácilmente con el DNA mitocondrial (mtDNA), sin embargo, este proceso es favorecido por la presencia de hierro u otro metal de transición. Esta preferencia por el mtDNA estaría reflejando la

existencia de una importante cantidad de hierro reactivo dentro de la mitocondria (Yakes and Van Houten, 1997). (iii) El DNA mitocondrial es deficiente en histonas las cuales pudieran proveer cierta protección frente al daño oxidativo. (iv) La reparación del mtDNA es más lenta y menos efectiva que la del nDNA. En condiciones en las que además existe una entrada masiva de hierro, es lógico pensar que existe un incremento del daño. En este contexto, la pérdida de funcionalidad mitocondrial observada en el mutante condicional es consistente con los resultados obtenidos por otros investigadores, quienes observaron que miocardiocitos cultivados con exceso de hierro mostraron una pérdida del contenido de ácidos grasos poli-insaturados de la membrana, pérdida de actividad de enzimas tiol-dependientes, además de una inhibición de la citocromo *c* oxidoreductasa dependiente de NADH (complejos I y II) y succinato deshidrogenasa (Link, et al., 1989; Link, et al., 1998).

2.2. Existen marcadores de estrés oxidativo en los mutantes *tetO-YFH1*

El primero de estos marcadores que señalan que estas células se hayan sometidas a un incremento del estrés endógeno, lo constituyó la inducción de las enzimas superóxido dismutasa. Los resultados mostrados en la figura 32 D y E, señalan que las células estarían respondiendo a una situación de incremento de las ROS a través de la inducción de estas importantes enzimas antioxidantes. En este sentido, se discutirá más adelante sobre esta respuesta de la célula, debido a que se observó que no existe una correlación adecuada entre el nivel de inducción de ambas enzimas SOD y la actividad que presentan las mismas. Esto indudablemente repercute en el equilibrio oxidativo de la célula, lo cual se refleja en un incremento importante del estrés oxidativo.

Seguidamente la evaluación del daño oxidativo sufrido por las proteínas mediante la formación de grupos carbonilo demostró que en el mutante *tetO₇-YFH1* existe un importante incremento en el nivel de carbonilación (figura 35). Se encontró además, que el daño era acumulativo y se incrementaba a lo largo del tratamiento con doxiciclina. El seguimiento de este mutante durante 72 horas mostró en el oxi-blot un patrón de bandas fuertemente carboniladas (Figura 35A). Esta situación de incremento de daño estaría ocurriendo en un momento en el que la célula presenta un nivel de hierro intracelular que excede en diez veces la cepa control (Figura 26B). De este modo, existen dos importantes acontecimientos que en conjunto podrían explicar la pérdida de actividad de las proteínas Fe-S como aconitasa. Tenemos por un lado, que el exceso de hierro *per se* puede tener un impacto directo sobre la

actividad de esta enzima y que además, este impacto puede ser el resultado de un incremento del estrés oxidativo que estaría inactivando la enzima. En este sentido, un trabajo realizado por nuestro grupo mostró que un mutante *Ayfh1* presentaba un incremento significativo de los niveles de carbonilación, además también se encontró que el daño oxidativo era selectivo (Irazusta, et al., 2008). Numerosos trabajos han establecido una fuerte conexión entre el estrés oxidativo y el desarrollo de ciertas patologías crónicas (Moylan and Reid, 2007). También se ha encontrado que la desregulación de la homeostasis del hierro podría desempeñar un papel clave en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, como lo es la ataxia de Friedreich (Ciudin, et al., 2010; Elia and Albanese, 2010; Lill and Mühlhoff, 2008).

2.3. La baja actividad de las enzimas SOD contribuye a aumentar el estrés oxidativo

Se encontró que la inducción de ambas enzimas no se correspondía con un incremento de igual magnitud de la actividad tanto de *SOD1* como de *SOD2*. CuZn-SOD mostró un incremento inicial de actividad, sin embargo, cuando se evaluó la actividad específica de ambas enzimas se encontró que a medida que transcurría el tratamiento con doxiciclina, las enzimas perdían una parte importante de actividad (Figura 33). Esta pérdida de actividad resultó ser más dramática para Mn-SOD; ello podría responder al hecho de que esta enzima se ubica en la matriz de la mitocondria, organelo que en este mutante está sometido al mayor nivel de estrés. Esta falta de actividad SOD indudablemente contribuye decisivamente al incremento del estrés oxidativo endógeno. No resulta difícil encontrar una explicación a este fenómeno, dado que estas dos enzimas son las responsables de eliminar mayoritariamente el $O_2^{\bullet-}$, tanto en la mitocondria como en el citosol. En esta situación, la pérdida de actividad SOD estaría repercutiendo en un incremento de esta especie oxidativa, la cual estaría disponible para reaccionar con el exceso de hierro que se está acumulando en las mitocondrias. De este modo, a través de la reacción de *Haber-Weiss*, se estaría generando un mayor daño que impactaría, entre otras biomoléculas, sobre las enzimas Fe-S. En concordancia con estas observaciones, estudios realizados en el mutante *SOD1* han demostrado que las enzimas con centros Fe-S son especialmente sensibles al estrés oxidativo, mas específicamente se describió que aconitasa es una enzima altamente sensible al incremento del ión superóxido observado en este mutante (Wallace, et al., 2004).

2.4. La recuperación de la actividad Mn-SOD previene la inactivación de aconitasa

Otro de los resultados que apuntan a que la falta de actividad Mn-SOD estaría implicada en la pérdida de actividad las enzimas Fe-S, se presenta en la figura 36A. Este resultado demostró que la suplementación con MnCl_2 a una dosis no tóxica ($50 \mu\text{M}$), fue capaz de recuperar parcialmente la actividad de Mn-SOD en el mutante condicional *tetO₇-YFH1*. Esta relevancia demuestra una vez más, que la baja disponibilidad del cofactor sería responsable de la falta de actividad de esta enzima. También se pudo observar que este tratamiento era capaz de prevenir, también parcialmente, la pérdida de actividad aconitasa (Figura 36B). Este hecho se explicaría por la recuperación de actividad Mn-SOD, disminuyendo así, los niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y por tanto del estrés. Esta recuperación resulta interesante debido a que demuestra dos importantes cuestiones: a) La más relevante de ellas, es el hecho de que aconitasa recupera parte de su actividad en una situación de ausencia de Yfh1p, apuntando aún más al papel secundario de esta proteína en la actividad de las enzimas Fe-S. b) Sirve como base para remarcar una vez más el papel clave del estrés oxidativo en el fenotipo observado en el mutante condicional *tetO₇-YFH1*. Esta relevancia, constituiría un punto a tener en cuenta en la fisiopatología de la ataxia de Friedreich. En concordancia con estos resultados, se ha descrito que ratones deficientes en Mn-SOD exhibían un incremento progresivo del daño mitocondrial expresado como una deficiencia de las enzimas Fe-S (complejos I, II, III y aconitasa mitocondrial) y una importante acumulación de daño inducido en el DNA. Todas estas consideraciones, constituyen un interesante paralelismo entre las anomalías encontradas tanto en nuestro modelo experimental como en los individuos afectados por ataxia de Friedreich (Li, et al., 1995; Melov, et al., 1999).

2.5. La cantidad de Aco1p y Sdh2p disminuye con el tiempo: una posible regulación post-transcripcional?

En relación con esta pérdida de actividad de las enzimas Fe-S, un punto adicional que conviene señalar es que existe una disminución también de la cantidad además de la actividad de aconitasa y succinato deshidrogenasa, lo cual sería compatible con una regulación post-traducciona de estas enzimas mediada por Cth2p. Como se ha mencionado anteriormente, en una situación de carencia del metal, la activación del regulón de hierro por Aft1p, provoca paralelamente la “down-regulación” de proteínas implicadas en vías metabólicas que requieren un alto consumo de hierro; tal es el caso de aconitasa y succinato deshidrogenasa.

Se sabe que el sistema Cth2p/Tis11p es fuertemente inducido en condiciones de baja disponibilidad del metal. Además, como se ha mencionado anteriormente, este sistema es una diana de regulación de Aft1p. Se sabe que un aumento de la expresión Cth2p resulta en un incremento de la unión de ésta a los mRNAs de las proteínas diana. Esto provoca, en última instancia, la degradación de estos mRNAs y la disminución de la expresión de estas enzimas. Además, ya se ha descrito que aconitasa y succinato deshidrogenasa son enzimas susceptibles a este tipo de regulación pos-traducciona (Puig, et al., 2005). En este trabajo no se ha analizado esta posibilidad, sin embargo resultaría interesante conocer si este mecanismo de regulación estaría contribuyendo de manera importante en la pérdida de cantidad que se ha observado en estas enzimas en el mutante condicional *tetO₇-YFH1*.

3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA INACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS SOD

Ya se ha discutido en el apartado anterior que existen indicadores que demuestran la existencia de una situación importante de estrés oxidativo durante la depleción de Yfh1p. Se demostró que en este mutante existe un nivel elevado de estrés oxidativo endógeno, el cual está incrementando el daño oxidativo a las proteínas y probablemente contribuyendo de manera decisiva en la inactivación de las enzimas Fe-S. La inducción de las enzimas antioxidantes SOD no se correlaciona con un incremento en su actividad, lo cual resulta en una pérdida de actividad específica de las mismas. El interés se centró en las razones de esta falta de actividad. Una explicación razonable para la pérdida de actividad CuZn-SOD se encontró cuando se evaluaron los genes inducidos en el análisis transcriptómico por microarrays del mutante *tetO₇-YFH1* (Tabla 8). Algunos genes relacionados con la internalización del cobre se hallan inducidos, lo cual podría estar indicando que existe un requerimiento de mayores cantidades de cobre. Ya se ha probado suficientemente que la activación de Aft1p provoca la entrada masiva de hierro en este mutante y que este aumento de hierro ocurre a través del sistema de alta afinidad. En esta situación, la mayor parte del cobre biodisponible sería redirigido por la célula para ser incorporado en la multicobre oxidasa Fet3p. Esta situación de alta demanda de cobre por el sistema de alta afinidad, podría estar provocando una bajada importante en la disponibilidad del metal para ser incorporado en CuZn-SOD, lo cual contribuiría de manera decisiva en la falta de actividad. Esta hipótesis resulta bastante razonable si se tiene en cuenta que otros autores han descrito que al menos el 90% del cobre disponible en el plasma de muchas especies se encuentra formando parte de la ceruloplasmina (ortólogo de Fet3p) (Rogers and Lahiri, 2004).

En cuanto a Mn-SOD, la explicación para la pérdida de su actividad resultó ser un poco más compleja. Para evaluarla, se decidió analizar de qué forma la sobrecarga de hierro afectaría de manera secundaria el metabolismo de otros metales como el manganeso, necesario para la actividad Mn-SOD. Estudios previos de nuestro grupo demostraron que cuando existe un exceso de hierro se observa una disminución de la disponibilidad de manganeso, lo que conlleva unos bajos niveles de Mn-SOD en los mutantes $\Delta yfh1$ y $\Delta grx5$ (Irazusta, et al., 2008; Irazusta, et al., 2010). Además, existen evidencias que soportan la posibilidad de que en condiciones de baja disponibilidad de manganeso, el hierro podría desplazar a este metal en el centro activo de la enzima, lo cual promovería la acumulación de las formas inactivas apo-Sod2p y Fe-Sod2p (Luk, et al., 2003; Yang, et al., 2006). Se exploraron dos posibles vías para explicar si el hierro era responsable de la disminución de actividad Mn-SOD en el mutante *tetO₇-YFH1*. En primer lugar, al evaluar los niveles de manganeso intracelular se encontró que eran más bajos en la cepa sometida a tratamientos con doxiciclina a tiempos más largos (Figura 34A). Esta disminución del manganeso disponible puede ser una explicación a los bajos niveles de actividad *SOD2*. De este modo, el siguiente paso fue encontrar la explicación a esta baja disponibilidad de manganeso. Para ello, se evaluaron los niveles del transportador de alta afinidad de manganeso Smf2p. Se encontró que los niveles de esta proteína disminuían hasta un 40% en el mutante tratado durante 72 horas (Figura 34B). Este comportamiento de Smf2p resultó ser muy interesante, ya que la cinética de disminución del transportador a lo largo del tratamiento mostró un patrón similar al observado con la disminución del contenido de manganeso. Este resultado demostró que la falta del cofactor era responsable de la pérdida de actividad de la enzima. Lo siguiente fue encontrar la conexión entre esta disminución de la biodisponibilidad de manganeso y la sobrecarga de hierro. El experimento mostrado con el doble mutante $\Delta yfh1 \Delta Aft1$ de la figura 34C, demuestra de manera definitiva que existe una relación directa entre el exceso de hierro y la pérdida del transportador responsable de la disponibilidad de manganeso. Al prevenir la acumulación del metal en este doble mutante se obtiene un incremento significativo del transportador. Los datos mostrados en esta sección indican que la falta de actividad Mn-SOD en este mutante, es el resultado de la desregulación del metabolismo del manganeso provocada por la acumulación de hierro, la cual es inducida por la deficiencia de Yfh1p. Dicha desregulación causa una disminución de los niveles del transportador Smf2p que resulta en una baja disponibilidad de manganeso en la mitocondria.

Otra manera de evaluar si el efecto sobre las enzimas SOD y el aumento del estrés celular correspondía a una situación general inducida por la sobrecarga de hierro, fue evaluar si esta

situación era reproducida por un mutante deficiente en otro gen relacionado con la biosíntesis de centros Fe-S, en este caso *GRX5*. La mayor diferencia entre ambos mutantes condicionales *tetO7-YFH1* y *tetO7-GRX5* se encontró en el efecto sobre las enzimas Fe-S. Como se ha podido observar en los resultados presentados en la figura 40A y B, la pérdida de actividad de las enzimas Fe-S en el mutante *tetO7-GRX5* es inmediata, ocurre en paralelo con la disminución de la expresión de Grx5p al tratar las células con doxiciclina (Figura 40C). En estas condiciones, también se observó una activación rápida del regulón de hierro. Dicha activación se verificó una vez más mediante la cuantificación de la actividad LacZ acoplada al promotor de *FET3* (Figura 39C). Cabe resaltar que el nivel de inducción de Fet3-LacZ a las 8 horas de tratamiento fue mayor que el observado en el mutante condicional *YFH1*. En *tetO7-GRX5* este valor alcanzó 6 veces el nivel del control, mientras que en *tetO7-YFH1* se observó una inducción de 3 veces. Además, esta activación también resultó en una fuerte y más rápida acumulación de hierro en comparación con la observada en *tetO7-YFH1*. El mutante condicional *tetO7-GRX5* mostró un incremento en el nivel intracelular de hierro tres veces mayor que la cepa control a las 14 horas (Figura 39A), mientras que un nivel similar a este se observó a las 24 horas en *tetO7-YFH1*. Estos datos indican que, en lo que se refiere a la activación del regulón y el efecto sobre las enzimas Fe-S, el comportamiento observado en el mutante condicional *tetO7-GRX5* coincide con observaciones en las que se describió que las células deficientes en esta glutaredoxina presentan el fenotipo canónico de los miembros de la maquinaria mitocondrial ISC (Rodríguez-Manzaneque, et al., 2002), lo cual constituye una clara diferencia con lo encontrado en el mutante *tetO7-YFH1*. Una posible hipótesis consistiría en determinar si esta diferencia en cuanto al tiempo y el nivel de inducción de *FET3* constituyen un indicio de que existe una diferencia en la vía a través de la cual cada uno de estos mutantes estaría induciendo la activación del regulón de hierro. De ser así, constituiría un indicio más de que Yfh1p estaría cumpliendo un rol en el metabolismo del hierro en la mitocondria, formando parte de una vía de señalización independiente de la síntesis de centros Fe-S. Sin embargo, las diferencias encontradas entre ambos mutantes parecen terminar allí, ya que al igual que en *tetO7-YFH1*, en este mutante también se observó que existe una clara inducción de las enzimas SOD, lo cual reflejaría la existencia de un elevado estrés endógeno. Además, una vez más, la actividad de estas enzimas no se correspondían con el nivel de inducción de las mismas (Figura 41A y B). Dicha pérdida de actividad en el caso de Mn-SOD fue bastante evidente en las primeras horas de depleción de Grx5p. Al analizar la actividad efectiva de esta enzima se observó que había disminuido hasta 18% durante las primeras 14 horas (figura 42), a pesar de que la evaluación de los niveles de manganeso durante las

primeras 14 horas no mostró cambios significativos. Una evaluación a tiempos mas largos del transportador de manganeso Smf2p en el mutante *tetO₇-GRX5* mostró que efectivamente esta disminución de la actividad sería debida a la falta del cofactor. Al igual que en el mutante *tetO₇-YFH1* probablemente la sobrecarga de hierro estaría provocando una disminución del transportador de manganeso Smf2p. La expresión de esta proteína se encontró disminuido hasta la mitad a las 48 horas (Figura 43B). Los datos obtenidos muestran que este mutante tiene un comportamiento, en lo que se refiere a Mn-SOD, similar al observado en el mutante *tetO₇-YFH1*. Esta disminución en la actividad de Mn-SOD atribuida a una baja disponibilidad del cofactor coincide con lo descrito previamente en nuestro grupo (Irazusta, et al., 2006). Este trabajo demostró que el mutante *Δgrx5* mostraba un 80% menos de actividad Mn-SOD. Además, esta disminución se atribuyó a que en esta cepa el nivel de manganeso era 60% inferior al encontrado en la cepa salvaje. También se mostró una prueba definitiva de la implicación de los niveles bajos de manganeso en la pérdida de actividad *SOD2*, ya que la suplementación con manganeso era capaz de restaurar parcialmente la actividad de Mn-SOD (Irazusta, et al., 2006). Además, los resultados obtenidos con *GRX5* concuerdan con los datos observados con el mutante condicional YFH1, discutidos en los apartados anteriores. Todas estas observaciones analizadas de manera general constituyen una prueba definitiva de que existe un proceso de inactivación de las enzimas SOD que es común a ambos mutantes y que esta directamente ligada a la acumulación de hierro.

4. LA PÉRDIDA DE CAPACIDAD RESPIRATORIA INDUCE UNA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE CONDICIONAL: EXISTE UNA RESPUESTA METABÓLICA

Otro aspecto interesante lo constituyó el conocer ¿qué efectos deletéreos estaría provocando la disminución de la actividad de las proteínas Fe-S en el mutante condicional *tetO₇-YFH1*? Los resultados obtenidos indican que esta disminución de la actividad de las enzimas Fe-S en el mutante condicional *tetO₇-YFH1* estaría impactando directamente en la fosforilación oxidativa. Como ya se ha visto en los datos mostrados en la figura 37, las células presentan un marcado fenotipo de deficiencia respiratoria. El impacto más fuerte de esta deficiencia se ve reflejado en una importante disminución del consumo de oxígeno y por tanto sobre el crecimiento de la célula, lo cual se refleja en un importante incremento del tiempo de generación. No resulta difícil encontrar una explicación a este fenómeno, si se tiene en cuenta que aconitasa es una enzima clave en el ciclo de Krebs y que succinato deshidrogenasa forma

parte del complejo II de la cadena respiratoria. Sin embargo, es interesante destacar que este efecto sobre el consumo de oxígeno y la respiración, una vez más, ocurren más allá de las primeras 24 horas de depleción de Yfh1p. Esta afectación tardía excluiría la posibilidad de que éste fuese un efecto primario de la falta de la proteína. Lo que si parece claro, es que esta disminución de la respiración y del crecimiento coincide bastante bien con el declive de la actividad de las enzimas Fe-S. En este sentido, la falta de actividad de las enzimas Fe-S sería la explicación más razonable para este fenómeno. Se sabe que la falta de actividad de aconitasa y succinato deshidrogenasa provoca importantes defectos en la capacidad respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae* (Babcock, et al., 1997a), por tanto este trabajo apoyaría los resultados obtenidos en el mutante condicional *tetO7-YFH1*.

El hecho que la célula deba enfrentarse a esta situación lleva a pensar que de alguna manera éstas traten de reconducir el metabolismo hacia otras rutas alternativas que le permitan mantener la viabilidad celular. En este sentido *Saccharomyces cerevisiae* posee sistemas muy bien caracterizados que le permiten sostener la viabilidad celular frente a cambios metabólicos importantes como son, por ejemplo, el paso a la fase diaúxica. Cuando la disponibilidad de glucosa se vuelve limitante en el medio, las células de la levadura redistribuyen el flujo de metabolitos para adaptarlo al uso de fuentes de energía alternativas. Principalmente, la célula se mueve a un metabolismo mas respiratorio, donde se emplea el etanol producido durante la fermentación (Young, et al., 2003). Estos metabolitos disponibles son incorporados a rutas como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o del glioxalato para generar energía e intermediarios para la gluconeogénesis. Varios factores de transcripción y proteínas regulatorias son necesarios para alterar la transcripción que acompaña este cambio metabólico. En este sentido, *ADR1* es un factor transcripcional clave en este proceso (DeRisi, et al., 1997). Se sabe que este factor de transcripción es necesario para la expresión de *ADH2*. Se ha descrito que células deficientes en *ADH2* son incapaces de crecer empleando etanol como única fuente de carbono y acumulan gran cantidad de glicerol (Wills and Phelps, 1975). Además, se sabe que en presencia de glucosa, Adr1p disminuye, resultando en una fuerte represión de este *ADH2* (Blumberg, et al., 1988). Además, también se sabe que la interacción de Adr1p con el promotor de *ADH2* requiere la intervención de Snf1p (Young, et al., 2002), esta proteína es el ortólogo en levadura de la proteína quinasa dependiente de AMP presente en los eucariotas superiores. Snf1p podría fosforilar y activar Adr1p para que este último se una al promotor de los genes o bien podría interactuar con estos promotores de forma que favorecería la unión de Adr1p a los mismos. Se ha descrito que la mayoría de los genes cuya

expresión es dependiente de Adr1p son también reprimidos por la glucosa (Young, et al., 2003) y que Adr1p está implicado en la regulación de varios genes importantes para la utilización del etanol y el glicerol (Grauslund, et al., 1999; Kratzer and Schüller, 1997; Pavlik, et al., 1993). También se conoce que genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos son regulados por este factor transcripcional (Gurvitz, et al., 2000; Hiltunen, et al., 2003; Simon, et al., 1991). En este contexto, los resultados mostrados en la figura 38 muestran que en el mutante condicional *tetO₇-YFH1* la depleción de frataxina provoca una disminución importante del contenido de las proteínas Adh2p y Ald4p. Se encontró que el contenido de estas enzimas disminuía un 40% a las 24 horas de depleción de Yfh1p. Se sabe que ambas proteínas son indispensables para la utilización del glicerol/etanol como fuente de energía y su expresión depende de la actividad de Adr1p durante el crecimiento en medio respiratorio. Además ambas enzimas son fuertemente reprimidas por glucosa (Young, et al., 2003). En este sentido, un análisis global de la expresión génica mediante microarrays mostró que un número muy importante de genes necesarios para la utilización del etanol y el glicerol se hallaban igualmente reprimidos (tabla 10). Estos genes coinciden en su gran mayoría con genes que responden directamente a Adr1p y son reprimidos cuando las células crecen empleando glucosa como fuente de carbono (Young, et al., 2003). Dos de estos genes (*ADH2* y *ALD4*) obtenidos mediante el análisis transcriptómico confirman los resultados obtenidos por métodos proteómicos (Figura 38). Como se ha mencionado, el mutante condicional *tetO₇-YFH1* se encuentra creciendo en un medio respiratorio (YPG 3%), por lo que la represión de estos genes no puede ser sino el reflejo de la incapacidad de estas células para utilizar la fosforilación oxidativa como ruta metabólica para obtener la energía. Los resultados indican que en esta situación, las células están intentando redistribuir el flujo de metabolitos para adaptarlo al uso de una fuente de energía alternativa a la fuente disponible en este medio. El análisis transcriptómico también mostró que varios genes necesarios para la utilización de los ácidos grasos como fuente de energía mediante la β -oxidación se encontraban igualmente reprimidos. Se sabe que toda la ruta de β -oxidación en levadura ocurre en los peroxisomas y que estudios con microarrays han demostrado que un número significativo de genes involucrados en la β -oxidación de los ácidos grasos responde directamente a Adr1p (Young, et al., 2003).

Una visión general de los resultados discutidos en esta sección, puntualizan la implicación que estaría teniendo el factor de transcripción *ADR1* en la respuesta de la levadura al fallo de la respiración. La disminución de la expresión de un importante número de genes que responden a este factor, sería el reflejo de la disminución de Adr1p. Como se puede observar en la figura 46, *ADR1* es un importante coordinador de rutas metabólicas que emplean fuentes de carbono no fermentables, tal es el caso del etanol/glicerol. Por tanto, su función le permite a la levadura responder eficientemente a cambios en la disponibilidad de nutrientes (Young, et al., 2003).

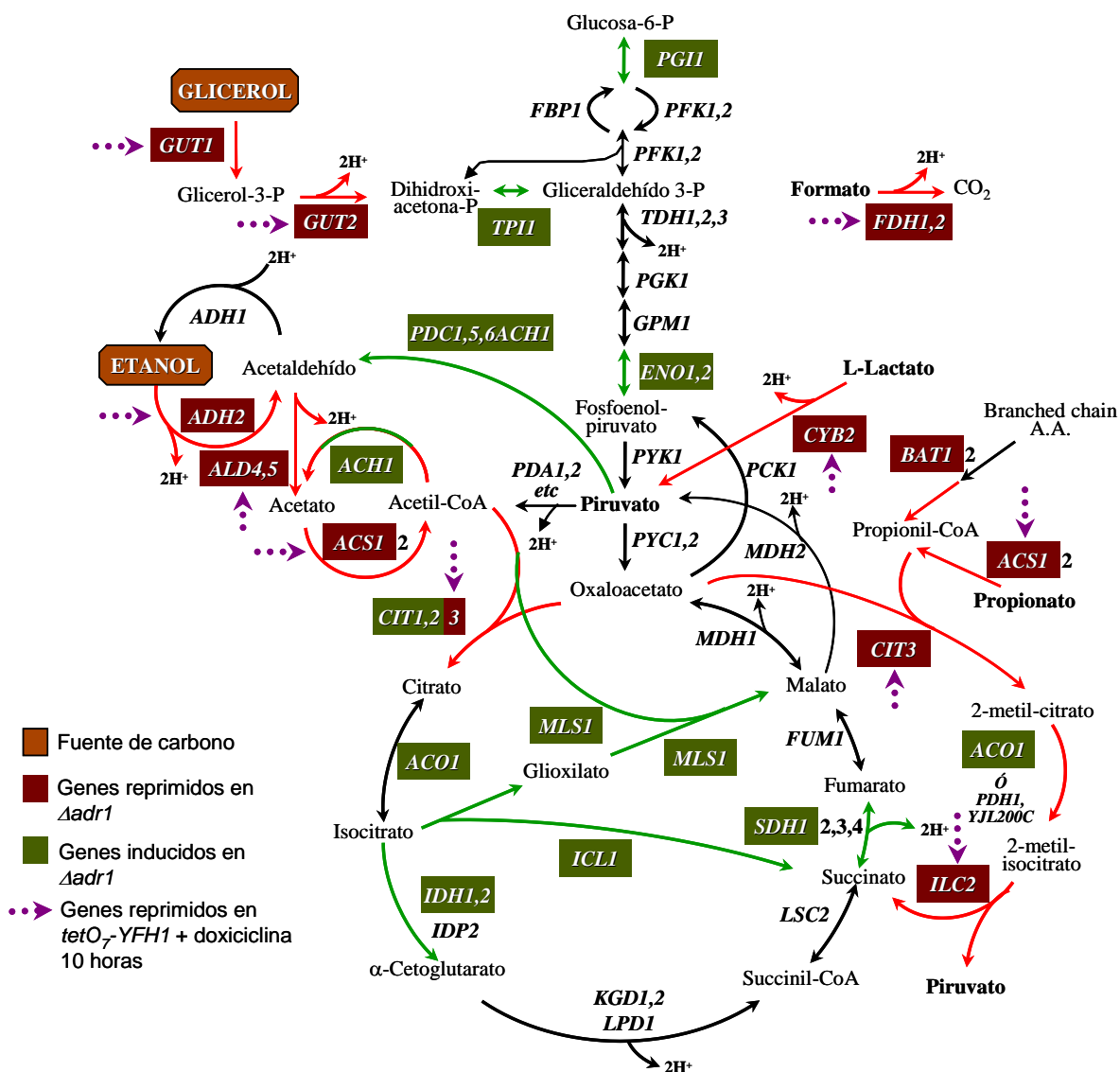


Figura 46. Genes relacionados con la utilización de fuentes de carbono no fermentables cuya expresión es influenciada por *ADR1*—Se muestra un conjunto de genes cuya expresión cambia en ausencia de *ADR1*. En rojo, se muestran los genes que se encontraron reprimidos. En verde aquellos cuya expresión aumenta en ausencia de *ADR1* (Young, et al., 2003). Las flechas violeta indican los genes que se encontraron reprimidos en *YFH1/yfh1* (células no tratadas vs. tratadas con doxiciclina 10 horas).

Si bien, el nivel de expresión de *ADR1* no presentó un cambio significativo en el análisis transcriptómico global, no se puede descartar la posibilidad que *Adr1p* no estuviera siendo fosforilado por la quinasa *Snf1p*, lo cual implicaría que este factor se acumule en el citosol y no esté activando los genes necesarios para obtener energía a partir del etanol/glicerol, ejemplo *Adh2p* y *Aldh4p*. Esta vía de regulación no implicaría necesariamente un cambio en los niveles del transcrito. Otra consideración relevante constituye el hecho que esta respuesta mediada por *ADR1* está ocurriendo a las 10 horas de tratamiento con doxiciclina, lo que implica que esta respuesta aparece antes de que ocurra una bajada del consumo de oxígeno y la pérdida de las enzimas Fe-S. ¿Quiere esto decir que se estaría activando una vía de señalización que es anterior a estos acontecimientos?.

5. POSIBLE FUNCIÓN DE *YFH1*

A la luz de los resultados obtenidos, ¿cual puede ser la función de *Yfh1*/Frataxina? Una interesante cuestión a explorar sobre la función de esta proteína sería la posibilidad que fuese responsable del mantenimiento de un adecuado balance de hierro en el interior de la mitocondria, funcionando o estando implicada en un sistema que mediría el status del hierro en el organelo y activaría la exportación del metal cuando fuese necesario. Otros autores han especulado sobre esta posibilidad al sugerir que el nivel de hierro en la mitocondria debe estar regulado. Se ha observado que la deficiencia de un gen esencial para la biosíntesis Fe-S como *NFS1*, induce la acumulación de una gran cantidad de hierro en la mitocondria (20-30 veces), y que si se reintroduce *Nfs1p*, disminuyen los niveles de hierro a valores similares a los del la cepa *wild type*. La explicación más razonable para esta restitución de la homeostasis y que explique de que forma se revierte la acumulación del metal en la mitocondria, sería que el hierro fuera exportado nuevamente al citosol (Chen, et al., 2002). *Yfh1p* podría participar en el mantenimiento de este adecuado balance en la mitocondria. En un mutante deficiente en *Yfh1*, la mitocondria sería incapaz de percibir el exceso del metal y promover su exportación. Esta hipótesis también explicaría la capacidad de *Yfh1p* de interaccionar con el metal y sería compatible con el papel regulador descrito recientemente para el ortólogo bacteriano *CyaY* (Adinolfi, et al., 2009). Este estudio sugiere que frataxina sería la responsable de regular el ritmo de producción de los centros Fe-S, lo cual dependería de la demanda de los mismos para ser ensamblados en las proteínas receptoras. En una situación de suficiencia de hierro frataxina sensaría el incremento en los niveles de Fe e inhibiría la formación del complejo *IscS-IscU*. En su ausencia se desregularía este proceso, lo cual provocaría una activación

constitutiva de la síntesis, un incremento del hierro y estrés oxidativo. Otra de las observaciones que apoyan esta posible función de Yfh1/frataxina es que en su ausencia se observa la inducción del transportador Mrs4p, el cual contribuye de manera decisiva a la acumulación de hierro en la mitocondria (Foury and Roganti, 2002). Sin embargo, esta activación del transportador mitocondrial no ocurre en el dominante negativo AFT1-up (Shakoury-Elizeh, et al., 2004), lo que sugeriría que la activación de AFT1 *per se* no es suficiente para inducir el transporte masivo de hierro a la mitocondria.

VI. CONCLUSIONES

Tomando como base los resultados obtenidos en este trabajo se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- 1.- Yfh1 no esta directamente implicada en la síntesis de centros Fe-S en el mutante condicional *YFHI*.
- 2.- La depleción de Yfh1p en el mutante condicional provoca la activación del sistema de alta afinidad de adquisición de hierro, lo cual induce una sobrecarga del metal. Esta activación no depende de la actividad de las enzimas con centros Fe-S.
- 3.- El mutante condicional *YFHI* presenta niveles elevados de las enzimas antioxidantes SOD. Ambos hechos son un reflejo de que existe un elevado estrés oxidativo endógeno.
- 4.- El déficit de Yfh1p induce una pérdida de actividad de Mn-SOD debido a una baja biodisponibilidad de manganeso. Estos bajos niveles de manganeso son el resultado de la regulación a la baja del transportador Smf2p, la cual es provocada por la sobrecarga de hierro.
- 5.- La baja actividad SOD y la sobrecarga de hierro son responsables del daño oxidativo inducido a las proteínas, además constituyen una de las causas de la inactivación de aconitasa.
- 6.- La disminución de la expresión de *YFHI* provoca un fenotipo de deficiencia respiratoria y pérdida del crecimiento.
- 7.- Las células deficientes en *YFHI* presentan “down-regulación” de un conjunto de genes cuya expresión depende del factor de transcripción *ADRI*. Estos genes están directamente implicados en la utilización de fuentes de carbono no fermentables.
- 8.- La depleción de *GRX5*, en el mutante condicional, provoca una rápida inactivación de las enzimas Fe-S y la acumulación de hierro, el cual constituiría un fenotipo canónico común de los miembros de la maquinaria ISC.

- 9.- *YFH1* y *GRX5* comparten un fenotipo de sobrecarga de hierro, incremento del estrés endógeno y déficit de manganeso. Esto sugiere la existencia de ciertos mecanismos comunes en situaciones de desregulación del metabolismo del hierro mitocondrial. Además, dichos mecanismos podrían ser relevantes en las patologías que muestran este mismo fenotipo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

—A—

- Acquaviva F, De Biase I, Nezi L, Ruggiero G, Tatangelo F, Pisano C, Monticelli A, Garbi C, Acquaviva AM, Coccozza S. 2005. Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *J Cell Sci* 118(Pt 17):3917-24.
- Adinolfi S, Iannuzzi C, Prischi F, Pastore C, Iametti S, Martin SR, Bonomi F, Pastore A. 2009. Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat Struct Mol Biol* 16(4):390-6.
- Adinolfi S, Trifuoggi M, Politou A, Martin S, Pastore A. 2002. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet* 11(16):1865-77.
- Aloria K, Schilke B, Andrew A, Craig E. 2004. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep* 5(11):1096-101.
- Alves R, Herrero E, Sorribas A. 2004. Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism. II. Role of glutaredoxin Grx5. *Proteins* 57(3):481-92.
- Anderson GJ, Lesuisse E, Dancis A, Roman DG, Labbe P, Klausner RD. 1992. Ferric iron reduction and iron assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Inorg Biochem* 47(3-4):249-55.
- Andrew AJ, Dutkiewicz R, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J. 2006. Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p. *J Biol Chem* 281(21):14580-7.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27(2-3):215-37.
- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, Kaplan J. 1994. The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76(2):403-10.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. John & Sons, New York.
- Azevedo D, Tacnet F, Delaunay A, Rodrigues-Pousada C, Toledano MB. 2003. Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med* 35(8):889-900.

—B—

- Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J. 1997. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276(5319):1709-12.
- Balasundaram D, Tabor CW, Tabor H. 1991. Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13):5872-6.
- Balasundaram D, Tabor CW, Tabor H. 1993. Oxygen toxicity in a polyamine-depleted spe2 delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(10):4693-7.
- Balk J, Aguilar Netz DJ, Tepper K, Pierik AJ, Lill R. 2005. The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. *Mol Cell Biol* 25(24):10833-41.
- Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Mühlhoff U, Lill R. 2004. The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *EMBO J* 23(10):2105-15.

- Barreto L, Garcerá A, Jansson K, Sunnerhagen P, Herrero E. 2006. A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is functionally related to sulfur amino acid metabolism. *Eukaryot Cell* 5(10):1748-59.
- Barrientos A. 2003. Yeast models of human mitochondrial diseases. *IUBMB Life* 55(2):83-95.
- Beinert H. 2000. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* 5(1):2-15.
- Beinert H, Holm RH, Münck E. 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277(5326):653-9.
- Bellí G, Garí E, Aldea M, Herrero E. 1998. Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* 14(12):1127-38.
- Bellí G, Polaina J, Tamarit J, De La Torre MA, Rodríguez-Manzanares MT, Ros J, Herrero E. 2002. Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *J Biol Chem* 277(40):37590-6.
- Bennetzen JL, Hall BD. 1982. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* 257(6):3018-25.
- Benzie IF. 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr* 39(2):53-61.
- Biteau B, Labarre J, Toledano MB. 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425(6961):980-4.
- Blaiseau PL, Lesuisse E, Camadro JM. 2001. Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol Chem* 276(36):34221-6.
- Blumberg H, Hartshorne TA, Young ET. 1988. Regulation of expression and activity of the yeast transcription factor ADR1. *Mol Cell Biol* 8(5):1868-76.
- Bou-Abdallah F, Adinolfi S, Pastore A, Laue T, Dennis Chasteen N. 2004. Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 341(2):605-15.
- Bouveris A, Cadenas E, Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria, in: L.W. Oberely (Ed.), *Superoxide Dismutases*, CRC press, Boca Raton, Florida, 1982, pp. 15–30.
- Brown JL, North S, Bussey H. 1993. SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol* 175(21):6908-15.
- Bulteau AL, Lundberg KC, Ikeda-Saito M, Isaya G, Szweda LI. 2005. Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(17):5987-91.
- Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G, Szweda LI. 2004. Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* 305(5681):242-5.
- Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. 1997. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* 23(3):361-6.

—C—

- Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275(35):27393-8.
- Camaschella C, Campanella A, De Falco L, Boschetto L, Merlini R, Silvestri L, Levi S, Iolascon A. 2007. The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 110(4):1353-8.

- Campanella A, Isaya G, O'Neill H, Santambrogio P, Cozzi A, Arosio P, Levi S. 2004a. The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum Mol Genet* 13(19):2279-88.
- Campanella A, Isaya G, O'Neill HA, Santambrogio P, Cozzi A, Arosio P, Levi S. 2004b. The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum Mol Genet* 13(19):2279-88.
- Campuzano V, Montermini L, Moltò M, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A and others. 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271(5254):1423-7.
- Carmel-Harel O, Stearman R, Gasch AP, Botstein D, Brown PO, Storz G. 2001. Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 39(3):595-605.
- Cavadini P, O'Neill HA, Benada O, Isaya G. 2002. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 11(3):217-27.
- Chandramouli K, Unciuleac MC, Naik S, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK. 2007. Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* 46(23):6804-11.
- Chen OS, Crisp RJ, Valachovic M, Bard M, Winge DR, Kaplan J. 2004. Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem* 279(28):29513-8.
- Chen OS, Hemenway S, Kaplan J. 2002. Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19):12321-6.
- Chen OS, Kaplan J. 2000. CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *J Biol Chem* 275(11):7626-32.
- Cheng NH, Liu JZ, Brock A, Nelson RS, Hirschi KD. 2006. AtGRXcp, an Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage. *J Biol Chem* 281(36):26280-8.
- Choi JH, Lou W, Vancura A. 1998. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(45):29915-22.
- Ciudin A, Hernandez C, Simo R. 2010. Iron overload in diabetic retinopathy: a cause or a consequence of impaired mechanisms? *Exp Diabetes Res* 2010.
- Condò I, Malisan F, Guccini I, Serio D, Rufini A, Testi R. 2010. Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin. *Hum Mol Genet* 19(7):1221-9.
- Condò I, Ventura N, Malisan F, Tomassini B, Testi R. 2006. A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. *J Biol Chem* 281(24):16750-6.
- Correia AR, Wang T, Craig EA, Gomes CM. 2010. Iron-binding activity in yeast frataxin entails a trade off with stability in the alpha1/beta1 acidic ridge region. *Biochem J* 426(2):197-203.
- Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. 2006a. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 1763(7):747-58.

