





**Universitat de Lleida**

MODIFICACIONES DEL PROTEOMA EN MODELOS CELULARES DE  
ATAXIA DE FRIEDREICH Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS  
OXIDATIVO Y LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO

VERÓNICA P. IRAZUSTA

LLEIDA, JULIO 2009





**Universitat de Lleida**

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSITAT DE LLEIDA

MODIFICACIONES DEL PROTEOMA EN MODELOS CELULARES DE  
ATAXIA DE FRIEDREICH Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS  
OXIDATIVO Y LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

POR LA UNIVERSIDAD DE LLEIDA

PRESENTADA POR

VERÓNICA P. IRAZUSTA





LA INTERESADA

Verónica P. Irazusta

VISTO BUENO DE LOS DIRECTORES

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

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



## AGRADECIMIENTOS

...y llegó el día!! Desde hace seis meses que pienso en los agradecimientos de mi tesis y curiosamente me está costando mucho escribirlos. Será porque sé que se termina, no sólo está tesis sino esta etapa de mi vida. Sé que muchos se emocionaran al leer esto, quiero que sepan que yo no puedo contener mis lágrimas. Y no estoy triste, porque todo lo que me llevo de aquí son cosas buenas, no únicamente en el sentido profesional y científico sino también, en el humano. Pero toda etapa llega a su fin y la culminación de ésta tesis es también el comienzo de una nueva vida.

Para empezar quiero agradecer a mis codirectores, Kim y Jordi. A Kim, por recibirme en el laboratorio aún sin conocerme, por su excelente predisposición para escuchar y solucionar todo tipo de problemas, por su optimismo y su entusiasmo por la ciencia, porque su manera de trabajar es un ejemplo a seguir para mí. A Jordi, por enseñarme todo sobre el estrés oxidativo, hierro, etc, etc, de historia, música (por algo es jordipedia!); por su paciencia y predisposición, por no cansarse nunca de responder todas mis dudas. A Elisa, por su calidad tanto humana como científica y por contestar mi primer e-mail!

Durante estos años "el laboratorio" no ha sido sólo mi lugar de trabajo sino también mi segundo hogar, tanto por la cantidad de horas de trabajo como por la calidad del tiempo compartido. Por eso quiero agradecer a todos y todas los que forman parte de él. A Armando "Armandito", mi compañero de escritorio y de poyata, por todas las cosas compartidas dentro y fuera del laboratorio, por ser mi amigo. A María Alba o mejor dicho "Maríaalbee", por su risa contagiosa, su optimismo y sus seminarios magistrales. A Myriam, "dubrianchu", por todo lo que me enseñó en cultivos y por ser la organizadora oficial de fiestas. A Stef, "mamushka", por ser tan sincera y por sus constipos. A Ana, por su ayuda con los virus y su disposición. A María José, por sus ricos mates, por las charlas sobre ciencia y sobre la vida, por escucharme, por todo. A Èlia o Elia, mi hijita mayor, por su paciencia y sensibilidad y perdón por el legado. A Vanessa, por sus ricos medios y su ayuda. A Gemma y a todos/as los que formaron parte del laboratorio, Suss, Inge, Anouk, etc. A Rosa por introducirme en el mundo de los cultivos celulares y a Isu por sus panes quemados.

Quiero agradecer al resto de becarios e investigadores de los departamentos (Ciències Mèdiques Bàsiques y Medicina Experimental), por la buena disposición y la ayuda que me ofrecieron cada vez que tuve una duda o un problema. Especialmente al grupo BML por el intercambio de información, reactivos, protocolos etc. A los "Portero" y a los "de la tercera".



También quiero agradecer a todos con los compartí comidas, salidas, risas y más en mi paso por Lleida, a Ariel, Ale, Vir, Gaby, Myrem, Mariano, Juan, Bupesh, Hiren, etc.

Especialmente quiero agradecer a toda mi gente de Salta, que me apoyó en estos años y me dieron siempre palabras de ánimo. A mi mamá y a mi papá, por formarme y darme la libertad de elegir, por confiar en mi, por todo su amor. A mis hermanos, Gonzalo, Javier, Facu y Nico, por cuidar un poco más de mis papis durante mi ausencia, por estar conmigo siempre aún en la distancia. A mis abuelos. A mis primas, Ana, María Inés y Marías Silvia, que son para mí mis hermanas. A mis tíos y tías, a mis suegros y cuñados, al resto de mi gran familia.

A mis amigos, Andrea, Sonia, Monky, Marcos, Natu, Leo, Anita, Caro, por tratar de entender lo que hago. Porque a pesar del tiempo y la distancia la amistad se mantuvo.

Por último, a mis dos amores, a Martín por ser mi amor, mi compañero, mi amigo, mi todo siempre, gracias por tu paciencia por tu amor y por haberte embarcado conmigo en esta aventura. A mi Ari, la luz de mis ojos, mi vida entera, por ser la bebé más sana, más linda y feliz que nunca habría imaginado, por hacerme esta etapa de mi vida aún más plena.

A las millones de *Saccharomyces cerevisiae* y a las células SY y 293, que sacrifique para obtener estos resultados tan chulis.

Moltes gràcies a tots, por haber hecho de este tiempo algo inolvidable, los quiero.



A toda mi familia





A mis dos Amores:

Martín y Ari



“No existe cantidad de experimentación  
que pueda demostrar que tengo razón,  
pero basta un solo experimento  
para demostrar que estoy equivocado”

Albert Einstein 1879-1955



## RESUM

El ferro juga un paper essencial en el metabolisme a causa de la seva gran versatilitat com a catalitzador biològic. La seva acumulació, però ha estat associada amb diverses condicions patològiques com per exemple l'Ataxia de Friedreich. Aquesta malaltia humana està causada per la disminució de l'expressió d'una proteïna mitocondrial anomenada frataxina. Un gran nombre d'estudis utilitzant diferents models, relacionen frataxina amb el metabolisme de ferro, ja que la seva deficiència provoca la sobrecàrrega d'aquest metall. La funció precisa de la proteïna és motiu de controvèrsia. La majoria d'investigadors la consideren necessària per a la biosíntesi dels centres Fe-S ja que en la seva absència les activitats d'enzims amb aquest tipus de centres es troben disminuïdes. Molts dels estudis realitzats a fi de conèixer la funció de frataxina han estat duts a terme en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, ja que frataxina i el seu homòleg en llevat, YFH1, són ortòlegs.

Com a punt de partida d'aquesta tesi, ens plantejarem l'estudi del proteoma del mutant  $\Delta yfh1$  en llevat com a model de l'Ataxia de Friedreich. L'estratègia utilitzada es va basar en l'ús d'electroforesi bidimensional i posterior identificació de proteïnes diferencialment expressades en mutants  $\Delta yfh1$  mitjançant empremta de masses peptídiques. Aquest anàlisi proteòmic, ens va revelar que les esmentades cèl·lules presenten un increment en la quantitat de proteïnes involucrades en la resposta a estrès oxidatiu. Entre els enzims induïts trobem a les superòxid dismutases 1 i 2, que, tanmateix, van mostrar menor activitat que la trobada a les cèl·lules control. En el cas de la superòxid dismutasa dependent de manganès (Mn-SOD), aquest fet paradoxal era degut a una deficiència en aquest metall, ja que al suplementar el medi de cultiu amb manganès, van ser restaurats tant el seu contingut cel·lular com l'activitat Mn-SOD. Les activitats enzimàtiques de quatre proteïnes que contenen centres Fe-S van ser analitzades, abans i després de la suplementació del medi de cultiu amb manganès. Les activitats de tres d'elles van ser restaurades, el que indica que frataxina no és essencial per a la biosíntesi de centres Fe-S. La quarta proteïna analitzada, aconitasa, no recuperava la seva activitat.

El segon objectiu va ser realitzar l'anàlisi del dany oxidatiu a proteïnes -també referit com a oxiproteoma- de les cèl·lules deficientes en YFH1. La toxicitat del ferro està relacionada amb la seva capacitat per generar espècies reactives de l'oxigen (ROS), les quals tenen el potencial de danyar els components cel·lulars. Mitjançant immunodetecció de grups carbonil identificarem 14 proteïnes selectivament oxidades, la majoria de les quals presentaven unió a magnesi, ja sigui directament unit per elles, o per mitjà de nucleòtids units a les esmentades proteïnes. Estudis *in vitro* van mostrar que l'oxidació d'aquestes proteïnes pot ser previnguda per magnesi i incrementada per ATP. A més, el ferro quelable va mostrar ser set vegades superior a les cèl·lules de la soca  $\Delta yfh1$  i la seva disminució mitjançant un agent quelant, va aconseguir prevenir la inactivació dels enzims magnesi- dependents. Una de les proteïnes oxidades era la superòxid dismutasa 1 dependent de CuZn (CuZn-SOD), la qual mostrava nivells elevats de

proteïna però es trobava parcialment inactivada. La relació entre la baixa activitat SOD, l'elevat contingut en ferro quelable i l'oxidació de proteïnes va ser estudiat amb més detall. Mitjançant l'addició de coure i manganès al medi de cultiu, es va aconseguir prevenir el dany oxidatiu específic a les proteïnes així com la seva inactivació. Així mateix, el mutant deficient en SOD1 va presentar elevats nivells de ferro quelable i inactivació d'enzims d'unió a magnesi. Aquests fets en el seu conjunt indiquen que la falta d'activitat SOD seria la responsable que els alts nivells de ferro puguin produir dany oxidatiu a les proteïnes en les cèl·lules *Δyfh1*.

Finalment, hem desenvolupat un model cel·lular humà d'Ataxia de Friedreich utilitzant la línia SH-SY5Y diferenciada a fenotip neuronal. Després de la depleció de frataxina en l'esmentat model mitjançant RNA d'interferència, trobem la inducció d'ambdues superòxid dismutases i la disminució en l'activitat CuZn-SOD. Aquestes dades reforcen la hipòtesi de que les alteracions en l'activitat de les superòxid dismutases poden jugar un paper rellevant en el desenvolupament de l'Ataxia de Friedreich

## RESUMEN

El hierro juega un papel esencial en el metabolismo debido a su gran versatilidad como catalizador biológico, sin embargo, su acumulación ha sido asociada con diversas condiciones patológicas como por ejemplo la Ataxia de Friedreich. Esta enfermedad humana está causada por la disminución de la expresión de una proteína mitocondrial denominada frataxina. Un gran número de estudios utilizando diferentes modelos, relacionan a frataxina con el metabolismo de hierro ya que su deficiencia provoca la sobrecarga de este metal. La función precisa de la proteína es motivo de controversia. La mayoría de investigadores la consideran necesaria para la biosíntesis de los centros Fe-S ya que en su ausencia las actividades de enzimas con centros Fe-S se encuentran disminuidas. Muchos de los estudios realizados con el fin de conocer la función de frataxina han sido llevados a cabo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que frataxina y su homólogo en levadura *YFH1* son ortólogos.

Como punto de partida de esta tesis, nos planteamos el estudio del proteoma del mutante  $\Delta yfh1$  en levadura como modelo de la Ataxia de Friedreich. La estrategia utilizada se basó en el uso de electroforesis bidimensional y posterior identificación de proteínas diferencialmente expresadas en mutantes  $\Delta yfh1$  mediante huella de masas peptídicas. Este análisis proteómico, nos reveló que dichas células presentan un incremento en la cantidad de proteínas involucradas en la respuesta a estrés oxidativo. Entre las enzimas inducidas encontramos a las superóxido dismutasas 1 y 2, las cuales, sin embargo, mostraron menor actividad que la encontrada en las células control. Para el caso de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD), este hecho paradójico era debido a una deficiencia en este metal, ya que al suplementar el medio de cultivo con manganeso, fueron restaurados tanto su contenido celular como la actividad Mn-SOD. Las actividades enzimáticas de cuatro proteínas que contienen centros Fe-S fueron analizadas, antes y después de la suplementación del medio de cultivo con manganeso. Las actividades de tres de ellas fueron restauradas, lo que indica que frataxina no es esencial para la biosíntesis de centros FeS. La cuarta proteína analizada, aconitasa, no recuperaba su actividad.

El segundo objetivo fue realizar el análisis del daño oxidativo a proteínas -también referido como oxiproteoma- de las células deficientes en *YFH1*. La toxicidad del hierro está relacionada con su capacidad para generar especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales tienen el potencial para dañar los componentes celulares. Mediante inmunodetección de grupos carbonilo identificamos 14 proteínas selectivamente oxidadas, la mayoría de las cuales presentaban unión a magnesio, ya sea directamente unido por ellas, o por medio de nucleótidos unidos a dichas proteínas. Estudios *in vitro* mostraron que la oxidación de estas proteínas puede ser prevenida por magnesio e incrementada por ATP. Además, el hierro quelable mostró ser siete veces mayor en las células de la cepa  $\Delta yfh1$  y su disminución mediante un agente quelante, logró prevenir la inactivación de las enzimas magnesio- dependientes. Una de las proteínas oxidadas



fue la superóxido dismutasa 1 dependiente de CuZn (CuZn-SOD), la cual mostraba niveles elevados de proteína pero se encontraba parcialmente inactivada. La relación entre la baja actividad SOD, el elevado contenido en hierro quelable y la oxidación de proteínas fue estudiado con más detalle. Mediante la adición de cobre y manganeso al medio de cultivo, se logró prevenir el daño oxidativo específico a las proteínas así como su inactivación. Asimismo, el mutante deficiente en *SOD1* presentó elevados niveles de hierro quelable e inactivación de enzimas de unión a magnesio. Estos hechos en su conjunto indican que la falta de actividad SOD sería la responsable de que los altos niveles de hierro puedan producir el daño oxidativo a las proteínas en las células *Δyfh1*.

Por último, desarrollamos un modelo celular humano de ataxia de Friedreich utilizando la línea SH-SY5Y diferenciada a fenotipo neuronal. Tras la depleción de frataxina en dicho modelo mediante RNA de interferencia, encontramos la inducción de ambas superóxido dismutasas y la disminución en la actividad CuZn-SOD. Estos datos refuerzan la hipótesis de que las alteraciones en la actividad de las superóxido dismutasas pueden jugar un papel relevante en el desarrollo de la ataxia de Friedreich.

## ABSTRACT

Iron plays an essential role in cellular metabolism due to its great versatility as a biologic catalyst. However, high tissue iron concentrations have been associated with several pathological conditions such as Friedreich Ataxia (FRDA). FRDA is caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin. Many studies link frataxin to iron metabolism because its deficiency generates iron overload in different models. However, the precise function of this protein remains a matter of debate. Most researchers consider that Frataxin plays a role in iron-sulfur cluster biosynthesis because decreased activities of iron-sulfur containing proteins have been reported. Many studies in frataxin function arise from experiments performed with *Saccharomyces cerevisiae*, as frataxin and the yeast homologue Yfh1 are orthologues.

In this work we analyzed the proteome of the yeast model of Friedreich Ataxia. The strategy used was based on the use of two-dimensional electrophoresis and subsequent identification of proteins differentially expressed in  $\Delta yfh1$  cells by peptide mass fingerprinting. We found that these cells show an increased amount of proteins involved in the oxidative stress response, among them, Superoxide dismutase 1 and 2. However, these two enzymes showed decreased activity in  $\Delta yfh1$  cells. In the case of superoxide dismutase manganese-dependent (Mn-SOD), this paradox was due to a deficiency in the cellular amount of manganese, because in cells grown in manganese-supplemented media, both Mn-SOD activity was restored. The activities of four Fe-S enzymes were analyzed for the effects of manganese supplementation. Enzyme activities were recovered by manganese treatment, except for aconitase, suggesting that frataxin is not essential for Fe-S clusters biosynthesis.