—D—

- Dancis A, Roman DG, Anderson GJ, Hinnebusch AG, Klausner RD. 1992. Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9):3869-73.
- Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schiestl RH. 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10):5116-21.
- Davies SM, Poljak A, Duncan MW, Smythe GA, Murphy MP. 2001. Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. *Free Radic Biol Med* 31(2):181-90.
- Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* 19(19):5157-66.
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111(4):471-81.
- Della Nave R, Ginestroni A, Giannelli M, Tessa C, Salvatore E, Salvi F, Dotti M, De Michele G, Piacentini S, Mascalchi M. 2008. Brain structural damage in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(1):82-5.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278(5338):680-6.
- Ding H, Yang J, Coleman LC, Yeung S. 2007. Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *J Biol Chem* 282(11):7997-8004.
- Dix DR, Bridgman JT, Broderius MA, Byersdorfer CA, Eide DJ. 1994. The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269(42):26092-9.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47-95.
- Duby G, Foury F, Ramazzotti A, Herrmann J, Lutz T. 2002. A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet* 11(21):2635-43.
- Dutkiewicz R, Schilke B, Cheng S, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J. 2004. Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *J Biol Chem* 279(28):29167-74.
- Dutkiewicz R, Schilke B, Knieszner H, Walter W, Craig EA, Marszalek J. 2003. Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J Biol Chem* 278(32):29719-27.
- Díaz-Ruiz R, Avéret N, Araiza D, Pinson B, Uribe-Carvajal S, Devin A, Rigoulet M. 2008. Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *J Biol Chem* 283(40):26948-55.

—E—

- Elia AE, Albanese A. 2010. Emerging parkinsonian phenotypes. *Rev Neurol (Paris)*. France: 2010 Elsevier Masson SAS. p 834-40.
- Estruch F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24(4):469-86.

—F—

- Fairbanks G, Steck T, Wallach D. 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10(13):2606-17.

- Fernandes AP, Fladvad M, Berndt C, André sen C, Lillig CH, Neubauer P, Sunnerhagen M, Holmgren A, Vlamis-Gardikas A. 2005. A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 280(26):24544-52.
- Fish WW. 1988. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* 158:357-64.
- Foury F. 1997. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195(1):1-10.
- Foury F. 1999. Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett* 456(2):281-4.
- Foury F, Cazzalini O. 1997. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett* 411(2-3):373-7.
- Foury F, Roganti T. 2002. Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* 277(27):24475-83.
- Foury F, Talibi D. 2001. Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* 276(11):7762-8.
- Fragiadakis GS, Tzamarias D, Alexandraki D. 2004. Nhp6 facilitates Aft1 binding and Ssn6 recruitment, both essential for FRE2 transcriptional activation. *EMBO J* 23(2):333-42.
- Frieden E, Hsieh HS. 1976. The biological role of ceruloplasmin and its oxidase activity. *Adv Exp Med Biol* 74:505-29.
- Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV. 2004. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J* 23(14):2872-81.

—G—

- Garcerá A, Barreto L, Piedrafita L, Tamarit J, Herrero E. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem J* 398(2):187-96.
- Gardner PR, Fridovich I. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem* 266(29):19328-33.
- Garí E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E. 1997. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13(9):837-48.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11(12):4241-57.
- Gerber J, Muhlenhoff U, Lill R. 2003. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* 4(9):906-11.
- Gibson TJ, Koonin EV, Musco G, Pastore A, Bork P. 1996. Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 19(11):465-8.
- Gietz R, Sugino A. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74(2):527-34.
- Ginsberg MD, Feliciello A, Jones JK, Avvedimento EV, Gottesman ME. 2003. PKA-dependent binding of mRNA to the mitochondrial AKAP121 protein. *J Mol Biol* 327(4):885-97.
- Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9):722-8.

- Gonzalez-Cabo P, Vazquez-Manrique RP, Garcia-Gimeno MA, Sanz P, Palau F. 2005. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet* 14(15):2091-8
- Gralla EB, Valentine JS. 1991. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* 173(18):5918-20.
- Grant CM, Luikenhuis S, Beckhouse A, Soderbergh M, Dawes IW. 2000. Differential regulation of glutaredoxin gene expression in response to stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1490(1-2):33-42.
- Grant CM, MacIver FH, Dawes IW. 1996. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29(6):511-5.
- Grauslund M, Lopes JM, Rønnow B. 1999. Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. *Nucleic Acids Res* 27(22):4391-8.
- Guarente L. 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol* 101:181-91.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388(6641):482-8.
- Gurvitz A, Wabnegger L, Rottensteiner H, Dawes IW, Hartig A, Ruis H, Hamilton B. 2000. Adr1p-dependent regulation of the oleic acid-inducible yeast gene SPS19 encoding the peroxisomal beta-oxidation auxiliary enzyme 2,4-dienoyl-CoA reductase. *Mol Cell Biol Res Commun* 4(2):81-9.
- Görner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schüller C. 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12(4):586-97.

—H—

- Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281(1-2):9-19.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219(1):1-14.
- Halliwell B, and Gutteridge JM, *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed.), Oxford University.
- Hausmann A, Aguilar Netz DJ, Balk J, Pierik AJ, Mühlenhoff U, Lill R. 2005. The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9):3266-71.
- Hausmann A, Samans B, Lill R, Mühlenhoff U. 2008. Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 283(13):8318-30.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.
- Herrero E, Bellí G, Casa C. 2010. Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Curr Protein Pept Sci* 11(8):659-68.
- Hiltunen JK, Mursula AM, Rottensteiner H, Wierenga RK, Kastaniotis AJ, Gurvitz A. 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 27(1):35-64.
- Holmgren A. 1985. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54:237-71.
- Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264(24):13963-6.

- Holmgren A, Söderberg BO, Eklund H, Brändén CI. 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(6):2305-9.
- Huber C, Eisenreich W, Hecht S, Wächtershäuser G. 2003. A possible primordial peptide cycle. *Science* 301(5635):938-40.
- Huh WK, Lee BH, Kim ST, Kim YR, Rhie GE, Baek YW, Hwang CS, Lee JS, Kang SO. 1998. D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 30(4):895-903.
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257(5076):1496-502.

I

- Ihrig J, Hausmann A, Hain A, Richter N, Hamza I, Lill R, Mühlenhoff U. 2010. Iron regulation through the back door: iron-dependent metabolite levels contribute to transcriptional adaptation to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 9(3):460-71.
- Irazusta V, Cabisco E, Reverter-Branchat G, Ros J, Tamarit J. 2006. Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *J Biol Chem* 281(18):12227-32.
- Irazusta V, Moreno-Cermeño A, Cabisco E, Ros J, Tamarit J. 2008. Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins. *Free Radic Biol Med* 44(9):1712-23.
- Irazusta V, Obis E, Moreno-Cermeño A, Cabisco E, Ros J, Tamarit J. 2010. Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 48(3):411-20.
- Isoyama T, Murayama A, Nomoto A, Kuge S. 2001. Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *J Biol Chem* 276(24):21863-9.
- Izawa S, Inoue Y, Kimura A. 1996. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 320 (Pt 1):61-7.
- Izquierdo A, Casas C, Mühlenhoff U, Lillig CH, Herrero E. 2008. *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryot Cell* 7(8):1415-26.

J

- Jamieson DJ. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(16):1511-27.
- Jara M, Vivancos AP, Calvo IA, Moldón A, Sansó M, Hidalgo E. 2007. The peroxiredoxin Tpx1 is essential as a H₂O₂ scavenger during aerobic growth in fission yeast. *Mol Biol Cell* 18(6):2288-95.
- Jara M, Vivancos AP, Hidalgo E. 2008. C-terminal truncation of the peroxiredoxin Tpx1 decreases its sensitivity for hydrogen peroxide without compromising its role in signal transduction. *Genes Cells* 13(2):171-9.
- Jensen LT, Culotta VC. 2000. Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol* 20(11):3918-27.

—K—

- Kaplan CD, Kaplan J. 2009. Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chem Rev* 109(10):4536-52.
- Kaplan J, McVey Ward D, Crisp RJ, Philpott CC. 2006. Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1763(7):646-51.
- Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R. 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 18(14):3981-9.
- Knight SA, Kim R, Pain D, Dancis A. 1999. The yeast connection to Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet. United States.* p 365-71.
- Kondapalli K, Kok N, Dancis A, Stemmler T. 2008. *Drosophila* frataxin: an iron chaperone during cellular Fe-S cluster bioassembly. *Biochemistry* 47(26):6917-27.
- Kratzer S, Schüller HJ. 1997. Transcriptional control of the yeast acetyl-CoA synthetase gene, ACS1, by the positive regulators CAT8 and ADR1 and the pleiotropic repressor UME6. *Mol Microbiol* 26(4):631-41.
- Krems B, Charizanis C, Entian KD. 1996. The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet* 29(4):327-34.
- Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A. 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21(18):6139-50.
- Kuge S, Jones N. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 13(3):655-64.
- Kumánovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D and others. 2008. Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J Biol Chem* 283(16):10276-86.

—L—

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Lange H, Kispal G, Lill R. 1999. Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J Biol Chem* 274(27):18989-96.
- Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Mühlenhoff U, Kispal G, Lill R. 2001. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* 2(8):715-20.
- Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274(23):16040-6.
- Lesuisse E, Simon-Casteras M, Labbe P. 1998. Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology* 144 (Pt 12):3455-62.
- Levi S, Corsi B, Bosisio M, Invernizzi R, Volz A, Sanford D, Arosio P, Drysdale J. 2001. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* 276(27):24437-40.
- Levine RL, R SE. 2006. Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology. In: I D-D, A S, A BD, editors. *Redox Proteomics: From protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. United States of America: Wiley-Interscience. p 123-168.

- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-57.
- Levine RL. 2006. Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology. In: I. D-D, Butterfield SAADA, editors. *Redox Proteomics: From protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. United States of America: Wiley-Interscience. p 123-168.
- Li H, Mapolelo DT, Dingra NN, Naik SG, Lees NS, Hoffman BM, Riggs-Gelasco PJ, Huynh BH, Johnson MK, Outten CE. 2009. The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* 48(40):9569-81.
- Li J, Kogan M, Knight SA, Pain D, Dancis A. 1999. Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem* 274(46):33025-34.
- Li L, Chen O, McVey Ward D, Kaplan J. 2001. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* 276(31):29515-9.
- Li L, Kaplan J. 2001. The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J Biol Chem* 276(7):5036-43.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH and others. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11(4):376-81.
- Lia DS, Ohshima K, Jiralersponga S, Bojanowskib MW, Pandolfoa M, c. 1999. Knock-out of the *cyaY* gene in *Escherichia coli* does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Lett* 456(1):13-16.
- Lill R, Diekert K, Kaut A, Lange H, Pelzer W, Prohl C, Kispal G. 1999. The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* 380(10):1157-66.
- Lill R, Kispal G. 2000. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25(8):352-6.
- Lill R, Mühlenhoff U. 2008. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* 77:669-700.
- Lillig CH, Berndt C, Holmgren A. 2008. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* 1780(11):1304-17.
- Link G, Pinson A, Kahane I, Hershko C. 1989. Iron loading modifies the fatty acid composition of cultured rat myocardial cells and liposomal vesicles: effect of ascorbate and alpha-tocopherol on myocardial lipid peroxidation. *J Lab Clin Med* 114(3):243-9.
- Link G, Saada A, Pinson A, Konijn AM, Hershko C. 1998. Mitochondrial respiratory enzymes are a major target of iron toxicity in rat heart cells. *J Lab Clin Med* 131(5):466-74.
- Liu XF, Elashvili I, Gralla EB, Valentine JS, Lapinskas P, Culotta VC. 1992. Yeast lacking superoxide dismutase. Isolation of genetic suppressors. *J Biol Chem* 267(26):18298-302.
- Longo VD, Gralla EB, Valentine JS. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* 271(21):12275-80.
- Lopreiato R, Facchin S, Sartori G, Arrigoni G, Casonato S, Ruzzene M, Pinna LA, Carignani G. 2004. Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem J* 377(Pt 2):395-405.

- Luikenhuis S, Perrone G, Dawes IW, Grant CM. 1998. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* 9(5):1081-91.
- Luk E, Carroll M, Baker M, Culotta VC. 2003. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18):10353-7.
- Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y, Culotta VC. 2005. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280(24):22715-20.
- Luk EE, Culotta VC. 2001. Manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p. *J Biol Chem* 276(50):47556-62.

—M—

- Machado AK, Morgan BA, Merrill GF. 1997. Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272(27):17045-54.
- Madeo F, Fröhlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Fröhlich KU. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145(4):757-67.
- Manchenko GP. 1994. *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15(9):2227-35.
- Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT and others. 1999. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3):846-51.
- Mesecke N, Mittler S, Eckers E, Herrmann JM, Deponte M. 2008. Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins. *Biochemistry* 47(5):1452-63.
- Mewes HW, Albermann K, Bähr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maierl A, Oliver SG and others. 1997. Overview of the yeast genome. *Nature* 387(6632 Suppl):7-65.
- Molina MM, Bellí G, de la Torre MA, Rodríguez-Manzanque MT, Herrero E. 2004. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem* 279(50):51923-30.
- Molina-Navarro MM, Casas C, Piedrafita L, Bellí G, Herrero E. 2006. Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Lett* 580(9):2273-80.
- Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM, Stadtman ER. 1997. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(18):9585-9.

- Moskvina E, Schüller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H. 1998. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* 14(11):1041-50.
- Moylan JS, Reid MB. 2007. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve* 35(4):411-29.
- Munujos P, Coll-Canti J, Gonzalez-Sastre F, Gella FJ. 1993. Assay of succinate dehydrogenase activity by a colorimetric-continuous method using iodonitrotetrazolium chloride as electron acceptor. *Anal Biochem* 212(2):506-9.
- Mühlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R. 2003. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* 22(18):4815-25.
- Mühlenhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, Zhang Y, Stubbe J, Pierrel F, Herrero E and others. 2010. Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab* 12(4):373-85.
- Mühlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G, Lill R. 2002. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* 11(17):2025-36.

—N—

- Navarro-Aviño JP, Prasad R, Miralles VJ, Benito RM, Serrano R. 1999. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. *Yeast* 15(10A):829-42.

—O—

- Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford JC, Lill R, Winge DR. 2006. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281(26):17661-9.
- Ota IM, Varshavsky A. 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262(5133):566-9.
- Oyedotun KS, Lemire BD. 2004. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *J Biol Chem* 279(10):9424-31.

—P—

- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87(1):315-424.
- Pandolfo M. 2009. Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol* 256 Suppl 1:3-8.
- Pandolfo M. 2008. Drug Insight: antioxidant therapy in inherited ataxias. *Nat Clin Pract Neurol* 4(2):86-96.
- Pandolfo M, Pastore A. 2009. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J Neurol* 256 Suppl 1:9-17.
- Park S, Gakh O, Mooney SM, Isaya G. 2002. The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J Biol Chem* 277(41):38589-95.
- Park S, Gakh O, O'Neill H, Mangravita A, Nichol H, Ferreira G, Isaya G. 2003. Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J Biol Chem* 278(33):31340-51.

- Park SG, Cha MK, Jeong W, Kim IH. 2000. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275(8):5723-32.
- Pastore C, Franzese M, Sica F, Temussi P, Pastore A. 2007. Understanding the binding properties of an unusual metal-binding protein--a study of bacterial frataxin. *FEBS J* 274(16):4199-210.
- Pavlik P, Simon M, Schuster T, Ruis H. 1993. The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Curr Genet* 24(1-2):21-5.
- Pedrajas JR, Porras P, Martínez-Galisteo E, Padilla CA, Miranda-Vizuete A, Bárcena JA. 2002. Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. *Biochem J* 364(Pt 3):617-23.
- Petrova VY, Drescher D, Kujumdzieva AV, Schmitt MJ. 2004. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J* 380(Pt 2):393-400.
- Philpott CC, Protchenko O. 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7(1):20-7.
- Porras P, Padilla CA, Krayl M, Voos W, Bárcena JA. 2006. One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281(24):16551-62.
- Puig S, Askeland E, Thiele DJ. 2005. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* 120(1):99-110.
- Pujol-Carrion N, Belli G, Herrero E, Nogues A, de la Torre-Ruiz MA. 2006. Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 119(Pt 21):4554-64.

—R—

- Radi R, Catro L, Rodríguez M, Cassina A, Thomson L. 1997. Free Radical Damage to Mitochondria. In: M. Flint Beal NH, Ivan Bodis-Wollner, editor. *Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*: Wiley-Liss. p 57-89.
- Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, Johnston LH. 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 11(7):2335-47.
- Reverter-Branchat G, Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2004. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J Biol Chem* 279(30):31983-9.
- Reverter-Branchat G, Cabiscol E, Tamarit J, Sorolla MA, Angeles de la Torre M, Ros J. 2007. Chronological and replicative life-span extension in *Saccharomyces cerevisiae* by increased dosage of alcohol dehydrogenase 1. *Microbiology* 153(Pt 11):3667-76.
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38(12):1543-52.
- Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Stadtman ER. 1999. A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors* 10(2-3):207-9.
- Robinson AJ, Kunji ER. 2006. Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2617-22.
- Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, Frommel TO, Winship DH, Holmes EW. 1999. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem* 266(1):48-57.
- Robinson J, Brent L, Sumegi B, Serrerre P. 1987. *Mitochondria: a practical approach*: IRL, Press, Oxford.

- Rodríguez-Colman MJ, Reverter-Branchat G, Sorolla MA, Tamarit J, Ros J, Cabiscol E. 2010. The forkhead transcription factor Hcm1 promotes mitochondrial biogenesis and stress resistance in yeast. *J Biol Chem* 285(47):37092-101.
- Rodríguez-Manzaneque MT, Ros J, Cabiscol E, Sorribas A, Herrero E. 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19(12):8180-90.
- Rodríguez-Manzaneque MT, Tamarit J, Bellí G, Ros J, Herrero E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* 13(4):1109-21.
- Rogers JT, Lahiri DK. 2004. Metal and inflammatory targets for Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 5(6):535-51.
- Rosenzweig AC. 2002. Metallochaperones: bind and deliver. *Chem Biol* 9(6):673-7.
- Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A, Rustin P. 1997. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17(2):215-7.
- Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot JP. 2008. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol* 59:143-66.
- Roy A, Solodovnikova N, Nicholson T, Antholine W, Walden WE. 2003. A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *EMBO J* 22(18):4826-35.
- Rutherford JC, Bird AJ. 2004. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* 3(1):1-13.
- Rutherford JC, Jaron S, Ray E, Brown PO, Winge DR. 2001. A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25):14322-7.
- Rutherford JC, Ojeda L, Balk J, Mühlhoff U, Lill R, Winge DR. 2005. Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 280(11):10135-40.

—S—

- Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E. 1999. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18):10206-11.
- Schmitt AP, McEntee K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12):5777-82.
- Schmucker S, Argentini M, Carelle-Calmels N, Martelli A, Puccio H. 2008. The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet* 17(22):3521-31.
- Shakoury-Elizeh M, Tiedeman J, Rashford J, Ferea T, Demeter J, Garcia E, Rolfes R, Brown PO, Botstein D, Philpott CC. 2004. Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15(3):1233-43.
- Sherman F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350:3-41.
- Simon M, Adam G, Rapatz W, Spevak W, Ruis H. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* ADR1 gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. *Mol Cell Biol* 11(2):699-704.
- Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R, Kispal G. 2002. Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem* 277(30):26944-9.
- Spector A. 2000. Review: Oxidative stress and disease. *J Ocul Pharmacol Ther* 16(2):193-201.

- Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, Dancis A. 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271(5255):1552-7.
- Stemmler T, Lesuisse E, Pain D, Dancis A. 2010. Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *J Biol Chem* 285(35):26737-43.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276(41):38084-9.
- Subramanian P, Rodrigues AV, Ghimire-Rijal S, Stemmler TL. 2011. Iron chaperones for mitochondrial Fe-S cluster biosynthesis and ferritin iron storage. *Curr Opin Chem Biol*.
- Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N. 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10):5105-10.

—T—

- Tamarit J, Belli G, Cabisco E, Herrero E, Ros J. 2003. Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J Biol Chem* 278(28):25745-51.
- Tamarit J, Cabisco E, Ros J. 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* 273(5):3027-32.
- Tamarit J, Irazusta V, Moreno-Cermeno A, Ros J, Pr. 2006. Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Analytical Biochemistry* 351(1):149-151.
- Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 15(6):319-26.
- ter Linde JJ, Liang H, Davis RW, Steensma HY, van Dijken JP, Pronk JT. 1999. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181(24):7409-13.
- Tokumoto U, Kitamura S, Fukuyama K, Takahashi Y. 2004. Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*. *J Biochem* 136(2):199-209.
- Toledano MB, Delaunay A, Biteau B, Spector D and D. Azevedo In: S. Hohmann and P.W.H. Mager, Editors, *Oxidative Stress Responses in Yeast, Topics in Current Genetics, Yeast Stress Responses* vol. 1, Springer-Verlag (2003), pp. 241–303.
- Tsuzi D, Maeta K, Takatsume Y, Izawa S, Inoue Y. 2004. Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett* 565(1-3):148-54.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237(2):408-14.

—U—

- Ueta R, Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y. 2007. Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18(8):2980-90.
- Ueta R, Fukunaka A, Yamaguchi-Iwai Y. 2003. Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278(50):50120-7.

- Unciuleac MC, Chandramouli K, Naik S, Mayer S, Huynh BH, Johnson MK, Dean DR. 2007. In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* 46(23):6812-21.

—V—

- Vickery LE, Cupp-Vickery JR. 2007. Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(2):95-111.
- Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barceló A, Ariño J. 2004. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279(42):43614-24.
- Vilella F, Alves R, Rodríguez-Manzanque MT, Bellí G, Swaminathan S, Sunnerhagen P, Herrero E. 2004. Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comp Funct Genomics* 5(4):328-41.

—W—

- Wallace MA, Liou LL, Martins J, Clement MH, Bailey S, Longo VD, Valentine JS, Gralla EB. 2004. Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. *J Biol Chem* 279(31):32055-62.
- Wang T, Craig EA. 2008. Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *J Biol Chem* 283(18):12674-9.
- Wiesenberger G, Link TA, von Ahsen U, Waldherr M, Schweyen RJ. 1991. MRS3 and MRS4, two suppressors of mtRNA splicing defects in yeast, are new members of the mitochondrial carrier family. *J Mol Biol* 217(1):23-37.
- Williams DM, Lee GR, Cartwright GE. 1974. Ferroxidase activity of rat ceruloplasmin. *Am J Physiol* 227(5):1094-7.
- Wills C, Phelps J. 1975. A technique for the isolation of yeast alcohol dehydrogenase mutants with altered substrate specificity. *Arch Biochem Biophys* 167(2):627-37.
- Wingert RA, Galloway JL, Barut B, Foott H, Fraenkel P, Axe JL, Weber GJ, Dooley K, Davidson AJ, Schmid B and others. 2005. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436(7053):1035-39.
- Wishart JA, Hayes A, Wardleworth L, Zhang N, Oliver SG. 2005. Doxycycline, the drug used to control the tet-regulatable promoter system, has no effect on global gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22(7):565-9.
- Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, Rhee SG. 2003. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300(5619):653-6.
- Wächtershäuser G. 2007. On the chemistry and evolution of the pioneer organism. *Chem Biodivers* 4(4):584-602.

—Y—

- Yakes FM, Van Houten B. 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2):514-9.
- Yamaguchi-Iwai Y, Dancis A, Klausner RD. 1995. AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14(6):1231-9.
- Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A, Klausner RD. 1996. Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J* 15(13):3377-84.

- Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, Sasaki R. 2002. Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277(21):18914-8.
- Yan C, Lee LH, Davis LI. 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J* 17(24):7416-29.
- Yang M, Cobine PA, Molik S, Naranuntarat A, Lill R, Winge DR, Culotta VC. 2006. The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. *EMBO J* 25(8):1775-83.
- Yoon T, Cowan J. 2003. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc* 125(20):6078-84.
- Yoon T, Cowan JA. 2004. Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* 279(25):25943-6.
- Young ET, Dombek KM, Tachibana C, Ideker T. 2003. Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J Biol Chem* 278(28):26146-58.
- Young ET, Kacherovsky N, Van Riper K. 2002. Snf1 protein kinase regulates Adr1 binding to chromatin but not transcription activation. *J Biol Chem* 277(41):38095-103.
- Young ET, Pilgrim D. 1985. Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 5(11):3024-34.
- Yun C, Ferea T, Rashford J, Ardon O, Brown P, Botstein D, Kaplan J, Philpott C. 2000. Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J Biol Chem* 275(14):10709-15.
- Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR. 2000. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2):599-604.

—Z—

- Zagarese HE, Diaz M, Pedrozo F, Ferraro M, Cravero W, Tartarotti B. 2001. Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. *J Photochem Photobiol B* 61(1-2):35-45.
- Zhang Y, Lyver ER, Knight SA, Pain D, Lesuisse E, Dancis A. 2006. Mrs3p, Mrs4p, and frataxin provide iron for Fe-S cluster synthesis in mitochondria. *J Biol Chem* 281(32):22493-502.

VIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Frataxin Depletion in Yeast Triggers Up-regulation of Iron Transport Systems before Affecting Iron-Sulfur Enzyme Activities*

Received for publication, May 28, 2010, and in revised form, October 7, 2010. Published, JBC Papers in Press, October 18, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.149443

Armando Moreno-Cermeño, Èlia Obis, Gemma Bellí, Elisa Cabiscol, Joaquim Ros¹, and Jordi Tamarit

From the Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, Universitat de Lleida, 25008 Lleida, Spain

The primary function of frataxin, a mitochondrial protein involved in iron homeostasis, remains controversial. Using a yeast model of conditional expression of the frataxin homologue *YFH1*, we analyzed the primary effects of *YFH1* depletion. The main conclusion unambiguously points to the up-regulation of iron transport systems as a primary effect of *YFH1* down-regulation. We observed that inactivation of aconitase, an iron-sulfur enzyme, occurs long after the iron uptake system has been activated. Decreased aconitase activity should be considered part of a group of secondary events promoted by iron overloading, which includes decreased superoxide dismutase activity and increased protein carbonyl formation. Impaired manganese uptake, which contributes to superoxide dismutase deficiency, has also been observed in *YFH1*-deficient cells. This low manganese content can be attributed to the down-regulation of the metal ion transporter *Smf2*. Low *Smf2* levels were not observed in *AFT1/YFH1* double mutants, indicating that high iron levels could be responsible for the *Smf2* decline. In summary, the results presented here indicate that decreased iron-sulfur enzyme activities in *YFH1*-deficient cells are the consequence of the oxidative stress conditions suffered by these cells.

Frataxin is a small mitochondrial protein that when deficient is the cause of Friedreich ataxia in humans. Homologues of this protein are found in bacteria, fungi, and plants (1). The gene encoding frataxin was identified 14 years ago (2). Initial research performed with yeast cells deficient in the yeast frataxin homologue 1 gene (*YFH1*) indicates the presence of a direct link between frataxin and iron metabolism (3) and the mitochondrial nature of the disease (4, 5). The presence of deficient activities of iron-sulfur-containing enzymes in frataxin- or *Yfh1*-deficient cells was also observed early and initially considered a consequence of iron-induced oxidative stress (6). A direct role of *Yfh1* in iron-sulfur biogenesis was first suggested in 1999 based on the presence of low aconitase activity in yeast *Yfh1* mutants grown under iron-limiting con-

ditions (7). Two years later, iron-sulfur deficiency was observed prior to iron accumulation in a conditional frataxin mutant mouse model (8). Both facts support the hypothesis of a primary role for frataxin in iron-sulfur biogenesis, a complex process requiring the participation of several highly conserved proteins called ISC system proteins (9, 10). These proteins are involved in providing the sulfur, iron, and reductive power required to build the cluster. Also, some of them act as scaffold proteins where the newborn clusters are initially accommodated. Finally, a group of proteins participates in the transfer of the cluster from the scaffold proteins to their final host proteins. Many studies have provided evidence that frataxins act as iron donors in iron-sulfur maturation. Most of these studies are based on the finding of direct interactions between frataxins and ISC system proteins such as *Isu1* (11–13). However, other findings contradict the hypothesis that frataxin plays a primary role in iron-sulfur biogenesis. For instance, the respiratory function in *Yfh1*-deficient yeasts can be rescued by limiting iron toxicity, either by expressing human mitochondrial ferritin (14) or overexpressing the vacuolar iron transporter *CCC1* (15). Also in yeast, aconitase activity is preserved in $\Delta yfh1$ cells grown under strict anaerobic conditions (16). Moreover, in two previous studies (17, 18), we observed that *YFH1* null mutations lead to the impairment of superoxide dismutase (SOD)² activities. When these activities were restored, the activities of several iron-sulfur-containing enzymes were also recovered, suggesting that iron-sulfur deficiency in $\Delta yfh1$ yeasts is due to the lack of SOD activities. In frataxin-deficient *Drosophila melanogaster*, aconitase deficiency is observed only under hyperoxia conditions (19), whereas H₂O₂ scavenging restores aconitase activity (20). All of these observations suggest that lack of iron-sulfur enzymatic activities in frataxin-deficient cells could be a consequence of oxidative stress conditions generated by iron accumulation.

The controversy about the primary function of frataxin may be due to the difficulty in differentiating between primary defects directly related to frataxin function and those caused by oxidative stress conditions exerted by iron overload. These latter effects should be considered secondary and not directly related to frataxin function. To solve this problem, some studies have analyzed the evolution of several bio-

* This study was supported by Grants BFU2007-66249/BMC and CSD2007-00020 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and SGR0677 from the Generalitat de Catalunya (Spain).

¹ To whom correspondence should be addressed: Dept. Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Montserrat Roig, 2, 25008 Lleida, Spain. Tel.: 34-973-702-275; Fax: 34-973-702-426; E-mail: joaquim.ros@cmb.udl.es.

² The abbreviations used are: SOD, superoxide dismutase; CBB, Coomassie Brilliant Blue.

Frataxin Depletion Triggers Up-regulation of Iron Transport

TABLE 1

Strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Comments
W303-1A	<i>MATa ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1</i>	Wild type
W303-1B	<i>MATa ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1</i>	
MML298	W303-1A <i>yfh1::kanMX4</i>	$\Delta yfh1$ (17)
MML348	W303-1A <i>aft1-$\Delta 5$::URA3</i>	$\Delta aft1$ (45)
BQS100	W303-1A <i>aft1-$\Delta 5$::URA3 yfh1::kanMX4</i>	$\Delta aft1 \Delta yfh1$ (44)
MML830	W303-1A <i>tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Integration of pCM244 in W303-1A (56)
<i>tetO₂-YFH1</i>	W303-1A <i>tetO₂-YFH1::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Promoter substitution of <i>YFH1</i> in MML830
BQS099	W303-1A <i>tetO₇-YFH1::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Promoter substitution of <i>YFH1</i> in MML830
<i>tetO₇-YFH1</i>	W303-1A <i>tetO₇-YFH1::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Spore from BQS099 \times W303-1B cross
BQS202	<i>tetO₂-YFH1 YFH1-3HA::natMX4</i>	Chromosomal <i>YFH1</i> tagged with 3HA using the <i>natMX4</i> cassette
BQS203	<i>tetO₇-YFH1; YFH1-3HA::natMX4</i>	Chromosomal <i>YFH1</i> tagged with 3HA using the <i>natMX4</i> cassette
BQS204	W303-1A <i>YFH1-3HA::natMX4</i>	Chromosomal <i>YFH1</i> tagged with 3HA using the <i>natMX4</i> cassette
BQS206	<i>tetO₇-YFH1; SMF2-3HA::hphNT1</i>	Chromosomal <i>SMF2</i> tagged with 3HA using the <i>hphNT1</i> cassette
BQS207	MML298 <i>SMF2-3HA::hphNT1</i>	Chromosomal <i>SMF2</i> tagged with 3HA using the <i>hphNT1</i> cassette
BQS208	W303-1A <i>SMF2-3HA::hphNT1</i>	Chromosomal <i>SMF2</i> tagged with 3HA using the <i>hphNT1</i> cassette
BQS213	BQS100 <i>SMF2-3HA::hphNT1</i>	Chromosomal <i>SMF2</i> tagged with 3HA using the <i>hphNT1</i> cassette
BQS212	MML348 <i>SMF2-3HA::hphNT1</i>	Chromosomal <i>SMF2</i> tagged with 3HA using the <i>hphNT1</i> cassette

chemical parameters in frataxin conditional mutants. In yeast, studies taking this approach have used galactose (21)- or methionine (22)-regulated promoters. However, *gal* promoters present the disadvantage of the strong metabolic rearrangements suffered by yeast cells after changes in the carbon source present in the growth media, whereas methionine promoters have not been used to address the early effects of Yfh1 deficiency. An interesting alternative approach was attempted in cell culture using tetracycline-inducible shRNA against frataxin (23). Unfortunately, it is difficult to obtain strong evidence from this model because detailed biochemical analysis of the parameters affected by frataxin depletion in cell lines is very challenging. The present study used yeast *tetO-YFH1* mutants in an effort to decipher the primary consequences of frataxin deficiency. In this model the addition of doxycycline to the growth media allows efficient repression of frataxin expression. This drug is known to have no effects on global expression of the yeast genome (24), avoiding the side effects associated with other kinds of promoters. This approach has allowed us to establish unambiguously that the primary effect of frataxin deficiency is up-regulation of the iron transport systems. We also observed that decreased activities of iron-sulfur-containing enzymes is a secondary effect, resulting from the oxidative stress conditions generated by iron overload and by decreased SOD activities.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Organisms and Culture Conditions—The *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. All of them are derived from W303-1A (*MATa ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1*), which is considered the wild type strain in this work. Yeast cells were grown in rich medium (1% yeast extract and 2% peptone with either 2% glucose (YPD) or 3% glycerol (YPG)) by incubation in a rotary shaker at 30 °C. When indicated, cells were grown in synthetic complete (SC) medium containing 0.67% yeast nitrogen base, a mixture of amino acids, and a carbon source (either 2% glucose or 3% glycerol). All of the experiments described in this work were performed with exponentially growing cells at optical densities ranging from 0.5 to 0.7 ($\lambda = 600$ nm, 1-cm light path).

Plasmids and Genetic Methods—The promoter substitution cassettes from plasmids pCM224 and pCM225 were employed for replacing the endogenous promoters of *YFH1* in MML830 by the *tetO₂* and *tetO₇* promoters as described (25). The primers used for these promoter substitutions were 5'-CAT CGC ACT TGA CAA ATT TCA AAA AAC CGT ATT CAG TGA TCA GCT GAA GCT TCG TAC GC-3' and 5'-CAC TCT ATC TTC TCG CTT AGT TTT TTT TGA AAT ACT ATC TTT GCA TAG GCC ACT AGT GGA T-3'. Plasmids pCYC106 (supplied by Dr. E. Garí, Universitat de Lleida) and pYM24 (26) were used for 3HA tagging of the coding terminus of the chromosomal copies of *YFH1* and *SMF2*, respectively. The primers used for HA tagging in *YFH1* were 5'-ACT TAC TGA AGA AGT TGA GAA GGC CAT TTC TAA AAG CCA ACG TAC GCT GCA GGT CGA C-3' and 5'-AAG GAA GAG AGA CTC TAA CTA TGA AAT AGA TTG GAT GCG TCA TCG ATG AAT TCG AGC TCG-3'. The primers used for tagging HA in *SMF2* were 5'-TGA ACT TTT ATA TGT TAC TGG GCT TTA CTA CGG GCA AAG AAG TAC ACC TCC GTA CGC TGC AGG TCG AC-3' and 5'-ATT CTT GGA TAA AAT GTA TAC TTA TAC TAG TCT AAA GAA TTG TTA TAT TAA TCG ATG AAT TCG AGC TCG-3'. For the overexpression of *Mrs4*, we used the plasmid JK1489 in which *MRS4* tagged with FLAG at its C terminus was inserted into pCM185 (27), a tetracycline-regulated plasmid. JK1489 was generously supplied by Dr. Jerry Kaplan (University of Utah, Salt Lake City).

Iron and Manganese Analyses—Total cellular iron and manganese concentrations were determined in nitric acid (3%)-digested cells. Cellular volumes were calculated before digestion in a Coulter Z2 particle count and size analyzer. Iron content was determined using bathophenanthroline sulfonate as chelator (28). Manganese content was assayed in a graphite furnace atomic absorption spectrometer.

Enzyme Activities—Cell extracts were prepared using glass beads. Aconitase and citrate synthase enzyme activities were assayed as described (29). SOD activities were analyzed in zymograms. Briefly, cells were disrupted using glass beads in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and 30 μ g of protein were loaded on native Tris-glycine polyacrylamide gels. After electrophoresis, gels were stained for SOD activity as described

(30). Native gels were densitometered in a GS800 densitometer (Bio-Rad), and the density of the bands corresponding to Mn-SOD or CuZn-SOD activity was calculated using Quantity One software (Bio-Rad). A standard curve containing serial dilutions of a reference extract was used to estimate the relative SOD activity in each extract.

Oxygen Consumption—Oxygen consumption was measured in a Clark detector as described (31). In brief, oxygen uptake was measured in a 4-ml stirred chamber (100 rpm) using a YSI model 53 biological oxygen monitor (Yellow Springs Instruments) following the manufacturer's directions. A volume containing 1×10^7 cells grown in YPG was harvested, washed, resuspended in fresh YPG medium and tested for oxygen consumption.

Northern Blot Analyses—RNA isolation and electrophoresis, probe labeling with digoxigenin, hybridization, and signal detection were done as described previously (32). Gene probes were generated by PCR from genomic DNA, using oligonucleotides designed to amplify internal open reading frame sequences.

Western Blot Analysis—Cell extracts were separated in SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The following primary antibodies were used: Sod2 (Stressgen, SOD-111), Sod1 (Chemicon, AB1237), Aco1 (obtained from R. Lill, Marburg, Germany), Por1 (Molecular Probes, A6449), E2 subunit from α -ketoglutarate dehydrogenase (Kgd2) (33), and antibodies against HA epitope (Roche Applied Science, catalog No. 1867423). Peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies were used for detection. Image acquisition was performed in a ChemiDoc XRS (Bio-Rad). When required, chemiluminescent data were analyzed using Quantity One software (Bio-Rad). The protein load was verified by post-Western Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining of the PVDF membranes.

Carbonyl Quantitation—Oxidative damage to proteins can be evaluated by the use of 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH), a compound that reacts with carbonyl groups in proteins. Carbonyl groups are common by-products of oxidative damage to amino acid side chains. Antibodies against DNP allow the immunodetection of this compound bound to proteins by classic Western blot techniques. Crude extracts were prepared as described previously (33). Antibodies against DNP (Dako) were used at a 1:5000 dilution. A peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was used for detection. Images were acquired in a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) and analyzed with Quantity One software (Bio-Rad).

β -Galactosidase Assay—A Fet3-LacZ plasmid containing the FET3 promoter region cloned into YEpl354, a LacZ expression vector, was kindly supplied by Dr. Jerry Kaplan (University of Utah) (34). This plasmid was used to transform *tetO₇-YFH1* cells. Cells were grown in SC medium without the specific marker present in the plasmid. β -Galactosidase activity was measured using a 96-well kinetic assay as described (35). The reaction rate was assayed over a span of 10 min. Specific activity is defined as nmol/min/mg protein.

RNA Isolation and Quantitative Real-time PCR—Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, catalog no.

74104) according to manufacturer's instructions. 1 μ g of total RNA from each sample was converted into cDNA, and 50 ng was used for each individual real-time PCR reaction. The assays were performed in an iCycler (Bio-Rad) using the TaqMan Universal PCR Master Mix kit from Applied Biosystems. Actin (ACT1) was used as an internal control. Primer sequences and probes for FET3 and ACT1 were provided by Applied Biosystems (TaqMan gene expression assays, custom). Quantification was completed using iCycler IQ real-time detection system software (version 2.3, Bio-Rad). Relative expression ratios were calculated on the basis of Δ Cp values with efficiency correction based on multiple samples (36).

Yeast Cell Fractionation—Mitochondrial and cytosolic fractions were obtained from YPG-grown cells by the following procedure. 0.6 g of yeast cells (wet weight) were resuspended in 2 ml of 100 mM Tris-HCl, pH 9.3, containing 10 mM dithiothreitol and incubated for 30 min at 30 °C. Cells were centrifuged at $1250 \times g$ for 4 min, and the pellet was washed with 4 ml of buffer A (25 mM sodium phosphate, pH 7, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 2 M sorbitol). After a second centrifugation step (4 min, $1250 \times g$) the pellet was resuspended in 2 ml of buffer A containing 5000 units of zymolyase. After a 1-h incubation, the spheroplasts were pelleted by centrifugation at $2800 \times g$ for 7 min. The pellet was resuspended in 2 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1 mM EGTA, 0.32 M sucrose, and protease inhibitors. The spheroplast suspension was subjected three times to 10 strokes in a cooled Potter-Elvehjem tissue grinder (Kimble/Kontes) and centrifuged at $1250 \times g$ for 4 min to eliminate unbroken cells and debris. The supernatant was centrifuged again (10 min, $7800 \times g$) to separate the cytosolic proteins (which remained in the supernatant) from the mitochondria pellet.

Immunoprecipitation of Yfh1—Mitochondrial or cytoplasmic proteins (200 μ g) were immunoprecipitated using a μ MACS™ column (Miltenyi Biotec) prepared for HA-tagged protein isolation according to manufacturer's instructions. The immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes, and immunodetected using anti-HA antibodies.

Measurement of Cell Growth Rate—Cell growth was monitored in 1-ml cultures in 24-well plates incubated at 30 °C and constant agitation in a Biotek PowerWave XS Microplate Spectrophotometer. Plates were sealed with Breathe-EASY membranes (Diversified Biotech, Boston, MA). Optical density (600 nm) was recorded every 30 min. Generation times were calculated every hour using four measurements around the desired time point. Gen5 data analysis software and Microsoft Excel were used for these calculations.