We also analyzed oxidative damage to proteins in cells deficient in *YFH1*. Iron toxicity is related to its ability to trigger the generation of reactive oxygen species (ROS). These species are highly reactive and have the potential to damage cellular components. By carbonyl group immunodetection we identified 14 proteins selectively oxidized, most of which showed binding sites to magnesium or nucleotides. In vitro studies showed that oxidation of these proteins can be prevented with magnesium, and increased by ATP. In addition, chelatable iron was found seven times increased in  $\Delta yfh1$  cells. The use of a chelating agent, was able to prevent inactivation of magnesium dependent enzymes. Superoxide dismutase 1 (CuZn-SOD) was one of the oxidized proteins. This protein was partially inactive. The relationship between low SOD activity, the high chelatable iron content and protein oxidation was studied in more detail. The addition of copper and manganese to the culture medium prevented both oxidative damage and inactivation of specific proteins. The mutant deficient in *SOD1* showed high levels of chelatable iron and inactivation of magnesium-binding enzymes. These facts indicate that the absence of CuZn-SOD activity is the responsible for the high levels of chelatable iron that can cause oxidative damage to proteins in  $\Delta yfh1$  cells.

Finally, we developed a human cell model of Friedreich ataxia using the SH-SY5Y cell line differentiated to neuronal phenotype. Upon frataxin depletion in this model using interference RNA, we found induction of both superoxide dismutases and decreased CuZn-SOD activity. These data indicate that alterations in the activity of superoxide dismutases may play an important role in the development of Friedreich Ataxia.

## ABREVIATURAS

2D	Electroforesis bidimensional
4-HNE	4-hidroxinonenal
ADH	alcohol deshidrogenasa
ADP	adenosina-5'-difosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
Amp	ampicilina
BPS	batofenantrolina disulfonato
BSA	albúmina sérica bovina
CHAPS	3-[(3 colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DFO	desferrioxamina
DHE	dihidroetidio
DNP	2,4-dinitrofenilo
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
dNTP	deoxinucleótido
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiaminotetracetato
FRDA	Ataxia de Friedreich
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
•HO	radical hidroxilo
kDa	kilodalton
LB	medio Luria-Bertani
MA	miliamperio
MALDI	ionización mediante desorción por láser asistida por matriz
MCO	oxidación catalizada por metales
MDA	Malondialdehído
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
MTT	bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAD(H)	nicotinoamina adenina dinucleótido (fórmula reducida)
NADP(H)	nicotinoamina adenina dinucleótido fosfato (fórmula reducida)
NOS	especies derivadas del nitrógeno

OD	densidad óptica
$O_2^{\bullet -}$	radical superóxido
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pI	punto isoeléctrico
PMS	metosulfato de fenazina
PVDF	difluoruro de polivenilida
RHB	tampón de rehidratación
RNAi	RNA de interferencia
ROS	especies reactivas del oxígeno
SC	medio sintético
SCR	<i>scrambled</i>
SDS	dodecil sulfato sódico
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
SOD	superóxido dismutasa
TOF	tiempo de vuelo
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
wt	<i>Wild Type</i> (tipo salvaje)
YPD	<i>yeast peptone dextrose</i>
YPG	<i>yeast peptone glycerol</i>

## ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1 LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).....	3
1.1 Origen de las ROS.....	6
1.2 Efectos de las ROS sobre las biomoléculas.....	8
1.3 Modos de medir daño oxidativo en proteínas: Carbonilos.....	9
1.3.1 Formación de los grupos carbonilo en las proteínas	9
1.3.2 Cuantificación de los grupos carbonilo	12
1.3.2.1 Identificación de proteínas oxidadas mediante herramientas proteómicas	12
1.4 Mecanismos detoxificantes de ROS.....	14
1.4.1 Sistemas no enzimáticos	14
1.4.1.1 Glutación (GSH)	14
1.4.1.2 Ácido ascórbico	15
1.4.1.3 $\alpha$ -Tocoferol	16
1.4.1.4 Coenzima Q (ubiquinol-10)	16
1.4.2 Sistemas enzimáticos	17
1.4.2.1 Superóxido Dismutasas	17
1.4.2.2 Catalasa	21
1.4.2.3 Peroxiredoxinas	22
1.4.2.4 Tio-redoxinas y Tio-redoxina Reductasa	23
1.4.2.5 Glutaredoxinas	25
1.4.2.6 Glutación peroxidasa	26
1.4.2.7 Sulfiredoxinas	27
1.4.2.8 Metionina sulfóxido reductasa	27
2. METABOLISMO DEL HIERRO.....	28
2.1 Transporte de hierro.....	28
2.1.1 Ferrireductasas	28
2.1.2 Transporte de hierro en <i>S. cerevisiae</i>	29
2.1.2.1 Transporte de baja afinidad	29
2.1.2.2 Transporte de alta afinidad	29
2.1.1.3 Sideróforos	30
2.1.3 Transporte de hierro en eucariotas superiores	31



2.2	Almacenamiento del hierro	35
2.3	Biosíntesis y regulación de los centros Fe-S	36
2.4	Homeostasis del hierro	39
2.5	Desregulación de la homeostasis de hierro y sus consecuencias	41
3.	LA ATAXIA DE FRIEDREICH.....	43
3.1.	El gen FXN y la frataxina.....	43
3.2	Posibles funciones de frataxina.....	45
3.2.1	Frataxina como almacenadora o detoxificadora de hierro	47
3.2.2	Frataxina como chaperona de hierro en la formación de los centros Fe-S	48
3.3	Modelos de estudio de la ataxia de Friedreich.....	49
3.3.1	Levaduras	49
3.3.2	Líneas celulares	49
3.3.3	Organismos multicelulares	50
3.3.3.1	Modelos murinos de FRDA	50
3.4	Posibles estrategias terapéuticas para la FRDA	52
<b>II.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>55</b>
1.	MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	57
1.1	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	57
1.2	Medidas de tiempos de generación.....	59
2.	TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	59
2.1	Extracción de DNA genómico.....	59
2.2	Amplificación por PCR.....	60
2.3	Purificación de los productos de PCR.....	60
2.4	Electroforesis de DNA.....	61
2.5	Obtención de DNA plasmídico.....	62
2.6	Transformación celular.....	62
2.6.1	Transformación en <i>E. coli</i>	62
2.6.2	Transformación en <i>S. cerevisiae</i>	63
2.7	Cruzamiento de cepas por esporulación.....	64
3	MÉTODOS DE ESTUDIO DE PROTEÍNAS.....	66
3.1	Obtención de extractos celulares totales.....	66
3.2	Obtención de extractos enriquecidos en su fracción mitocondrial.....	67

3.3	Determinación de la concentración de proteína.....	68
3.4	Sistemas electroforéticos.....	69
3.4.1	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	69
3.4.2	Electroforesis en condiciones no desnaturizantes	70
3.4.3	Electroforesis Bidimensional (2D)	70
3.4.3.1	Tinción y análisis	72
3.5	Inmunodetección de proteínas.....	73
3.5.1	Determinación de grupos carbonilo	75
3.6	Identificación de proteínas por huella peptídica.....	76
4	ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	77
4.1	Métodos espectrofotométricos.....	77
4.1.1	Aconitasa (ACO)	77
4.1.2	Succinato Deshidrogenasa (SDH)	78
4.1.3	Glutamato sintasa (GOGAT)	79
4.1.4	Isopropil Malato Deshidratasa (IMDH)	80
4.1.5	Piruvato Quinasa (PK)	81
4.1.6	Fosfoglicerato Quinasa (PGK)	82
4.1.7	Adenilato Quinasa (ADK)	83
4.1.8	Malato Deshidrogenasa (MDH)	84
4.1.9	Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa (G3PDH)	84
4.1.10	Alcohol Deshidrogenasa (ADH)	85
4.1.11	F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP Sintasa	86
4.1.12	Catalasa	87
4.2	Actividades Enzimáticas en gel: Zimograma.....	88
4.2.1	Superóxido Dismutasa (SOD)	88
5	OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS POR ASCORBATO Y HIERRO.....	89
6	DETERMINACIÓN DE METALES E IONES.....	89
6.1	Determinación del contenido de hierro intracelular total	89
6.2	Determinación de la cantidad de hierro intracelular quelable	90
6.3	Determinación del contenido de manganeso intracelular	91
6.4	Determinación del superóxido intracelular	91
7	CULTIVOS CELULARES.....	92
7.1	SH-SY5Y.....	92
7.1.1	Mantenimiento de la línea	92
7.1.2	Diferenciación	93

7.2	HEK293T (Human Embryonic Kidney).....	94
7.2.1	Mantenimiento de la línea.....	94
8	INTERFERENCIA DE FRATAXINA UTILIZANDO ShRNA.....	95
8.1	Plásmidos lentivirales.....	95
8.2	Transfección de HEK293T para la producción de lentivirus.....	96
8.3	Titulación de lentivirus.....	97
8.4	Transducción de SH-SY5Y.....	98
9	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES TOTALES.....	99
10	TRATAMIENTO DE LAS PLACAS CON COLÁGENO.....	100

### **III.RESULTADOS.....101**

#### **CAPITULO 1: ESTUDIO PROTEOMICO DE $\Delta yfh1$ , RELACIÓN CON LA Mn-SOD, Y SU IMPLICACIÓN EN LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON CENTROS Fe-S.....103**

1.1.	ESTUDIO PROTÉOMICO DE LAS CÉLULAS $\Delta yfh1$ .....	104
1.2.	INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA.....	107
1.3.	LA CEPA $\Delta yfh1$ PRESENTA BAJO NIVELES DE ACTIVIDAD Mn-SOD.....	108
1.4.	LA DEFICIENCIA DE MANGANESO EXPLICA LA FALTA DE ACTIVIDAD Mn-SOD.....	109
1.5.	LA FALTA DE MANGANESO ES LA RESPONSABLE DE LA DISMINUCIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CON CENTROS HIERRO-AZUFRE.....	113
1.6.	EL EXCESO DE HIERRO ES LA CAUSA INICIALDE LA FALTA DE ACTIVIDAD DE Mn-SOD Y DE ENZIMAS CON CENTROS HIERRO-AZUFRE.....	115
1.7.	LA ACUMULACIÓN DE HIERRO ES RESPONSABLE DEL BAJO CONTENIDO DE MANGANESO Y POR LO TANTO DE LA DEFICIENCIA EN LA ACTIVIDAD DE Mn-SOD.....	116

#### **CAPITULO 2: ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL MUTANTE $\Delta yfh1$ , PAPEL DEL HIERRO QUELABLE EN LA CARBONILACIÓN E INACTIVACIÓN DE ENZIMAS...119**

2.1.	AUMENTO DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL MUTANTE DEFICIENTE EN FRATAXINA.....	120
2.2.	OXIDACIÓN SELECTIVA DE LAS PROTEÍNAS EN EL MUTANTE $\Delta yfh1$ .....	122
2.3.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS OXIDADAS.....	128
2.4.	LA INACTIVACIÓN DE PIRUVATO QUINASA ESTA MEDIADA POR HIERRO.....	130

2.5.	LA CARBONILACIÓN DE FOSFOGLICERATO QUINASA ESTA MEDIADA POR ATP.....	134
2.6.	EL MUTANTE $\Delta yfh1$ PRESENTA UN INCREMENTO EN EL CONTENIDO DE HIERRO QUELABLE.....	136
2.7.	EL INCREMENTO DE HIERRO QUELABLE EN $\Delta yfh1$ ES PREVENIDO CON DESFERRIOXIAMINA O CON LA MUTACIÓN EN EL GEN <i>AFT1</i> .....	139
2.8.	EL DAÑO OXIDATIVO DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A MAGNESIO EN $\Delta yfh1$ ES CONSECUENCIA DEL INCREMENTO EN HIERROQUELABLE.....	141

### **CAPITULO 3:** LA DISMINUCIÓN EN LA ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA

1	DESCENDADENA DAÑO OXIDATIVO EN LAS LEVADURAS DEFICIENTES EN <i>YFH1</i> .....	145
3.1.	DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD CuZn-SOD EN LAS CÉLULAS $\Delta yfh1$ .....	146
3.2.	RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS CARBONILADAS EN $\Delta yfh1$ .....	149
3.3.	RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SUCCINATO DESHIDROGENASA PERO NO DE ACONITASA EN $\Delta yfh1$ .....	151
3.4.	PROTECCIÓN CONTRA LA OXIDACIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS CON TRATAMIENTOS COMBINADOS DE COBRE Y MANGANESO EN EL MUTANTE $\Delta yfh1$ .....	152
3.5.	EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON COBRE Y MANGANESO EN EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS $\Delta yfh1n$ Y SU SENSIBILIDAD A MENADIONA.....	156
3.6.	LA INACTIVACIÓN DE PIRUVATO QUINASA ES CONSECUENCIA DE LA FALTA DE ACTIVIDAD CuZn-SOD EN LAS CÉLULAS $\Delta yfh1$ .....	158
3.7.	CONTENIDO DE HIERRO QUELABLE EN $\Delta sod1$ .....	159

### **CAPÍTULO 4:** EFECTOS DE LA DISMINUCIÓN DE FRATAXINA EN LA LÍNEA CELULAR

SH-SY5Y	DIFERENCIADAS A UN FENOTIPO NEURONAL.....	163
4.1.	DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y A UN FENOTIPO NEURONAL Y SU REPERCUSIÓN EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.....	164
4.2.	PRODUCCIÓN, TITULACIÓN Y CÁLCULO DE LA PROBABILIDAD DE INFECCIÓN DE LOS LENTIVIRUS UTILIZADOS.....	165
4.3.	DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE FRATAXINA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE shRNA.....	167
4.4.	DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD CuZn-SOD EN LAS CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS E INTERFERIDAS PARA FRATAXINA.....	169

<b>IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
1. LA FRATAXINA NO ES ESENCIAL EN LA SÍNTESIS DE LOS CENTROS Fe-S.....	173
2. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>Δyfh1</i> PROVOCA DAÑO A PROTEÍNAS ESPECÍFICAS.....	177
3. RELACIÓN ENTRE METABOLISMO DEL HIERRO Y ACTIVIDADES SOD: ¿UN ASPECTO CLAVE EN LA ATAXIA DE FRIEDREICH?.....	182
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>187</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>190</b>
<b>VII. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>215</b>