RESULTS

Selection of Growth Media—The present study used yeast *tetO-YFH1* mutant strains in which the endogenous *YFH1* gene was placed under the control of a Tet promoter. Nevertheless, we first analyzed the effect of the growth media on mitochondrial content and activity in our wild type strain (W303-1A) to select the optimal growth conditions for this study. Glucose is the preferred carbon source of *S. cerevisiae*,

Frataxin Depletion Triggers Up-regulation of Iron Transport

and consequently this sugar exerts a strong repressive effect over many genes involved in the utilization of other carbon sources. Glucose also has a strong repressive effect on many mitochondrial genes involved in respiration or NADH generation. As a consequence, yeast grown under conventional YPD medium (which contain 2% glucose) display a respirofermentative metabolism in which most of the glucose used is converted to ethanol. This phenomenon is known as the Crabtree effect (37, 38). Yeast cells can also grow efficiently in

rich medium containing glycerol (YPG), which is a nonfermentable carbon source. Therefore, we analyzed several mitochondrial markers, both in YPD- and YPG-grown cells, including two enzymatic activities (aconitase and mitochondrial citrate synthase) and three proteins (aconitase, α -ketoglutarate dehydrogenase, and the mitochondrial porin). As shown in Fig. 1, all of these parameters were higher in cells grown in YPG, indicating strong repression of mitochondrial function in cells grown in YPD medium. As a result, YPG medium was selected to perform our experiments. It is worth reminding that frataxin is a mitochondrial protein, and tissues most affected in Friedreich ataxia are those with high oxygen consumption (39).

Construction and Validation of Conditional *YFH1* Mutant Strains—We constructed two conditional mutants in which *YFH1* expression was placed under the control of either *tetO₂* or *tetO₇* promoters. For this purpose, we generated *tetO₂-YFH1* and *tetO₇-YFH1* strains in which the wild type *YFH1* promoter was replaced by these two promoters. Because these promoters differ in the number of activation/repression boxes they contain, *tetO₇* promoters are more efficient than *tetO₂* promoters (32). Both of the *tetO-YFH1* strains were able to grow on glycerol in the absence of doxycycline (*YFH1* expressed). The level of expression of *YFH1* was measured by Northern blot before and after 7 h of exposure to doxycycline (Fig. 2A). Wild type and $\Delta yfh1$ strains were used as controls. As expected, *tetO₇-YFH1* presented higher levels of expression than *tetO₂-YFH1* in the absence of doxycycline, whereas in the presence of this drug the repression was stronger in *tetO₇-YFH1* than in *tetO₂-YFH1*. To evaluate the effect of the different expression levels on protein levels, a 3 \times HA tag was placed at the C-terminal site of Yfh1 in wild type and *tetO-*

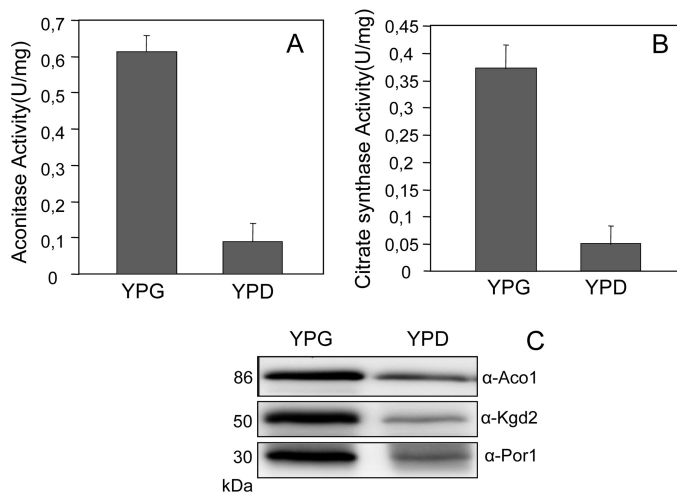


FIGURE 1. Increased mitochondrial content in YPG-grown cells. W303 cells were grown in either YPG or YPD medium. Enzymatic activities of aconitase (A) and citrate synthase (B) were measured in whole cell extracts. The protein content of Aco1, Kgd2, and Por1 was analyzed using specific antibodies (C). In each gel lane, 15 μ g of protein from whole cell extracts was loaded. The protein load was also verified by post-Western CBB staining of the PVDF membrane. The apparent molecular weight of each protein is shown in kDa.

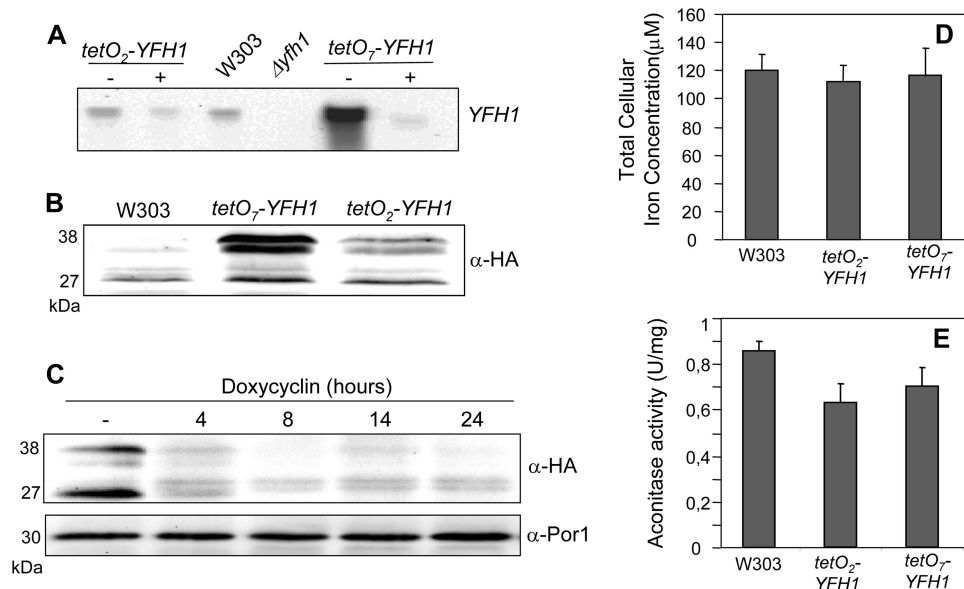


FIGURE 2. Validation of conditional *YFH1* mutant strains. A, W303, *tetO₂-YFH1*, and *tetO₇-YFH1* cells were grown in YPD medium, and the expression of *YFH1* was analyzed by Northern blot before and after the addition of doxycycline (7 h) to the growth medium. B, the effect of the promoter on Yfh1 protein levels was analyzed in YPG-grown cells by Western blot in the HA-tagged versions of the described strains. C, evolution of Yfh1-HA and Por1 protein content after doxycycline addition in the *tetO₇-YFH1-HA* strain grown in YPG medium. The detectable signal in the α -HA Western blot after 8 h of doxycycline addition corresponds to a nonspecific signal. In B and C, 30 μ g of protein from whole cell extracts was loaded in each gel lane, and the protein load was verified by post-Western CBB staining of the PVDF membrane. D, total cellular iron concentration was quantified in YPG-grown cells as described under "Experimental Procedures." E, aconitase activity was measured in whole cell extracts from YPG-grown cells. Data are representative of means \pm S.D. from three independent experiments. The apparent molecular weight of each protein is shown in kDa.

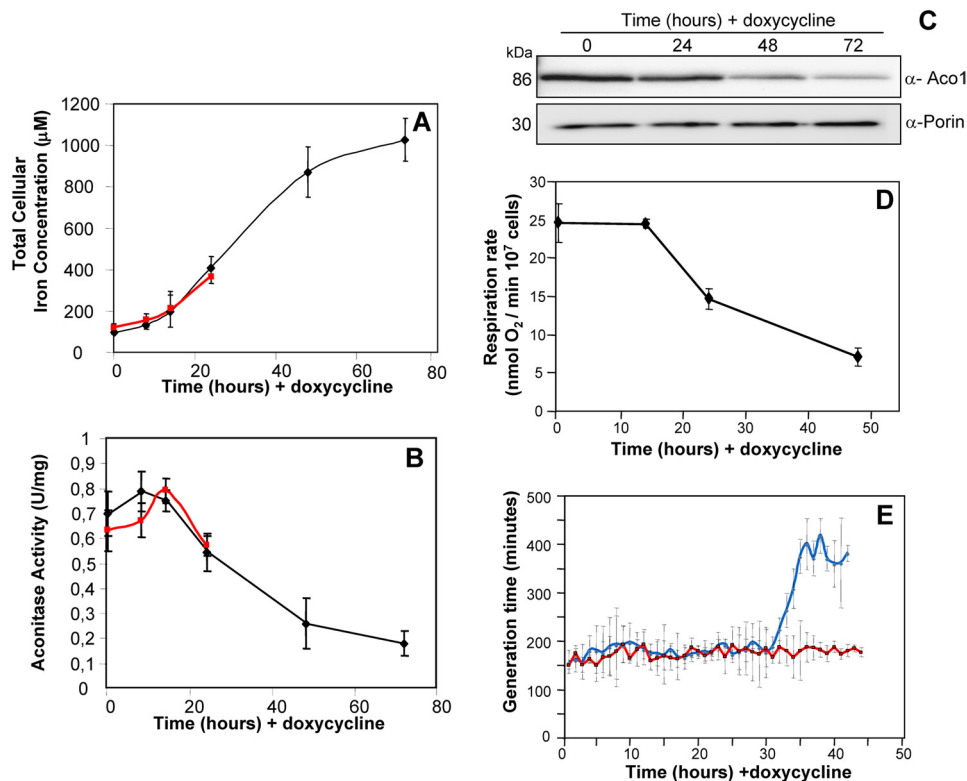


FIGURE 3. Evolution of aconitase activity and iron content after Yfh1 depletion. Total cellular iron concentration (A) and aconitase activity (B) were measured in YPG-grown *tetO₂-YFH1* (red line) and *tetO₇-YFH1* cells (black line) after doxycycline iron concentration. C, Aco1 and Por1 protein content was measured in YPG-grown *tetO₇-YFH1* cells using specific antibodies. In each gel lane, 15 µg of protein from whole cell extracts was loaded, and protein load was verified by post-Western CBB staining of the PVDF membrane. The apparent molecular weight of each protein is shown in kDa. D, oxygen consumption (nmol O₂ min⁻¹) was measured by a Clark-type electrode. Data are representative of means ± S.D. of three independent experiments. E, *tetO₇-YFH1* cells were grown in 24-well plates in YPG medium containing (blue line) or not containing (red line) 2 µg/ml doxycycline. Generation time was calculated for each condition as explained under "Experimental Procedures." Data are representative of mean ± confidence intervals from five independent cultures.

regulated strains. Western blot analysis revealed the presence of three bands (Fig. 2B). The fast migrating band corresponds to the mature form of the protein, whereas bands of higher molecular weight correspond to the immature forms. Wild type and *tetO₂-YFH1-HA* presented similar levels of the mature form, whereas some increase in this form could be observed in the *tetO₇-YFH1-HA* strain. Immature forms were found increased in both of the conditional strains, although this increase was higher in the *tetO₇-YFH1-HA* strain. After doxycycline addition (Fig. 2C), both the mature and immature forms disappeared, and the Yfh1 signal was undetectable after 8 h of incubation with the drug. As an additional control, we analyzed the iron levels and aconitase activity in the different strains used. As shown in Fig. 2, D and E, no relevant changes were observed in these parameters between the different strains. Finally, we analyzed the effects of doxycycline addition to the wild type strain on iron levels, aconitase activity, and SOD amounts (measured by Western blot). No significant changes were observed in any of these parameters after 24 h of incubation with doxycycline (not shown). This observation is consistent with previous reports indicating no doxycycline effect on global gene expression in *S. cerevisiae* (24). All of these data indicate that neither the substitution of the *YFH1* promoter nor the addition of doxycycline *per se* has a major effect on the parameters under study. Therefore, any effect observed on the conditional mutants after doxycycline addition may be attributed to Yfh1 depletion.

Analysis of Iron Accumulation and Aconitase Activity on the Conditional Mutants—We analyzed the effect of doxycycline addition on total cellular iron content and aconitase activity in both strains: *tetO₂-YFH1* at 0, 8, 14 and 24 h and *tetO₇-YFH1* at 0, 8, 14, 24, 48, and 72 h. Iron accumulation was detected after 14 h of *YFH1* repression in both strains, reaching a 10-fold increase after 72 h of doxycycline addition in *tetO₇-YFH1* (Fig. 3A). Aconitase activity (Fig. 3B) was stable for 14 h and then slowly began to decrease after 24 h of incubation. After 72 h, less than 30% of the initial activity could be detected. Western blot analysis of Aco1 protein content (Fig. 3C) indicated that decreased aconitase activity was due to the loss of Aco1 protein. Mitochondrial porin was used as a control of mitochondrial content. This protein remained constant throughout the incubation, indicating that the observed decrease in aconitase activity and content was not due to a general loss of mitochondria. During the first 24 h of *YFH1* repression, the patterns of iron accumulation and aconitase activity were similar in both *tetO₂-YFH1* and *tetO₇-YFH1* strains, indicating that the original levels of Yfh1 do not have a marked effect on the evolution of the parameters analyzed.

Decline in Respiratory Function—Respiratory failure is a common trait in Yfh1-deficient cells. This failure may result from inactivation of several iron-sulfur-containing proteins, including aconitase and those present in the mitochondrial complexes of the respiratory chain. As a measure of respiratory function, oxygen consumption was analyzed in *tetO₇-*

Frataxin Depletion Triggers Up-regulation of Iron Transport

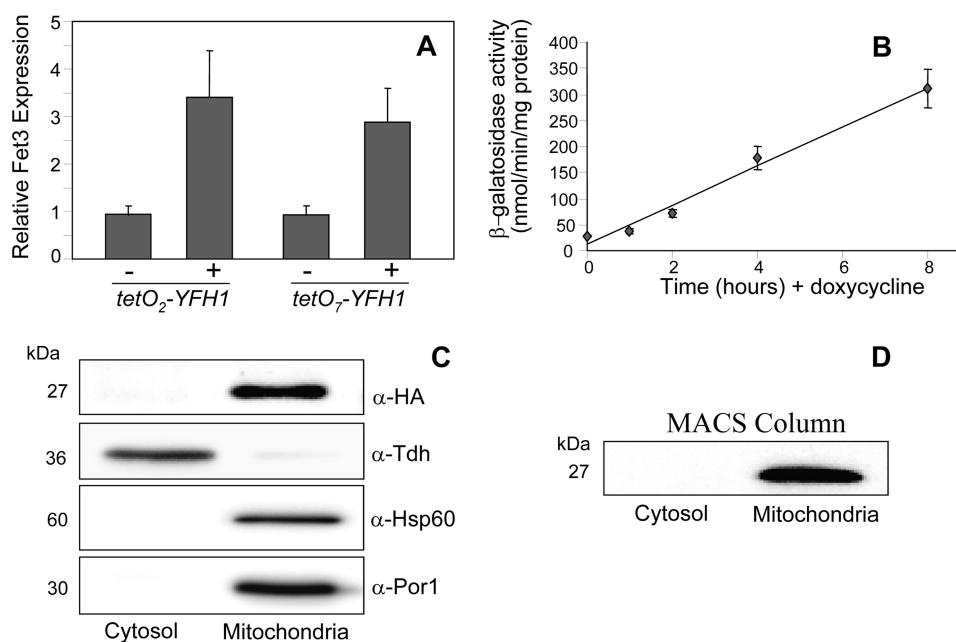


FIGURE 4. Early induction of Fet3 after Yfh1 depletion. *A*, relative expression of *FET3* in the indicated strains was analyzed in YPG-grown cells before (–) and after 4 h of addition of doxycycline (+) by quantitative RT-PCR. Reference values are those observed in untreated *tetO₂-YFH1* cells. *ACT1* was used as a control. *B*, *tetO₇-YFH1* cells transformed with a plasmid containing a *FET3*-LacZ construction were grown in SC medium plus glycerol, and β -galactosidase activity was measured at the indicated time points after doxycycline addition. In both panels, Data are representative of means \pm S.D. from three independent experiments. *C*, mitochondrial and cytosolic fractions were prepared from YPG-grown BQS204 cells (as described under “Experimental Procedures”) and loaded on SDS-polyacrylamide gels. The indicated proteins were detected by Western blot. *D*, mitochondrial and cytosolic fractions were subjected to immunoprecipitation using antibodies against the HA tag and MACS magnetic beads. The immunoprecipitate was loaded on SDS-polyacrylamide gels and analyzed for the presence of Yfh1-HA using antibodies against this tag. The apparent molecular weight of each protein is shown in kDa.

YFH1 cells using a Clark-type electrode. As shown in Fig. 3*D*, oxygen consumption remained constant in our conditional model during the first 14 h after doxycycline addition followed by a progressive decline. This pattern indicates that, similar to aconitase, iron-sulfur centers in respiratory chain complexes were not quickly affected by Yfh1 depletion.

Decline in Growth Rate—We followed the effect of Yfh1 depletion on the growth rate of the *tetO₇-YFH1* strain. We performed these experiments in 24-well plates containing 1 ml of YPG cultures. These plates, containing control cells and doxycycline-treated cells, were incubated in a Biotek Power-Wave XS Microplate Spectrophotometer. As described under “Experimental Procedures,” cultures were kept at log phase by diluting in a new plate every 12 h. Optical density was measured every 30 min, and generation times were calculated for each culture considering 2-h time lapses. As shown in Fig. 3*E*, a significant increase in the generation time was observed after 30 h of treatment with doxycycline. Notably, this increase parallels with the loss in aconitase activity and respiratory function described above.

Activation of the Iron Regulator Precedes Aconitase Inactivation

Inactivation—The results presented above suggest that iron accumulation precedes the decline in aconitase activity and oxygen consumption as observed, for instance, after 24 h of incubation with doxycycline. At this time point, total cellular iron has increased nearly 4 times, both in *tetO₂-YFH1* and *tetO₇-YFH1* strains, whereas aconitase activity presents only a slight (10%) and insignificant decrease (Fig. 3, *A* and *B*). This finding suggests that Aft1p, the transcription factor involved in iron homeostasis, is activated early, before aconitase activ-

ity or oxygen consumption decrease. This finding is highly relevant, because most authors consider iron accumulation in $\Delta yfh1$ strains to be one of the consequences of iron-sulfur deficiency, as Aft1p is known to be activated by the disruption of iron-sulfur biogenesis (40). However, if this canonical hypothesis were true, our conditional model would show a decrease in aconitase activity before Aft1p activation. To further confirm the early activation of iron-responsive genes after Yfh1p depletion, we measured the expression of *FET3* by quantitative RT-PCR at 4 h after doxycycline addition in both the *tetO₂-YFH1* and *tetO₇-YFH1* strains. The Fet3 protein plays a central role in the high affinity iron transport system of yeast and is strongly induced after Aft1 activation (41). The results presented in Fig. 4*A* indicate a clear induction of the *FET3* transcript in both strains. To further investigate this point, we transformed the *tetO₇-YFH1* strain with a plasmid containing a LacZ reporter gene under the control of the Fet3 promoter. Fig. 4*B* shows the evolution of LacZ activity in the transformed strain after addition of doxycycline. A progressive increase in LacZ activity was observed soon after doxycycline addition, confirming the quantitative RT-PCR data. In summary, our data indicate that induction of the high affinity iron transport system in the absence of Yfh1 is not triggered by a general decrease in iron-sulfur centers, thus questioning the idea that iron-sulfur biogenesis is a primary function of frataxin or Yfh1.

Absence of Extramitochondrial Yfh1—The results described above indicate that depletion of Yfh1 leads to an early activation of the high affinity iron transport system through an unknown mechanism not dependent on iron-sulfur biosynthesis.

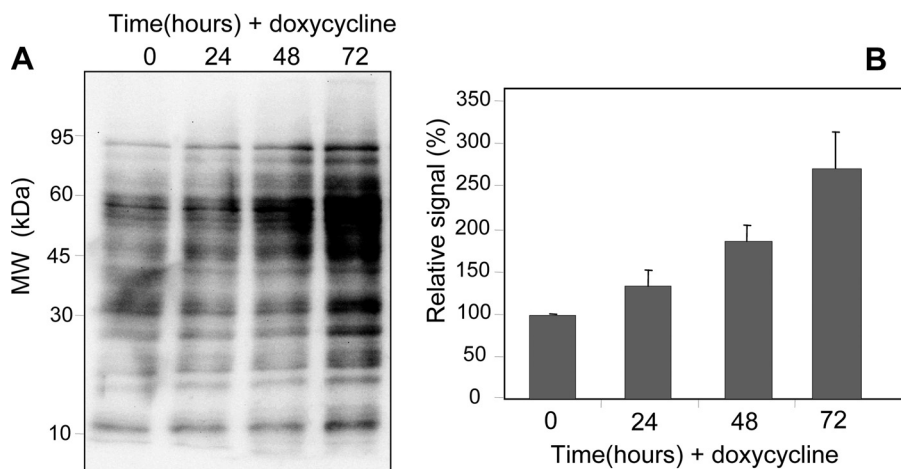


FIGURE 5. **Oxidative damage as carbonylation increases after Yfh1 depletion.** A, carbonylated proteins were detected by Western blot using α -DNP antibodies at the indicated time points after doxycycline addition in YPG-grown *tetO₇-YFH1* cells. B, the chemiluminescent signal of each lane of the Western blot was analyzed using Quantity One software (Bio-Rad). Carbonyl levels at time point 0 were used as the 100% reference. Data are representative of means \pm S.D. from three independent experiments.

We wanted to explore the presence of a cytosolic form of Yfh1 that could act as a regulator of Aft1. In human cells, the presence of an extramitochondrial form of frataxin has been reported that could be involved in IRP1 regulation (42). It should be noted, however, that the existence of such an extramitochondrial form of frataxin has been questioned by other authors (43). To analyze the existence of such an extramitochondrial form of Yfh1, yeast cells carrying an HA-tagged Yfh1 (strain BQS204) were fractionated and analyzed by Western blot for the presence of Yfh1-HA in the cytosolic and mitochondrial fractions (Fig. 4C). The mitochondrial proteins Hsp60 and Por1 were not detected in the cytosolic fraction, indicating the absence of mitochondrial contamination in such fractions. The cytosolic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Tdh1) was used as a cytosolic marker. The presence of Yfh1-HA could not be detected in the cytosolic fraction. This may be due to the presence of minute amounts of Yfh1, not detectable by Western blot, a technique with a limited dynamic range. To overcome this limitation and further confirm the absence of Yfh1 in the cytosol, we immunoprecipitated this protein in the cytosolic and mitochondrial fractions using anti-HA antibodies. Again, Yfh1-HA could not be detected in the cytosolic fraction (Fig. 4D). These results suggest that yeast cells do not display a cytosolic form of Yfh1. Activation of the high affinity iron transport system in *YFH1*-deficient cells may then be triggered by mitochondrial events.

Protein Oxidative Damage—Oxidative stress could explain the progressive decrease of aconitase protein and activity in *tetO₇-YFH1* after doxycycline addition. Iron overload is known to trigger oxidative stress, which would compromise the activity of aconitase, a protein highly sensitive to such stress. We decided to analyze the presence of protein carbonylation, a known marker of protein oxidative damage, in *tetO₇-YFH1* after doxycycline addition. Carbonyl groups are common by-products of the free radical attack on amino acid side chains. They can be detected by Western blot after derivatization with DNPH (33). Protein carbonylation has been

found previously to be increased in $\Delta yfh1$ mutants (16, 44) as well as in other mutants showing iron accumulation (45). Fig. 5 shows the progressive accumulation of carbonyl groups on proteins after Yfh1 depletion in the *tetO₇-YFH1* strain. Analysis of the chemiluminescent data reveals a significant increase in protein carbonylation after 24 h of incubation with doxycycline, indicating the presence of a strong oxidative environment under such conditions. This could explain the observed decline in aconitase at this same time point.

Evolution of SOD Amounts and Activities—In two previous studies, we showed that SODs play a central role in protein oxidative damage in null *YFH1* yeast cells. First, we observed the presence of decreased Mn-SOD activity in $\Delta yfh1$, which compromise the activity of some iron-sulfur-containing enzymes (17). We also observed that decreased activities of SOD1 and SOD2 contribute to oxidative damage to a specific subset of proteins by increasing the presence of chelatable iron in $\Delta yfh1$ cells (18). We wanted now to explore the evolution of both SOD enzymes on the conditional *tetO-YFH1* strains and their potential relevance to aconitase deficiency. To this purpose we analyzed changes in protein content (by Western blot) and enzymatic activities (by zymograms) of both SOD isoenzymes after doxycycline addition to the growth media. Again, *tetO₂-YFH1* was monitored for 24 h and *tetO₇-YFH1* for 72 h. SOD protein amounts were induced progressively after Yfh1 repression in both strains (Fig. 6A). This induction was also observed previously in $\Delta yfh1$ mutants (17, 44) and may be the consequence of the oxidative stress conditions exerted by iron overload. Enzymatic activities were measured using zymograms, which allow a clear differentiation of both isoenzymes (Fig. 6B). As shown in Fig. 6, C and D, enzymatic activities did not correlate to protein amounts (Fig. 6A) over the time course of the study. Mn-SOD activity decreased steadily over the time course of the study, whereas CuZn-SOD showed an initial increase followed by a progressive decline after 24 h of incubation with doxycycline.

Evolution of Manganese and Smf2 Levels—We were interested in understanding the origin of the Mn-SOD activity de-

Frataxin Depletion Triggers Up-regulation of Iron Transport

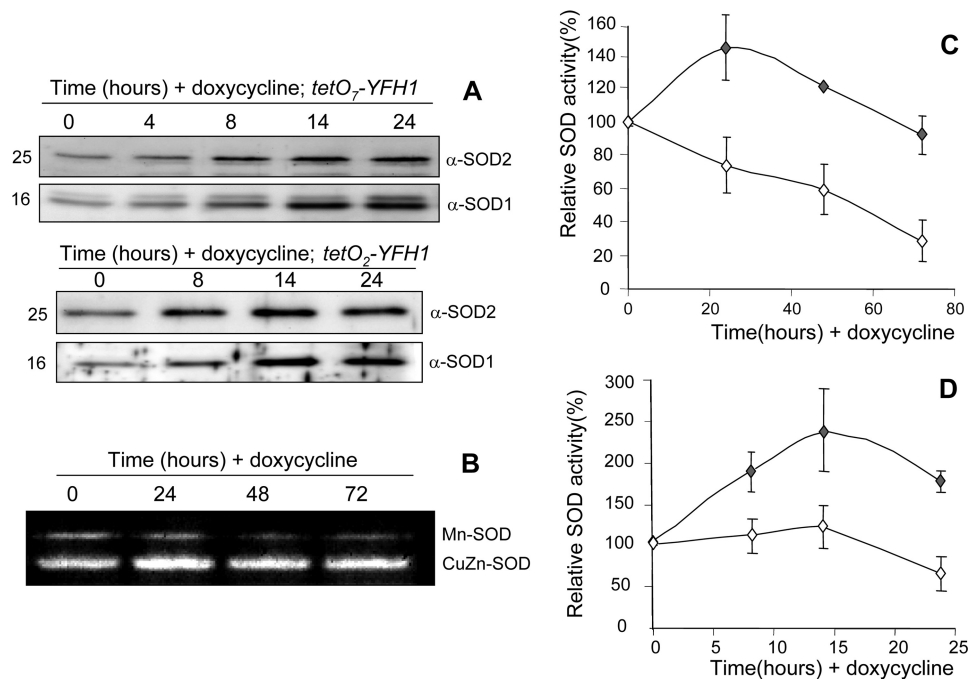


FIGURE 6. Evolution of SOD content and activity after Yfh1 depletion. *A*, evolution of Sod1 and Sod2 protein content in the indicated strains after the addition of doxycycline was analyzed by Western blot using specific antibodies. In each gel lane, 15 μ g of protein from whole cell extracts was loaded, and protein load was verified by post-Western CBB staining of the PVDF membrane. The apparent molecular weight of each protein is shown in kDa. *B*, a representative zymogram from *tetO₇-YFH1* is shown, with the bands corresponding to Mn-SOD and CuZn-SOD activity indicated. *C* and *D*, CuZn SOD activity (gray rhombus) and Mn-SOD activity (white rhombus) were measured by zymograms in YPG-grown *tetO₇-YFH1* (*C*) and *tetO₇-YFH1* cells (*D*) at different time points after doxycycline addition. Activities at time point 0 were used as 100% reference. Data are representative of means \pm S.D. from three independent experiments.

iciency in Yfh1-deficient cells. Previously, we reported that $\Delta yfh1$ mutants exhibited decreased total cellular manganese content. Manganese supplementation of the growth media restored normal manganese levels and recovered Mn-SOD activity, suggesting that inactivation of Mn-SOD was due to limited cofactor availability (17). The reasons for this manganese deficiency in $\Delta yfh1$ cells and their relationship with Yfh1 were not investigated. Therefore, we analyzed the manganese content at 0, 24, 48, and 72 h of incubation with doxycycline in the *tetO₇-YFH1* strain and observed a decline on this metal content after 48 h (Fig. 7A). This is consistent with previous observations in the null mutant and suggests that manganese deficiency is a late effect of Yfh1 depletion not directly linked with the primary function of Yfh1. To analyze the possibility of an early deficiency of this metal in mitochondria, manganese content was also measured in mitochondrial fractions after 24 h of doxycycline addition. No significant differences were found in the manganese content in this organelle at this time point (data not shown). To find the reason for the total cellular manganese content deficiency, we decided to analyze the expression of Smf2, an internal membrane protein required for manganese uptake. Loss of this protein leads to decreased manganese cellular content and decreased Mn-SOD activity, which can be recovered by manganese supplementation of the growth media (46). Smf2 is regulated at the post-translational level by iron and manganese levels. Upon metal-replete conditions, it is targeted to the vacuole for degradation (47). By Western blot, we followed the presence of Smf2 after doxycycline addition to BQS206, a *tetO₇-YFH1* strain with a HA-tagged version of Smf2. We observed a pro-

gressive decline of Smf2 levels after 14 h of incubation (Fig. 7, B and C), which became more marked after 48 h of incubation when only 40% of the original levels of the protein could be detected. Thus, manganese deficiency in Yfh1-depleted cells may be due to the loss of this protein. To further understand the Smf2 deficiency, we investigated the presence of Smf2-HA in $\Delta yfh1$, $\Delta aft1$, and double $\Delta yfh1\Delta aft1$ strains. Mutation of *AFT1* prevents iron accumulation in a $\Delta yfh1$ background (44). As shown in Fig. 7D, Smf2 levels are very low in $\Delta yfh1$ in contrast to the levels observed in $\Delta aft1$ and in the double $\Delta yfh1\Delta aft1$ mutants. This suggests that decreased Smf2 levels in both $\Delta yfh1$ and *tetO₇-YFH1* are due to iron accumulation. In contrast to Aft1, Smf2 could be able to sense increased iron levels in $\Delta yfh1$ cells and lead to decreased high affinity manganese transport.

Effect of Manganese Supplementation on SOD and Aconitase—In a previous study in $\Delta yfh1$ cells (17), we observed protection of several iron-sulfur enzymes by manganese supplementation of the growth media. This treatment also restored Mn-SOD activity. This finding suggested that iron-sulfur enzymes are inactivated by the oxidative stress conditions created by decreased Mn-SOD activity and iron overload. However, manganese treatment in $\Delta yfh1$ cells was unable to restore aconitase activity. This differential behavior of aconitase could be due merely to increased sensitivity of this enzyme toward oxidative stress (relative to the other iron-sulfur enzymes tested), or to the existence of a specific role of Yfh1 in holo-aconitase maturation or stability. The conditional *tetO₇-YFH1* model used in this work allowed us to better address the relationship between decreased SOD and

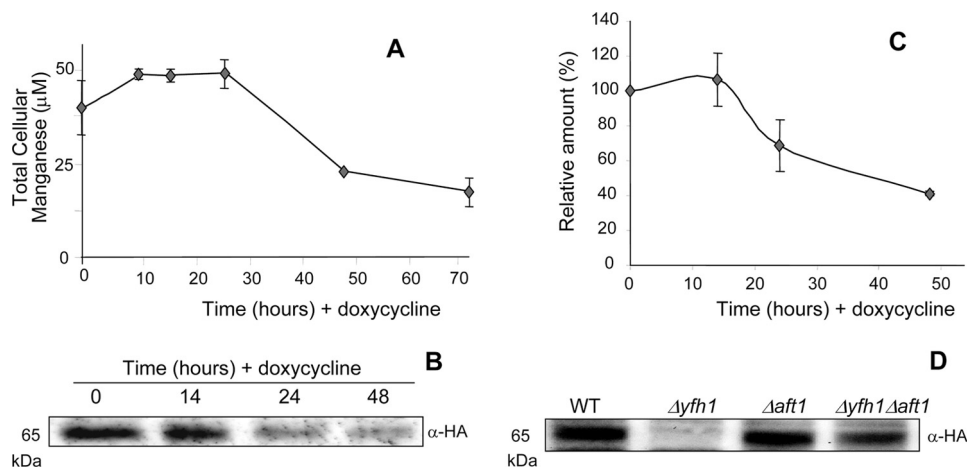


FIGURE 7. Total cellular manganese and Smf2 levels in Yfh1-depleted cells. *A*, evolution of total cellular manganese concentration was analyzed in YPG-grown *tetO₇-YFH1* cells after doxycycline addition. *B*, analysis by Western blot of the content, after doxycycline addition, of an HA-tagged version of Smf2 in a *tetO₇-YFH1* strain (BQ5206). In each gel lane, 30 µg of proteins from whole cell extracts was loaded, and protein load was verified by post-Western CBB staining of the PVDF membrane. *Wt*, wild type. *C*, to calculate the Smf2 relative content at the indicated time points, the chemiluminescent signal from each lane of the Western blot was analyzed using Quantity One software (Bio-Rad). Smf2-HA levels at time point 0 were used as the 100% reference. *D*, analysis by Western blot of Smf2-HA content in strains presenting the indicated mutations. In each gel lane, 30 µg of protein from whole cell extracts was loaded, and protein load was verified by post-Western CBB staining of the PVDF membrane. In all panels, Data are representative of means ± S.D. from three independent experiments. The apparent molecular weight of each protein is shown in kDa.

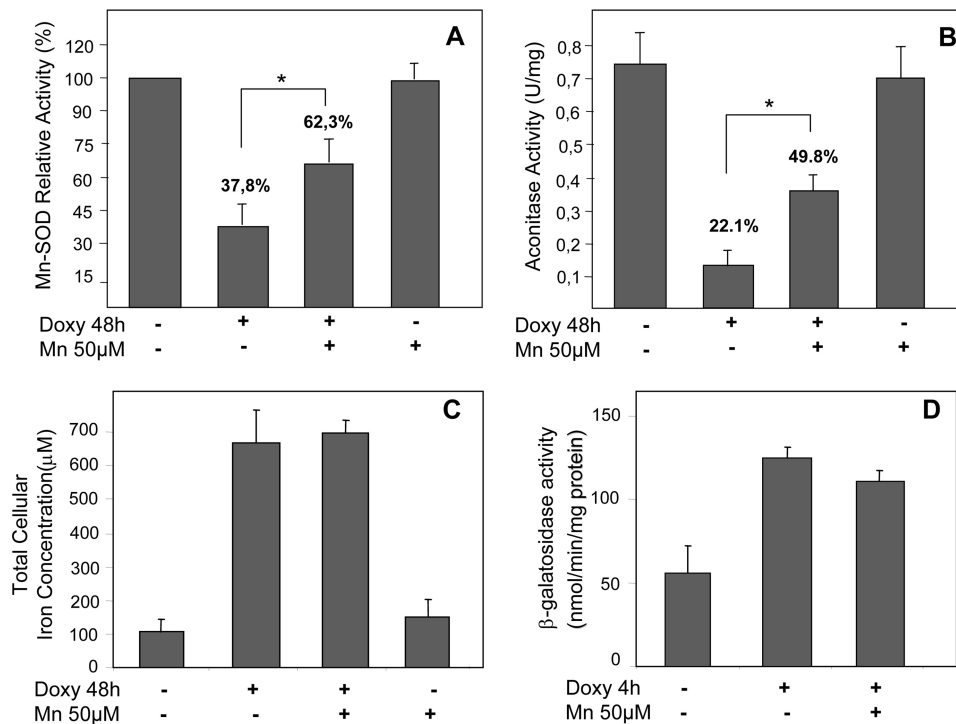


FIGURE 8. Manganese treatment prevents the decline in Mn-SOD and aconitase activities. *A–C*, the enzymatic activities of Mn-SOD (*A*), aconitase (*B*), and total cellular iron were measured in YPG-grown *tetO₇-YFH1* cells exposed (+) or not (–) to doxycycline (*Doxy*) and 50 µM MnCl₂ for 48 h. For Mn-SOD, the values of the nontreated cells were used as the 100% reference. Manganese treatment provided a significant protection to both enzymatic activities (*, *p* < 0.05). *D*, *tetO₇-YFH1* cells transformed with a plasmid containing a FET3-LacZ construction were grown in SC-glycerol medium supplemented (+) or not (–) with 50 µM MnCl₂. β-Galactosidase activity was measured 4 h after doxycycline addition. Data are representative of means ± S.D. from three independent experiments.

aconitase activities. The results presented in Figs. 3 and 6 indicate that both Mn-SOD and aconitase activities showed a similar inactivation rate, suggesting that aconitase inactivation could be triggered by a decrease in Mn-SOD activity. To confirm this triggering, we analyzed the effect of manganese supplementation on Mn-SOD and aconitase activities in the conditional *tetO₇-YFH1* mutant. We measured both activities

in cultures treated with doxycycline for 48 h and supplemented or not with 50 µM manganese. As shown in Fig. 8, *A* and *B*, manganese had a similar protective effect on both aconitase and Mn-SOD activities in the doxycycline-treated cells (*Yfh1* OFF), whereas no effect of this metal was observed in the control cultures not treated with doxycycline (*Yfh1* ON). These data support the hypothesis that aconitase inacti-

Frataxin Depletion Triggers Up-regulation of Iron Transport

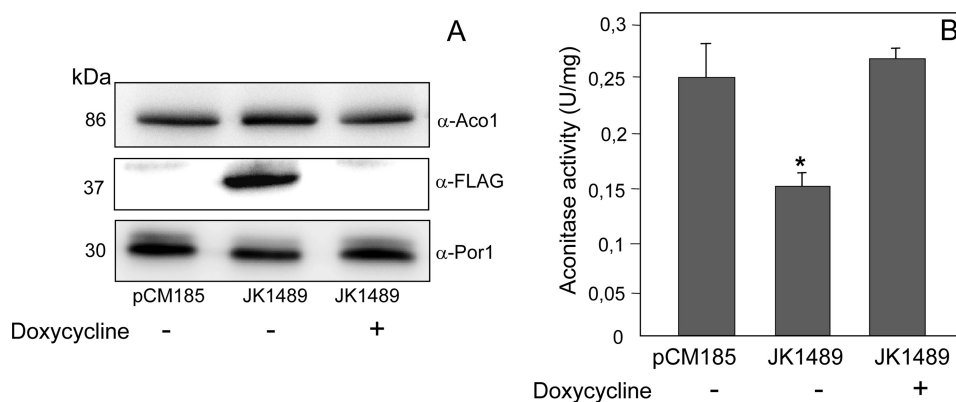


FIGURE 9. Overexpression of MRS4 promotes inactivation of aconitase. W303 cells were transformed with plasmid JK1489 (containing *MRS4* tagged with FLAG) or with the plasmid vector (pCM185). Cells were grown in SC-glucose medium. Where indicated, doxycycline was added at 2 μ g/ml. *A*, aconitase, Mrs4-FLAG, and porin were detected by Western blot using the indicated antibodies. In each gel lane, 15 μ g of protein from whole cell extracts was loaded, and protein load was verified by post-Western CBB staining of the PVDF membrane. The apparent molecular weight of each protein is shown in kDa. *B*, aconitase activity was measured in whole cell extracts. A significant decrease in aconitase activity was found in the cells overexpressing Mrs4 (*, $p < 0.05$). Data are representative of means \pm S.D. from three independent experiments.

vation may be triggered by increased superoxide levels due to decreased Mn-SOD activity. As a control, total cellular iron content was measured after 48 h of treatment, and Fet3 promoter activity was measured after 4 h of doxycycline addition (using the Fet3LacZ construction). As shown in Fig. 8, *C* and *D*, neither of these parameters was affected by manganese supplementation.

Effect of Mitochondrial Iron Overload on Aconitase—To confirm the sensitivity of aconitase under iron overload conditions, we transformed wild type yeast cells with a multicopy plasmid carrying a FLAG-tagged version of the mitochondrial iron transporter Mrs4 under a *tet*-regulated promoter. This led to overexpression of this transporter (Fig. 9*A*), which promotes mitochondrial iron overload (48). As shown in Fig. 9*B*, such overexpression resulted in a 50% decrease in aconitase activity. When expression of Mrs4 was repressed by the addition of doxycycline (or in cells transformed with the void plasmid) this inactivation was not observed. This result indicates that excess iron in the mitochondria contributes to aconitase inactivation.