## **I. INTRODUCCIÓN**





## 1. LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)

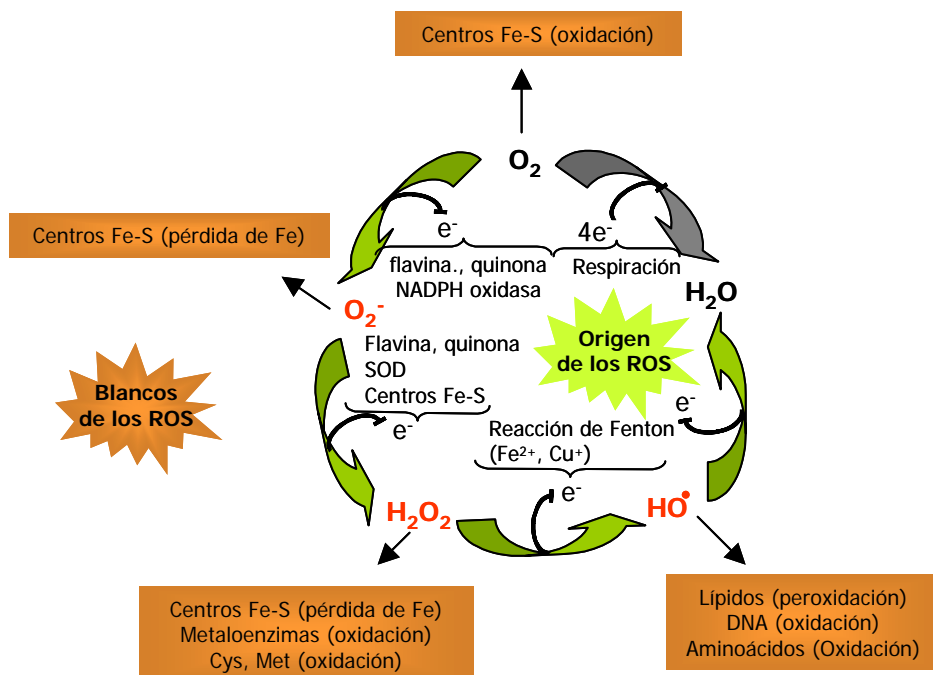
Hace millones de años los organismos que poblaban la tierra se vieron en la necesidad de evolucionar con el fin de adaptarse a la aparición de una nueva molécula: el oxígeno. Cuando la fotosíntesis se volvió eficaz, estos organismos descubrieron que la ventaja tenía un precio. Los microorganismos que supieron sobrevivir en su presencia se encontraron con la ventaja de poder utilizar el oxígeno para obtener la energía de un modo más eficaz a través de la respiración. Los organismos que se enfrentaron a este ambiente se vieron en la obligación de construir sistemas de defensas que contrarrestaran los efectos perjudiciales de este gas. Aquellos organismos que tuvieron éxito en el desarrollo de las defensas requeridas fueron capaces de generar diversas formas de vida en nuestro planeta.

Los efectos perjudiciales de la molécula del oxígeno están relacionados con el hecho de que cada molécula de oxígeno posee dos electrones desapareados lo que lo hace altamente reactivo. Las especies reactivas del oxígeno es el nombre colectivo con que se denominan a las especies químicas que se forman de la reducción incompleta del oxígeno e incluye al anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) (Halliwell and Gutteridge, 1984).

	$O_2$	$O_2^{\cdot-}$	$H_2O_2$	$HO\cdot$	$H_2O$
Potencial de reducción (V):		0.94	0.32	2.31	
Tiempo de vida media (seg):		$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-9}$	
Concentración <i>in vivo</i> (M)		$10^{-10}$	$10^{-7}$	$10^{-15}$	

**Figura I 1: Reducción del oxígeno y propiedades de las especies reactivas del oxígeno.** El potencial de reducción es una medida (en voltios (V)) de la afinidad de la sustancia por los electrones, comparado con el hidrógeno (el cual se sitúa en 0). El  $H_2O_2$  presenta la reactividad más baja y la más alta estabilidad (medida como el tiempo de vida media en segundos) y la más alta concentración *in vivo* (Fuente: Giorgio et al., 2007)

El oxígeno molecular es capaz de aceptar un electrón adicional para crear el anión superóxido que es una forma más reactiva del oxígeno. Dicho superóxido puede provocar la inactivación de proteínas que contienen centros hierro-azufre (Fe-S). Por otro lado, el electrón desapareado del superóxido le permite combinarse con facilidad con el óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) dando lugar al peroxinitrito capaz de producir peroxidación lipídica y reacciones dañinas para las proteínas (D'Autreaux and Toledano, 2007).



**Figura I 2: Generación de las ROS y sus dianas en los sistemas biológicos.** A pesar de que el oxígeno es un di-radical y no es excesivamente reactivo, su reducción a la forma univalente da lugar a la formación de especies químicas más activas (conocidas como especies reactivas del oxígeno ó ROS, en rojo). Debido a sus propiedades químicas intrínsecas, cada ROS posee preferencia sobre diferentes dianas biológicas (señaladas en las cajas naranjas). Fuente: D'Autréaux and Toledano, 2007)

El peróxido de hidrógeno formado por la dismutación del superóxido no es tan reactivo y es relativamente estable (Figura I 1). La reacción de dismutación está catalizada por las enzimas superóxido dismutasas. En levaduras existen dos clases de dichas enzimas y tres en mamíferos. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene la capacidad de reaccionar con los centros Fe-S con una afinidad media, así como con glutatión, cisteínas libres y con baja afinidad con residuos de metionina. A su vez, presenta reactividad con selenocisteínas y con residuos de cisteínas que puede ser muy significativa dependiendo del contexto de la proteína en cuestión. Esta reactividad selectiva y su propiedad de difundir a través de la membrana plasmática hacen del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> una molécula muy importante en señalización celular (Raha and Robinson, 2000; D'Autreaux and Toledano, 2007; Giorgio et al., 2007).

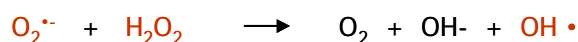
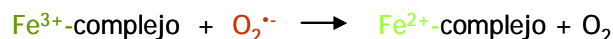
Por último, el radical hidroxilo es particularmente reactivo, capaz de producir daño a proteínas, lípidos y DNA. Se puede formar mediante la **Reacción de Fenton** a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de metales que presentan más de un estado de oxidación. Un ejemplo

sería el hierro. Su forma reducida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) es capaz de transferir un electrón al peróxido de hidrógeno tal como se muestra en la siguiente reacción:



El hierro más proclive a catalizar esta reacción es el que se encuentra en forma libre, es decir, no incorporado en enzimas o en proteínas encargadas de almacenarlo (Imlay, 2003). El cobre también puede transferir electrones al peróxido de hidrógeno, *in vitro*, pero parece poco probable que suceda *in vivo*, debido a su baja concentración intracelular o porque se encuentra unido a tioles y por lo tanto, no reactivo (Gunther et al., 1995).

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno es capaz de reaccionar con el grupo prostético de metaloproteínas que contienen hierro, generando radicales  $\text{HO}\cdot$  en la proximidad de los centros activos de las metaloproteínas. Este fenómeno ha sido denominado oxidación catalizada por metales (MCO) y será discutido más adelante. La acción conjunta del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el hierro puede dar lugar a la reacción de Haber-Weiss:

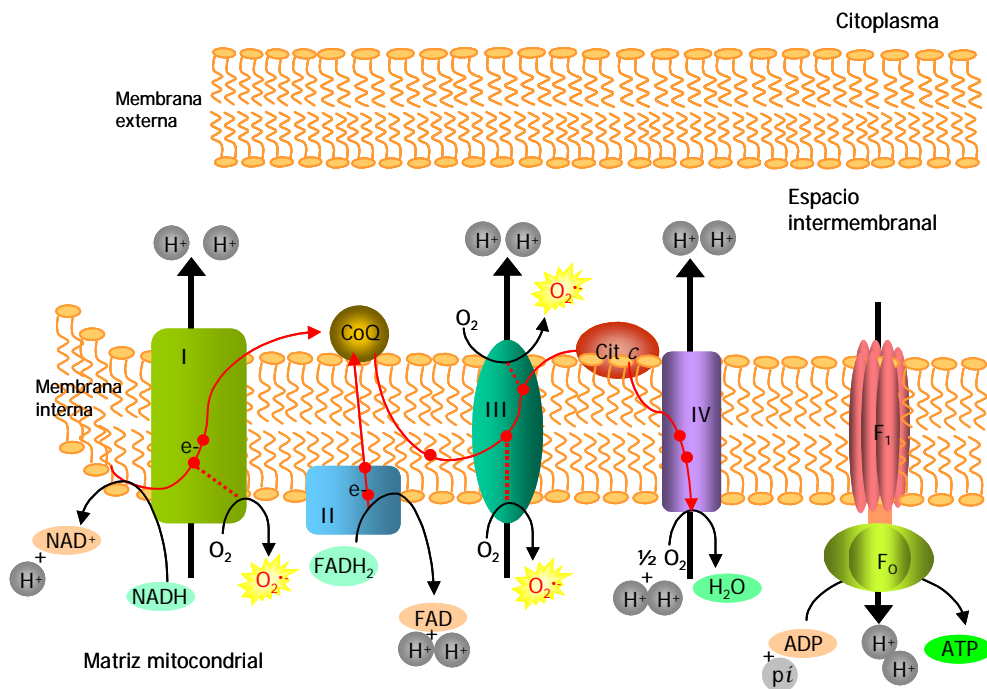


La alta reactividad del hidroxilo lo hace capaz de reaccionar rápidamente con cualquier biomolécula que se encuentra próxima, generando a su vez nuevos radicales menos activos capaces de producir daño a nuevas estructuras celulares. De esta manera se produce un efecto en cadena y la propagación del daño oxidativo (Raha and Robinson, 2000; D'Autreaux and Toledano, 2007).