DISCUSSION

Fourteen years after the discovery of the gene coding for frataxin, the precise function of this protein remains a matter of debate. According to the results shown here, the primary role of frataxin in iron-sulfur biogenesis should be questioned. The use of conditional Yfh1 mutants in this work has allowed us to overcome one of the main difficulties in analyzing the effects of frataxin deficiency: distinguishing primary defects directly due to the absence of the protein from those defects due to oxidative stress exerted by iron deregulation. Our results indicate that deregulation of iron metabolism is the primary effect of Yfh1 depletion, as increased expression of Fet3 was clearly observed 4 h after doxycycline addition in both *tetO₂-YFH1* and *tetO₇-YFH1* strains. This induction was observed by quantitative RT-PCR analysis, as well as with the Fet3-LacZ reporter protein. Iron accumulation was also observed at the early stages of Yfh1 depletion. The remaining effects (increased protein oxidative damage, decreased aconitase

and SOD activities, decreased oxygen consumption, and decreased manganese and Smf2 levels) were observed only after 24 or 48 h of doxycycline addition. Therefore, all of these may be secondary effects, the consequence of iron overload.

The more controversial point in this hypothesis is the understanding of the mechanism that explains aconitase deficiency in Yfh1-depleted cells. This deficiency cannot be primary, as most of the activity of this enzyme remained stable 24 h after doxycycline addition, whereas iron overload, protein oxidative damage, and induction of both SOD isoenzymes were clearly observed at this time point. Previous observations indicate that disruption of genes involved in iron-sulfur biogenesis leads to a rapid loss in aconitase activity. Reduction of *GRX5* expression through the use of a *tet*-regulated promoter leads to a more than 80% decrease in aconitase activity within 12 h (45). Such a rapid decrease has also been observed in a Met-regulated Nfs1 strain (40). Both observations suggest that aconitase does not present a long half-life. Also, as yeast cells are not arrested during the first 24 h of treatment, the remaining aconitase activity cannot be attributed to the initial holo-aconitase pool. Indeed, the presence of high aconitase activity at this time point indicates that the biochemical machinery required for holo-aconitase maturation remains active in the absence of Yfh1. Aconitase activity decline appears to be a consequence of oxidative stress. First, markers of oxidative stress, such as carbonyl content or Sod1p and Sod2p content, were found increased at 24 h after doxycycline addition. Second, mitochondrial Mn-SOD activity was also decreased after 48 h of incubation. The presence of decreased activities of iron-sulfur enzymes has been widely described in different organisms as one of the consequences of decreased SOD activity, as this type of cofactor is extremely sensitive to superoxide (49). Finally, when inactivation of Mn-SOD activity is prevented by manganese supplementation of the growth media, a decline in aconitase activity was also prevented. This last observation highlights the relationship between decreased Mn-SOD and aconitase activities, previously analyzed in $\Delta yfh1$ cells (17, 18). Under such conditions, re-

storing Mn-SOD activity prevented inactivation of three iron-sulfur-containing enzymes (succinate dehydrogenase, glutamate synthase, and isopropyl malate dehydrogenase) but not of aconitase. The present work indicates that this difference between aconitase and other iron-sulfur-containing enzymes may be due to the increased sensitivity of aconitase toward oxidative stress conditions.

Iron overload may trigger the deficiencies observed in manganese and SOD activities. These anomalies were observed previously and investigated in $\Delta yfh1$ mutants (17, 18). Mn-SOD deficiency was considered the consequence of an imbalance between reduced cofactor (manganese) levels and increased iron content that would promote the accumulation of apo-Sod2 and Fe-Sod2, two inactive forms of the enzyme. However, the origin of manganese deficiency was not completely understood. In this work, we observed a decline in Smf2, a protein involved in manganese uptake, both in $\Delta yfh1$ cells and in *tetO₇-YFH1* cells treated with doxycycline. This is a late event that could be triggered by iron overload; this protein is known to be post-translationally regulated by metal levels (50). The experiment with the $\Delta yfh\Delta aft1$ strain confirms this triggering, as preventing iron accumulation in the double mutant also prevents the decay in Smf2 levels. Inactivation of the cytosolic SOD isoenzyme was also observed previously in $\Delta yfh1$ cells (18). Again, this inactivation was described as the consequence of limited cofactor (in this case copper) availability. Copper is required for Fet3 activity, which is largely induced in $\Delta yfh1$ (51) and, as observed in this work, in *tetO-YFH1* mutants. Indeed, it has been described that activation of iron acquisition by the iron-responding factor Aft1 increases copper transport into membrane compartments, leading to copper-deprived cytosol (41). In summary, the results described here using the conditional *tetO-YFH1* mutants confirm the previous observations in $\Delta yfh1$ cells and provide an explanation for the origin of manganese deficiency in Yfh1-deficient cells.

The final conclusion of this study is that Yfh1 does not have an essential role in iron-sulfur biogenesis. Then what is the role of this mitochondrial protein? Our results can fit with two alternative hypotheses among those that have been formulated to explain frataxin function: the iron storage-detoxification hypothesis and the iron-sensing hypothesis. The first suggests that frataxin forms ferritin-like structures that store iron in an oxidized, nonreactive form (52). Lack of frataxin would lead to the formation of highly reactive iron forms that inactivate iron-sulfur-containing enzymes. The second one suggests that, rather than acting as the iron donor for iron-sulfur biogenesis, frataxin senses mitochondrial iron content and regulates the rate of iron-sulfur biogenesis (53). This second hypothesis would explain the interactions observed between frataxin and members of the iron-sulfur biosynthetic machinery (11–13), as well as its iron binding properties (54). Of course, one of the early consequences of losing either an iron storage protein or an iron-sensing protein could be the deregulation of iron metabolism, as observed in the present study. Also, any of these mitochondrial roles could explain why Yfh1 depletion leads not only to Aft1 activation but also to iron accumulation in the mitochondria. In this context, it is

worth mentioning that the mitochondrial iron transporter Mrs4 is induced in $\Delta yfh1$ mutants (48), thus contributing to mitochondrial iron accumulation. In contrast, this induction is not observed in constitutively activated Aft1 mutants (the so-called Aft1-up) (55). This would indicate that such activation, in the absence of mitochondrial events, is not enough to explain the phenotype observed. The final clue needed to understand the primary role of frataxin may be obtained by deciphering the sequence of early events leading from Yfh1 depletion to Fet3 up-regulation.

Acknowledgments—We thank Jerry Kaplan (University of Utah) for critical review of the manuscript and Elaine M. Lilly for editorial assistance.

REFERENCES

- Pandolfo, M., and Pastore, A. (2009) *J. Neurol.* **256**, Suppl. 1, 9–17
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P. I., Di Donato, S., Mandel, J. L., Coccozza, S., Koenig, M., and Pandolfo, M. (1996) *Science* **271**, 1423–1427
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997) *Science* **276**, 1709–1712
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O., and Koenig, M. (1997) *Nat. Genet.* **16**, 345–351
- Wilson, R. B., and Roof, D. M. (1997) *Nat. Genet.* **16**, 352–357
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997) *Nat. Genet.* **17**, 215–217
- Foury, F. (1999) *FEBS Lett.* **456**, 281–284
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001) *Nat. Genet.* **27**, 181–186
- Raulfs, E. C., O'Carroll, I. P., Dos Santos, P. C., Unciuleac, M. C., and Dean, D. R. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 8591–8596
- Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K., and Johnson, M. K. (2008) *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1112–1119
- Gerber, J., Mühlenhoff, U., and Lill, R. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 906–911
- Wang, T., and Craig, E. A. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 12674–12679
- Gelling, C., Dawes, I. W., Richhardt, N., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008) *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1851–1861
- Campanella, A., Isaya, G., O'Neill, H. A., Santambrogio, P., Cozzi, A., Arosio, P., and Levi, S. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2279–2288
- Chen, O. S., and Kaplan, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 7626–7632
- Bulteau, A. L., Dancis, A., Gareil, M., Montagne, J. J., Camadro, J. M., and Lesuisse, E. (2007) *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1561–1570
- Irazusta, V., Cabisco, E., Reverter-Branchat, G., Ros, J., and Tamarit, J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 12227–12232
- Irazusta, V., Obis, E., Moreno-Cermeño, A., Cabisco, E., Ros, J., and Tamarit, J. (2009) *Free Radic. Biol. Med.*
- Llorens, J. V., Navarro, J. A., Martínez-Sebastián, M. J., Baylies, M. K., Schneuwly, S., Botella, J. A., and Moltó, M. D. (2007) *FASEB J.* **21**, 333–344
- Anderson, P. R., Kirby, K., Orr, W. C., Hilliker, A. J., and Phillips, J. P. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 611–616
- Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., and Lill, R. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2025–2036
- Chen, O. S., Hemenway, S., and Kaplan, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12321–12326
- Lu, C., and Cortopassi, G. (2007) *Arch Biochem. Biophys.* **457**, 111–122
- Wishart, J. A., Hayes, A., Wardleworth, L., Zhang, N., and Oliver, S. G. (2005) *Yeast* **22**, 565–569

Frataxin Depletion Triggers Up-regulation of Iron Transport

25. Belli, G., Garí, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Yeast* **14**, 1127–1138
26. Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., and Knop, M. (2004) *Yeast* **21**, 947–962
27. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) *Yeast* **13**, 837–848
28. Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., and Ros, J. (2006) *Anal. Biochem.* **351**, 149–151
29. Robinson, J., Brent, L., Sumegi, B., and Srerre, P. (1987) in *Mitochondria: A Practical Approach* (Darley-Usmar, V. M., Rickwood, D., and Wilson, M. T., eds) pp. 153–179, IRL Press, Oxford, United Kingdom
30. Manchenko, G. P. (1994) *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*, p. 98, CRC Press LLC, Boca Raton, FL
31. Reverter-Branchat, G., Cabisco, E., Tamarit, J., Sorolla, M. A., Angeles de la Torre, M., and Ros, J. (2007) *Microbiology* **153**, 3667–3676
32. Belli, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 942–947
33. Cabisco, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27393–27398
34. Li, L., and Kaplan, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 5036–5043
35. Guarente, L. (1983) *Methods Enzymol.* **101**, 181–191
36. Pfaffl, M. W. (2006) in *Real-time PCR* (Dorak, T., ed) pp 63–82, Taylor & Francis Group, New York
37. Swanson, W. H., and Clifton, C. E. (1948) *J. Bacteriol.* **56**, 115–124
38. Díaz-Ruiz, R., Avéret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., and Rigoulet, M. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 26948–26955
39. Kaplan, J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10948–10949
40. Kumánovics, A., Chen, O. S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., Dingra, N. N., Outten, C. E., Keller, G., Winge, D., Ward, D. M., and Kaplan, J. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 10276–10286
41. Philpott, C. C., and Protchenko, O. (2008) *Eukaryot. Cell* **7**, 20–27
42. Condò, I., Malisan, F., Guccini, I., Serio, D., Rufini, A., and Testi, R. (2010) *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1221–1229
43. Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., and Pucio, H. (2008) *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3521–3531
44. Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Cabisco, E., Ros, J., and Tamarit, J. (2008) *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1712–1723
45. Rodríguez-Manzaneque, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109–1121
46. Luk, E. E., and Culotta, V. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 47556–47562
47. Portnoy, M. E., Liu, X. F., and Culotta, V. C. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7893–7902
48. Foury, F., and Roganti, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24475–24483
49. Wallace, M. A., Liou, L. L., Martins, J., Clement, M. H., Bailey, S., Longo, V. D., Valentine, J. S., and Gralla, E. B. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 32055–32062
50. Reddi, A. R., Jensen, L. T., and Culotta, V. C. (2009) *Chem. Rev.* **109**, 4722–4732
51. Foury, F., and Talibi, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 7762–7768
52. Schagerlöf, U., Elmlund, H., Gakh, O., Nordlund, G., Hebert, H., Lindahl, M., Isaya, G., and Al-Karadaghi, S. (2008) *Biochemistry* **47**, 4948–4954
53. Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S. R., Bonomi, F., and Pastore, A. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 390–396
54. Cook, J. D., Bencze, K. Z., Jankovic, A. D., Crater, A. K., Busch, C. N., Bradley, P. B., Stemmler, A. J., Spaller, M. R., and Stemmler, T. L. (2006) *Biochemistry* **45**, 7767–7777
55. Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J., Garcia, E., Rolfes, R., Brown, P. O., Botstein, D., and Philpott, C. C. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 1233–1243
56. Molina-Navarro, M. M., Castells-Roca, L., Belli, G., García-Martínez, J., Marín-Navarro, J., Moreno, J., Pérez-Ortín, J. E., and Herrero, E. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 17908–17918

Notes & Tips

Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast

Jordi Tamarit, Verónica Irazusta, Armando Moreno-Cermeño, Joaquim Ros*

Grup de Bioquímica de l'Estrès Oxidatiu, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, 25008 Lleida, Spain

Received 26 October 2005

Available online 20 December 2005

Iron is a cofactor required for many cellular functions such as oxygen transport, electron transfer, or enzymatic catalysis. However, when it is found in excess, it can easily react with oxygen or hydrogen peroxide and can generate toxic oxygen-derived species [1]. Thus, maintaining iron homeostasis is essential for cells. Many metabolic diseases have been related to iron imbalance [2]. The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has become a widely used model to study iron uptake, distribution, and storage in eukaryotic cells [3]. Quantitation of total cellular iron content in yeast is required to evaluate the impact of different mutations in iron metabolism. However, this quantitation cannot easily be performed in many molecular biology laboratories because the existing methods require the use of expensive equipment such as atomic absorption or ICP¹–mass spectrometers [4]. Also, radioactive iron has been used to estimate cell iron uptake and accumulation [5]. Here, we present a modification of a classical iron determination assay that allows, after nitric acid digestion of yeast cells, a rapid colorimetric quantitation of total iron in *S. cerevisiae* cells.

Methods employed for the assay of iron in biological samples require as a first step an initial treatment which releases the complexed iron and as a second step a quantitative determination of the released iron. Iron detection can be performed by radioactive, spectrometric, or colorimetric methods. These colorimetric methods rely on the fact that iron chelators form colored complexes with iron. They are convenient for laboratories that do not have an easy access to atomic absorption facilities or that are not adapted to work with radioactive material. In a method described by Fish [6], digestion was achieved by a mixture of HCl acid and KMnO₄. Later, ammonium acetate and sodium ascor-

bate were used to, respectively, increase pH and reduce iron. Finally, reduced iron was detected with ferrozine, which forms an intensely colored ferrous complex. This method is quite accurate for iron determination in many biological samples. However, yeast cells contain a strong cell wall [7] whose complete digestion requires the use of 3% nitric acid. Thus, we have developed a modification of the Fish method that allows the colorimetric quantitation of iron after nitric acid digestion of yeast cells.

W303 (wild type) and MML298 (*Δyfh1*) strains were kindly provided by Dr. Enrique Herrero (Universitat de Lleida). Yeast cells were grown in YPD-rich medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) by incubation in a rotary shaker at 30 °C. All chemicals were purchased from Sigma, except bathophenanthrolinedisulfonic acid (BPS) and CuSO₄ that were from Fluka. Ultrapure water was obtained with a Millipore Milli-Q Biocel. Reactions were carried on in disposable 1.5-ml polypropylene tubes with screw caps from Sarstedt.

Nitric acid (400 μl, 3%) containing either standards or digested yeast cells were mixed with 160 μl 38 mg/ml sodium ascorbate, 320 μl 1.7 mg/ml iron chelator (either BPS or ferrozine), and 126 μl ammonium acetate solution (saturated ammonium acetate diluted 1/3). After 5 min, the specific absorbance of the iron–chelator complex was recorded at 535 nm (when BPS was used) or 565 nm (when ferrozine was used) in a Shimadzu UV-2401 PC spectrophotometer. In both cases, the accuracy of the assay was improved by subtracting nonspecific absorbance recorded at 680 nm. Cell volumes were calculated in a Z2 particle count and size analyzer from Coulter (cell volume = number of cells × mean volume).

First, we tested the feasibility of the Fish method [6] for detection of iron dissolved in nitric acid. In addition to ferrozine, we tested the use of BPS as the iron chelator. Different amounts of Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ were dissolved in 3% nitric acid. Ammonium acetate was added to the nitric acid

* Corresponding author. Fax: +34 973 702426.

E-mail address: joaquim.ros@cmb.udl.es (J. Ros).

¹ Abbreviations used: BPS, bathophenanthrolinedisulfonic acid; ICP, inductively coupled plasma.

solution in the required amount to turn pH to 5.4, where the absorbance of both the ferrozine–Fe (565 nm) and the BPS–Fe (535 nm) complexes is maximal. Finally, sodium ascorbate and the desired iron chelator were added and absorbance was recorded in a spectrophotometer. Fig. 1 shows the correlation between iron content and light absorption after complete reaction of iron with ferrozine or BPS. Using any of the iron chelators, the assay had a linear response to iron content and was able to detect accurately 1 nmol of iron. The same results were obtained when FeCl_3 instead of $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ was dissolved in nitric acid, indicating that ascorbate was able to efficiently reduce iron under such conditions. Standard curves were also prepared with other metals that are also present in yeast, such as ZnCl_2 , MnCl_2 , and CuSO_4 [8]. A significant reactivity of copper with ferrozine was observed, which is consistent with previous results from other authors [9]. This interference was minimized in the Fish method by the use of the copper chelator neocuproine in the reaction mixture [6]. However, as shown in Fig. 1B, reactivity of BPS with copper was 50 times lower than that observed with iron. Consequently, it was negligible with regard to obtaining an accurate iron determination in yeast cells, where iron content largely exceeds copper content [8]. Thus, BPS was selected as the iron chelator for iron determination, avoid-

ing the need for neocuproine. From the results shown in Fig. 1B, an extinction coefficient of $23,141 \text{ M}^{-1}$ can be calculated for the iron–BPS complex.

Second, we analyzed whether this same method could be used to detect iron from nitric-acid-digested yeast cells. We used two *S. cerevisiae* strains that contain different amounts of iron: a wild-type strain (W303) and a strain deleted in the YFH1 gene (MML298). This gene encodes a mitochondrial protein highly homologous to the human protein frataxin, whose decreased expression is responsible for Friedreich's ataxia. Deletion of YFH1 in yeast leads to an increase in cellular iron content [10]. Yeast cells were grown on glucose-rich media (YPD), harvested during exponential growth, washed twice with ultrapure water, resuspended in 0.5 ml 3% nitric acid, and incubated for 16 h at 98°C in 1.5-ml polypropylene tubes tightly capped. After this incubation, samples were centrifuged in a tabletop centrifuge at 12,000 rpm for 5 min and 400 μl from the supernatant was collected and mixed with BPS, sodium ascorbate, and ammonium acetate. Reaction was completed in less than 1 min. Nonspecific absorbance was measured at 680 nm and subtracted from the specific absorbance of the iron–BPS complex (535 nm). To eliminate the contribution of contaminant iron, absorbance was recorded against blanks containing all the reagents

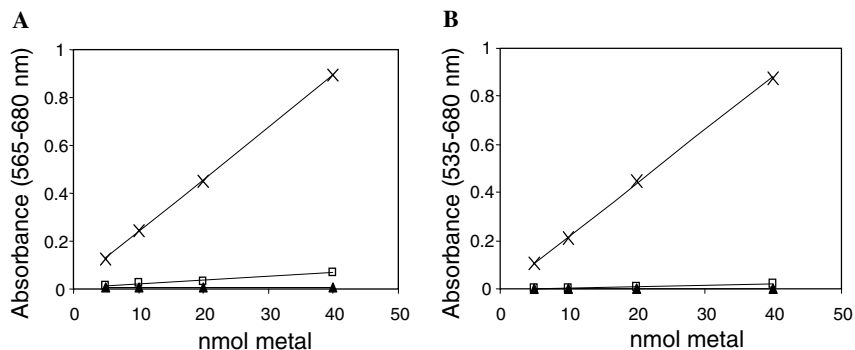


Fig. 1. Detection of metals dissolved in nitric acid. The indicated amounts of $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (X), CuSO_4 (□), and MnCl_2 (▲) were dissolved in 3% nitric acid and treated as described in the text (using either ferrozine or BPS as iron chelator). Nonspecific absorbance was measured at 680 nm and subtracted from the specific absorbance of the iron–ferrozine complex at 565 nm (A) or the iron–BPS complex at 535 nm (B). The same results were obtained when equimolar amounts of $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ or FeCl_3 were used as the iron source. No reaction between ZnCl_2 and the iron chelators could be detected. Data are represented as mean from three independent experiments (standard error was always below 5% and is not shown).

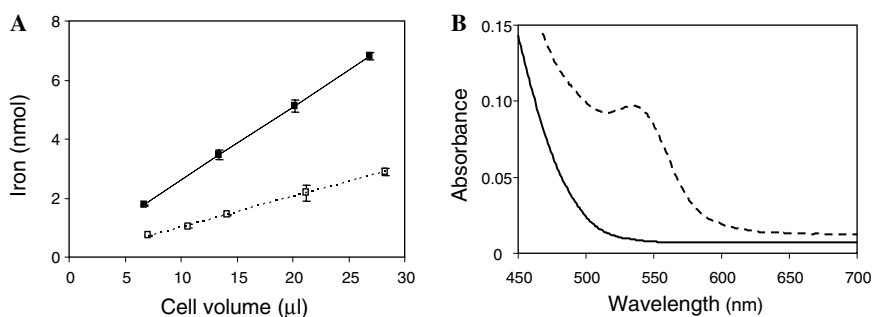


Fig. 2. Determination of iron content in nitric-acid-digested samples from yeast. (A) Different amounts of wild-type and $\Delta yfh1$ cells were digested overnight in 3% nitric acid and iron content was quantified as described in the text. Iron content shows a strong correlation with digested cell volume. Cell volumes were quantified using a Z2 particle count and size analyzer from Coulter. Data are represented as mean \pm standard error from three independent experiments. (B) Light absorption spectra of the reaction mixture (from $\Delta yfh1$ cells) with (dashed line) or without (solid line) BPS included.

used (including BPS). The absorbance from these blanks against water was always below 0.005. Fig. 2A shows the amount of iron detected after digestion of increasing amounts of yeast cells from both strains analyzed. The results indicate the feasibility of the method, since cellular volume digested and iron content show a strong correlation and reproducibility. Also, iron contents in both strains are close to those reported previously [11]. Taking all the results shown in Fig. 2A, an iron content of $105.3 \pm 8.7 \mu\text{M}$ can be calculated for wild-type cells ($n = 15$), while that of $\Delta yfh1$ cells is $253.7 \pm 8.6 \mu\text{M}$ ($n = 12$). Fig. 2B shows the absorption spectra of the reaction mixture with or without BPS included. It can be observed that absorbance from digestion products does not interfere with that of the iron–BPS complex.

To further ensure the accuracy of the colorimetric method described in this work, results were compared with those obtained with ICP–mass spectrometry. With this purpose, we digested an equal volume of wild type and $\Delta yfh1$ yeast cells in 3% nitric acid and analyzed the digested preparation with either ICP–mass spectrometry or the colorimetric method described above. Similar results were obtained with both methods: with ICP–mass spectrometry, the estimated whole-cell iron concentrations were $98.5 \pm 2.2 \mu\text{M}$ in wild-type cells and $242.2 \pm 3.1 \mu\text{M}$ in $\Delta yfh1$ cells; with our colorimetric method, estimated amounts were $102.1 \pm 1.8 \mu\text{M}$ in wild-type cells and $250.4 \pm 3.5 \mu\text{M}$ in $\Delta yfh1$ cells.

In summary, the presented colorimetric method may provide molecular biology laboratories with a powerful technique for evaluating iron levels in yeast cells or other biological samples resistant to digestion of acids other than nitric acid.

Acknowledgments

We thank Vanessa Guijarro for technical assistance. This study was supported by Grants BFU2004-00593/BMC

and GEN2001-4707C08-06 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). V.I. is a recipient of a Ph.D. scholarship from the Generalitat de Catalunya. We also thank Sílvia Esteve for editorial assistance.

References

- [1] J.W. Eaton, M. Qian, Molecular bases of cellular iron toxicity, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 833–840.
- [2] C.N. Roy, N.C. Andrews, Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 2181–2186.
- [3] A. Van Ho, D.M. Ward, J. Kaplan, Transition metal transport in yeast, *Annu. Rev. Microbiol.* 56 (2002) 237–261.
- [4] Y. Zhang, E.R. Lyver, S.A. Knight, E. Lesuisse, A. Dancis, Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19794–19807.
- [5] R. Santos, A. Dancis, D. Eide, J.M. Camadro, E. Lesuisse, Zinc suppresses the iron-accumulation phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* lacking the yeast frataxin homologue (Yfh1), *Biochem. J.* 375 (2003) 247–254.
- [6] W.W. Fish, Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples, *Methods Enzymol.* 158 (1988) 357–364.
- [7] F.M. Klis, P. Mol, K. Hellingwerf, S. Brul, Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 26 (2002) 239–256.
- [8] D.J. Eide, S. Clark, T.M. Nair, M. Gehl, M. Gribskov, M.L. Guerinet, J.F. Harper, Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genome Biol.* 6 (2005) R77.
- [9] P. Carter, Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine), *Anal. Biochem.* 40 (1971) 450–458.
- [10] M.Y. Sherman, P.J. Muchowski, Making yeast tremble: yeast models as tools to study neurodegenerative disorders, *Neuromol. Med.* 4 (2003) 133–134.
- [11] M. Babcock, D. de Silva, R. Oaks, S. Davis-Kaplan, S. Jiralerspong, L. Montermini, M. Pandolfo, J. Kaplan, Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin, *Science* 276 (1997) 1709–1712.

Original Contribution

Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins

Verónica Irazusta, Armando Moreno-Cermeño, Elisa Cabisco, Joaquim Ros*, Jordi Tamarit

Grup de Bioquímica de l'Estrès Oxidatiu, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, 25008 Lleida, Spain

Received 12 November 2007; revised 9 January 2008; accepted 10 January 2008

Available online 30 January 2008

Abstract

Iron accumulation has been associated with several pathological conditions such as Friedreich ataxia. This human disorder is caused by decreased expression of frataxin. Iron-overload triggers oxidative stress, but the main targets of such stress are not known. In yeast cells lacking the frataxin ortholog *YFH1*, we have identified a set of 14 carbonylated proteins, which include mitochondrial ATP synthase, phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase, and molecular chaperones. Interestingly, most of the target proteins are magnesium- and/or nucleotide-binding proteins. This key feature leads us to postulate that when iron accumulates, chelatable iron replaces magnesium at the corresponding metal-binding site, promoting selective damage to these proteins. Consistent with this hypothesis, in vitro experiments performed with pure pyruvate kinase and phosphoglycerate kinase showed that oxidation of these proteins can be prevented by magnesium and increased by the presence of ATP. Also, chelatable iron, which forms complexes with nucleotides, showed a sevenfold increase in $\Delta yfh1$ cells. Moreover, lowering chelatable iron in $\Delta yfh1$ cells by desferrioxamine prevented enzyme inactivation. As a general conclusion, we propose that magnesium bound to proteins is replaced by chelatable iron when this metal accumulates. This mechanism explains selective protein oxidation and provides clues for better understanding of iron-overloading pathologies.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Iron-overload; Protein carbonylation; Metal-catalyzed oxidation; Frataxin; Yeast; Free radicals

Reactive oxygen species (ROS) are common by-products of aerobic metabolism and have the potential to damage cellular components such as lipids, nucleic acids, carbohydrates, and proteins. The relevance of ROS to the cellular metabolism is highlighted by the fact that all living organisms have developed defenses against ROS, allowing organisms to live in the presence of oxygen [1].

Oxidative stress is defined as the imbalance between the production and the destruction of ROS by antioxidant mechanisms [2]. It can be induced exogenously by toxic compounds such as H_2O_2 or superoxide-generating compounds such as menadione. Endogenous oxidative stress is present in several physiological conditions such as aging or several diseases, some

of them related to iron metabolism [3]. Iron is an important element in biochemistry because of its great versatility as a biologic catalyst. However, high tissue iron concentrations can play a catalytic role in the initiation of free radical reactions [4]. Iron accumulation has been associated with the development and progression of several pathological conditions such as Friedreich ataxia (FRDA), hereditary hemochromatosis, aceruloplasminemia, or X-linked sideroblastic anemia [5–7].

One of the most intriguing disorders of iron metabolism is FRDA. This human neurological and cardiac disorder is caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin [8]. FRDA patients suffer from multiple symptoms, including progressive gait and limb ataxia, hypertrophic cardiomyopathy, and diabetes mellitus [9]. Although a large number of studies link frataxin to iron metabolism its precise function remains a matter of debate. Frataxin has been suggested to play a role in iron–sulfur cluster biosynthesis [10], heme biosynthesis [11,12], iron storage [13,14], electron transfer to ubiquinone [15], or holo-aconitase reconstitution [16]. In most cellular and animal models

Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; FRDA, Friedreich ataxia; SOD, superoxide dismutase; MCO, metal-catalyzed oxidation; DNPH, 2,4-dinitrophenyl hydrazine.

* Corresponding author. Fax: +34 973 702 426.

E-mail address: joaquim.ros@cmb.udl.es (J. Ros).

of FRDA, decreased activities of iron–sulfur-containing proteins and increased mitochondrial iron accumulation have been reported [17]. Consequently, some therapeutic approaches under study suggest reducing the degree of iron accumulation by chelators or preventing its pro-oxidant effects by the use of antioxidants such as idebenone, a coenzyme Q analog [9]. Many studies in frataxin function arise from experiments performed with *Saccharomyces cerevisiae*, as frataxin and the yeast homolog *YFH1* are orthologs. Frataxin and *Yfh1* are mitochondrial proteins; $\Delta yfh1$ strains accumulate iron and show decreased activities of iron–sulfur-containing proteins [18], and finally, human frataxin complements yeast $\Delta yfh1$ mutant strains [19].

In a previous work we analyzed the proteome of $\Delta yfh1$ cells [20]. Our results indicated that frataxin-deficient yeast cells express increased amounts of proteins involved in the defense against oxidative stress, suggesting that they are exposed to continuous oxidative conditions. Oxidative stress was due to iron overload, but also to decreased activity of the antioxidant mitochondrial enzyme manganese-superoxide dismutase (SOD). In the present work we will focus on protein damage induced by such endogenous oxidative stress in $\Delta yfh1$ cells. Oxidative damage to proteins is a highly specific process, as some proteins are more prone to suffer this damage than others. This has been shown in studies using *Escherichia coli* or yeast subjected to pro-oxidant agents such as H_2O_2 or menadione [21,22]. One of the mechanisms involved in protein oxidation is metal-catalyzed oxidation (MCO). Through this mechanism, iron bound by the polypeptide chain promotes the generation of reactive oxygen species that can damage the neighboring amino acids [23]. As a consequence, enzymes containing mononuclear iron centers are known to be highly sensitive to oxidative stress. An example would be microbial type III NAD(P)-dependent dehydrogenases [24,25]. In contrast, zinc-dependent alcohol dehydrogenases are highly resistant to the pro-oxidant action of ascorbate and iron. Indeed, replacement of iron by zinc in the active centers of type III NAD(P)-dependent dehydrogenases leads to MCO-resistant enzymes [26]. Oxidative damage to proteins can be evaluated by analyzing protein-carbonyl content [27].

The results presented here show that iron accumulation in $\Delta yfh1$ cells promotes specific oxidative damage to proteins having magnesium-binding sites. Such damage is mediated by chelatable iron that can replace magnesium ions which are bound to proteins, either directly or through a nucleotide moiety.

Experimental procedures

Organisms and culture conditions

Wild type *S. cerevisiae* strain W303-1A (*MATa ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1*) was used in this study [20]. The following strains are isogenic to W303 and have been previously described: $\Delta yfh1$, MML298 (*MATa yfh::kanMX4*) [20]; $\Delta aft1$, MML348 (*MATa aft1- Δ 5::URA3*) [28]; and MML350 (*MAT α aft1- Δ 5::URA3*) [28]. The $\Delta yfh1\Delta aft1$ strain, BQS100 (*MAT α aft1- Δ 5::URA3 yfh1::kanMX4*), was obtained from a spore after crossing MML298 and MML350. Yeast cells were grown in rich medium (1% yeast extract, 2% peptone) with

either 2% glucose (YPD) or 3% glycerol (YPG) by incubation in a rotary shaker at 30°C. Synthetic medium (SC) contained 2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base (Difco), a mixture of amino acids, and the required auxotrophic supplements. All the experiments described in this work were performed with exponentially growing cells at optical densities ranging from 0.5 to 1 ($\lambda = 600$ nm, 1-cm light path).

Two-dimensional gel electrophoresis

Cells were suspended in 25 mM Tris–HCl buffer, pH 8, plus 8 M urea, and disrupted using glass beads. An equal volume of 8 M urea, 8% Chaps, and 50 mM DTT was added to the lysed cells, and after centrifugation (12,000 rpm for 5 min) 10 μ l of the supernatant was diluted in 140 μ l of Rehydration Buffer [29]. Protein amounts were quantitated with a Nanodrop ND-100 spectrophotometer and adjusted to 0.33 mg/ml with rehydration buffer. Isoelectric focusing was performed in 7-cm immobilized pH gradient strips (3–10 NL; Bio-Rad). After the first dimension, strips were incubated for 20 min with 5 ml of a solution containing 10 mM 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) in 10% trifluoroacetic acid (TFA). This compound reacts with carbonyl groups in proteins. To stop this reaction, the strip was transferred to a 5-ml solution containing 0.4 M Tris, 6 M urea, 2% SDS, and 20% glycerol. Second-dimension SDS–PAGE was performed on 18 \times 18-cm 12.5% polyacrylamide gels (2.6% C). Two strips (wild type and $\Delta yfh1$) were run in parallel on the same gel. Gels were either transferred to PVDF membranes for Western blot analysis or silver stained and scanned in a GS800 densitometer (Bio-Rad). In both cases, the obtained images were analyzed with PDQuest software (Bio-Rad). Gels were silver stained using the PlusOne silver staining kit from General Electric Healthcare. PVDF membranes were silver stained as described [30].

Western blot analysis and carbonyl content quantitation

Oxidative damage to proteins can be evaluated by the use of DNPH, a compound that reacts with carbonyl groups in proteins. Carbonyl groups are common by-products of oxidative damage to amino acid side chains. Antibodies against DNPH allow the immunodetection of this compound bound to proteins by classic Western blot techniques [27]. Crude extracts were prepared as previously described [21] for Western blots from one-dimensional gels. Western blots from two-dimensional gels were prepared as described in the previous section. In both cases, antibodies against DNPH (Dako) were used at 1:5000 dilution. A peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was used for detection. Images were acquired in a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) and analyzed with Quantity One software (Bio-Rad). In one-dimensional Western blots, carbonyl content was obtained from the chemiluminescent signal of each lane (when crude extracts were analyzed) or band (when pure protein preparations were analyzed). To control protein load, membranes were stained with Coomassie brilliant blue, scanned in a GS800 densitometer (Bio-Rad), and analyzed with Quantity One software (Bio-Rad).

Protein identification by tryptic digestion and MALDI-TOF

Protein spots were excised from gels and subjected to in situ digestion with trypsin on a ZipPlate (Millipore). Gel pieces were washed with 25 mM ammonium bicarbonate and dehydrated with acetonitrile followed by (i) reduction of cysteines with 10 mM DTT, (ii) alkylation of free cysteines with 55 mM iodoacetamide, and (iii) in situ digestion with 170 ng trypsin overnight at 30°C. Peptide extraction and wash were performed in a ZipPlate according to the manufacturer's recommendations. Tryptic peptides were recovered in 5 μ l of 0.1% TFA, 50% acetonitrile, and spotted onto a MALDI plate in the presence of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. The spectra were obtained in an Applied Biosystems Voyager DE PRO MALDI-TOF apparatus operating in a reflector mode. Spectra with resolutions higher than 8000 were obtained. External calibration was performed with calibration mixtures from Applied Biosystems. The acquired spectra were processed by Data Explorer (version 4.0). Proteins were identified by peptide mass fingerprinting searching against the Swiss-Prot database using MASCOT. Peptide mass fingerprinting used the assumption that peptides are monoisotopic, oxidized at methionine residues (optional), and carbamidomethylated at cysteine residues (optional). One maximum missed cleavage was allowed with a maximum peptide mass tolerance of 100 ppm.

Enzyme activities

Cell extracts were prepared using glass beads and assayed as described in the following references: pyruvate kinase [31], phosphoglycerate kinase [32], adenylate kinase [33], malate dehydrogenase [34], glyceraldehyde dehydrogenase [35], and alcohol dehydrogenase [26]. Mitochondrial F_1F_0 ATP synthase was assayed in mitochondrial preparations as described [36]. Oligomycin at 6 μ g/ml, an inhibitor of this enzyme [37], was used for background subtraction. Mitochondria were prepared as previously described [28]. In all the activities tested, units are μ mol/min. Specific activities were obtained after dividing the activity in crude extracts (U/mg of total protein) by the relative content of each enzyme in the crude extract (mg of enzyme/mg of total protein). This last value was obtained from the analysis of the 2D gels shown in Figs. 2C and 2D using PDQuest software.

Oxidation of proteins by ascorbate and iron

Proteins were obtained from Sigma (pyruvate kinase, Product No. P1506; phosphoglycerate kinase, Product No. P7634). The purity of these preparations was tested by SDS-PAGE and its identity was verified by peptide mass fingerprinting after tryptic digestion of the protein. We confirmed that they correspond to rabbit pyruvate kinase (Swiss-Prot Accession No. P11974) and yeast phosphoglycerate kinase (Swiss-Prot Accession No. P00560). Alcohol dehydrogenase 1 was from Fluka (Product No. 05635). The commercial preparations (100 μ l) were dialyzed against 0.1 M Tris buffer, pH 7.3, for 1 h at 4°C in two Slide-A-Lyzer mini dialysis units from Pierce. After dialysis, these preparations were further cleaned using a 5-ml

Hi-Trap desalting gel filtration column and an AKTA prime chromatographic system from GE Healthcare. The solvent used was 0.1 M Tris buffer, pH 7.3. Inactivation of the enzymes was performed in opened 1.5-ml polypropylene tubes in a Thermomixer Comfort (Eppendorf) at 20°C and 1000 rpm. The reaction mixture (20 μ l) contained 180 pmol of pyruvate kinase or phosphoglycerate kinase and the indicated amounts of ascorbate, $FeCl_3$, ferrous ammonium sulfate, ATP, CTP, or $MgCl_2$.

Iron analyses

Total cellular iron concentration was determined as described [38]. In short, cell volumes were calculated in a Coulter Z2 particle count and size analyzer and iron content was determined in nitric acid-digested cells, using bathophenanthroline sulfonate as chelator. Analysis of intracellular chelatable iron was performed using confocal microscopy and the fluorescent iron chelator Phen Green SK diacetate (Molecular Probes). Yeast cells were grown in YPD medium, washed twice with SC medium, and then loaded for 20 min with 20 μ M Phen Green SK diacetate in 300 μ l of SC medium. This incubation was performed over glass coverslips mounted in a stainless steel chamber placed on the stage of an inverted Olympus FV500 confocal laser scanning microscope. Coverslips had been previously treated with concanavalin A (Sigma) to fix the cells. After 20 min of incubation with Phen Green SK diacetate, cells already fixed on the chamber's coverslip were washed twice with SC medium, diluted again in 300 μ l of SC medium, and imaged in the microscope using an argon laser ($\lambda_{excitation}$ 488 nm) and a 505 nm long-pass filter. An Olympus PlanApo oil objective (60 \times /1.40 NA) was used. For dynamic measurements of Phen Green dequenching, images were collected at 5-s intervals. After 1 min, 3 μ l of a solution containing 0.2 M 1,10-phenanthroline was added to the chamber and images were collected for 4 additional minutes at 5-s intervals. Data were analyzed using Olympus Fluoview and Microsoft Excel software.

Statistical methods

All data are expressed as means \pm standard deviation. Data obtained from two paired groups were compared using Student's *t* test. Comparisons among multiple groups were performed using ANOVA and Tukey's post hoc test.

Results

Increased protein oxidation in $\Delta yfh1$ mutants

To analyze the presence of significant protein oxidative damage induced by iron overload in $\Delta yfh1$ cells, the total protein carbonyl contents of wild-type and $\Delta yfh1$ cell extracts were compared. To this purpose, cells grown in rich medium with either glucose or glycerol were harvested during exponential phase. Iron content was analyzed in both strains (Fig. 1A). Consistent with previous observations [20,38], $\Delta yfh1$ cells exhibit a 2.5-fold increase in iron content when grown in YPD and a 3-fold increase when grown in YPG. Carbonyl groups were

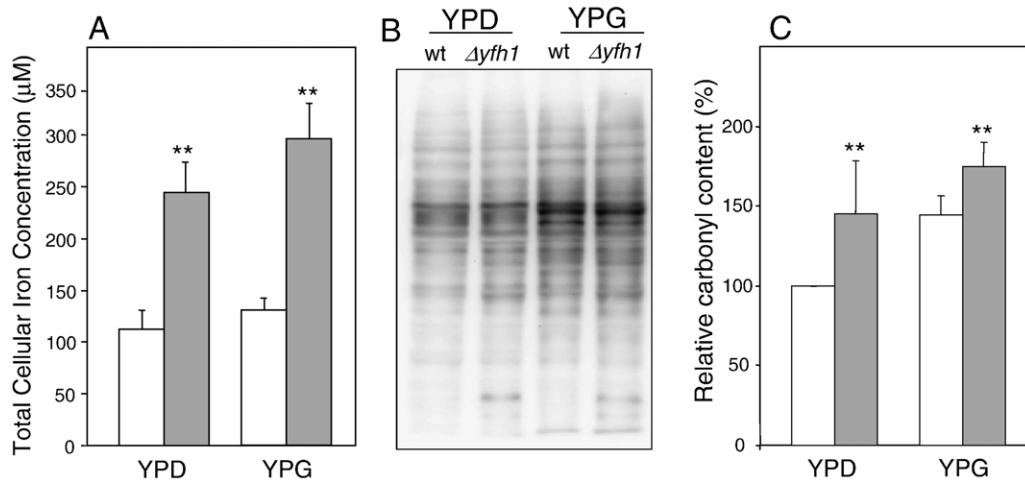


Fig. 1. Increased protein oxidative damage in $\Delta yfh1$ cells. Wild-type (white bars) and $\Delta yfh1$ cells (gray bars) grown in YPD or YPG medium were taken at mid-exponential phase and prepared as described under Experimental procedures. (A) Total cellular iron was quantified as described under Experimental procedures. Data are represented as mean \pm standard deviation from three independent experiments. A highly significant increase (** $p < 0.01$) in iron concentration is observed in $\Delta yfh1$ cells relative to wild-type cells, in either YPD or YPG. (B) Carbonylated proteins were detected by Western blot after one-dimensional SDS–PAGE using antibodies against 2,4-dinitrophenyl. (C) Relative carbonyl content was calculated from the chemiluminescent signal of each lane of the Western blot analyzed with Quantity One software (Bio-Rad). Carbonyl levels in wild-type YPD-grown cells were used as a 100% reference. Data are represented as mean \pm standard deviation from six independent experiments. Also in this case, a highly significant increase (** $p < 0.01$) in carbonyl content is observed in $\Delta yfh1$ cells relative to wild-type cells, in either YPD or YPG.

detected by Western blot after one-dimensional SDS–PAGE separation of crude extracts as described under Experimental procedures (Fig. 1B). Relative carbonyl content (Fig. 1C) was calculated by Western blot as described under Experimental procedures. Carbonyl levels in wild-type YPD-grown cells were used as a 100% reference. In $\Delta yfh1$ mutant cells grown in YPD, a 40% increase in protein carbonyl content could be detected with respect to levels found in wild-type cells. Also, in YPG-grown $\Delta yfh1$ cells a 30% increase in carbonyl content was observed. Thus, the higher degree of protein carbonylation observed is consistent with the iron accumulation in $\Delta yfh1$ cells. Increased protein carbonyl content in *YFH1*-null mutants has been previously described by different authors [39–41]. The differences in carbonyl content observed between YPG- and YPD-grown wild-type cells are consistent with previously published results from our group [22]. Interestingly, in both media, specific bands showed an increase which was higher than the average. This result agrees with the fact that carbonylation targets specific proteins.

Selective protein oxidation in $\Delta yfh1$ mutants

To further analyze oxidative damage to specific proteins, crude extracts from wild-type and $\Delta yfh1$ cells grown in YPG were prepared and analyzed by two-dimensional electrophoresis. This experiment was carried out with yeast cells grown in YPG because in this medium cells exhibit higher respiration rates and increased mitochondrial content. It is worth mentioning that in *YFH1*-null mutants iron accumulation occurs mainly in mitochondria [42], and the tissues most affected in FRDA patients are those with elevated oxidative metabolism, like heart and nervous system [9]. The ability of *YFH1*-null mutants to grow in YPG has been reported by various authors, working mainly in the W303 background and without iron supplementation of the growth medium [42–44]. Carbonyl groups were

detected by Western blot as described under Experimental procedures and shown in Figs. 2A and 2B. Only spots showing a repetitive increase (at least twofold) in protein carbonylation in $\Delta yfh1$ cells were considered for further identification. Spots showing a reproducible decrease in carbonyl content were not observed in $\Delta yfh1$ cells. To identify which proteins corresponded to the spots detected in the Western blot, membranes were silver stained as described. Also, a duplicate was prepared in which crude extracts were separated in 2D gels and silver stained (Figs. 2C and 2D). This allowed the localization of the carbonylated spots on the silver-stained gel and the quantification of differences in protein amounts between wild-type and $\Delta yfh1$ extracts. Selected spots were identified by peptide mass fingerprinting after tryptic digestion and MALDI-TOF analysis. The list of identified proteins is shown in Table 1. Interestingly, six of them are mitochondrial proteins (Ssc1, Hsp78, Cta1, Atp1, Atp2, and Ilv5), highlighting the relevance of oxidative stress in this organelle in $\Delta yfh1$ cells. The ratio between protein amounts of the selected spots in wild-type and $\Delta yfh1$ cells was calculated using the PDQuest software and is also shown in Table 1. Most of the spots show increased carbonyl content with no increase in protein amount, clearly indicating that these proteins are more damaged in $\Delta yfh1$ cells. In a proteomic study, we had previously identified Adk1, Sod1, and Ahp1 as induced proteins [20]. Induction of these proteins was confirmed in the silver-stained gels. In addition we also identified Cta1 as a highly induced protein. As shown in Table 1, these four proteins exhibit higher increase in carbonyl content than in protein amount, indicating that they are also specific targets of oxidative damage.

Enzymatic activities of oxidized proteins

Some of the proteins identified as targets of iron-induced oxidative stress in the previous section are enzymes. In order to

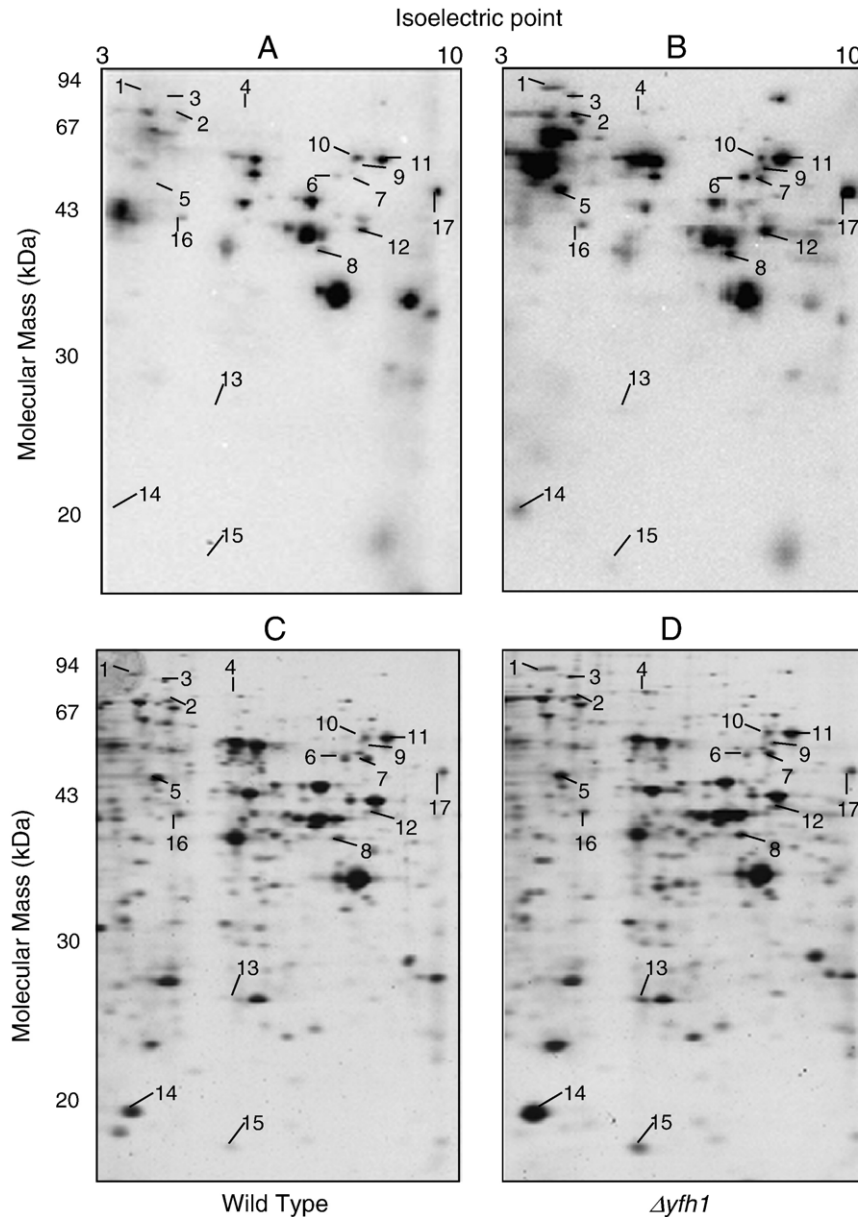


Fig. 2. Analysis of the proteome and oxyproteome of wild-type and $\Delta yfh1$ cells grown in YPG by two-dimensional gel electrophoresis. Cells were grown in YPG medium and 40 μg of total cell lysates were separated by two-dimensional gel electrophoresis as described under Experimental procedures. Gels were transferred to PVDF membranes and oxidized proteins detected with antibodies against 2,4-dinitrophenyl. Images corresponding to (A) wild type and (B) $\Delta yfh1$ were recorded in a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad). Silver-stained gels corresponding to (C) wild-type and (D) $\Delta yfh1$ were digitized using a GS-800 densitometer (Bio-Rad). Images were analyzed with PDQuest software (Bio-Rad). The indicated spots showed a reproducible increase (more than twofold) in $\Delta yfh1$ cells in three independent experiments (see Table 1).

determine if their oxidation leads to a decrease in their function, we measured the enzymatic activities of pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase, adenylate kinase, and F_1F_0 ATP synthase. The first three, which are cytosolic enzymes, were measured in crude extracts from wild-type and $\Delta yfh1$ cells. Enzymatic activities were normalized according to the differences observed in protein amounts in 2D gels as described under Experimental procedures. The activity of mitochondrial F_1F_0 ATP synthase was measured in crude mitochondrial extracts. This activity was corrected using either mitochondrial porin (detected by Western blot—not shown) or the activity of mitochondrial citrate synthase as an indicator of mitochondrial

protein content in each mitochondrial preparation. As shown in Fig. 2 and Table 1, no changes in Atp1 and Atp2 protein content were detected by 2D gels. The analyses of enzymatic activities of the four enzymes (Fig. 3) show a clear decrease in their specific activity in $\Delta yfh1$ cells. This fact confirms that iron-induced oxidative stress targeted these proteins in $YFH1$ -deficient yeast, and, as a consequence, its biological function was impaired. As a control, we assayed the activities of two enzymes, malate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which do not bind either Mg^{2+} or nucleotides. The activities of both enzymes were the same as those found in wild-type cells.

Table 1
Carbonylated proteins in $\Delta yfh1$ cells

Protein	Gene	Spots	Score	Oxidation fold	Protein fold	Oxidation/protein
Mitochondrial heat shock protein	<i>SSC1</i>	1	101	3.4±1.2	0.9±0.2	3.9
		3	134	3.1±0.4	1.3±0.4	2.4
Mitochondrial matrix chaperone	<i>HSP78</i>	4	59	14.6±1.2	0.9±0.3	15.3
Cytoplasmic heat shock protein homolog	<i>SSE1</i>	2	66	6.6±2.3	0.9±0.2	7.1
F ₁ F ₀ ATP synthase, α subunit	<i>ATP1</i>	6	63	5.4±0.7	1.2±0.2	4.5
		7	98	12.1±2.7	1.0±0.4	12.1
F ₁ F ₀ ATP synthase, β subunit	<i>ATP2</i>	5	86	3.4±1.4	0.7±0.3	4.7
Acetohydroxyacid reductoisomerase	<i>ILV5</i>	8	77	10.3±2.5	1.0±0.5	9.7
Pyruvate kinase 1	<i>CDC19</i>	10	100	3.5±1.3	0.9±0.1	3.9
		11	142	2.8±0.6	0.8±0.2	3.4
3-Phosphoglycerate kinase	<i>PGK1</i>	12	82	3.9±0.8	1.0±0.3	3.7
Adenylate kinase	<i>ADK1</i>	13	72	8.2±1.5	2.5±0.5	3.3
Catalase A	<i>CTA1</i>	9	92	49.7±6.2	6.1±1.7	8.1
Thiol-specific peroxiredoxin	<i>AHP1</i>	14	129	16.3±4.4	4.3±1.0	3.7
CuZn-superoxide dismutase	<i>SOD1</i>	15	75	14.9±4.3	5.2±1.0	2.83
Actin, α chain	<i>ACT1</i>	16	128	2.6±0.3	0.7±0.1	3.43
Translational elongation factor EF-1 α	<i>TEF2</i>	17	92	9.12±1.61	1.2±0.4	7.12

Oxidation fold ($\Delta yfh1$ over wild type) was quantified from oxy-blot shown in Figs. 2A and 2B. Protein fold ($\Delta yfh1$ over wild type) was quantified from silver-stained gels shown in Figs. 2C and 2D. Values in the last column are the ratios between oxidation and protein fold and represent the relative increase in oxidative damage for each identified protein in $\Delta yfh1$. Spots were digested with trypsin and analyzed in an Applied Biosystems Voyager DE PRO MALDI-TOF system. Proteins were identified by peptide mass fingerprinting using MASCOT. Scores higher than 50 are significant ($p < 0.05$). Data are means \pm standard deviation from three independent experiments.

Iron-mediated inactivation of pyruvate kinase

The analysis of the oxyproteome of $\Delta yfh1$ cells reveals that 11 of the 14 proteins identified as targets of oxidative stress

share, as a common trait, the ability to bind magnesium ions. In these proteins, magnesium can be found directly chelated by amino acid side chains (as in pyruvate kinase, Ilv5, and both subunits of ATP synthase) or through the nucleotides bound to

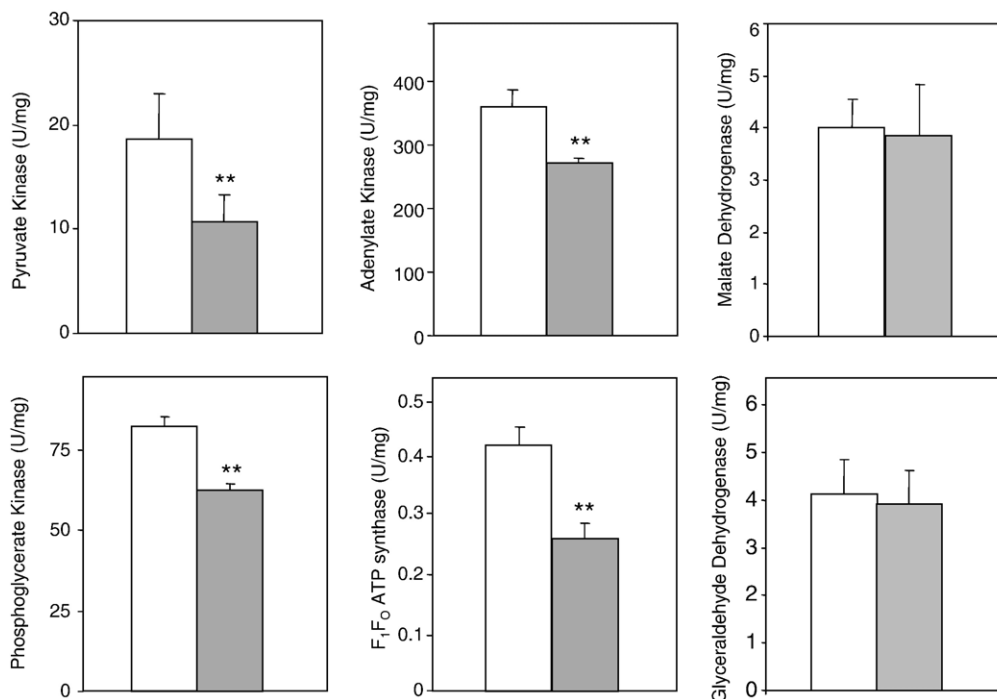


Fig. 3. Specific activities of carbonylated enzymes in wild-type and $\Delta yfh1$ yeast cells. Wild-type (white bars) and $\Delta yfh1$ cells (gray bars) were grown in YPG. Enzymatic activities of pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase, and adenylate kinase were measured in whole-cell extracts and the specific activities (U/mg enzyme) calculated considering the relative amount of each enzyme detected in 2D gels. F₁F₀ ATP synthase was measured in mitochondrial preparations from wild-type and $\Delta yfh1$ cells, and the activity found in $\Delta yfh1$ mitochondria was corrected considering the relative amount of mitochondrial porin present in each preparation (detected by Western blot). The same results were obtained when mitochondrial citrate synthase activity was used as reference (not shown). As a control, the activities of malate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (proteins that bind neither magnesium nor nucleotides) were assayed. Data are represented as means \pm standard deviation from three independent experiments. A significant decrease in enzymatic activities (** $p < 0.01$) was found in $\Delta yfh1$ yeasts.

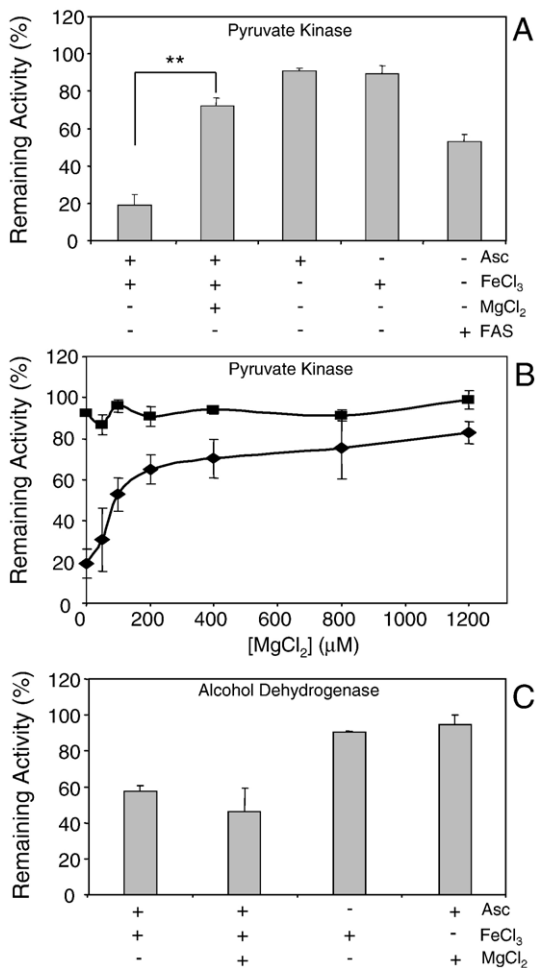


Fig. 4. Inactivation of pyruvate kinase by ascorbate and iron. (A) Pure preparations of rabbit pyruvate kinase (9 μ M final concentration) were incubated with the indicated compounds at the following final concentrations: 50 μ M FeCl₃, 10 mM ascorbate, 50 μ M ferrous ammonium sulfate (FAS), and 0.5 mM MgCl₂. After incubation for 20 min at 20°C, the remaining enzymatic activity was measured. Note the clear protection of the activity of pyruvate kinase observed when magnesium was present (** $p < 0.01$). (B) Pure preparations of rabbit pyruvate kinase (9 μ M final concentration) were incubated with 50 μ M FeCl₃ and the indicated amounts of MgCl₂ in the presence (◆) or absence (■) of 10 mM ascorbate. The remaining enzymatic activity was measured after 20 min of incubation at 20°C. (C) Pure preparations of alcohol dehydrogenase were assayed for inactivation by 10 mM ascorbate and 100 μ M FeCl₃. When added, MgCl₂ was used at 0.5 mM. Results in A, B, and C are represented as means \pm standard deviation from three independent experiments.

these proteins (as in chaperones, phosphoglycerate kinase, adenylate kinase, actin, and Tef2). It is worth mentioning that, according to the Swiss-Prot database, only 1.4% of the yeast sequences have been described as magnesium-containing proteins and 8.7% as nucleotide-binding proteins. These observations would suggest that damage to these proteins could be mediated by the replacement of magnesium ions by iron in the corresponding binding sites. To analyze if binding of iron to magnesium-binding sites in proteins could be involved in iron-mediated protein oxidative damage, we incubated pure preparations of the magnesium-containing enzyme pyruvate kinase with the pro-oxidant system ascorbate/Fe³⁺. This MCO system promotes the inactivation of those enzymes which are

able to bind iron in the proximity of its active center [45]. Pure preparations of pyruvate kinase were incubated with 10 mM ascorbate and 50 μ M FeCl₃ for 20 min and its activity was measured. As shown in Fig. 4A, the presence of both ascorbate and iron was required to promote inactivation of the enzyme. The degree of inactivation of pyruvate kinase is similar to that observed for MCO-sensitive enzymes under similar conditions [26,46]. This fact suggests that iron may be bound by pyruvate kinase in the vicinity of the active center and then promote the generation of ROS. Ascorbate or FeCl₃ alone did not promote inactivation, whereas ferrous ammonium sulfate promoted some inactivation of the enzyme. This indicates that the reduced form of iron is the one able to bind to the magnesium center and trigger the generation of ROS. To further analyze if iron is bound at the magnesium-binding site, we tested whether magnesium could prevent enzymatic inactivation of pyruvate kinase by ascorbate and iron. As shown in Fig. 4B, magnesium prevented the oxidative inactivation of the enzyme in a dose-dependent manner: inactivation was almost avoided at 1.2 mM and half-maximal protection was achieved at 85 μ M magnesium. The effect of magnesium was not observed when alcohol dehydrogenase 1—an enzyme that binds neither magnesium nor nucleotides—was used as a control. Fig. 4C shows that the inactivation by ascorbate/iron was not avoided by addition of

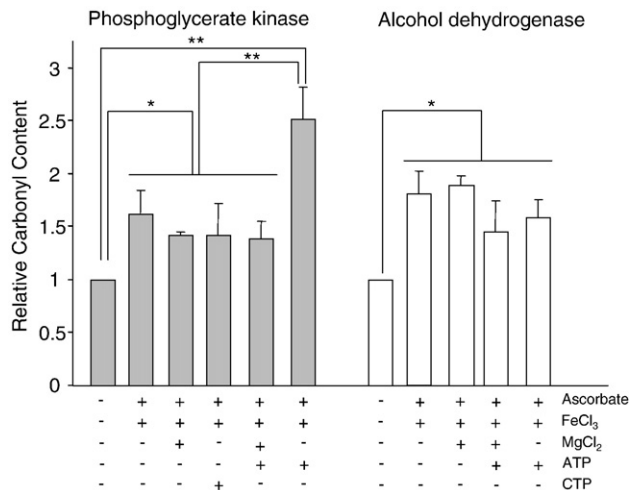


Fig. 5. Metal-catalyzed oxidation of phosphoglycerate kinase by ascorbate and iron is enhanced by ATP. Pure preparations of yeast phosphoglycerate kinase (9 μ M final concentration) were incubated with the indicated compounds at the following final concentrations: 50 μ M FeCl₃, 10 mM ascorbate, 25 μ M ATP, 25 μ M CTP, and 0.5 mM MgCl₂. After incubation for 5 min at 20°C, phosphoglycerate kinase was derivatized with DNP and separated in one-dimensional gels and carbonyl content was measured by Western blot. The carbonyl content from nonoxidized samples was taken as a reference value. Data are represented as means \pm standard deviation from six independent experiments. Significant differences are shown. Ascorbate and iron promoted a significant increase in carbonyl content. A highly significant increase in carbonyl content (** $p < 0.01$) was found in the preparations containing ATP compared to those not containing ATP or those containing ATP plus MgCl₂. This fact indicates that the ATP–Fe complex exerts a pro-oxidant effect on phosphoglycerate kinase. As a control, alcohol dehydrogenase 1 (white bars) was processed in parallel. Ascorbate and iron induced a significant increase in carbonyl content, but the presence of ATP did not significantly modify the carbonyl content of this enzyme.

magnesium. As in Fig. 4A, the absence of iron or ascorbate in the reaction mixture did not promote enzyme inactivation. It should be mentioned that 50% of the inactivation of alcohol dehydrogenase 1 was achieved with 100 μ M iron, whereas 50 μ M iron produced 80% inactivation of pyruvate kinase. Taken together, these results are consistent with replacement of magnesium by iron, thus promoting inactivation of pyruvate kinase by MCO.

ATP-mediated carbonyl formation

The experiments described in the previous section have shown that iron can promote the oxidation of proteins containing magnesium-binding sites. We wanted now to test the effects of iron, magnesium, and ATP in the degree of oxidation of proteins containing nucleotide-binding sites. To that purpose, phosphoglycerate kinase, one of the previously identified proteins, was incubated with 10 mM ascorbate and 50 μ M FeCl₃ in the presence of oxygen (Fig. 5, gray bars). A control experiment using alcohol dehydrogenase 1, which does not contain nucleotide-binding sites, was also performed (Fig. 5, white bars). The presence of ascorbate and iron promoted an increase

in carbonyl content in both proteins that could not be prevented with magnesium. This fact is consistent with the absence of magnesium-binding sites in these proteins. This oxidative modification may be due to free radicals generated in solution by the iron/ascorbate system or to the presence of adventitious iron bound in a transient form to the polypeptide chain. Interestingly, the presence of 25 μ M ATP in the reaction mixture significantly enhanced carbonyl content in phosphoglycerate kinase but not in alcohol dehydrogenase 1. Such increase could be prevented by addition of magnesium to the reaction mixture. These results indicate that ATP-promoted oxidation of phosphoglycerate kinase is due to iron bound to this nucleotide and confirms that iron overload can promote the oxidation of proteins containing nucleotide-binding sites. This result was strengthened by the fact that CTP, used instead of ATP, was unable to increase carbonylation (Fig. 5).

YFH1-deficient cells show increased levels of chelatable iron

Chelatable iron is considered to be the fraction of cellular iron that exists in transit between uptake and release from iron-binding proteins. This iron has also been termed “free iron,”

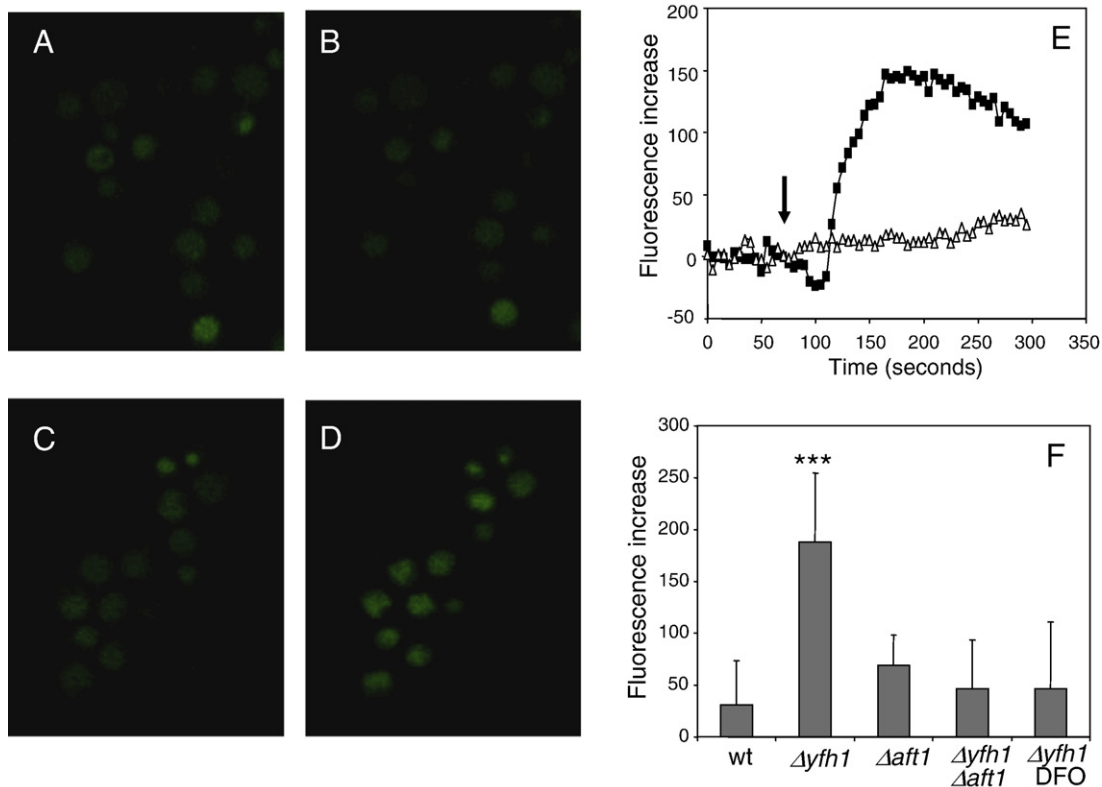


Fig. 6. Increased levels of chelatable iron in $\Delta yfh1$ cells. Wild-type, $\Delta yfh1$, $\Delta aft1$, and $\Delta yfh1 \Delta aft1$ cells were grown in YPD medium, washed with SC medium, and then loaded for 20 min with 20 μ M Phen Green SK diacetate. Images were obtained by confocal microscopy using a 505-nm long-pass filter ($\lambda_{\text{excitation}}$ 488 nm). (A–D) Images collected before (A, C) and 90 s after (B, D) the addition of 1,10-phenanthroline to wild-type (A, B) and $\Delta yfh1$ cells (C, D). (E) A representative experiment is shown. Each series corresponds to the average fluorescence of 30 cells found in the same microscopic field from wild-type (Δ) or $\Delta yfh1$ (\blacksquare) strains. Basal fluorescence was recorded for 1 min. An increase in fluorescence was observed after addition of 2 mM 1,10-phenanthroline to the preparation (arrow). (F) Relative levels of chelatable iron in the four strains analyzed. To obtain this value, the fluorescence recorded before 1,10-phenanthroline addition was subtracted from that recorded for the same cell 90 s after addition of the chelator. Data are represented as means \pm standard deviation. Three independent experiments were performed. A minimum of 30 cells were recorded in each single experiment. Values were significantly different between groups ($p < 0.0001$; ANOVA). Tukey's post hoc test was used to find the causative group for this significant difference. The differences were significant ($***p < 0.05$) when the $\Delta yfh1$ group was compared to wild-type, $\Delta aft1$, $\Delta aft1 \Delta yfh1$, or $\Delta yfh1$ treated with desferrioxamine ($\Delta yfh1$ DFO). No other statistically significant differences between groups were observed.

“redox-active iron,” or “labile iron pool” and is considered to be the iron fraction more directly involved in iron toxicity [47]. The exact nature of this iron fraction is poorly defined, but it is generally considered to be associated with low-molecular-weight ligands such as ATP, ADP, phosphate, or citrate [48,49]. Thus, one hypothesis to explain our results would be that *YFH1*-deficient cells could have higher levels of chelatable iron which would replace magnesium ions in magnesium-binding proteins and in nucleotides. The pro-oxidant action of iron bound to proteins or nucleotides has been extensively documented [4,5,26,50]. To test this hypothesis we first analyzed the presence of chelatable iron in $\Delta yfh1$ cells. Chelatable iron can be estimated with the use of Phen Green SK, a cell-permeant fluorescent sensor carrying a phenanthroline group. Inside cells, the fluorescence of this sensor is quenched by iron binding and

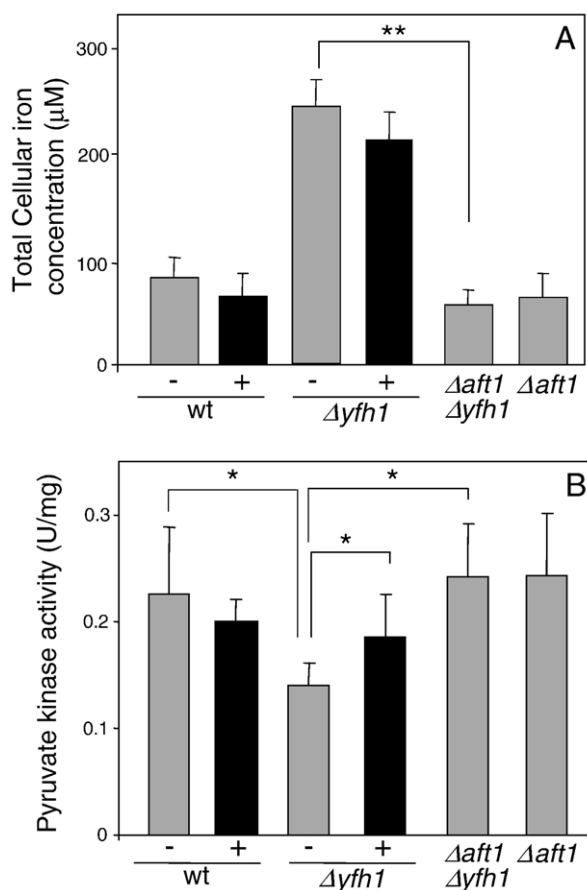


Fig. 7. Pyruvate kinase activity and iron content in iron-deprived $\Delta yfh1$ cells. Wild-type $\Delta yfh1$, $\Delta aft1$, and $\Delta yfh1\Delta aft1$ cells were grown in YPD medium supplemented with 0.5 mM desferrioxamine (black bars) or without supplementation (gray bars). (A) Total cellular iron concentration was quantified as described under Experimental procedures. Data are represented as means \pm standard deviation from three independent experiments. Desferrioxamine did not promote a significant decrease in the total iron concentration in wild-type or $\Delta yfh1$ cells. Disruption of the *AFT1* gene in the $\Delta yfh1$ strain produced a highly significant decrease in total iron concentration (** $p < 0.01$). (B) Pyruvate kinase activity was measured in whole-cell extracts. Values are U/mg of total protein. Data are represented as means \pm standard deviation from four independent experiments. Enzyme activity in $\Delta yfh1$ cells was significantly lower than that found in wild-type cells, $\Delta yfh1\Delta aft1$ cells, or $\Delta yfh1$ cells treated with desferrioxamine (* $p < 0.05$).

can be recovered after addition of the cell permeant iron chelator 1,10-phenanthroline to the cell suspension [49]. To this purpose, YPD grown cells were washed with synthetic medium, loaded with 20 μ M Phen Green SK diacetate for 20 min, and washed again with synthetic medium and fluorescence was recorded in a confocal microscope. After basal fluorescence was recorded for 1 min, 2 mM 1,10-phenanthroline was added to the preparation and fluorescence recorded for 4 additional minutes. Figs. 6A–6D show the images of wild-type and $\Delta yfh1$ cells before and 90 s after the addition of 1,10-phenanthroline. The mean recorded fluorescence for both strains at different times is shown in Fig. 6E. A sharp increase in fluorescence intensity, followed by a plateau, is observed soon after the addition of the chelator. By subtracting the basal fluorescence of each cell from the fluorescence of the same cell after 90 s of exposure to 1,10-phenanthroline, the relative amount of chelatable iron was obtained (shown in Fig. 6F). A minimum of 30 different cells from three independent experiments were considered for the estimation of this value. By this approach we can conclude that $\Delta yfh1$ cells display sevenfold higher fluorescence, which reflects a clear increase in chelatable iron compared to the wild-type strain.

Protein oxidative damage is a consequence of increased chelatable iron content

To confirm that increased protein oxidative damage in $\Delta yfh1$ is due to increased iron content, we constructed a double mutant, $\Delta yfh1\Delta aft1$. Aft1 is an iron sensor that regulates the transcription of several iron transport proteins [43]. Disruption of the *AFT1* gene induces a decrease in chelatable iron content in $\Delta aft1\Delta yfh1$ cells (Fig. 6F) as well as in total cellular iron concentration (Fig. 7A). We analyzed the effect of the *AFT1* mutation on the degree of protein oxidation. As a measure of total protein oxidative damage, we analyzed the total carbonyl content by one-dimensional Western blots. Carbonyl content in $\Delta aft1$ and in $\Delta yfh1\Delta aft1$ strains was undistinguishable from that of wild-type cells (not shown). Pyruvate kinase activity was chosen as an indicator of specific protein damage to magnesium-binding proteins. As shown in Fig. 7B, pyruvate kinase activity was restored to wild-type levels in $\Delta aft1$ and in $\Delta yfh1\Delta aft1$ strains. To confirm that increased chelatable iron is the iron fraction responsible for iron-mediated oxidative damage in $\Delta yfh1$ cells, we treated wild-type and *YFH1*-deficient cells with the iron chelator desferrioxamine. This treatment induced a marked decrease in $\Delta yfh1$ chelatable iron content (Fig. 6E), but not in total iron content (Fig. 7A). As shown in Fig. 7B, under such conditions, pyruvate kinase activity was restored in $\Delta yfh1$ cells.

Discussion

Iron has a well-known role in promoting oxidative damage to proteins. Among them, iron-containing enzymes are major targets of oxidative stress. This is due to the presence of a redox-active metal in their active site, which can trigger the formation of ROS in the active site of the enzyme [45,46]. This phenomenon has been termed metal-catalyzed oxidation and has

been well characterized by in vitro experiments with purified proteins. The effects of MCO in proteins include loss of function and decreased overall protein stability [51]. Metalloenzymes containing non-redox-active metals such as zinc are highly resistant to MCO [26]. In contrast to this well-characterized role of iron in promoting oxidative damage to proteins in vitro, the mechanisms underlying the damaging effects of iron overload inside cells are poorly understood despite its potential relevance in pathologies related to iron overload. In this work we have used frataxin-deficient yeast as a model for the analysis of protein damage induced by iron overload. This model could be especially relevant for understanding the pro-oxidant role of iron in FRDA.

The results presented in this work clearly establish that iron overload in *YFH1*-deficient cells leads to oxidative damage to proteins, measured as an increase in protein carbonyl content. More interestingly, this damage targets specific proteins, which show high increases in protein carbonyl content (up to 15-fold in the case of Hsp78). In addition to carbonyl formation, enzyme inactivation has also been observed. Crude extracts or mitochondrial preparations of $\Delta yfh1$ cells show decreased specific enzymatic activities of pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase, adenylate kinase, and ATP synthase.

Several conclusions can be extracted from the list of proteins identified from the Western blots presented in Fig. 2. First, 6 of the 14 identified proteins are mitochondrial, a number clearly higher than expected by random. This fact indicates that in $\Delta yfh1$ cells mitochondria may be more exposed to oxidative stress than other subcellular locations. This result agrees with the fact that frataxin is a mitochondrial protein. Mitochondria are a major site of iron accumulation in frataxin-deficient cells [42] and many other defects in mitochondrial function can be observed in the absence of frataxin (for instance aconitase and MnSOD deficiency) [20]. Second, some of the proteins identified had been previously identified as targets of oxidative stress in different studies. This is the case of actin and mitochondrial ATP synthase [52] and to a minor extent Tef2 [53] and pyruvate kinase [54]. Also, chaperones have been described previously as major targets of oxidative stress [52]. Studies in *E. coli* and yeast have suggested that they could play a role in preventing protein oxidation [55,56].

However, the most relevant observation is the fact that 11 of the identified proteins are proteins with magnesium- or nucleotide-binding sites. This number is clearly higher than what would be expected by random (less than 10% of the yeast proteins are classified as nucleotide- or magnesium-binding proteins in the Swiss-Prot database). Our results are the first evidence that oxidative damage to magnesium-binding proteins could be a general and physiologically relevant mechanism in diseases involving iron overload. The presence of increased levels of chelatable iron in $\Delta yfh1$ cells that would replace magnesium-binding sites in nucleotides and proteins is consistent with this hypothesis. This iron, bound to magnesium-binding sites, would promote the generation of reactive oxygen species in the vicinity of those proteins presenting magnesium- or nucleotide-binding sites. Our observations with pyruvate kinase and phosphoglycerate kinase also support this hypothesis. Pyruvate kinase shows a marked inactivation in crude extracts of $\Delta yfh1$ cells. This inactivation is not observed when chelatable iron is decreased by

means of the double *aft1/yfh1* mutant or by deferrioxamine treatment. Finally, the in vitro experiments with pure pyruvate kinase clearly suggest that iron could replace the magnesium in the metal-binding site of this protein and in this way promote inactivation of the enzyme. In the case of pure phosphoglycerate kinase, the presence of ATP promotes the formation of carbonyl groups. This effect depends on the formation of an ATP–Fe complex, as the pro-oxidant action of ATP is inhibited by magnesium. Interestingly, oxidation of pure phosphoglycerate kinase by ATP and iron does not result in inactivation of this enzyme (not shown). Also, the enzymatic activities of F_1F_0 ATP synthase and pyruvate kinase (in which magnesium ions are chelated by amino acid side chains) are more markedly affected in $\Delta yfh1$ cells than those of phosphoglycerate kinase or adenylate kinase. This fact suggests that enzymes containing magnesium-binding sites in their active centers would be more sensitive to iron-mediated oxidative stress than nucleotide-binding enzymes, as ROS would be generated close to the active site and would target essential amino acids. In contrast, ROS generated by iron bound to nucleotides would target nonessential amino acids. The notion that magnesium- and nucleotide-binding proteins could be specific targets of oxidative stress or iron overload has been previously suggested by several authors. This assumption was based on the observation that proteins such as mitochondrial ATP synthase [21] or sarcoplasmic reticulum Ca pump [57] are inactivated by oxidative stress. This sensitivity has been also attributed to the ability of Fe(II) to replace magnesium ions bound to the phosphate groups of the nucleotides and once there promote the formation of reactive oxygen species after reacting with H_2O_2 or oxygen [58]. Indeed, oxidation of ATP synthase in vitro has been shown to be mediated by iron binding to magnesium-binding sites. The presence of ATP promoted further oxidation and fragmentation of the protein [59].