Cabe destacar que en las células existen otro tipo de radicales libres pero que en este caso derivan del nitrógeno. Dichas especies son el óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el peroxinitrito- $\text{CO}_2$  y los productos de las interacciones del hipoclorito y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el nitrito inorgánico. Estas especies derivadas del nitrógeno (NOS) tienen la capacidad de reaccionar a su vez con las ROS y ya sea a partir de dicha reacción o por sí mismas, son capaces de provocar daño en las estructuras celulares (Stadtman, 2004).

## 1.1 Origen de las ROS

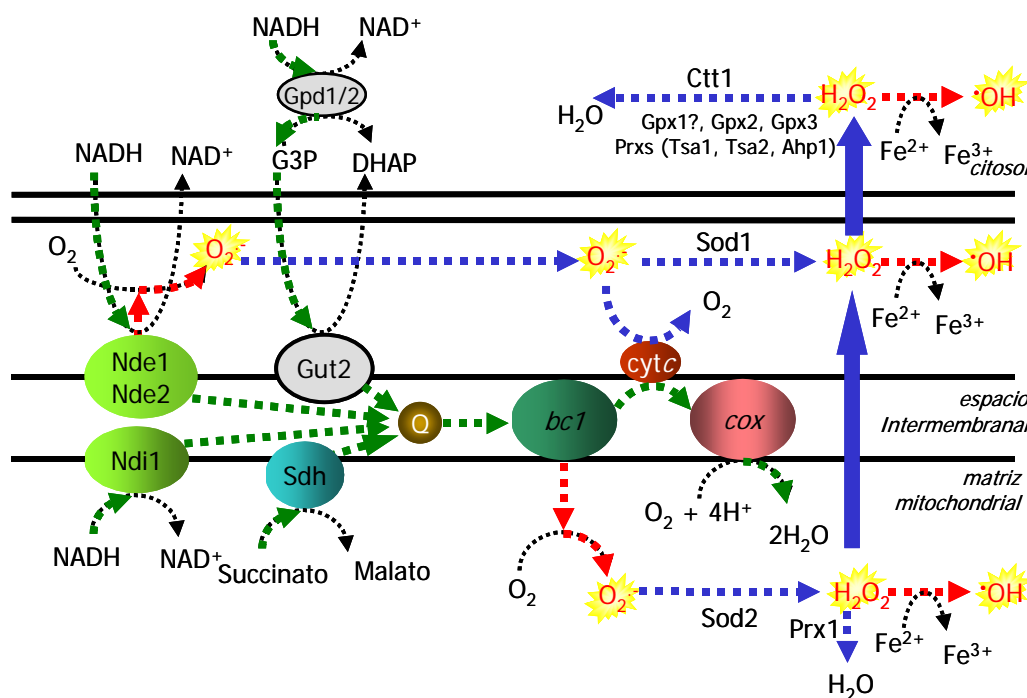
La principal fuente de ROS celular (estimada en el 90%) proviene de la mitocondria. Aproximadamente el 0.1% del oxígeno consumido es derivado a la formación de ROS, como resultado de la autooxidación de ciertos componentes de la cadena de transporte de electrones (Fridovich, 2004). La generación de ROS mitocondrial es consecuencia de la fosforilación oxidativa, un proceso que utiliza la oxidación controlada de NADH y FADH<sub>2</sub> para generar un potencial de energía de protones a través de complejos proteicos ubicados en la membrana interna mitocondrial. Los electrones fluyen a través de los complejos I, II, III y IV por transferencia a los grupos flavinas, centros Fe-S, grupos hemo y iones cobre que poseen dichos complejos. Los encargados de transportar los electrones de un complejo al siguiente son la ubiquinona y el citocromo *c*. El flujo electrónico genera un potencial de energía que es luego utilizado para fosforilar ADP vía F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa con el fin de la formación del sustrato energético ATP empleado por la célula en diversas vías metabólicas.



**Figura I 3: Cadena de transporte de electrones en eucariotas superiores.**

Existen diferentes sitios de la cadena de transporte de electrones, donde los electrones pueden reaccionar directamente con el oxígeno o con otro aceptor de electrones y de esta manera generar radicales libres (Balaban et al., 2005). Como se observa en la Figura I 3, en eucariotas superiores los dos sitios de la cadena de electrones de mayor generación de ROS son el complejo I y III.

*S. cerevisiae* no presenta complejo I, pero tiene tres NADH deshidrogenasas insensibles a rotenona localizadas en la membrana interna (Figura I 4) (Bakker et al., 2001). La NADH deshidrogenasa interna (Ndi1) parece no estar involucrada en la producción de superóxido, mientras que las NADH deshidrogenasas externas (Nde1/Nde2) generan aproximadamente la mitad de los radicales superóxidos producidos en la mitocondria de *S. cerevisiae*. De forma similar a lo que sucede en eucariotas superiores, el complejo citocromo *bc1* es también una importante fuente de superóxido (Fang and Beattie, 2003; Herrero et al., 2008).



**Figura I 4: Representación esquemática de la cadena de transporte de electrones en *S. cerevisiae*, incluyendo los sitios de formación de los ROS y las principales enzimas antioxidantes involucradas.**

*bc1*, complejo citocromo *bc1*; *cyt c*, citocromo *c*; *cox*, citocromo *c* oxidasa; *Ctt1*, catalasa citosólica T; *Gpd* glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ligada a NADH citosólica; *Gpx*, glutatión peróxidasa; *Gut2*, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de unión a membrana; *Nde*, NADH deshidrogenasa externa, *Ndi1*, NADH deshidrogenasa interna; *Prx*, peróxiredoxina, *Q*, ubiquinona; *sdh*, complejo succinato deshidrogenasa ligado a FADH<sub>2</sub>; y *Sod*, superóxido dismutasa. (Fuente:

Herrero et al., 2008)

Además de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, existen múltiples compartimentos y diversas enzimas capaces de generar especies reactivas del oxígeno. Entre ellas se incluyen proteínas de la membrana plasmática como la familia de las NADPH oxidasas así como la actividad de varias enzimas citosólicas. Entre ellas destacan las ciclooxigenasas, la oxigenasa dependiente del citocromo P450 y la xantina oxidasa cuya acción enzimática genera O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Además, la auto-oxidación de ciertos compuestos, incluyendo

el ácido ascórbico, tioles, adrenalina entre otros son fuente de superóxido para la célula (Cheeseman and Slater, 1993).

Por otro lado el metabolismo de los lípidos dentro de los peroxisomas es otra fuente importante de ROS endógeno, en este caso debido a la generación de  $H_2O_2$  por parte de la enzima acil-CoA oxidasa (Moldovan and Moldovan, 2004).

Existen también fuentes exógenas de ROS, como por ejemplo la contaminación ambiental ó la exposición a radiaciones X-,  $\gamma$ - y UV.

## 1.2 Efectos de las ROS sobre las biomoléculas

El estrés oxidativo puede causar daño en todo tipo de biomoléculas, incluyendo DNA, proteínas y lípidos. Las moléculas preferentemente afectadas por este tipo de estrés dependerán de la célula, las características del estrés y lo severo que éste sea (Cabiscol et al., 2000)

Los lípidos son una de las biomoléculas relacionadas con el daño celular producido por los radicales libres. Durante la peroxidación lipídica se produce la oxidación de ácidos grasos polinsaturados a través de una reacción en cadena que propaga y amplifica el ataque inicial de un agente oxidante sobre un lípido determinado. El mecanismo de la peroxidación lipídica se inicia por el ataque de un oxidante sobre la cadena de un lípido insaturado (LH) dando lugar a un radical alquilo ( $L\cdot$ ) como resultado de la abstracción de un átomo de hidrógeno. A su vez, este primer radical reacciona rápidamente con el oxígeno molecular para formar el radical peroxil ( $LOO\cdot$ ). La fase de propagación de la peroxidación lipídica se produce cuando el  $LOO\cdot$  abstrae el hidrógeno de ácidos grasos adyacentes para dar un hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ) y nuevamente el radical alquilo. Las principales consecuencias de este tipo de oxidación son la pérdida de integridad y función de la membrana, como también la formación de productos tóxicos y potencialmente bioactivos como el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal (Esterbauer et al., 1991).

Por otro lado, el daño oxidativo puede afectar a las bases del DNA aumentando las posibilidades de que aparezcan mutaciones. El DNA tiene la capacidad de unir átomos de hierro con alta afinidad, lo que provoca un ambiente idóneo para la formación de radicales hidroxilos a través de la reacción de Fenton. Dicho radical  $HO\cdot$  puede atacar a la molécula de DNA y abstraer un átomo de hidrógeno del grupo metilo de la tiamina y de las uniones C-H de la 2-desoxirribosa (Evans et al., 2004). Como resultado de la oxidación de los azúcares y las bases nitrogenadas de DNA se generan una variedad de productos de daño celular. Uno

de los compuestos más importantes que se forman como consecuencia de las ROS sobre el DNA es la 8-hidroxideoxiguanosina.

Por último, las proteínas son uno de los principales blancos de las ROS debido a su abundancia en los sistemas biológicos y a que muchas de ellas son dianas del estrés oxidativo como consecuencia de su estructura y función. En general, la oxidación conduce a una pérdida total o parcial de la función de la proteína (Levine et al., 1994; Tamarit et al., 1998; Dalle-Donne et al., 2006). Sin embargo, el estrés oxidativo puede causar modificaciones reversibles o irreversibles en las proteínas. Las modificaciones reversibles, generalmente en los residuos de cisteína, pueden ser reparadas mediante enzimas específicos como las glutaredoxinas o tioredoxinas (Oktyabrsky and Smirnova, 2007; Lillig et al., 2008). Habitualmente este tipo de modificaciones tiene la función de proteger ante el daño irreversible o de modular la función de las proteínas (regulación redox).

Las modificaciones irreversibles no pueden ser reparadas, de forma que las proteínas inactivas se acumulan o son degradadas. Un ejemplo de modificaciones irreversibles es el caso de la carbonilación de las proteínas (Dean et al., 1997; Imlay, 2003; Stadtman and Levine, 2003).

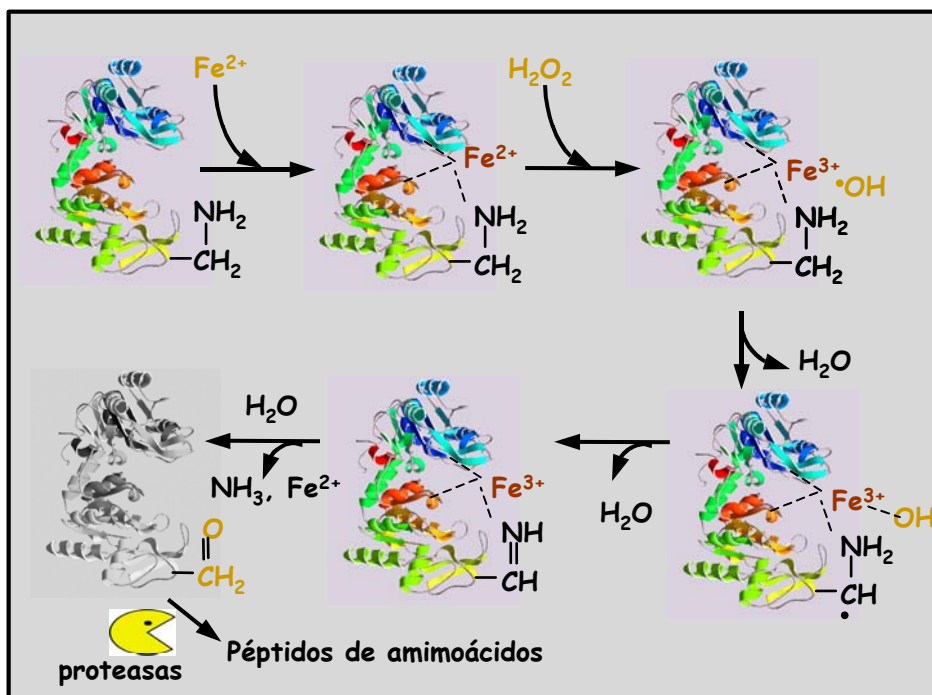
### **1.3 Modos de medir daño oxidativo en proteínas: Carbonilos**

Debido a que las ROS son generalmente muy reactivas y tienen una vida media muy corta, una forma indirecta de determinar la existencia de estrés oxidativo es la medida de los productos formados por la reacción de las ROS con biomoléculas. Dado que en el caso de las proteínas uno de los productos generados son los grupos carbonilo, su cuantificación se ha convertido en un parámetro ampliamente aceptado de daño oxidativo en condiciones de estrés.

#### **1.3.1 Formación de los grupos carbonilo en las proteínas**

Los grupos carbonilo pueden ser introducidos en las proteínas en diferentes sitios y por medio de diferentes mecanismos. Por un lado, los carbonilos son producidos en las cadenas laterales de los aminoácidos, especialmente en los residuos de prolina, arginina, lisina y treonina los cuales son oxidados a derivados aldehídos o cetonas (Berlett and Stadtman, 1997; Stadtman and Berlett, 1998). Este tipo de modificaciones se produce habitualmente por el ataque del radical HO•, que puede ser originado por radiación ionizante o por la reacción de cationes metálicos con el peróxido de hidrógeno (Figura I 5).

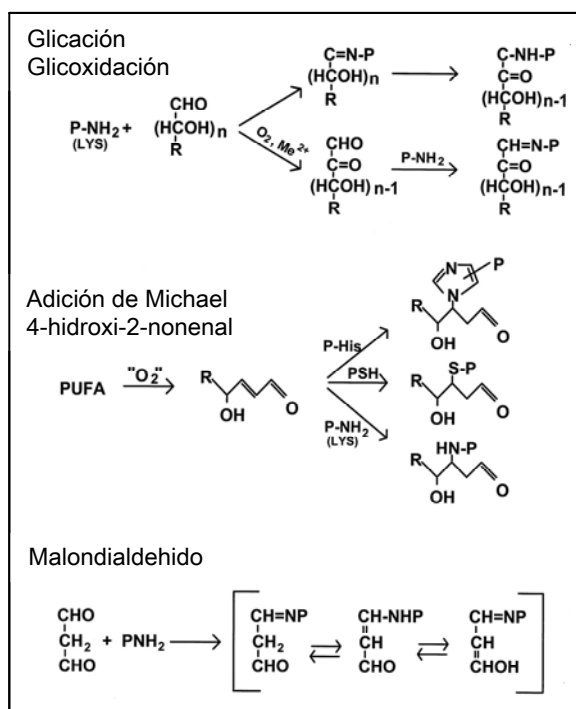




**Figura I 5: Formación de grupos carbonilo en proteínas por la acción de la reacción de Fenton.**

Hay que tener en cuenta que la sensibilidad a estrés oxidativo por parte de las proteínas depende de su localización, la clase y ubicación de los aminoácidos que la forman, presencia de metales en sus centros activos, entre otros factores.