Finally, what consequences may the oxidation of the proteins reported in this work have for cellular function? Malfunction of some of these proteins may explain some of the phenotypes reported for frataxin-deficient cells. The proteins listed in Table 1 can be divided into different groups in terms of function. The first would be the chaperones (Ssc1, Hsp78, Sse1). Ssc1 is involved in the import of Yfh1 and other mitochondrial proteins [60], Hsp78 prevents aggregation of misfolded mitochondrial proteins [61], and $\Delta sse1$ mutants are unable to grow on nonfermentable carbon sources. Thus, malfunction of any of these chaperones would exacerbate any mitochondrial defect caused by decreased frataxin content. Interestingly, it has been recently described that the human Ssc1 homolog, mortalin, interacts with frataxin [62]. Also, posttranslational modifications of mortalin have been related to Alzheimer disease [63]. The second group of proteins would be antioxidant enzymes (Cta1, Ahp1, Sod1). Due to the large increase in the content of these proteins and the presence of a redundant defense mechanism, oxidation of these proteins will have a marginal effect on the overall defense capacity of the cell. However, Sod1 deserves a special attention, because it is the only superoxide scavenging system in the cytoplasm. It is worth mentioning that decreased Mn-SOD has been observed in *YFH1*-deficient yeast [20] and decreased total SOD activity was reported in hearts of conditional knockout frataxin mice [64]. The

last group of proteins would be those involved in metabolism (Atp1, Atp2, Ilv5, Cdc19, Pgl1, Adk1). Special attention may be paid to the inactivation of ATP synthase, as this protein plays a fundamental role in ATP production. In this context, many works have reported alterations in the ATP production of frataxin-deficient cells. Mitochondrial ATP production in FRDA patients is below the normal range [65] and can be improved with antioxidant treatment [66]. Reduced ATP levels have also been observed in mice with disrupted frataxin expression in hepatocytes [67]. In rats with chronic iron overload, reduced ATP levels have also been found [68,69]. In this context, the reduced ATP content observed in different models of FRDA could be due, not only to well-known malfunction of enzymes such as aconitase or succinate dehydrogenase, but also to impairment of pyruvate kinase and ATP synthase activity. Interestingly, iron chelation by deferiprone has been shown to reduce neuropathy and ataxic gait in patients of FRDA [70]. This fact confirms that iron-induced oxidative damage plays a relevant role in this disease. The results provided by our work also uncover a mechanism for understanding the specificity of protein damage. Also, it is conceivable that this would apply to all the pathologies in which iron accumulation is involved.

Acknowledgments

We thank Vanessa Guijarro for technical assistance. This work is supported by the Friedreich's Ataxia Research Alliance (Arlington, VA, USA) and Grants BFU2004-00593/BMC and CSD2007-00020 Consolider- Ingenio 2010 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). V.I. is the recipient of a Ph.D. fellowship from the Generalitat de Catalunya.

References

- [1] Raha, S.; Robinson, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* **25**:502–508; 2000.
- [2] Cadenas, E.; Wefers, H.; Müller, A.; Brigelius, R.; Sies, H. Active oxygen metabolites and their action in the hepatocyte: studies on chemiluminescence responses and alkane production. *Agents Actions Suppl.* **11**:203–216; 1982.
- [3] Zecca, L.; Youdim, M. B. H.; Riederer, P.; Connor, J. R.; Crichton, R. R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**:863–873; 2004.
- [4] Pierre, J. L.; Fontecave, M. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biomaterials* **12**:195–199; 1999.
- [5] Eaton, J. W.; Qian, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **32**:833–840; 2002.
- [6] Sheth, S.; Brittenham, G. M. Genetic disorders affecting proteins of iron metabolism: clinical implications. *Annu. Rev. Med.* **51**:443–464; 2000.
- [7] Roy, C. N.; Andrews, N. C. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum. Mol. Genet.* **10**:2181–2186; 2001.
- [8] Campuzano, V.; Montermini, L.; Molto, M. D.; Pianese, L.; Cossee, M.; Cavalcanti, F.; Monros, E.; Roldán, F.; Ducloux, F.; Monticelli, A.; Zara, F.; Canizares, J.; Koutnikova, H.; Bidichandani, S. I.; Gellera, C.; Brice, A.; Trouillas, P.; De Michele, G.; Filla, A.; De Frutos, R.; Palau, F.; Patel, P. I.; Di Donato, S.; Mandel, J. L.; Coccozza, S.; Koenig, M.; Pandolfo, M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**:1423–1427; 1996.
- [9] Rotig, A.; Sidi, D.; Munnich, A.; Rustin, P. Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. *Trends Mol. Med.* **8**:221–224; 2002.
- [10] Gerber, J.; Muhlenhoff, U.; Lill, R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**:906–911; 2003.
- [11] Yoon, T.; Cowan, J. A. Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**:25943–25946; 2004.
- [12] Zhang, Y.; Lyver, E. R.; Knight, S. A. B.; Lesuisse, E.; Dancis, A. Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis. *J. Biol. Chem.* **280**:19794–19807; 2005.
- [13] Campanella, A.; Isaya, G.; O'Neill, H. A.; Santambrogio, P.; Cozzi, A.; Arosio, P.; Levi, S. The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum. Mol. Genet.* **13**:2279–2288; 2004.
- [14] Karlberg, T.; Schagerlof, U.; Gakh, O.; Park, S.; Ryde, U.; Lindahl, M.; Leath, K.; Garman, E.; Isaya, G.; Al-Karadaghi, S. The structures of frataxin oligomers reveal the mechanism for the delivery and detoxification of iron. *Structure* **14**:1535–1546; 2006.
- [15] Gonzalez-Cabo, P.; Vazquez-Manrique, R. P.; Garcia-Gimeno, M. A.; Sanz, P.; Palau, F. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum. Mol. Genet.* **14**:2091–2098; 2005.
- [16] Bulteau, A. -L.; Lundberg, K. C.; Ikeda-Saito, M.; Isaya, G.; Szewda, L. I. Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:5987–5991; 2005.
- [17] Rotig, A.; de Lonlay, P.; Chretien, D.; Foury, F.; Koenig, M.; Sidi, D.; Munnich, A.; Rustin, P. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**:215–217; 1997.
- [18] Babcock, M.; de Silva, D.; Oaks, R.; Davis-Kaplan, S.; Jiralerspong, S.; Montermini, L.; Pandolfo, M.; Kaplan, J. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**:1709–1712; 1997.
- [19] Cavadini, P.; Gellera, C.; Patel, P. I.; Isaya, G. Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum. Mol. Genet.* **9**:2523–2530; 2000.
- [20] Irazusta, V.; Cabisco, E.; Reverter-Branchat, G.; Ros, J.; Tamarit, J. Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *J. Biol. Chem.* **281**:12227–12232; 2006.
- [21] Tamarit, J.; Cabisco, E.; Ros, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **273**:3027–3032; 1998.
- [22] Cabisco, E.; Piulats, E.; Echave, P.; Herrero, E.; Ros, J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**:27393–27398; 2000.
- [23] Stadtman, E. R.; Levine, R. L. Protein oxidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **899**:191–208; 2000.
- [24] Lu, Z.; Cabisco, E.; Obradors, N.; Tamarit, J.; Ros, J.; Aguilar, J.; Lin, E. C. Evolution of an *Escherichia coli* protein with increased resistance to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **273**:8308–8316; 1998.
- [25] Echave, P.; Tamarit, J.; Cabisco, E.; Ros, J. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**:30193–30198; 2003.
- [26] Tamarit, J.; Cabisco, E.; Aguilar, J.; Ros, J. Differential inactivation of alcohol dehydrogenase isoenzymes in *Zymomonas mobilis* by oxygen. *J. Bacteriol.* **179**:1102–1104; 1997.
- [27] Shacter, E.; Williams, J. A.; Lim, M.; Levine, R. L. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay. *Free Radic. Biol. Med.* **17**:429–437; 1994.
- [28] Rodriguez-Manzanque, M. T.; Tamarit, J.; Belli, G.; Ros, J.; Herrero, E. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* **13**:1109–1121; 2002.
- [29] Reverter-Branchat, G.; Cabisco, E.; Tamarit, J.; Ros, J. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J. Biol. Chem.* **279**:31983–31989; 2004.
- [30] Sorensen, B. K.; Hojrup, P.; Ostergard, E.; Jorgensen, C. S.; Enghild, J.; Ryder, L. R.; Houen, G. Silver staining of proteins on electroblotting membranes and intensification of silver staining of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **304**:33–41; 2002.

- [31] Fenton, A. W.; Blair, J. B. Kinetic and allosteric consequences of mutations in the subunit and domain interfaces and the allosteric site of yeast pyruvate kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**:28–39; 2002.
- [32] Maitra, P. K.; Lobo, Z. A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.* **246**:475–488; 1971.
- [33] Konrad, M. Analysis and in vivo disruption of the gene coding for adenylate kinase (ADK1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**:19468–19474; 1988.
- [34] Robinson, J.; Brent, L.; Sumegi, B.; Srerre, P. Mitochondria: a practical approach. IRL Press, Oxford, pp. 153–179; 1987.
- [35] McAlister, L.; Holland, M. J. Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* **260**:15019–15027; 1985.
- [36] Mueller, D. M. Arginine 328 of the beta-subunit of the mitochondrial ATPase in yeast is essential for protein stability. *J. Biol. Chem.* **263**:5634–5639; 1988.
- [37] Velours, J.; Vaillier, J.; Paumard, P.; Soubannier, V.; Lai-Zhang, J.; Mueller, D. M. Bovine coupling factor 6, with just 14.5% shared identity, replaces subunit h in the yeast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **276**:8602–8607; 2001.
- [38] Tamarit, J.; Irazusta, V.; Moreno-Cermeno, A.; Ros, J. Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Anal. Biochem.* **351**:149–151; 2006.
- [39] Karthikeyan, G.; Santos, J. H.; Graziewicz, M. A.; Copeland, W. C.; Isaya, G.; Van Houten, B.; Resnick, M. A. Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Hum. Mol. Genet.* **12**:3331–3342; 2003.
- [40] Desmyter, L.; Dewaele, S.; Reekmans, R.; Nystrom, T.; Contreras, R.; Chen, C. Expression of the human ferritin light chain in a frataxin mutant yeast affects ageing and cell death. *Exp. Gerontol.* **39**:707–715; 2004.
- [41] Bulteau, A. -L.; Dancis, A.; Gareil, M.; Montagne, J. -J.; Camadro, J. -M.; Lesuisse, E. Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. *Free Radic. Biol. Med.* **42**:1561–1570; 2007.
- [42] Chen, O. S.; Kaplan, J. CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *J. Biol. Chem.* **275**:7626–7632; 2000.
- [43] Foury, F.; Talibi, D. Mitochondrial control of iron homeostasis: a genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J. Biol. Chem.* **276**:7762–7768; 2001.
- [44] Duby, G.; Foury, F.; Ramazzotti, A.; Herrmann, J.; Lutz, T. A non-essential function for yeast frataxin in iron–sulfur cluster assembly. *Hum. Mol. Genet.* **11**:2635–2643; 2002.
- [45] Levine, R. L. Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system. *J. Biol. Chem.* **258**:11828–11833; 1983.
- [46] Cabisco, E.; Aguilar, J.; Ros, J. Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ dehydrogenases: consensus target sequence between propanediol oxidoreductase of *Escherichia coli* and alcohol dehydrogenase II of *Zymomonas mobilis*. *J. Biol. Chem.* **269**:6592–6597; 1994.
- [47] Kakhlon, O.; Cabantchik, Z. I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes (1). *Free Radic. Biol. Med.* **33**:1037–1046; 2002.
- [48] Fontecave, M.; Pierre, J. L. Iron: metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie* **75**:767–773; 1993.
- [49] Petrat, F.; de Groot, H.; Rauhen, U. Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* **356**:61–69; 2001.
- [50] Yamazaki, I.; Piette, L. H. ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe²⁺ ions with H₂O₂-reactive species in oxygen toxicity in biology. *J. Biol. Chem.* **265**:13589–13594; 1990.
- [51] Stadtman, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **9**:315–325; 1990.
- [52] Cabisco, E.; Ros, J. Oxidative damage to proteins: structural modifications and consequences in cell function. Redox proteomics: from protein modification to cellular dysfunction and diseases. Wiley, New York, pp. 399–472; 2006.
- [53] Shenton, D.; Grant, C. M. Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **374**:513–519; 2003.
- [54] Yoo, B. S.; Regnier, F. E. Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin–fluorescein affinity staining. *Electrophoresis* **25**:1334–1341; 2004.
- [55] Echave, P.; Esparza-Ceron, M. A.; Cabisco, E.; Tamarit, J.; Ros, J.; Membrillo-Hernandez, J.; Lin, E. C. C. DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:4626–4631; 2002.
- [56] Cabisco, E.; Belli, G.; Tamarit, J.; Echave, P.; Herrero, E.; Ros, J. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**:44531–44538; 2002.
- [57] Moreau, V. H.; Castilho, R. F.; Ferreira, S. T.; Carvalho-Alves, P. C. Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase at submicromolar iron concentrations: evidence for metal-catalyzed oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **25**:554–560; 1998.
- [58] Hermes-Lima, M.; Castilho, R. F.; Meinicke, A. R.; Vercesi, A. E. Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biochem.* **145**:53–60; 1995.
- [59] Belogradov, G. I. Mitochondrial ATP synthase: Fe²⁺-catalyzed fragmentation of the soluble F₁-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**:131–138; 1996.
- [60] Voisine, C.; Schilke, B.; Ohlson, M.; Beinert, H.; Marszalek, J.; Craig, E. A. Role of the mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1. *Mol. Cell. Biol.* **20**:3677–3684; 2000.
- [61] Rottgers, K.; Zufall, N.; Guiard, B.; Voos, W. The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **277**:45829–45837; 2002.
- [62] Shan, Y.; Napoli, E.; Cortopassi, G. Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum. Mol. Genet.* **16**:929–941; 2007.
- [63] Osorio, C.; Sullivan, P. M.; He, D. N.; Mace, B. E.; Ervin, J. F.; Strittmatter, W. J.; Alzate, O. Mortalin is regulated by APOE in hippocampus of AD patients and by human APOE in TR mice. *Neurobiol. Aging* **28**:1853–1862; 2007.
- [64] Chantrel-Groussard, K.; Geromel, V.; Puccio, H.; Koenig, M.; Munnich, A.; Rotig, A.; Rustin, P. Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **10**:2061–2067; 2001.
- [65] Lodi, R.; Cooper, J. M.; Bradley, J. L.; Manners, D.; Styles, P.; Taylor, D. J.; Schapira, A. H. Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:11492–11495; 1999.
- [66] Lodi, R.; Hart, P. E.; Rajagopalan, B.; Taylor, D. J.; Crilly, J. G.; Bradley, J. L.; Blamire, A. M.; Manners, D.; Styles, P.; Schapira, A. H.; Cooper, J. M. Antioxidant treatment improves in vivo cardiac and skeletal muscle bioenergetics in patients with Friedreich's ataxia. *Ann. Neurol.* **49**:590–596; 2001.
- [67] Thierbach, R.; Schulz, T. J.; Isken, F.; Voigt, A.; Mietzner, B.; Drewes, G.; von Kleist-Retzow, J. C.; Wiesner, R. J.; Magnuson, M. A.; Puccio, H.; Pfeiffer, A. F.; Steinberg, P.; Ristow, M. Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum. Mol. Genet.* **14**:3857–3864; 2005.
- [68] Bacon, B. R.; O'Neill, R.; Britton, R. S. Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. *Gastroenterology* **105**:1134–1140; 1993.
- [69] Ceccarelli, D.; Gallesi, D.; Giovannini, F.; Ferrali, M.; Masini, A. Relationship between free iron level and rat liver mitochondrial dysfunction in experimental dietary iron overload. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**:53–59; 1995.
- [70] Boddaert, N.; Le Quan Sang, K. H.; Rotig, A.; Leroy-Willig, A.; Gallet, S.; Brunelle, F.; Sidi, D.; Thalabard, J. C.; Munnich, A.; Cabantchik, Z. I. Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood* **110**:401–408; 2007.



Original Contribution

Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage

Verónica Irazusta, Elia Obis, Armando Moreno-Cermeño, Elisa Cabiscol, Joaquim Ros*, Jordi Tamarit

Grup de Bioquímica de l'Estrès Oxidatiu, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, 25008 Lleida, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2009

Revised 25 October 2009

Accepted 16 November 2009

Available online 8 December 2009

Keywords:

Iron overload

Protein carbonylation

Metal-catalyzed oxidation

Frataxin

Yeast

Superoxide dismutase

Iron toxicity

Friedreich ataxia

Free radicals

ABSTRACT

Iron overload is involved in several pathological conditions, including Friedreich ataxia, a disease caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin. In a previous study, we identified 14 proteins selectively oxidized in yeast cells lacking Yfh1, the yeast frataxin homolog. Most of these were magnesium-binding proteins. Decreased Mn-SOD activity, oxidative damage to CuZn-SOD, and increased levels of chelatable iron were also observed in this model. This study explores the relationship between low SOD activity, the presence of chelatable iron, and protein damage. We observed that addition of copper and manganese to the culture medium restored SOD activity and prevented both oxidative damage and inactivation of magnesium-binding proteins. This protection was compartment specific: recovery of mitochondrial enzymes required the addition of manganese, whereas cytosolic enzymes were recovered by adding copper. Copper treatment also decreased $\Delta yfh1$ sensitivity to menadione. Finally, a $\Delta sod1$ mutant showed high levels of chelatable iron and inactivation of magnesium-binding enzymes. These results suggest that reduced superoxide dismutase activity contributes to the toxic effects of iron overloading. This would also apply to pathologies involving iron accumulation.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Iron plays an essential role in cellular metabolism due to its great versatility as a biological catalyst [1]. However, high tissue iron concentrations have been associated with the development and progression of several pathological conditions [2], including genetic disorders caused by mutations in proteins directly involved in iron metabolism, such as hereditary hemochromatosis, Friedreich ataxia (FRDA), aceruloplasminemia, and X-linked sideroblastic anemia [3]. Increased body iron stores that could contribute to pathology progression have been described in other disorders, such as cancer [4] and Parkinson disease [5].

FRDA is caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin [6]. Many studies have linked frataxin to iron metabolism and iron overload. Consequently, some therapeutic approaches under study seek to reduce the degree of iron accumulation using chelators [7] or siderophores or to prevent its pro-oxidant effects with antioxidants such as idebenone, a coenzyme Q analog [8]. In most cellular and animal models of FRDA, decreased activity of proteins containing iron–sulfur clusters has been reported, suggesting that frataxin has a role in iron–sulfur cluster biosynthesis [9]. However, the precise function of this protein remains a matter of debate. Many studies of frataxin function have used *Saccharomyces cerevisiae*, as frataxin and the yeast homolog Yfh1 are orthologs. Frataxin and Yfh1 are mitochondrial proteins, $\Delta yfh1$ strains accumulate iron and show decreased activity of iron–sulfur-containing

proteins [10], and human frataxin complements yeast $\Delta yfh1$ mutant strains [11].

Iron toxicity is related to its ability to trigger the generation of reactive oxygen species (ROS) [12]. These species are highly reactive and have the potential to damage cellular components such as lipids, nucleic acids, carbohydrates, and proteins. “Free iron” is considered to be the iron fraction that is in transit between uptake and release from iron-binding proteins and is directly involved in iron toxicity. Although the exact nature of this iron fraction, also termed “chelatable iron,” “redox-active iron,” or “labile iron pool” [13], is poorly defined, it is generally considered to be associated with small-molecular-weight ligands such as ATP, ADP, phosphate, or citrate [1,14]. All living organisms have developed iron transport and storage systems that keep concentrations of free iron as low as possible [13].

In a previous study, we addressed the consequences of iron overload on the cellular proteome of a yeast model of Friedreich ataxia [15]. By analyzing protein carbonylation, one of the end-products of free radical attack on proteins, we identified 14 proteins specifically carbonylated in $\Delta yfh1$ mutants. Most of these were Mg-binding proteins, indicating that iron can replace Mg-binding sites and specifically promote damage of this group of proteins. Our results also indicated that chelatable iron, and not total cellular iron, was the iron fraction directly involved in promoting protein damage.

Our proteomic search for iron targets in $\Delta yfh1$ mutants also identified the cytosolic CuZn-dependent superoxide dismutase (SOD1) as one of the damaged enzymes [15]. Independent results from our lab [16] and others [17] have shown that iron overload in

* Corresponding author. Fax: +34 973 702 426.

E-mail address: joaquim.ros@cmb.udl.es (J. Ros).

yeast promotes inactivation of SOD2, and a similar effect was recently reported in a mouse model of hereditary hemochromatosis [18]. These data suggest that, in addition to its known catalytic ability to generate reactive oxygen species, iron overload could promote oxidative stress by inactivating both the mitochondrial and the cytosolic superoxide dismutases. This study shows that decreased SOD activity promotes increased levels of chelatable iron, which in turn promote specific protein damage in a yeast model of FRDA.

Experimental procedures

Organisms and culture conditions

The *S. cerevisiae* strains used in this work were W303-1A (wild type; MATa *ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1*) and its isogenic null mutants MML298 ($\Delta yfh1$; MATa *yfh1::kanMX4*) [15,16], BQS102 ($\Delta sod1$; MATa *sod1::URA3*), and BQS050 ($\Delta yfh1\Delta sod1$; MATa *yfh1::kanMX4, sod1::URA3*). BQS050 and BQS102 were obtained by replacing the SOD1 open reading frame in either W303-1A or MML298 with a *URA3* cassette obtained by PCR amplification from strain 96687 (MATa *sod1::URA3*; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Yeast cells were grown in rich medium (1% yeast extract, 2% peptone) with either 2% glucose (YPD) or 3% glycerol (YPG) by incubation in a rotary shaker at 30°C. Synthetic medium (SC) contained 2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base (Difco), a mixture of amino acids, and the required auxotrophic supplements. All experiments were performed with exponentially growing cells at optical densities ranging from 0.5 to 1 ($\lambda = 600$ nm, 1-cm light path).

Two-dimensional gel electrophoresis

Cells were suspended in 25 mM Tris–HCl buffer, pH 8, plus 8 M urea and disrupted using glass beads. An equal volume of 8 M urea, 8% Chaps, and 50 mM dithiothreitol (DTT) was added to the lysed cells, and after centrifugation (12,000 rpm for 10 min) protein amounts in the supernatant were quantitated with a Nanodrop ND-100 spectrophotometer and 40 μ g of protein was diluted in 150 μ l of rehydration buffer (8 M urea, 4% Chaps, 25 mM DTT, 0.5% Bio-Lytes). Isoelectric focusing was performed in 7-cm IPG immobilized pH gradient strips (3–10 NL Bio-Rad). After the first dimension, the strips were incubated for 20 min with 5 ml of a solution containing 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 10% trifluoroacetic acid. DNPH reacts with carbonyl groups in proteins. Antibodies against DNPH allow immunodetection of this compound bound to carbonyl groups in proteins by classic Western blot techniques. To stop this reaction, the strips were transferred to a 5-ml solution containing 0.4 M Tris, pH 8.8, 6 M urea, 2% SDS, and 20% glycerol. Second-dimension SDS–PAGE was performed on 18 \times 18-cm 12.5% polyacrylamide gels. For comparative purposes, two strips (one corresponding to wild-type cells and the other to $\Delta yfh1$ cells grown under the same conditions) were run in parallel on the same gel to obtain images with the same exposure and incubation times. Gels were either transferred to PVDF membranes for Western blot analysis or silver stained (PlusOne silver staining kit; General Electric Healthcare) and scanned in a GS800 densitometer (Bio-Rad). Antibodies against DNPH (Dako) were used at 1:5000 dilution. A peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was used for detection. Images were acquired in a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) and analyzed with PDQuest software (Bio-Rad).

Enzyme activity

Cell extracts were prepared using glass beads, and enzymatic activity was assayed as previously described for aconitase and succinate dehydrogenase [19], pyruvate kinase [20], and phosphoglycerate kinase [21]. Mitochondrial F_1F_0 ATP synthase was assayed in mitochondrial preparations as described [22]. Oligomycin at 6 μ g/ml,

an inhibitor of this enzyme [23], was used for background subtraction. Mitochondria were prepared as described [19]. Superoxide dismutase activity was analyzed in zymograms. Briefly, cells were disrupted using glass beads in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0. Crude extracts were loaded onto native 12% Tris–glycine polyacrylamide gels, pH 8.8. After electrophoresis, gels were stained for SOD activity as described [24]. Native gels were subjected to densitometry and the density of the bands corresponding to Mn-SOD or CuZn-SOD activity was calculated using Quantity One software (Bio-Rad).

Iron analyses

Total cellular iron was determined in nitric acid-digested cells, using bathophenanthroline sulfonate as chelator [25]. Intracellular chelatable iron was determined using confocal microscopy and the fluorescent iron chelator Phen Green SK diacetate (Molecular Probes) [15]. Yeast cells were grown in YPD medium, washed twice with SC medium, and then loaded for 20 min with 20 μ M Phen Green SK diacetate in 300 μ l of SC medium. This incubation was performed over glass coverslips treated with concanavalin A (Sigma) to fix the cells and mounted in a stainless steel chamber placed on the stage of an inverted Olympus FV500 confocal laser scanning microscope. After 20 min incubation with Phen Green SK diacetate, the cells fixed on the chamber's coverslip were washed twice with SC medium, diluted again in 300 μ l of SC medium, and imaged in the microscope using an argon laser ($\lambda_{excitation}$ 488 nm), 505 nm longpass filter, and Olympus PlanApo oil objective (60 \times /1.40 NA). For dynamic measurements of Phen green dequenching, images were collected at 5-s intervals. After 1 min, 3 μ l of a solution containing 0.2 M 1,10-phenanthroline was added to the chamber and images were collected for 4 additional minutes at 5-s intervals. Data were analyzed using Olympus Fluoview and Microsoft Excel software.

Measurement of cell growth rate

Cell growth was monitored in 1-ml cultures in 24-well plates incubated at 30°C and constant agitation in a Biotek PowerWave XS microplate spectrophotometer. Plates were sealed with Breathe Easy membranes (Diversified Biotech, Boston, MA, USA). Optical density (600 nm) was recorded every 30 min. Generation times were calculated using Gen5 data analysis software and Microsoft Excel.

Results

CuZn-SOD activity is decreased in $\Delta yfh1$ cells

In two previous proteomic analyses of $\Delta yfh1$ yeast cells, we identified CuZn-superoxide dismutase as both a highly induced protein [16] and a target of iron-induced oxidative stress [15]. The degree of carbonylation significantly exceeded the increase in SOD1 protein, suggesting that a fraction of this protein may be present in a damaged form in $\Delta yfh1$ cells. However, the consequences of such carbonylation on SOD1 activity were not studied. To reveal whether total SOD1 activity was altered in $\Delta yfh1$ cells, this study analyzed the activity of both SOD isoenzymes using native gels stained for SOD activity. As shown in Figs. 1A and 1B, CuZn-SOD activity was slightly decreased in $\Delta yfh1$. The SOD1 activity decrease appears stronger when specific activity (Fig. 1C) is calculated by dividing the enzymatic activity with the protein amounts measured by Western blot (Fig. 1A). The origin of such low specific activity may be protein carbonylation due to ROS damage but could also be related to limited copper availability, which would result in large amounts of apo-SOD1 protein. This is very possible, as copper is required for the activity of Fet3, a multicopper oxidase involved in iron transport that is largely induced in $\Delta yfh1$ strains [26]. Indeed, it has been described that activation of iron acquisition by the iron-responding factor Aft1 increases copper

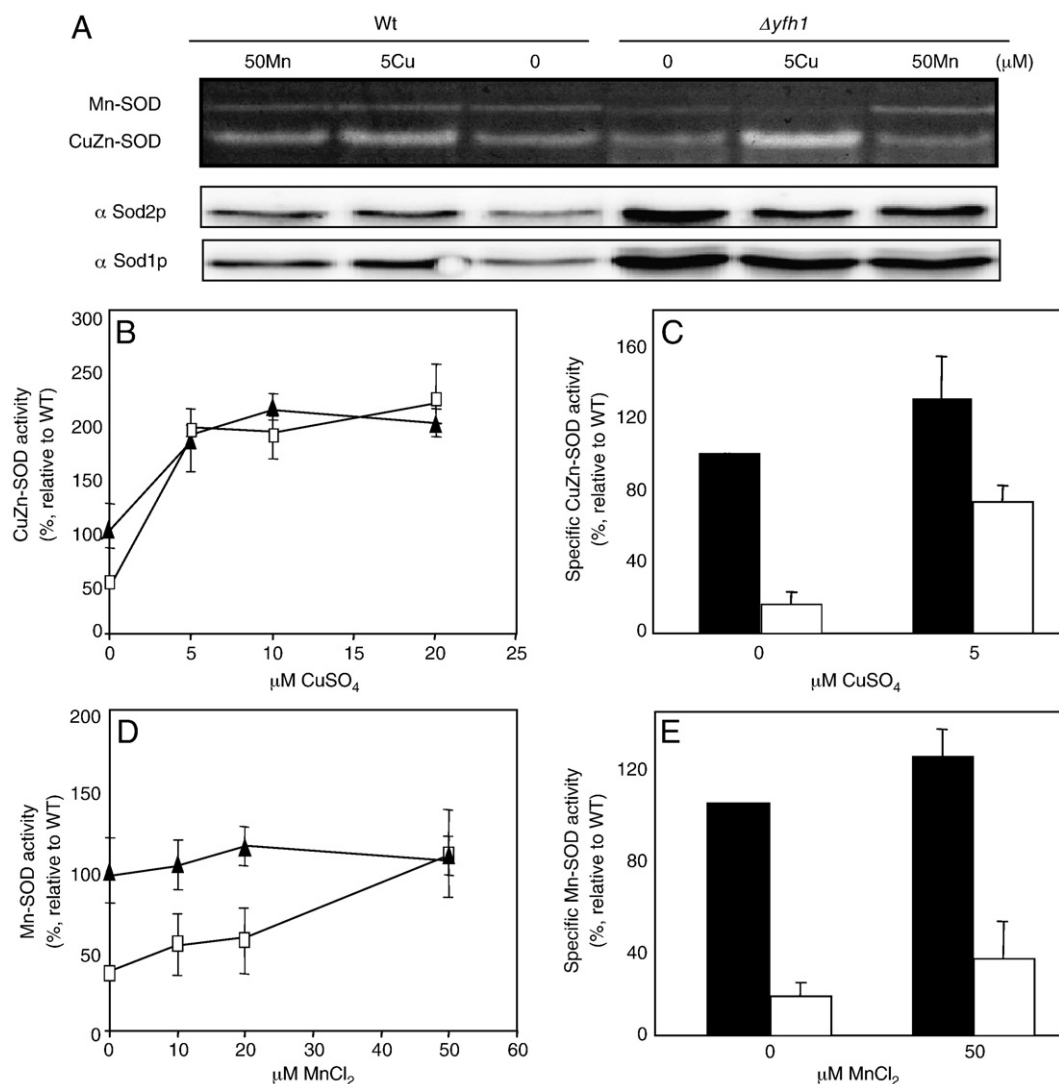


Fig. 1. SOD activity in $\Delta yfh1$ cells. Crude extracts from wild-type and $\Delta yfh1$ cells grown under various conditions were loaded on native gels and SOD activity was detected as explained under [Experimental procedures](#). Crude extracts were also separated by SDS-PAGE and the amounts of SOD1 and SOD2 calculated by Western blot. (A) Zymograms and Western blots showing the activity and amounts of both isoforms in crude extracts from cells grown in YPG supplemented or not with 5 $\mu\text{M CuSO}_4$, 50 $\mu\text{M MnCl}_2$. (B) Total CuZn-SOD activity in cells grown in supplemented YPG medium was calculated by analyzing the intensity of the corresponding band in the zymogram. Activity in nonsupplemented wild-type cells was considered the 100% reference value. (C) Specific CuZn-SOD activity was calculated by dividing the relative enzymatic activity (obtained by zymograms) by the relative intensity of the Western blot bands against SOD1. Activity in nonsupplemented wild-type cells was considered the 100% reference value. (D and E) In manganese-supplemented cultures, total and specific Mn-SOD activity was calculated as explained for CuZn-SOD. All data are presented as means \pm standard deviation of three independent experiments.

transport into membrane compartments, leading to copper-depleted cytosol [27]. To investigate whether copper availability may be limited in $\Delta yfh1$ cells, we supplemented the culture medium with copper sulfate at various concentrations. As shown in [Fig. 1B](#), copper treatment increased CuZn-SOD activity in both wild-type and $\Delta yfh1$ cells. In wild-type cells, this was due to higher protein expression, as observed by Western blot ([Fig. 1A](#)). Consequently, specific activity was not altered ([Fig. 1C](#)). Recovery of wild-type levels of CuZn-SOD activity in $\Delta yfh1$ cells was achieved with 5 $\mu\text{M CuSO}_4$. Supplementing culture medium with higher concentrations of copper did not further increase SOD activity. However, specific activity was not fully restored. This fact may indicate that, in addition to limited copper availability, a fraction of CuZn-SOD may be inactive in $\Delta yfh1$ cells because of oxidative damage.

We also investigated the effects of copper and manganese treatment on Mn-SOD activity. In a previous study [16], we observed that the mitochondrial manganese-dependent isoenzyme (Mn-SOD) showed a marked increase in protein amounts, but paradoxically decreased activity in $\Delta yfh1$ cells. This decreased activity was

considered one of the consequences of the manganese deficiency found in $\Delta yfh1$ cells and could be reverted by manganese supplementation of the culture medium. The zymograms shown in [Fig. 1A](#) confirmed this marked decrease in Mn-SOD activity and its recovery by manganese ([Fig. 1D](#)). However, when specific activity was calculated, large amounts of inactive SOD2 were present, even in manganese-supplemented cultures ([Fig. 1E](#)). This fact indicates that Mn-SOD may be inactivated by iron accumulation in mitochondria, as well as by manganese deficiency. Iron would occupy the active site of the enzyme [17], yielding an inactive and easily oxidizable [15] form of this enzyme.

Carbonyl content in supplemented cultures

In a previous study, we used a proteomics approach to identify oxidatively damaged proteins in a $\Delta yfh1$ strain. This approach consisted of Western blot detection of carbonyl groups on proteins previously separated by two-dimensional gel electrophoresis (2D-oxy blot). We identified 17 spots with increased carbonyl content in $\Delta yfh1$

cells, corresponding to 14 different proteins. To explore the contribution of decreased SOD activity to the carbonylation of this group of proteins, we analyzed protein carbonylation in yeast cells grown in YPG medium supplemented or not with 50 μM MnCl_2 and 5 μM CuSO_4 . As shown in Fig. 1, recovery of wild-type levels of CuZn-SOD and Mn-SOD in $\Delta yfh1$ cells was achieved with these metal concentrations. Crude extracts were prepared and analyzed by 2D-oxy blots as described under Experimental procedures. Replicate gels were silver stained to measure the changes in protein amounts of every analyzed spot under each experimental condition. Representative images of these gels are shown in Fig. 2. Both 2D-oxy blots and silver-stained gels were analyzed in pairs (wild type vs $\Delta yfh1$) using PDQuest software. Relative carbonyl and protein amounts ($\Delta yfh1/\text{wild type}$) obtained for each spot are shown in Table 1. These results are summarized in Fig. 3, which presents the increase in carbonylation in $\Delta yfh1$ cells of each protein analyzed (corrected considering changes in protein amounts), in treated and untreated cultures. A significant decrease in the carbonylation degree of most of the analyzed proteins was observed after manganese and copper treatment. As a control, spot 18, which showed no change in carbonylation in $\Delta yfh1$ cells, was identified as the two isoforms of glyceraldehyde-3P dehydrogenase (TDH2 and TDH3). Previously, we had shown that glyceraldehyde-3P dehydrogenase activity was not altered in $\Delta yfh1$ mutants [15]. As

shown in Fig. 3, metal treatment had no effect on the degree of carbonylation, suggesting that these proteins are damaged as a consequence of increased superoxide levels produced in $\Delta yfh1$ cells.

Recovery of enzymatic activity by copper and manganese treatments

To validate the results obtained in the previous experiments, we analyzed the enzymatic activity of pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase, and mitochondrial ATP synthase in YPG cultures supplemented or not with copper and manganese. These three enzymes were described as targets of iron-induced oxidative stress in $\Delta yfh1$ cells because their enzymatic activities decreased and carbonyl content increased in such cells [15]. Fig. 4 shows that manganese and copper treatment protected these enzymatic activities from inactivation in $\Delta yfh1$ cells, confirming the proteomic data presented in Table 1 and Fig. 3. We also wanted to determine if copper alone was able to recover both cytosolic and mitochondrial enzymes; a cross-compartment protection by CuZn-SOD of mitochondrial enzymes such as homocitric acid or aconitase has been reported [28]. Only the cytosolic proteins pyruvate kinase and phosphoglycerate kinase were recovered by copper treatment, whereas recovery of the mitochondrial ATP synthase required both copper and manganese. This result suggests that these enzymes are inactivated as a consequence of increased

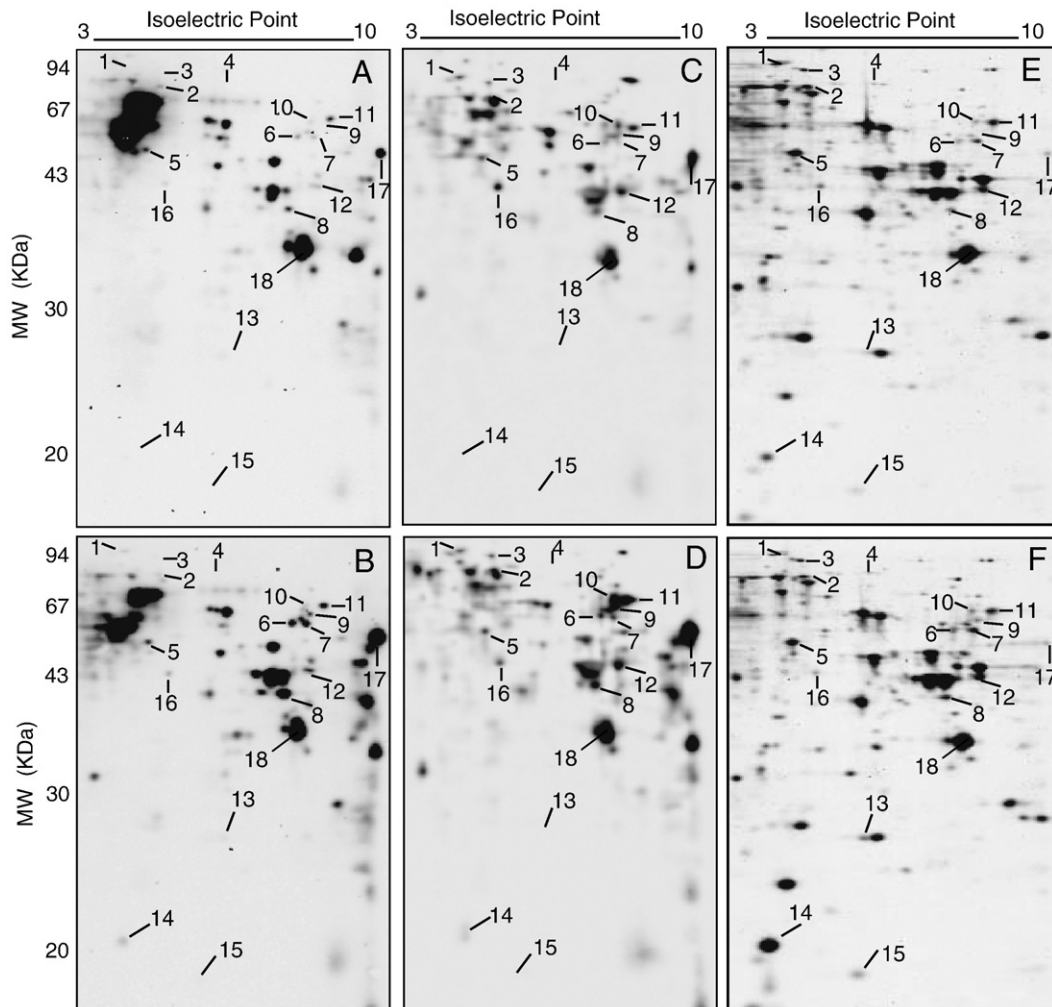


Fig. 2. Analysis of the oxyproteome of wild-type and $\Delta yfh1$ cells grown in metal-supplemented YPG by two-dimensional gel electrophoresis. Cells were grown in YPG medium supplemented with 50 μM MnCl_2 and 5 μM CuSO_4 as indicated. Control cultures were grown without supplementation. Cell lysates (40 μg of total protein) were separated by two-dimensional gel electrophoresis as described under Experimental procedures. Gels were transferred to PVDF membranes and oxidized proteins detected with antibodies against 2,4-dinitrophenol: (A) wild-type and (B) $\Delta yfh1$ cells grown in unsupplemented YPG; (C) wild-type and (D) $\Delta yfh1$ cells grown in supplemented YPG. (E and F) Silver-stained gels correspond to (E) wild-type and (F) $\Delta yfh1$ cells grown in supplemented YPG. The indicated spots are those previously identified as targets of oxidative stress in $\Delta yfh1$ cells [15] (see Table 1).

Table 1Analysis of specific protein carbonylation in $\Delta yfh1$ cells grown in YPG medium supplemented or not with copper and manganese

Protein	Gene	Spot	Untreated			5 μ M CuSO ₄ + 50 μ M MnCl ₂		
			Oxidation increase	Protein increase	Oxidation/protein	Protein increase	Protein increase	Oxidation/protein
Mitochondrial heat shock protein	SSC1	1	3.43 \pm 1.74	0.86 \pm 0.46	4.0 \pm 0.6	1.17 \pm 0.33	0.62 \pm 0.47	2.34 \pm 0.90
			3	3.27 \pm 0.41	1.19 \pm 0.60	2.75 \pm 0.83	1.68 \pm 0.42	0.74 \pm 0.20
Mitochondrial matrix chaperone	HSP78	4	14.47 \pm 1.15	0.92 \pm 0.25	15.75 \pm 3.0	2.19 \pm 0.35	1.35 \pm 0.65	1.62 \pm 0.81
Cytoplasmic heat shock protein homolog	SSE1	2	6.61 \pm 3.48	0.96 \pm 0.29	6.8 \pm 2.1	2.27 \pm 0.01	0.74 \pm 0.36	3.027 \pm 1.39
F ₁ F ₀ ATP synthase, α subunit	ATP1	6	5.47 \pm 0.60	1.21 \pm 0.20	4.6 \pm 0.28	1.56 \pm 0.79	1.98 \pm 0.92	0.79 \pm 0.15
			7	12.62 \pm 3.45	1.00 \pm 0.30	12.69 \pm 0.4	1.72 \pm 0.82	1.64 \pm 0.42
F ₁ F ₀ ATP synthase, β subunit	ATP2	5	3.43 \pm 1.25	0.67 \pm 0.38	5.30 \pm 1.7	1.43 \pm 0.67	0.71 \pm 0.25	2.05 \pm 0.91
Acetohydroxy acid reductoisomerase	ILV5	8	10.20 \pm 2.41	0.98 \pm 0.55	10.4 \pm 2.9	1.02 \pm 0.54	1.83 \pm 0.87	0.49 \pm 0.13
Pyruvate kinase 1	CDC19	10	3.60 \pm 1.25	0.90 \pm 0.10	3.90 \pm 1.01	1.02 \pm 1.42	1.63 \pm 1.2	0.61 \pm 0.55
			11	2.73 \pm 0.55	0.80 \pm 0.20	3.5 \pm 0.19	1.65 \pm 0.06	1.34 \pm 0.51
3-Phosphoglycerate kinase	PGK1	12	4.00 \pm 0.75	1.02 \pm 0.25	3.9 \pm 0.27	1.71 \pm 0.51	0.93 \pm 0.51	1.85 \pm 0.45
Adenylate kinase	ADK1	13	8.30 \pm 1.35	2.50 \pm 0.53	3.3 \pm 0.21	1.71 \pm 0.51	3.17 \pm 0.92	0.54 \pm 0.02
Catalase A	CTA1	9	49.37 \pm 5.75	6.07 \pm 1.74	8.46 \pm 2.8	2.17 \pm 0.86	7.13 \pm 5.30	0.35 \pm 0.13
Thiol-specific peroxiredoxin	AHP1	14	15.33 \pm 4.43	4.37 \pm 1.07	3.50 \pm 0.73	6.76 \pm 2.31	6.53 \pm 0.92	1.03 \pm 0.27
CuZn-superoxide dismutase	SOD1	15	14.83 \pm 2.84	5.01 \pm 2.03	2.97 \pm 0.74	5.20 \pm 1.44	2.11 \pm 0.38	2.44 \pm 0.27
Actin, α chain	ACT1	16	2.63 \pm 0.25	0.77 \pm 0.06	3.43 \pm 0.19	1.24 \pm 0.50	0.55 \pm 0.17	2.22 \pm 0.37
Translational elongation factor EF-1 α	TEF2	17	9.20 \pm 1.45	1.24 \pm 0.42	7.51 \pm 1.41	1.87 \pm 0.73	0.82 \pm 0.07	2.28 \pm 0.53
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TDH2/3	18	0.94 \pm 0.11	0.89 \pm 0.41	1.06 \pm 0.28	0.95 \pm 0.49	0.85 \pm 0.02	1.12 \pm 0.56

The spots indicated in Fig. 2 were previously identified as the indicated proteins [15]. Oxidation increase ($\Delta yfh1$ over wild type) was quantified from the oxy blots shown in Fig. 2. Protein increase ($\Delta yfh1$ over wild type) was quantified from silver-stained gels. Values in the last column are the ratio between oxidation and protein increases and represent the relative increase in oxidative damage for each protein in $\Delta yfh1$. Data are mean \pm confidence intervals ($\alpha = 0.05$) from four independent experiments.

superoxide levels found in $\Delta yfh1$ cells in their respective cellular compartments. To further investigate the contribution of CuZn-SOD activity to the inactivation of mitochondrial enzymes in $\Delta yfh1$ cells, we analyzed the effects of copper alone or in conjunction with manganese on the activity of two representative iron-sulfur enzymes, aconitase and succinate dehydrogenase. In a previous study, we showed that inactivation of several iron-sulfur enzymes, one of the hallmarks of FRDA, could be prevented in $\Delta yfh1$ cells when Mn-SOD was recovered by manganese treatment [16]. The exception was aconitase, which still presented low levels of activity after manganese treatment. As shown in Fig. 5, copper alone had no effect on aconitase and succinate dehydrogenase activity. The combined treatment (copper plus manganese) restored succinate dehydrogenase activity, but had no effect on aconitase activity. These results confirm our

previous observation that aconitase is more dependent on the presence of Yfh1 than other iron-sulfur enzymes and also that decreased CuZn-SOD activity in $\Delta yfh1$ cells has little effect on mitochondrial enzymes.

Effects of copper and manganese treatments on cell growth rate and sensitivity to menadione

When grown in YPG, $\Delta yfh1$ cells present a decrease in cell growth rate. Because copper and manganese prevented protein damage in $\Delta yfh1$ cells, we investigated the effects of such supplementation on cell growth rate. To test several combinations of both metal concentrations and to detect slight changes in growth rate, we performed these experiments in liquid media in multiwell plates.

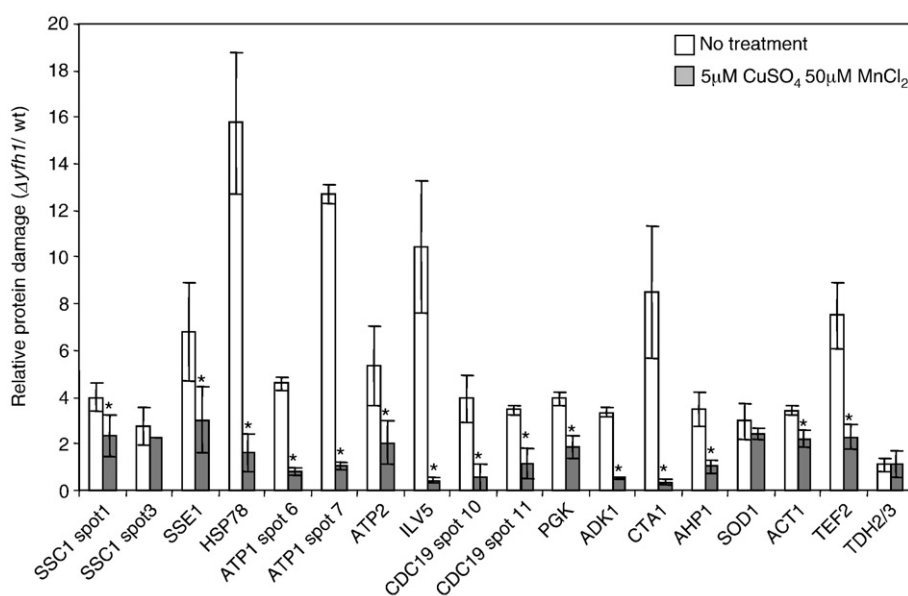


Fig. 3. Comparative analysis of specific protein damage in untreated and treated cultures. Values are the ratios between the changes observed in protein carbonylation (by oxy-blots) and the protein amounts (silver-stained gels) for each specific spot and represent the relative increase in oxidative damage in $\Delta yfh1$ for each protein analyzed under the various growth conditions. Error bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$). *Significant decrease in the relative protein damage value after metal treatment.

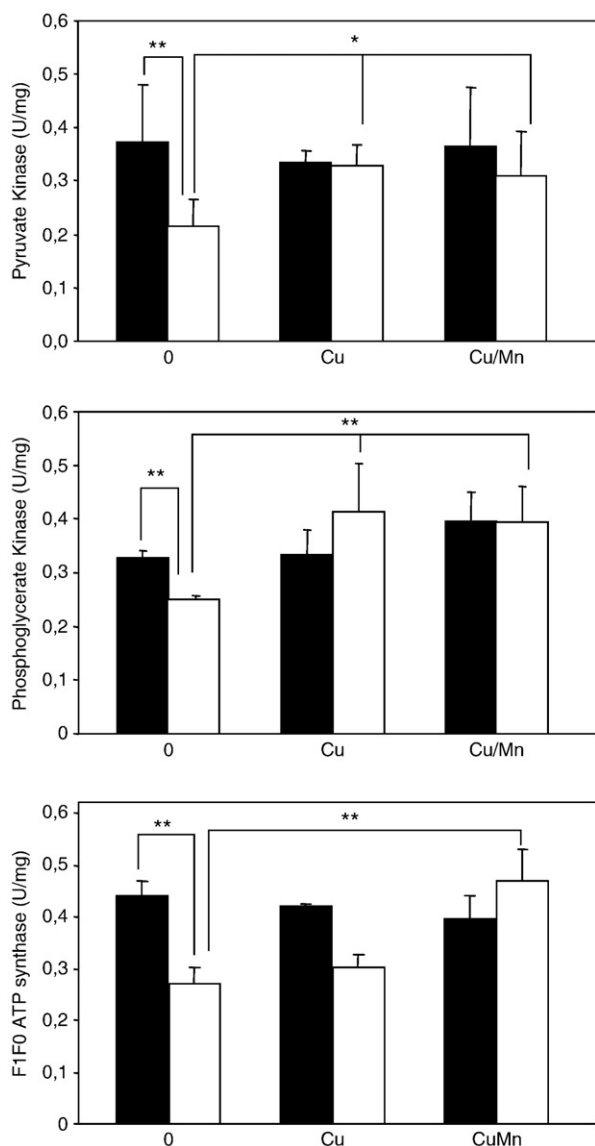


Fig. 4. Recovery of specific activity of carbonylated enzymes in $\Delta yfh1$ yeast cells by metal treatment. Wild-type (black bars) and $\Delta yfh1$ cells (white bars) were grown in YPG supplemented with 50 μM MnCl_2 and 5 μM CuSO_4 as indicated. Control cultures were grown without supplementation. Enzymatic activity of pyruvate kinase and phosphoglycerate kinase was measured in whole-cell extracts. F_1F_0 -ATP synthase was measured in mitochondrial preparations from wild-type and $\Delta yfh1$ cells, and the activity found in $\Delta yfh1$ mitochondria was corrected according to the relative amount of mitochondrial porin present in each preparation (detected by Western blot). Data are presented as means \pm standard deviation from three independent experiments. Combined copper and manganese treatment provided a significant protection of the three enzymatic activities. Copper alone provided significant protection to cytosolic enzymatic activity but failed to protect F_1F_0 -ATP synthase (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Cultures of 1 ml containing various concentrations of copper and manganese in YPG were incubated for 18 h in 24-well plates in a Biotek PowerWave XS microplate spectrophotometer. An equal number of cells were inoculated in each well at the beginning of the experiment, and optical density was measured every 30 min. Maximum generation times were calculated for each culture considering at least a 4-h period. Cells lacking Yfh1 presented longer generation times (208 min) than wild-type cells (156 min). Copper or manganese treatment, alone (Fig. 6) or combined (not shown), did not significantly affect these parameters. This fact indicates that the reduced growth rate in $\Delta yfh1$ cells is not due to increased protein damage to Mg-binding proteins or FeS enzymes recovered by copper and manganese treatment.

We also wanted to test the sensitivity of both strains to the superoxide-generating agent menadione, as well as the effect of metal supplementation on such sensitivity. For this purpose, cell cultures were challenged with 2.5 μM menadione 4 h after metal treatment and growth rate was monitored for 14 additional hours. Maximum generation times were calculated as described. Menadione had a strong effect on $\Delta yfh1$ generation time (461 min, more than double), but did not have a significant effect on wild-type generation time. Copper and manganese treatments had divergent effects on the increased sensitivity of the $\Delta yfh1$ strain to menadione. Copper decreased sensitivity but manganese increased it in a dose-dependent manner (Fig. 6). These results confirm that $\Delta yfh1$ cells are more sensitive to oxidative stress than wild-type cells and suggest that decreased CuZn-SOD activity is involved in such sensitivity. Supporting this idea, experiments carried out with a double mutant, $\Delta yfh1\Delta sod1$, showed that it was unable to grow aerobically (data not shown), which is in accordance with a deleterious effect of decreased SOD activity in cells lacking Yfh1.

Pyruvate kinase activity in $\Delta sod1$ cells: effect of copper supplementation

To further investigate the contribution of decreased SOD activity to protein oxidation, we analyzed pyruvate kinase activity in a $\Delta sod1$ strain. Because this mutant does not grow in YPG, cells were grown in YPD for these experiments. As shown in Fig. 7, pyruvate kinase activity presented a significant decrease in $\Delta sod1$, similar to that observed in the $\Delta yfh1$ mutant grown under the same conditions. Interestingly, in contrast to what was observed in $\Delta yfh1$ cells, enzymatic activity was not recovered in $\Delta sod1$ cells grown in copper-supplemented medium. This result indicates that the recovery of pyruvate kinase by copper treatment in $\Delta yfh1$ cells is due to the recovery of CuZn-SOD activity and not to any other indirect effect exerted by copper treatment.

Both $\Delta yfh1$ and $\Delta sod1$ strains show increased levels of chelatable iron

Previously, we had shown that chelatable iron was the fraction responsible for protein oxidative damage in $\Delta yfh1$ cells [15]. A possible link between SOD activity and oxidative damage to proteins could be directly related to the known ability of superoxide to increase the fraction of chelatable iron [29]. To investigate this point, we measured the relative content of chelatable iron in wild-type, $\Delta yfh1$, and $\Delta sod1$ cells grown in YPD, as well as the total cellular iron content after acid digestion of the cells. Chelatable iron can be estimated with the use of Phen Green SK, a cell-permeative fluorescent sensor carrying a phenanthroline group. Inside cells, the fluorescence of this sensor is quenched by iron binding and can be recovered after addition of the cell-permeative iron chelator 1,10-phenanthroline to the cell suspension [30]. Cells were washed with synthetic medium, loaded with 20 μM Phen Green SK diacetate for 20 min, and washed again with synthetic medium and the fluorescence was recorded in a confocal microscope. After basal fluorescence was recorded for 1 min, 2 mM 1,10-phenanthroline was added to the preparation and fluorescence recorded for 4 additional minutes. Figs. 8A–8F shows the images of wild-type $\Delta sod1$ and $\Delta yfh1$ cells before and 90 s after the addition of 1,10-phenanthroline. The mean recorded fluorescence for both strains at various times is shown in Fig. 8G. A sharp increase in fluorescence intensity, followed by a plateau, is observed soon after the addition of the chelator. Subtracting the basal fluorescence of each cell from the fluorescence of the same cell after 90 s of exposure to 1,10-phenanthroline yielded the relative amount of chelatable iron (shown in Fig. 8H). This value was obtained from at least 30 cells from three independent experiments. As shown in Fig. 8H, both mutants exhibited increased amounts of chelatable iron. When total cell iron content was measured, $\Delta sod1$ cells did not show a significant increase in total iron in contrast to what was observed in $\Delta yfh1$ cells. These results

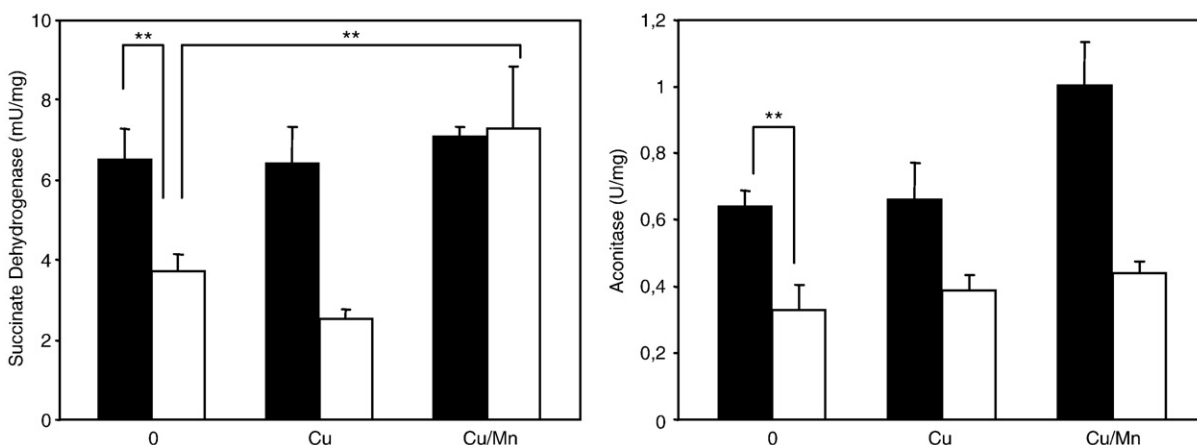


Fig. 5. Specific activity of mitochondrial FeS enzymes in $\Delta yfh1$ yeast cells is not recovered by copper treatment. Wild-type (black bars) and $\Delta yfh1$ cells (white bars) were grown in YPG medium supplemented with 50 μM MnCl_2 and 5 μM CuSO_4 as indicated. Control cultures were grown without supplementation. Enzymatic activity was measured in whole-cell extracts. Data are presented as means \pm standard deviation from three independent experiments. Combined copper and manganese treatment provided significant protection of succinate dehydrogenase but not of aconitase. Copper alone did not protect any of these enzymes (** $P < 0.01$).

indicate that chelatable iron formation in $\Delta yfh1$ cells is promoted by decreased SOD activity.

Discussion

In a previous study, we described the presence of high levels of chelatable iron, oxidative damage to Mg-binding proteins, and

decreased SOD activity in $\Delta yfh1$ mutants. This study investigated the role of SOD deficiency in promoting oxidative damage under iron-overload conditions. Our results suggest a central role for both SODs in promoting protein oxidative damage, consistent with previously published observations and represented in Fig. 9. It has been widely described that loss of Yfh1 activates the iron regulon AFT1, which in turn promotes Ftr1 and Fet3 expression and iron acquisition [10,15,26]. Activation of AFT1 leads to copper-deprived cytosol, as this metal is required for the ferroxidase activity of Fet3 [27]. This would result in decreased cytosolic SOD activity, which would promote the inactivation of iron-sulfur enzymes and trigger the formation of chelatable iron. This form of iron would replace Mg from Mg-binding sites and promote the specific damage to Mg-binding proteins [15]. Yfh1 depletion also induces a decrease in manganese uptake, through a still unknown mechanism [16]. This results in decreased Mn-SOD activity, which has effects in mitochondria similar to those exerted by decreased CuZn-SOD activity in the cytosol. Moreover, Mn-SOD may be inactivated by iron [17], leading to a vicious cycle that promotes further increase in superoxide levels and decreased activity of target enzymes. This vicious cycle can be prevented by enhancing the cofactor availability (copper and manganese), allowing partial recovery of both SOD activities and, consequently, preventing the oxidation of most of the enzymes targeted by superoxide. In $\Delta sod1$ cells, increased superoxide levels

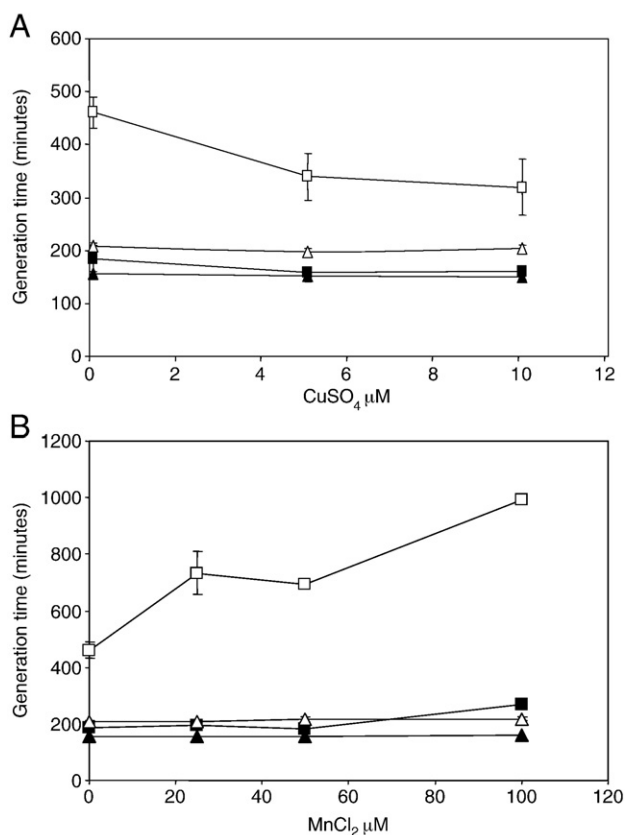


Fig. 6. Effects of menadione, copper, and manganese on the generation time of wild-type and $\Delta yfh1$ cells. Wild-type (black markers) and $\Delta yfh1$ cells (white markers) were grown in 24-well plates in YPG medium containing the indicated amounts of (A) CuSO_4 or (B) MnCl_2 and stressed by 2.5 μM menadione (square markers) or not stressed (triangles). Generation time was calculated for each condition as explained under Experimental procedures. Data are presented as means \pm confidence intervals from six independent cultures.

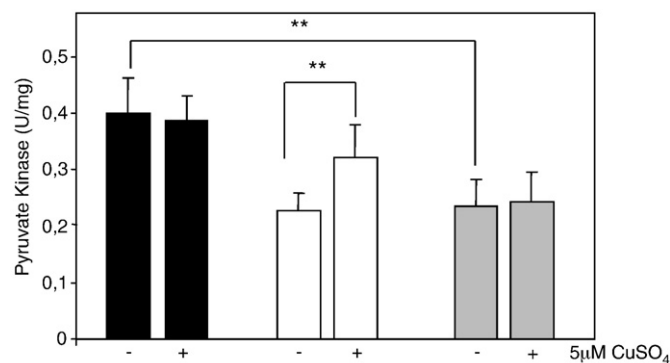


Fig. 7. Effects of copper supplementation on pyruvate kinase activity in $\Delta yfh1$ and $\Delta sod1$ cells. Wild-type (black bars), $\Delta yfh1$ (white bars), and $\Delta sod1$ (gray bars) cells were grown in YPD medium supplemented with 5 μM CuSO_4 or without supplementation and pyruvate kinase activity was measured in whole-cell extracts. Values are U/mg of total protein. Data are presented as means \pm standard deviation from three independent experiments. A significant protection in pyruvate kinase activity (** $P < 0.01$) was provided by copper treatment in $\Delta yfh1$ cells but not in $\Delta sod1$ cells.

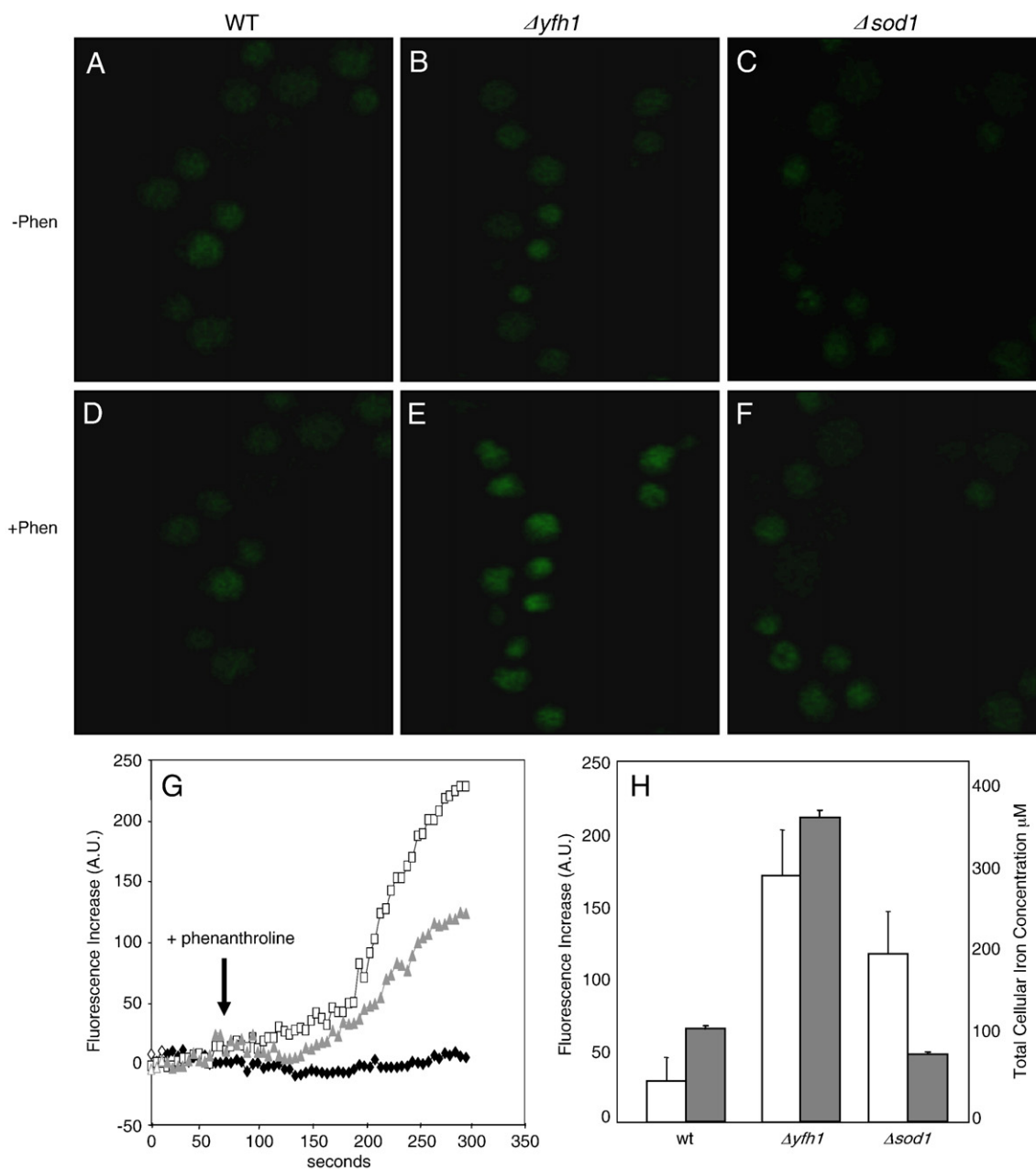


Fig. 8. Increased levels of chelatable iron in $\Delta yfh1$ cells. Wild-type, $\Delta yfh1$, and $\Delta sod1$ cells were grown in YPD medium, washed with SC medium, and then loaded for 20 min with 20 μM Phen Green SK diacetate. Images were obtained by confocal microscopy using a 505 nm longpass filter ($\lambda_{\text{excitation}}$ 488 nm). (A–F) Images collected (A–C) before and (D–F) 90 s after the addition of 1,10-phenanthroline to wild-type (A, D), $\Delta yfh1$ (B, E), and $\Delta sod1$ cells (C, F). (G) A representative experiment is shown. Each series corresponds to the average fluorescence of 30 cells found in the same microscopic field from wild-type (♦), $\Delta yfh1$ (□), or $\Delta sod1$ (▲) strains. Basal fluorescence was recorded for 1 min. An increase in fluorescence was observed after the addition of 2 mM 1,10-phenanthroline to the preparation (arrow). (H) Relative levels of chelatable iron (white bars) and total iron content (gray bars) in the three strains analyzed. To obtain the chelatable iron value, the fluorescence recorded before 1,10-phenanthroline addition was subtracted from that recorded for the same cell 90 s after addition of the chelator. Values for a minimum of 30 cells were recorded in each experiment. Total cell iron was calculated after acid digestion of the cells as described under [Experimental procedures](#). Data are presented as means \pm standard deviation from three independent experiments.

due to the absence of cytosolic SOD activity also result in increased chelatable iron and inactivation of Mg-binding enzymes such as pyruvate kinase. However, copper supplementation is not able to restore the SOD activity and, consequently, inactivation of pyruvate kinase is not prevented by this treatment.

Considering all of these elements, then, what is the relevance of SOD deficiency on cellular function or viability? The analysis of the effect of metal supplementation on growth rate indicates that the decreased growth rate of the $\Delta yfh1$ strain under basal conditions is not due to decreased SOD activity. However, this is not the case when cells are exposed to a slight oxidative challenge such as the addition of 2.5 μM menadione to the culture medium. Under such

conditions, copper treatment significantly ameliorates the slow growth rate of $\Delta yfh1$ cells. This fact indicates that decreased CuZn-SOD activity is directly involved in the increased sensitivity of Yfh1-deficient cells to oxidative stress. In contrast, manganese supplementation has a negative effect on the growth rate of $\Delta yfh1$ cells in the presence of menadione. It should be considered that menadione toxicity can be mediated by cytosolic enzymes such as glutathione S-transferase [32] or cytosolic quinone oxidoreductases [33] acting as reductants of the drug. In this context, restoring Mn-SOD activity would not have any effect under menadione stress. In addition, it is known that manganese has both beneficial and toxic effects [31]; under the conditions tested, the detrimental impact on cell viability

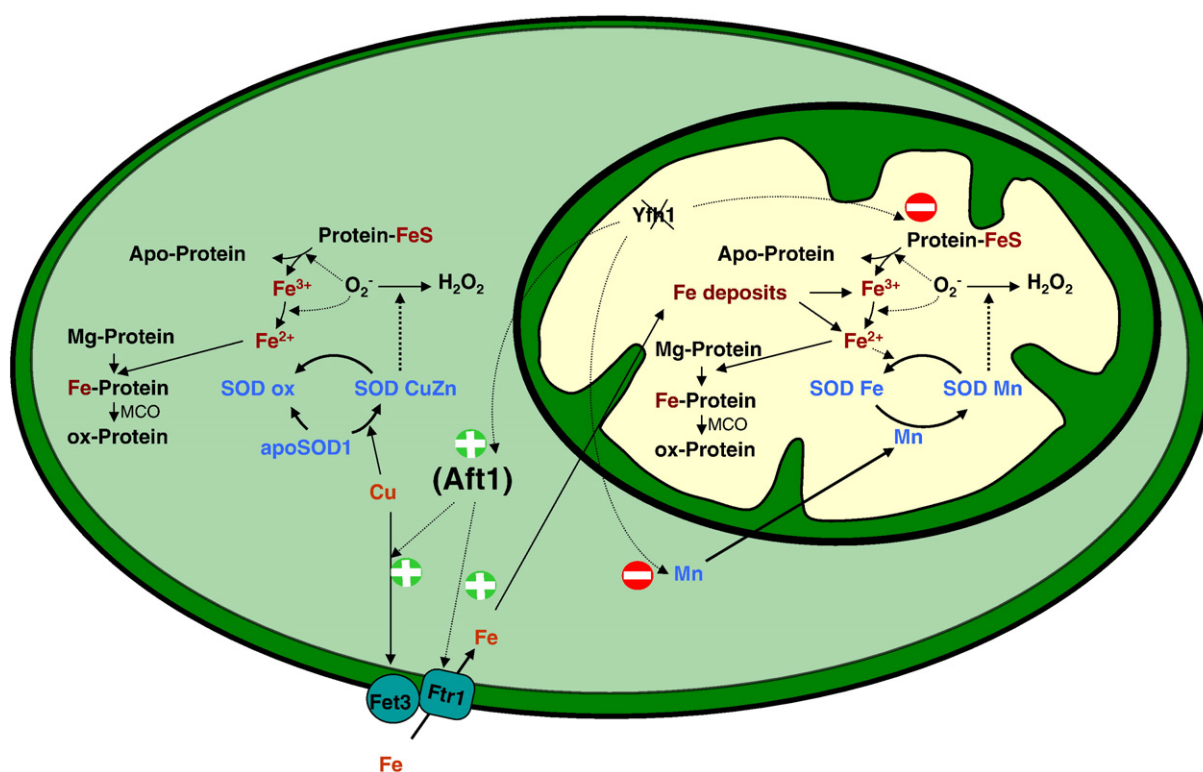


Fig. 9. Proposed mechanism to explain the role of SOD deficiency in promoting oxidative damage under iron-overload conditions. Manganese deficiency in *Yfh1* cells was previously described (Ref. [15]) as affecting SOD2 activity. Supplementation of the culture medium with this metal decreases the damage to mitochondrial proteins (this study). Also, AFT1 induction in *Yfh1* cells enhances the recruitment of copper by membrane transporters (Ref. [27]) and, as a consequence, SOD1 activity is decreased. Supplementation of the cultures with copper restores normal levels of SOD1 activity and, as a result, the oxidative damage to cytosolic proteins is decreased (this study). For more details, see text.

would be greater than the beneficial effects of restoring Mn-SOD activity. Nevertheless, the increased sensitivity of *Yfh1*-deficient cells toward menadione should not be considered a minor point because patients suffering Friedreich ataxia or other iron-overloading pathologies may be exposed to many environmental challenges during their lifetime that could compromise cellular function. In this context, any treatment restoring the activity of superoxide dismutases would improve the oxidative stress resilience of cells exposed to iron overload. Indeed, lowered SOD activity could explain the increased sensitivity of frataxin-deficient cells to oxidative stress. Of course, iron overload would trigger the formation of O_2^- or $\cdot OH$ radicals and sensitize frataxin-deficient cells to oxidative stress. It is worth mentioning that alterations in SOD activity and expression have been reported in other FRDA models. Hearts from conditional mouse models of FRDA display decreased total SOD activity [34] and abnormal expression of Mn-SOD [35]. More recently, fibroblasts from FRDA patients were shown to be unable to induce Mn-SOD expression after an oxidative stress challenge [36]. In both cases, however, the contribution of this decreased SOD activity on cellular dysfunction was discussed, because treatment with Mn-TBAP (a compound considered a SOD mimetic) did not exert any beneficial effect in either model. It should be considered, however, that recent reports indicate that this compound would have low O_2^- scavenging activity [37]. To our knowledge, other known SOD mimetics, like some EUK compounds that have proven effective in *sod*^{-/-} mice [38], have not been tested in any frataxin-deficient model. In conditional mouse models of FRDA [35], no positive effects on survival were observed by overexpression of human SOD1. However, negative results in such experiments are not conclusive, as SOD1 overexpression has also been reported to trigger negative effects in mice [39]. Thus, the relevance of decreased SOD activity in the pathophysiology of FRDA remains an open question. In this context, metal treatment could be an alternative approach to increasing SOD

activities. However, this approach would require further work in mammalian models of the disease to uncover the mechanisms responsible for SOD deficiency in such models.

Some interesting questions remain unanswered regarding *Yfh1* function and the consequences of its absence on metal homeostasis. It is clear that loss of *Yfh1* activates AFT1, but the precise mechanism linking both proteins is not completely understood. *Yfh1* has been frequently reported to be involved in iron-sulfur biogenesis and disruption of this process is known to activate AFT1 [40]. However, several studies have questioned whether *Yfh1* plays an essential role in iron-sulfur biogenesis [16,41–43], and other roles such as iron storage/detoxification [44], electron transfer to ubiquinone [45], or heme biosynthesis [46] have been proposed for frataxin or *Yfh1*. Any of these roles, in conjunction with a nonessential involvement in iron-sulfur biogenesis or not, could create an imbalance in mitochondrial iron homeostasis that would trigger AFT1 activation. Once AFT1 is activated, increased iron deposits and decreased copper availability could promote SOD deficiency and begin an unending cycle of increased superoxide levels, inactivation of iron-sulfur enzymes, stronger AFT1 activation, and enhanced SOD deficiency. Finally, the intriguing question of the origin of manganese deficiency deserves further investigation to determine whether it is a direct consequence of *Yfh1* deficiency or is secondary to AFT1 activation, iron accumulation, or any other consequence of *Yfh1* depletion.

Acknowledgments

This work was supported by Grants BFU2004-00593/BMC and CSD2007-00020 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and SGR 0677 from Generalitat de Catalunya (Spain). V.I. received a Ph.D. fellowship from the Generalitat de Catalunya. We thank Elaine M. Lilly for editorial assistance.

References

- [1] Fontecave, M.; Pierre, J. L. Iron: metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie* **75**: 767–773; 1993.
- [2] De Domenico, I.; McVey Ward, D.; Kaplan, J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:72–81; 2008.
- [3] Eaton, J. W.; Qian, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **32**:833–840; 2002.
- [4] Toyokuni, S. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci.* **100**:9–16; 2009.
- [5] Salazar, J.; Mena, N.; Hunot, S.; Prigent, A.; Alvarez-Fischer, D.; Arredondo, M.; Duyckaerts, C.; Sazdovitch, V.; Zhao, L.; Garrick, L. M.; Nuñez, M. T.; Garrick, M. D.; Raisman-Vozari, R.; Hirsch, E. C. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:18578–18583; 2008.
- [6] Campuzano, V.; Montermini, L.; Molto, M. D.; Pianese, L.; Cossee, M.; Cavalcanti, F.; Monros, E.; Rodius, F.; Duclos, F.; Monticelli, A.; Zara, F.; Canizares, J.; Koutnikova, H.; Bidichandani, S. I.; Gellera, C.; Brice, A.; Trouillas, P.; De Michele, G.; Filla, A.; De Frutos, R.; Palau, F.; Patel, P. I.; Di Donato, S.; Mandel, J. L.; Coccozza, S.; Koenig, M.; Pandolfo, M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**:1423–1427; 1996.
- [7] Boddaert, N.; Le Quan Sang, K. H.; Rotig, A.; Leroy-Willig, A.; Gallet, S.; Brunelle, F.; Sidi, D.; Thalabard, J. C.; Munnich, A.; Cabantchik, Z. I. Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood* **110**:401–408; 2007.
- [8] Rotig, A.; Sidi, D.; Munnich, A.; Rustin, P. Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. *Trends Mol. Med.* **8**:221–224; 2002.
- [9] Rotig, A.; de Lonlay, P.; Chretien, D.; Foury, F.; Koenig, M.; Sidi, D.; Munnich, A.; Rustin, P. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**:215–217; 1997.
- [10] Babcock, M.; de Silva, D.; Oaks, R.; Davis-Kaplan, S.; Jiralerspong, S.; Montermini, L.; Pandolfo, M.; Kaplan, J. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**:1709–1712; 1997.
- [11] Cavadini, P.; Gellera, C.; Patel, P. I.; Isaya, G. Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum. Mol. Genet.* **9**:2523–2530; 2000.
- [12] Pierre, J. L.; Fontecave, M. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biomaterials* **12**:195–199; 1999.
- [13] Kakhlon, O.; Cabantchik, Z. I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes, 1. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:1037–1046; 2002.
- [14] Petrat, F.; de Groot, H.; Sustmann, R.; Rauen, U. The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol. Chem.* **383**:489–502; 2002.
- [15] Irazusta, V.; Moreno-Cermeno, A.; Cabisco, E.; Ros, J.; Tamarit, J. Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **44**:1712–1723; 2008.
- [16] Irazusta, V.; Cabisco, E.; Reverter-Branchat, G.; Ros, J.; Tamarit, J. Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *J. Biol. Chem.* **281**:12227–12232; 2006.
- [17] Yang, M.; Cobine, P. A.; Molik, S.; Naranuntarat, A.; Lill, R.; Winge, D. R.; Culotta, V. C. The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. *EMBO J.* **25**:1775–1783; 2006.
- [18] Jouihan, H. A.; Cobine, P. A.; Cooksey, R. C.; Hoagland, E. A.; Boudina, S.; Abel, E. D.; Winge, D. R.; McClain, D. A. Iron-mediated inhibition of mitochondrial manganese uptake mediates mitochondrial dysfunction in a mouse model of hemochromatosis. *Mol. Med.* **14**:98–108; 2008.
- [19] Rodriguez-Manzanique, M. T.; Tamarit, J.; Belli, G.; Ros, J.; Herrero, E. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* **13**:1109–1121; 2002.
- [20] Fenton, A. W.; Blair, J. B. Kinetic and allosteric consequences of mutations in the subunit and domain interfaces and the allosteric site of yeast pyruvate kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**:28–39; 2002.
- [21] Maitra, P. K.; Lobo, Z. A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.* **246**:475–488; 1971.
- [22] Mueller, D. M. Arginine 328 of the beta-subunit of the mitochondrial ATPase in yeast is essential for protein stability. *J. Biol. Chem.* **263**:5634–5639; 1988.
- [23] Velours, J.; Vaillier, J.; Paumard, P.; Soubannier, V.; Lai-Zhang, J.; Mueller, D. M. Bovine coupling factor 6, with just 14.5% shared identity, replaces subunit h in the yeast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **276**:8602–8607; 2001.
- [24] Manchenko, G. P. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. CRC Press, Boca Raton, FL; 1994.
- [25] Tamarit, J.; Irazusta, V.; Moreno-Cermeno, A.; Ros, J. Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Anal. Biochem.* **351**:149–151; 2006.
- [26] Foury, F.; Talibi, D. Mitochondrial control of iron homeostasis: a genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J. Biol. Chem.* **276**: 7762–7768; 2001.
- [27] Philpott, C. C.; Protchenko, O. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **7**:20–27; 2007.
- [28] Wallace, M. A.; Liou, L. L.; Martins, J.; Clement, M. H.; Bailey, S.; Longo, V. D.; Valentine, J. S.; Gralla, E. B. Superoxide inhibits 4Fe–4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis: cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **279**:32055–32062; 2004.
- [29] Srinivasan, C.; Liba, A.; Imlay, J. A.; Valentine, J. S.; Gralla, E. B. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.* **275**:29187–29192; 2000.
- [30] Petrat, F.; de Groot, H.; Rauen, U. Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* **356**:61–69; 2001.
- [31] Gunter, T. E.; Gavin, C. E.; Aschner, M.; Gunter, K. K. Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* **27**:765–776; 2006.
- [32] Zadinski, R.; Fortuniak, A.; Bilinski, T.; Grey, M.; Bartosz, G. Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**:747–759; 1998.
- [33] Long 2nd, D. J.; Iskander, K.; Gaikwad, A.; Arin, M.; Roop, D. R.; Knox, R.; Barrios, R.; Jaiswal, A. K. Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity. *J. Biol. Chem.* **277**:46131–46139; 2002.
- [34] Chantrel-Groussard, K.; Geromel, V.; Puccio, H.; Koenig, M.; Munnich, A.; Rotig, A.; Rustin, P. Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **10**:2061–2067; 2001.
- [35] Seznec, H.; Simon, D.; Bouton, C.; Reutenauer, L.; Hertzog, A.; Golik, P.; Procaccio, V.; Patel, M.; Drapier, J. C.; Koenig, M.; Puccio, H. Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* **14**:463–474; 2005.
- [36] Paupé, V.; Dassa, E. P.; Goncalves, S.; Auchere, F.; Lonn, M.; Holmgren, A.; Rustin, P. Impaired nuclear Nrf2 translocation undermines the oxidative stress response in Friedreich ataxia. *PLoS One* **4**:e253; 2009.
- [37] Batinic-Haberle, I.; Cuzzocrea, S.; Reboucas, J. S.; Ferrer-Sueta, G.; Mazzon, E.; Di Paola, R.; Radi, R.; Spasojevic, I.; Benov, L.; Salvemini, D. Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-specific *Escherichia coli* model and carrageenan-induced pleurisy. *Free Radic. Biol. Med.* **46**:192–201; 2009.
- [38] Melov, S.; Doctrow, S. R.; Schneider, J. A.; Haberson, J.; Patel, M.; Coskun, P. E.; Huffman, K.; Wallace, D. C.; Malfroy, B. Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J. Neurosci.* **21**:8348–8353; 2001.
- [39] Peled-Kamar, M.; Lotem, J.; Wirguin, I.; Weiner, L.; Hermalin, A.; Groner, Y. Oxidative stress mediates impairment of muscle function in transgenic mice with elevated level of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3883–3887; 1997.
- [40] Hausmann, A.; Samans, B.; Lill, R.; Muhlenhoff, U. Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **283**: 8318–8330; 2008.
- [41] Ding, H.; Yang, J.; Coleman, L. C.; Yeung, S. Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *J. Biol. Chem.* **282**:7997–8004; 2007.
- [42] Campanella, A.; Rovelli, E.; Santambrogio, P.; Cozzi, A.; Taroni, F.; Levi, S. Mitochondrial ferritin limits oxidative damage regulating mitochondrial iron availability: hypothesis for a protective role in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **18**:1–11; 2008.
- [43] Adinolfi, S.; Iannuzzi, C.; Prisch, F.; Pastore, C.; Iametti, S.; Martin, S. R.; Bonomi, F.; Pastore, A. Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**:390–396; 2009.
- [44] Schagerlof, U.; Elmlund, H.; Gakh, O.; Nordlund, G.; Hebert, H.; Lindahl, M.; Isaya, G.; Al-Karadaghi, S. Structural basis of the iron storage function of frataxin from single-particle reconstruction of the iron-loaded oligomer. *Biochemistry* **47**: 4948–4954; 2008.
- [45] Gonzalez-Cabo, P.; Vazquez-Manrique, R. P.; Garcia-Gimeno, M. A.; Sanz, P.; Palau, F. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum. Mol. Genet.* **14**:2091–2098; 2005.
- [46] Benze, K. Z.; Yoon, T.; Millan-Pacheco, C.; Bradley, P. B.; Pastor, N.; Cowan, J. A.; Stemmler, T. L. Human frataxin: iron and ferrocyclase binding surface. *Chem. Commun. (Cambridge)* 1798–1800; 2007.

Proteomic Strategies for the Analysis of Carbonyl Groups on Proteins

Verónica Irazusta[§], Armando Moreno-Cermeño, Elisa Cabiscol, Jordi Tamarit and Joaquim Ros*

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, IRBLleida, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, 25008-Lleida, Spain

Abstract: Oxidative stress is caused by an imbalance between formation and destruction of reactive oxygen species. Analysis of the reaction products of reactive oxygen species in biomolecules is an indirect way of determining the existence of oxidative stress. In this context, the formation of carbonyl groups in proteins has been one of the most studied oxidative stress markers because of its stability and easy detection. Various proteomic tools offer great potential for the discovery of new proteins susceptible to oxidative stress, determination of quantitative changes in the profile of these modifications under different biological conditions, and characterization of the type of modification a particular protein has suffered. This paper reviews the different approaches used for the detection of protein carbonyls and the proteomic tools that can be used to identify them.

Keywords: Oxidative stress, protein oxidation, carbonyl groups, redox proteomics.

INTRODUCTION

Oxidative stress is described as a situation in which anti-oxidative defences are insufficient to completely inactivate reactive oxygen species (ROS) [1]. This imbalance between production and destruction of ROS can affect many cell components, including lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids [2-4]. Many of the changes that occur during aging and during the progression of certain diseases are a consequence of oxidative stress [5-7]. Proteins are one of the main targets for oxidative modification by ROS. This leads to structural changes, generally involving the partial or total loss of protein function [4, 8, 9]. In this context, protein oxidation plays an important role in the development of the aging process and in atherosclerosis, cancer, and various neurodegenerative diseases, including Alzheimer and Parkinson [10]. Many amino acid residues of proteins are susceptible to oxidation by various ROS. The protein oxidation products most widely studied in recent years are carbonyl groups because of their stability and easy detection. Therefore, their quantification has become the most accepted method for measuring protein oxidative damage in situations where oxidative stress is involved.

FORMATION OF CARBONYL GROUPS

Oxidative stress may cause reversible or irreversible changes in proteins. Reversible changes, usually in the cysteine residues, can be repaired by specific enzymes such as glutaredoxin or thioredoxin [11, 12]. Similarly, methionine is readily oxidized to methionine sulfoxide, which can be reduced by methionine sulfoxide reductase [13]. Such changes are meant to modulate protein function (redox regulation) or

protect against irreversible damage that causes the inactive proteins to accumulate or become degraded. Carbonylation is a good example of irreversible changes [14, 15].

Carbonyl groups can be introduced into proteins at different sites and through different mechanisms. Primarily, carbonyl groups are produced in the side chains of certain amino acids, especially from proline, arginine, lysine and threonine residues oxidized to aldehydes or ketones [2, 16]. Generally, the change results from hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) attack, which can be produced by ionizing radiation or by a Fenton reaction of metal cations with hydrogen peroxide. The majority of protein carbonyls formed by metal catalyzed oxidation are glutamic semialdehyde and amino adipic semialdehyde, derived from arginine and lysine, respectively Fig. (1A) [17]. Carbonyl groups can also be generated by protein proteolysis through the alpha-amidation pathway after $\bullet\text{OH}$ radical attack or after the oxidation of the side chains of glutamyl residues, resulting in the formation of a peptide in which the N-terminal amino acid is blocked by an alpha-ketoacyl derivative [16]. Other mechanisms that can lead to protein carbonylation include reactions with products generated during lipid peroxidation, such as 4-hydroxynonenal (4-HNE) Fig. (1B), 2-propenal (acrolein) and malondialdehyde [18]. This type of reaction, called "Michael Addition", involves the addition of reactive aldehyde groups to the side chains of cysteine, histidine or lysine residues. Finally, reactive carbonyl groups can be generated through the reaction of the amino group of lysine residues with reducing sugars or their oxidation products (glycation / glycoxidation) that results in compounds such as carboxymethyl lysine [2, 3].

MEASURES OF OXIDATIVE DAMAGE TO PROTEINS: CARBONYLS

ROS are generally very reactive and have a very short half life, which makes it difficult to measure them directly. An indirect way of determining the existence of oxidative stress is to measure the products of ROS reaction with biomolecules. As in the case of proteins, carbonyl groups are

*Address correspondence to this author at the Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, IRBLleida, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, 25008-Lleida, Spain; Tel: (34)9737022275; Fax: (34)973702426; E-mail: joaquim.ros@cmb.udl.cat

[§]Present address: PROIMI-CONICET. Av Belgrano y Pje Caseros (CP 4000), Tucumán, Argentina

among the products generated and their quantification has become widely accepted as a parameter for analyzing the presence of oxidative damage under stress conditions. The most commonly used method of quantifying carbonyl groups is based on its reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form 2,4-dinitrophenylhydrazone. In turn, this method is based on the ability of DNPH to bind covalently to the carbonyl groups, forming a Schiff base to allow formation of stable hydrazones Fig. (1C). Dinitrophenyl group (DNP) can be detected and quantified spectrophotometrically because it displays a characteristic absorption spectrum with a maximum absorbance at 365-375 nm [8, 19]. Given the excellent commercially available antibodies against dinitrophenyl group [20, 21], the detection of carbonyl groups can be performed by western blot, dot blot, immunohistochemistry or ELISA. Various methods have been developed for derivatization and sample preparation [10, 22-24].

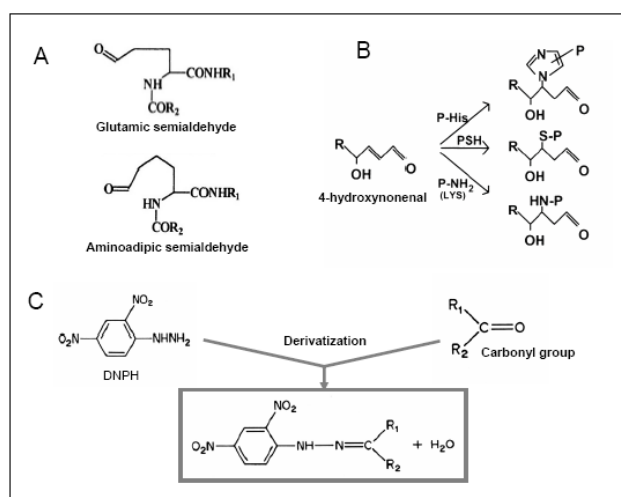


Fig. (1). Formation of carbonyl groups with DNPH derivatization. **A:** products generated by the attack of $\bullet\text{OH}$ radical on arginine (glutamic semialdehyde) and lysine side chains (amino adipic semialdehyde) [17], **B:** the reaction of 4-HNE with the side chains of cysteine, histidine and lysine residues involves the addition of reactive aldehyde groups to proteins [16], **C:** 2,4-dinitrophenylhydrazone formation after reaction of DNPH with carbonyl groups.

However, alternatives to DNPH methods are emerging because some authors question the stability of the 2,4-dinitrophenylhydrazone in alkaline conditions or during prolonged storage. The most commonly accepted alternative uses hydrazide chemistry. Hydrazides react specifically with protein carbonyls (primarily as aldehydes) by forming a Schiff base, which can be stabilized by reduction with cyanoborohydride [25-27]. The advantages of this approach are not only greater stability of the final reaction product but also the presence of a wide range of functional groups coupled to the hydrazide, allowing the design of strategies for the capture or detection of carbonylated proteins [28]. Among these functional groups are biotin, digoxigenin, and various fluorescent compounds. Thus the carbonyl groups can be derivatized with digoxigenin-hydrazide and identified using antibodies against digoxigenin [29]. A similar technique can be used with carbonyl groups derivatized with

biotin-hydrazide, using fluorescein-labeled avidin to identify the derivatized proteins [30]. Another compound used for fluorescent detection of carbonyl groups is the fluorescein-5-thiosemicarbazide. The reactivity of the thiosemicarbazide group with carbonyl groups is similar to that of hydrazides [31].

Finally, the total carbonyl content in biological samples can be measured by determination of specific products, such as glutamic semialdehyde and amino adipic semialdehyde, by gas chromatography and mass spectrometry with isotope dilution. This approach, developed by Requena and colleagues, has been used to characterize the nature of the different carbonyl products present in biological samples taken from Alzheimer patients [17, 32].

IDENTIFICATION OF OXIDIZED PROTEINS BY PROTEOMIC TOOLS

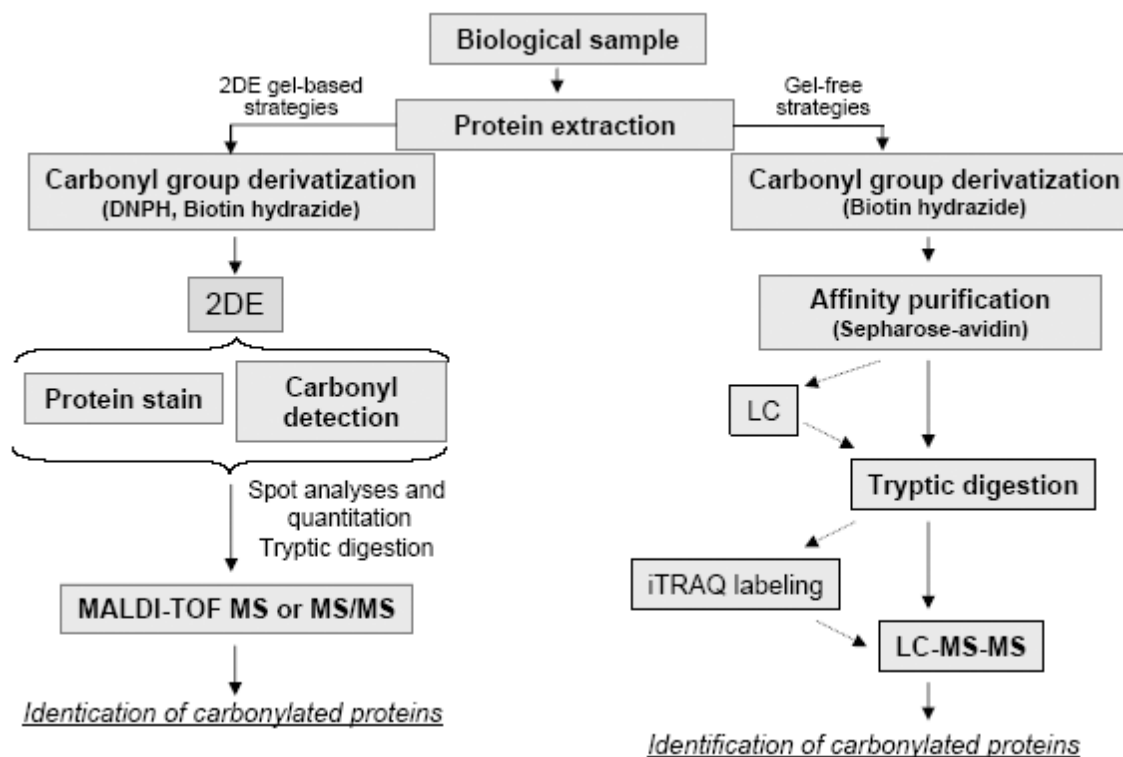
"Redox proteomics," defined as the set of proteomic approaches that allow identification of oxidatively modified proteins, offers great potential for discovering new proteins susceptible to oxidative stress, correlating quantitative variations in the profile of these changes with the state of a disease or aging, and characterizing the exact site and type of change by tandem mass spectrometry [3, 33]. This kind of approach can lead to the identification of groups of proteins selectively oxidized under certain conditions and thus help to elucidate the molecular mechanisms involved. To date, proteomic studies have shown that carbonylation is highly selective, because different groups of proteins particularly sensitive to oxidative stress have been identified in different models studied. Here we review some of the strategies used to identify carbonylated proteins, with a summary of the relevant studies in Table 1 and a schematic overview of the main strategies in Fig. (2).

Systems based on Two-Dimensional Electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis (2DE) has been widely used to identify carbonylated proteins in complex samples. The detection of this oxidative modification can be performed by western blot with antibodies that identify the modifying molecule attached to the protein (e.g., anti-4-HNE) [34], or with anti-DNP antibodies if the sample has been previously derivatized with DNP [35-37]. An example of this type of approach is shown in Fig. (3). In other cases, reactive carbonyls are covalently labeled with biotin-hydrazide and detected in the gel by avidin-fluorescein [30] or avidin-peroxidase [25]. The use of two-dimensional gels has proved very useful for the identification of oxidized proteins, especially when comparing two physiological conditions [38-40]. It has the advantage of showing the images obtained after detection of the functional group attached to the carbonyl group as well as those obtained after staining the gels with protein dyes (silver staining, SYPRO Ruby, Coomassie Brilliant blue, etc.). This allows the normalization of the carbonyl signal to the amount of protein. This is an important point because, as in any proteomic analysis, the study of carbonylated proteins is biased in favor of the most abundant proteins. Therefore, the relative level of carbonylation on a particular protein is more informative than the total carbonyl signal observed for that protein. Otherwise, abun-

Table 1: Studies Identifying Carbonylated Proteins

Reference	Organism	Model	Compound	Strategy	Identified Proteins
Systems Based on Two-Dimensional Electrophoresis					
[40]	Yeast	Frataxin Deficiency	DNPH	2DE Oxy-blot	14
[39, 50]	Human Brain	Huntington Disease	DNPH	2DE Oxy-blot	17
[38]	Yeast	Aging	DNPH	2DE Oxy-blot	16
[37]	Human Brain	Alzheimer Disease	DNPH	2DE Oxy-blot	4
[31]	Mouse	Aging	Fluorescein-5-Tiosemicarbazide	2DE/fluorescent detection	12
[30]	Yeast	H ₂ O ₂	Biotin hydrazide	2DE/avidin-fluorescein	20
[25]	Rat	Diabetes	Biotin hydrazide	2DE avidin blot	7
[56]	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Life Cycle	DNPH	2DE Oxy-blot	5
Gel-Free Approaches					
[28]	Yeast	H ₂ O ₂	Biotin hydrazide	Affinity/LC/proteolysis/MS-MS	99
[26]	Rat Mitochondria	Basal	Biotin hydrazide + iTRAQ	Affinity/proteolysis/iTRAQ/LC-MS-MS	200
[27]	Mouse Brain	Aging	Biotin hydrazide	Affinity/LC/proteolysis/LC-MS-MS	100
[43]	Tumor Cells	Photodynamic Treatment	Biotin hydrazide	Affinity/1DE/proteolysis/ LC-MS-MS	81
[47]	Yeast	H ₂ O ₂	Girard's Reagent	LC-MS/MALDI-MS-MS	36
[44]	Adipose Tissue	Obesity	Biotin hydrazide	Affinity/proteolysis/ LC-MS-MS	37

**Fig. (2).** Outline of various analytical strategies used for the identification and quantification of protein carbonyls.

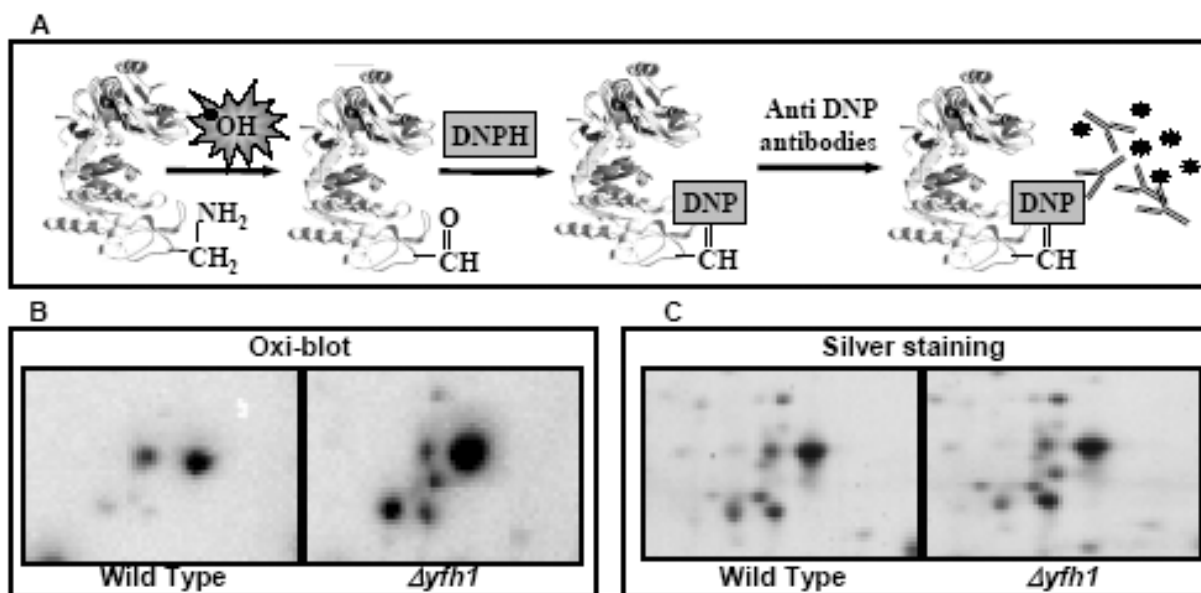


Fig. (3). Formation of carbonyl groups and detection by anti-DNP antibodies (Oxi-Blot). **A:** The attack of an $\bullet\text{OH}$ radical to an amino acid side chain generates a carbonyl group. The DNPH reacts specifically with the carbonyl group, forming a stable hydrazone that can be detected immunologically by anti-DNP antibodies. **B:** Detection of carbonylated proteins in cell extracts of two yeast strains by two-dimensional electrophoresis and Oxi-Blot. **C:** Silver staining of proteins in the same region of two-dimensional gels allows normalization of the carbonylation levels. It can be observed that different proteins have a higher degree of carbonylation in $\Delta yfh1$ strain (for details see ref.40).

dant proteins with low quantities of specific carbonyls may appear as predominant in oxi-blots, while proteins of low abundance but high levels of specific carbonylation may be discarded [10]. In addition, a change in the level of expression of a given protein between two conditions could be erroneously identified as a change in the degree of damage to this protein. It is noteworthy that several studies based on two-dimensional gels have identified low abundance proteins, such as mitochondrial chaperones [40-42], as highly sensitive to oxidative stress.

Despite the extensive information obtained by gel-based proteomic analysis, this type of approach has limitations in large-scale analysis and the identification of membrane or very low abundant proteins. On the other hand, a potential problem with two-dimensional gels is the validation of results. The comparison of images obtained by specific staining (anti-DNP, for example) and total proteins is not always easy, and the choice of criteria in each case is left to the researcher. In theory, dual fluorescent staining allows a better match between the different images obtained. Mass spectrometry analysis of the presence of modified peptides could confirm the damage to a particular protein. However, this strategy is not regularly used because approaches specifically designed for that purpose must be developed before the results would be conclusive. An indirect way of validating the results is to measure the enzymatic activities of proteins identified as oxidized. This approach has been used successfully in several studies [9, 38, 40], although the main limitation is that it can be applied only to enzymes for which an effective method exists to measure their activity.

Gel-Free Systems

Several authors have explored gel-free methods based on affinity enrichment of carbonylated proteins and subsequent

detection by mass spectrometry. In theory, these approaches would dispel some of the limitations of 2DE-based systems. However, the disadvantage of these approaches is that they do not allow quantitative analysis of the degree of carbonylation of the identified proteins, which limits their usefulness for studying changes in the pattern of protein oxidation under different biological conditions. The most common system for the enrichment of carbonylated proteins uses avidin affinity columns with carbonyls previously derivatized with biotin-hydrazide. The enriched proteins are digested and the peptides obtained are identified by LC-MS/MS [26-28, 43, 44]. Using this approach in a single experiment with brain homogenates of mice of different ages, Soreghan and colleagues identified 100 carbonylated proteins, including low abundance receptors and proteins involved in mitochondrial energy metabolism and stress response. Moreover, they were able to observe abundant cytoplasmic protein carbonyls previously identified by 2DE [27]. An extension of this technology using iTRAQTM distinguishes carbonylated proteins from those with affinity to avidin and has led to the identification of 200 carbonylated proteins in extracts of rat muscle mitochondria, showing high susceptibility of these proteins to oxidative stress [26]. Alternatively, proteins derivatized with biotin-hydrazide and purified by avidin affinity chromatography can be separated by liquid chromatography prior to digestion. Using this sort of "top-down" approach, Mirzaei and Regnier identified 99 carbonylated proteins in yeast treated with H_2O_2 [28].

Identification of Carbonylation Site

Recent attempts have been made to develop methodologies to identify the specific amino acids oxidatively modified. This information is important to an in-depth understanding of the functional effects that may result from a

change on a given amino acid in a protein. Most of the analytical strategies for the detection of modified amino acid are based on the observation of variation in the specific molecular mass of a covalently modified amino acid, which is easily measured by mass spectrometry. In some of the studies that used biotin-hydrazide to label protein carbonyls, identification of the biotinylated peptide confirmed the oxidative modification and it even provided information about its location [28, 43]. On the other hand, the reaction of 4-HNE with lysine histidine or cysteine residues can be monitored in intact proteins by detecting products with mass increases of 156 Da. The peptide bearing this specific mass difference can also be identified [3, 34, 45]. Another approach uses MALDI-TOF to identify 4-HNE modified peptides by the reaction of DNP with this lipid peroxidation product. These carbonylated peptides can be identified by the mass difference of 180 Da (corresponding to DNP) observed between derivatized and non derivatized samples. Given the low stability of the hydrazide under conditions typically used in MALDI-TOF analysis, this strategy requires the use of DNPH as a matrix for ionization [46]. Finally, Mirzaei and Regnier used two isotopic forms of Girard reagent (containing a hydrazide group) to characterize carbonylation sites in proteins using yeast extracts treated with H₂O₂ [47].

SELECTIVITY OF PROTEIN CARBONYLATION

A final aspect to consider is whether or not we can define groups of proteins that will be preferentially damaged under conditions of oxidative stress. After studying oxidative modifications using several cell models and different causes of oxidative stress, we realized that targeted proteins show some specificity. This was based on special characteristics of the protein: presence of metal ions, molecular chaperones or the high reactivity of thiol groups with lipid-peroxidation products.

Given that carbonyl groups can be generated by metal catalyzed oxidation, notably through the reaction of iron with H₂O₂, the presence of metal ions attached to the protein contributes to specificity. Thus, iron-binding proteins are prone to be oxidatively modified, as initially observed in iron-dependent alcohol dehydrogenases from *E. coli*, *Z. mobilis*, *S. typhimurium* and *S. marcescens* [9, 48]. More evidences about the general role of iron in promoting damage were obtained studying protein oxidative damage in mutants of *S. cerevisiae* lacking yeast frataxin homolog (*YFH1*), where accumulation of iron is paradigmatic. Among the consequences observed was the modification of proteins that bind to magnesium ions either directly or through nucleotides. These proteins were pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase, F₁F₀ ATP synthase, adenylate kinase and elongation factor EF1alpha [40]. The enzymatic activities of F₁F₀ ATP synthase and pyruvate kinase (in which magnesium ions are chelated by amino acid side chains) were more markedly affected than those of phosphoglycerate kinase or adenylate kinase in *Δyfh1* cells. These results concur with previous studies performed in *E. coli* cells challenged with hydrogen peroxide or superoxide-generating compounds resulting in carbonylation of elongation factor G (EF-G), or the beta subunit of F₁F₀ATP synthase [9]. When *S. cerevisiae* was used as a model, pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydro-

genases were identified as targets for oxidative modification [49].

Moreover, in human brain samples of patients affected with Huntington disease, the identified targets have common traits with those cited above: endoplasmic reticulum ATPase (VCP), pyridoxal kinase, pyruvate kinase isoenzymes M1 and M2, creatine kinase and ATP5A1 (alpha subunit of ATP synthase) [50]. What do all these identified targets have in common? The most important shared trait is that they bind to molecules such as magnesium or nucleotides (or thiamine pyrophosphate) which can facilitate iron binding at specific loci and, as a consequence, promote metal-catalyzed oxidation at specific sites. This suggests that enzymes containing magnesium binding sites in their active centers would be sensitive to iron-mediated oxidative stress. The notion that magnesium- and nucleotide-binding proteins could be specific targets of oxidative stress or iron overload has been previously suggested by several authors. This sensitivity has also been attributed to the ability of Fe(II) to replace magnesium ions bound to the phosphate groups of the nucleotides; their reaction with H₂O₂ or oxygen would then trigger the formation of reactive oxygen species [51]. Indeed, oxidation of ATP synthase *in vitro* has been shown to be mediated by iron binding to magnesium-binding sites. The presence of ATP promoted further oxidation and fragmentation of the protein [52]. On the other hand, metal-binding sites that cannot be occupied by iron are not prooxidant, as in the case of zinc-binding proteins [53].

Molecular chaperones are also prone to oxidative modification. In fact, identification of DnaK in *E. coli* or heat shock proteins such as Hsp60, Hsc71, Hsp78 in *S. cerevisiae* were detected after several stresses. These proteins also bind specific nucleotides that could promote iron binding and carbonylation. Nevertheless, oxidative modification of chaperones can be explained by their interaction with damaged proteins produced under oxidative stress. It has been suggested that oxidized proteins contain reactive species that can, in turn, damage other proteins [54].

Some specificity may be attributed to the high reactivity of thiol groups with lipid-peroxidation products such as malondialdehyde or 4-hydroxynonenal. This could also explain the carbonylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [55] and the modification of pyruvate and alpha ketoglutarate dehydrogenases [9, 49], as they both contain a dithiol group in their lipoic acid moiety.

It is clear that proteomic techniques are helping to deepen the detection, identification and understanding of mechanisms underlying oxidative modifications of proteins. In turn, this contributes to a better understanding of the significance of these changes at the cellular level and will undoubtedly lead to the next challenge: understanding their impact on cell physiology, that is, how the metabolome is affected as a result of the impaired function of certain proteins.

ABBREVIATIONS

LC	=	Liquid Chromatography
MS	=	Mass spectrometry
MS/MS	=	Tandem mass spectrometry
2DE	=	Two-dimensional gel electrophoresis

1DE = One-dimensional gel electrophoresis
 DNPH = 2,4-dinitrophenylhydrazine; 4-HNE, 4-hydroxynonenal

REFERENCES

- [1] Cadenas, E.; Wefers, H.; Muller, A.; Brigelius, R.; Sies, H. Active oxygen metabolites and their action in the hepatocyte. Studies on chemiluminescence responses and alkane production. *Agents Actions*, **1982**, *Suppl 11*, 203-216.
- [2] Stadtman, E.R.; Berlett, B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab. Rev.*, **1998**, *30*, 225-243.
- [3] Dalle-Donne, I.; Scaloni, A.; Giustarini, D.; Cavarra, E.; Tell, G.; Lungarella, G.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom. Rev.*, **2005**, *24*, 55-99.
- [4] Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell Mol. Med.*, **2006**, *10*, 389-406.
- [5] Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, **1956**, *11*, 298-300.
- [6] Balaban, R.S.; Nemoto, S.; Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **2005**, *120*, 483-495.
- [7] Giorgio, M.; Trinei, M.; Migliaccio, E.; Pelicci, P.G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*, 722-728.
- [8] Levine, R.L.; Williams, J.A.; Stadtman, E.R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **1994**, *233*, 346-357.
- [9] Tamarit, J.; Cabiscol, E.; Ros, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 3027-3032.
- [10] Levine, R.L.A.E.R.S. *Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology*. In: I., D.-D.; Butterfield, S.A.A.D.A., eds. Redox Proteomics: From protein modifications to cellular dysfunction and diseases. United States of America: Wiley-Interscience, **2006**, 123-168.
- [11] Lillig, C.H.; Berndt, C.; Holmgren, A. Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, *1780*, 1304-1317.
- [12] Oktyabrsky, O.N.; Smirnova, G.V. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Moscow)*, **2007**, *72*, 132-145.
- [13] Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, *18*, 93-105.
- [14] Stadtman, E.R.; Levine, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **2003**, *25*, 207-218.
- [15] Dean, R.T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, **1997**, *324*, 1-18.
- [16] Berlett, B.S.; Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 20313-20316.
- [17] Requena, J.R.; Chao, C.C.; Levine, R.L.; Stadtman, E.R. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 69-74.
- [18] Sayre, L.M.; Lin, D.; Yuan, Q.; Zhu, X.; Tang, X. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab. Rev.*, **2006**, *38*, 651-675.
- [19] Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **1990**, *186*, 464-478.
- [20] Shacter, E.; Williams, J.A.; Lim, M.; Levine, R.L. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic. Biol. Med.*, **1994**, *17*, 429-437.
- [21] Keller, R.J.; Halmes, N.C.; Hinson, J.A.; Pumford, N.R. Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem. Res. Toxicol.*, **1993**, *6*, 430-433.
- [22] Robinson, C.E.; Keshavarzian, A.; Pasco, D.S.; Frommel, T.O.; Winship, D.H.; Holmes, E.W. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal. Biochem.*, **1999**, *266*, 48-57.
- [23] Davies, S.M.; Poljak, A.; Duncan, M.W.; Smythe, G.A.; Murphy, M.P. Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, *31*, 181-190.
- [24] Buss, H.; Chan, T.P.; Sluis, K.B.; Domigan, N.M.; Winterbourn, C.C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**, *23*, 361-366.
- [25] Oh-Ishi, M.; Ueno, T.; Maeda, T. Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, *34*, 11-22.
- [26] Meany, D.L.; Xie, H.; Thompson, L.V.; Arriaga, E.A.; Griffin, T.J. Identification of carbonylated proteins from enriched rat skeletal muscle mitochondria using affinity chromatography-stable isotope labeling and tandem mass spectrometry. *Proteomics*, **2007**, *7*, 1150-1163.
- [27] Soreghan, B.A.; Yang, F.; Thomas, S.N.; Hsu, J.; Yang, A.J. High-throughput proteomic-based identification of oxidatively induced protein carbonylation in mouse brain. *Pharm. Res.*, **2003**, *20*, 1713-1720.
- [28] Mirzaei, H.; Regnier, F. Identification of yeast oxidized proteins: chromatographic top-down approach for identification of carbonylated, fragmented and cross-linked proteins in yeast. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1141*, 22-31.
- [29] Bautista, J.; Mateos-Nevado, M.D. Immunological detection and quantification of oxidized proteins by labelling with digoxigenin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, *62*, 419-423.
- [30] Yoo, B.S.; Regnier, F.E. Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. *Electrophoresis*, **2004**, *25*, 1334-1341.
- [31] Chaudhuri, A.R.; de Waal, E.M.; Pierce, A.; Van Remmen, H.; Ward, W.F.; Richardson, A. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. *Mech. Ageing Dev.*, **2006**, *127*, 849-861.
- [32] Pamplona, R.; Dalfo, E.; Ayala, V.; Bellmunt, M.J.; Prat, J.; Ferrer, I.; Portero-Otin, M. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycoxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 21522-21530.
- [33] Butterfield, D.A.; Sultana, R. Redox proteomics: understanding oxidative stress in the progression of age-related neurodegenerative disorders. *Expert Rev. Proteomics*, **2008**, *5*, 157-160.
- [34] Bennaars-Eiden, A.; Higgins, L.; Hertz, A.V.; Kapphahn, R.J.; Ferrington, D.A.; Bernlohr, D.A. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal *in vitro* and *in vivo*. Evidence for a role in antioxidant biology. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 50693-50702.
- [35] Costa, V.M.; Amorim, M.A.; Quintanilha, A.; Moradas-Ferreira, P. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**, *33*, 1507-1515.
- [36] Korolainen, M.A.; Goldsteins, G.; Alafuzoff, I.; Koistinaho, J.; Pirttila, T. Proteomic analysis of protein oxidation in Alzheimer's disease brain. *Electrophoresis*, **2002**, *23*, 3428-3433.
- [37] Castegna, A.; Aksenov, M.; Thongboonkerd, V.; Klein, J.B.; Pierce, W.M.; Booz, R.; Markesbery, W.R.; Butterfield, D.A. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J. Neurochem.*, **2002**, *82*, 1524-1532.
- [38] Reverter-Branchat, G.; Cabiscol, E.; Tamarit, J.; Ros, J. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 31983-31989.
- [39] Sorolla, M.A.; Reverter-Branchat, G.; Tamarit, J.; Ferrer, I.; Ros, J.; Cabiscol, E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, *45*, 667-678.
- [40] Irazusta, V.; Moreno-Cermeno, A.; Cabiscol, E.; Ros, J.; Tamarit, J. Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, *44*, 1712-1723.
- [41] Magi, B.; Ettore, A.; Liberatori, S.; Bini, L.; Andreassi, M.; Frosali, S.; Neri, P.; Pallini, V.; Di Stefano, A. Selectivity of pro-

- tein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ.*, **2004**, *11*, 842-852.
- [42] Cabisco, E.; Belli, G.; Tamarit, J.; Echave, P.; Herrero, E.; Ros, J. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 44531-44538.
- [43] Tsaytler, P.A.; M, C.O.F.; Sakharov, D.V.; Krijgsveld, J.; Egmond, M.R. Immediate protein targets of photodynamic treatment in carcinoma cells. *J. Proteome Res.*, **2008**, *7*, 3868-3878.
- [44] Grimsrud, P.A.; Picklo, M.J., Sr.; Griffin, T.J.; Bernlohr, D.A. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol. Cell Proteomics*, **2007**, *6*, 624-637.
- [45] Grimsrud, P.A.; Xie, H.; Griffin, T.J.; Bernlohr, D.A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 21837-21841.
- [46] Fenaille, F.; Tabet, J.C.; Guy, P.A. Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified peptides within unfractionated digests using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 867-873.
- [47] Mirzaei, H.; Regnier, F. Enrichment of carbonylated peptides using Girard P reagent and strong cation exchange chromatography. *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 770-778.
- [48] Echave, P.; Tamarit, J.; Cabisco, E.; Ros, J. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 30193-30198.
- [49] Cabisco, E.; Piulats, E.; Echave, P.; Herrero, E.; Ros, J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 27393-27398.
- [50] Sorolla, M.A.; Rodríguez-Colman, M.J.; Tamarit, J.; Ortega, Z.; Lucas, J.J.; Ferrer, I.; Ros, J.; Cabisco, E. Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism. *Free Radic. Biol. Med.*, **2010**, Available online 26 May.
- [51] Hermes-Lima, M.; Castilho, R.F.; Meinicke, A.R.; Vercesi, A.E. Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biochem.*, **1995**, *145*, 53-60.
- [52] Belogradov, G.I. Mitochondrial ATP synthase: Fe²⁺-catalyzed fragmentation of the soluble F1-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1996**, *335*, 131-138.
- [53] Tamarit, J.; Cabisco, E.; Aguilar, J.; Ros, J. Differential inactivation of alcohol dehydrogenase isoenzymes in *Zymomonas mobilis* by oxygen. *J. Bacteriol.*, **1997**, *179*, 1102-1104.
- [54] Dean, R.T.; Giese, S.; Davies, M.J. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **1993**, *18*, 437-441.
- [55] Uchida, K.; Stadtman, E.R. Quantitation of 4-hydroxynonenal protein adducts. *Methods Mol. Biol.*, **2000**, *99*, 25-34.
- [56] Johansson, E.; Olsson, O.; Nystrom, T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 22204-22208.