Como se observa en la Figura I 5, el peróxido de hidrógeno es capaz de reaccionar con metales de transición, como el Fe<sup>2+</sup> y el Cu<sup>+</sup>, que están formando parte de los centros activos de muchas proteínas en un proceso denominado Reacción Catalizada por Metales (MCO). Dicho mecanismo está muy localizado en el espacio, de manera que los radicales de oxígeno se generan en el mismo sitio activo y oxidan a los aminoácidos cercanos a dicho centro. Por este motivo, este mecanismo conlleva como consecuencia una pérdida de actividad enzimática (Stadtman, 1990).



**Figura I 6: Formación de grupos carbonilos por glicación, glicoxidación y por reacciones con productos de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)** (Fuente: Berlett & Stadtman, 1997).

En este sentido merece la pena comentar que la mayoría de los carbonilos formados en las proteínas mediante la oxidación catalizada por metales son el semialdehído glutámico, derivado de la arginina, y el semialdehído aminoadípico, derivado de la lisina (Requena et al., 2001). Por otro lado, los grupos carbonilo pueden también ser generados por proteólisis de las proteínas, vía alfa-amidación o tras la oxidación de las cadenas laterales de residuos glutamilo, dando lugar a la formación de un péptido en el cual el N-terminal del aminoácido está bloqueado por un derivado de alfa-cetoacilo (Berlett and Stadtman, 1997). Existen también otros mecanismos que pueden dar lugar a la carbonilación proteica como la reacción con productos generados durante la peroxidación lipídica como 4-hidroxinonenal (4-HNE), 2-propenal (acroleína) y malondialdehído (Sayre et al., 2006). Este tipo de reacción denominada “Adición de Michael”, conlleva la adición de grupos aldehído reactivos a las cadenas laterales de los residuos de cisteína, histidina o lisina. Finalmente, grupos carbonilo reactivos pueden ser también generados por reacciones del grupo amino de los residuos de lisina con azúcares reducidos o por la oxidación de sus productos de reacción (glicación/glicoxidación), dando lugar a, por ejemplo, carboximetil lisina (Figura I 6) (Stadtman and Berlett, 1998; Dalle-Donne et al., 2005).

### 1.3.2 Cuantificación de los grupos carbonilo

Los grupos carbonilo han sido cuantificados de diversas formas. El método más comúnmente utilizado es el basado en su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona. Este método se basa en que el DNPH es capaz de unirse covalentemente a los grupos carbonilo -formando una base Schiff- para dar lugar a hidrazonas estables. El grupo dinitrofenilo (DNP) puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima a 365-375 nm (Levine et al., 1990; Levine et al., 1994). Asimismo, debido a que existen excelentes anticuerpos comerciales contra el grupo dinitrofenilo (Keller et al., 1993; Shacter et al., 1994), la detección de grupos carbonilo puede realizarse mediante western blot, dot blot, inmunohistoquímica o ELISA. Se han desarrollado diversos métodos para la derivatización y la preparación de las muestras. La detección mediante western blot ha sido comúnmente denominada Oxi-blot (Buss et al., 1997; Robinson et al., 1999; Davies et al., 2001; Levine, 2006). Sin embargo otros métodos están emergiendo como alternativas al DNPH. Para mayor detalle véase la revisión sobre este tema incluida en "Artículos publicados" al final de ésta tesis.

#### 1.3.2.1 Identificación de proteínas oxidadas mediante herramientas proteómicas

Podemos definir la "proteómica redox" como el conjunto de aproximaciones proteómicas que permiten la identificación de proteínas modificadas oxidativamente. La proteómica redox ofrece un gran potencial para descubrir nuevas proteínas susceptibles al estrés oxidativo, correlacionar cambios cuantitativos en el perfil de estas modificaciones con el estado de una enfermedad o con el envejecimiento, y para caracterizar el sitio exacto y tipo de modificación mediante espectrometría de masas (Dalle-Donne et al., 2005; Butterfield and Sultana, 2008). Este tipo de aproximaciones puede dar lugar a la identificación de grupos de proteínas selectivamente oxidadas en determinadas patologías y por tanto contribuir a aclarar los mecanismos moleculares involucrados en dichas patologías. Hasta la fecha diversos estudios proteómicos han demostrado que la carbonilación es altamente selectiva, debido a que en diferentes modelos de estudio se han identificado grupos de proteínas particularmente sensibles al estrés oxidativo.

*Sistemas basados en electroforesis bidimensional*

La electroforesis bidimensional (2D) ha sido ampliamente utilizada para la identificación de proteínas carboniladas a partir de muestras complejas. La detección de esta modificación oxidativa se puede realizar mediante western blot con anticuerpos que reconocen directamente la modificación carbonilo en la proteína (por ejemplo: anti -4-HNE) (Bennaars-Eiden et al., 2002), o bien contra anticuerpos anti-DNP si la muestra ha sido previamente derivatizada con este compuesto (Castegna et al., 2002; Costa et al., 2002; Korolainen et al., 2002). En otros casos, los carbonilos reactivos son marcados covalentemente con hidrazida y detectados en el gel mediante avidina-fluoresceína o avidina-peroxidasa (Yoo and Regnier, 2004). El uso de geles bidimensionales ha demostrado ser muy útil para la identificación de proteínas oxidadas, especialmente cuando se comparan dos condiciones fisiológicas (Reverter-Branchat et al., 2004; Sorolla et al., 2008). Presenta la ventaja de poder obtener por un lado las imágenes obtenidas tras la detección del grupo funcional unido a los carbonilos y por otro aquella obtenida por tinción de los geles con colorantes de proteínas (tinción con plata, Sypro Ruby, Coomassie Brilliant blue, etc.). Esto permite la normalización de la señal carbonilo respecto la cantidad de proteína. Hay que tener en cuenta que como en cualquier análisis proteómico, el estudio de las proteínas carboniladas está sesgado a favor de aquellas proteínas más abundantes. Por tanto la determinación del porcentaje de carbonilación de una determinada proteína es más informativo que el contenido total de proteína. De lo contrario, aquellas proteínas abundantes pero con bajo contenido de carbonilos específicos pueden aparecer como predominantes en oxi-blots, mientras que proteínas poco abundantes pero con niveles altos de carbonilación específica podrían pasar desapercibidas (Levine, 2006). Asimismo un cambio en el nivel de expresión de una determinada proteína entre dos condiciones de estudio podría identificarse erróneamente como un cambio en el grado de daño de dicha proteína. En este sentido conviene destacar que diversos estudios basados en geles bidimensionales han permitido identificar proteínas poco abundantes como altamente sensibles al estrés oxidativo. Un ejemplo serían las chaperonas mitocondriales (Reverter-Branchat et al., 2004; Magi et al., 2004)

A pesar de la gran información obtenida mediante el análisis proteómico a nivel de geles, existen limitaciones de este tipo de aproximación para el caso de análisis a gran escala así como para la identificación de proteínas de membrana o proteínas poco abundantes. Por esta razón diversos autores han explorado métodos libres de gel, basados en el enriquecimiento mediante afinidad de proteínas que presentan una modificación tipo carbonilo y su posterior detección mediante espectrometría de masas (Tsaytler et al., 2008;

Mirzaei and Regnier, 2006; Grimsrud et al., 2007). Estas aproximaciones permitirían en teoría obviar algunas de las limitaciones de los sistemas basados en 2D descritas anteriormente. Sin embargo la desventaja de estas aproximaciones es que no permiten un análisis cuantitativo del grado de carbonilación de las distintas proteínas identificadas en diferentes muestras, lo que limita su utilidad como herramienta para el estudio de cambios en el patrón de oxidación de proteínas en distintas condiciones biológicas.

## **1.4 Mecanismos detoxificantes de ROS**

El estrés oxidativo se describe como una situación en la cual las defensas antioxidantes son insuficientes para inactivar a las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Cadenas et al., 1982). Este desequilibrio entre la producción y la destrucción de ROS puede afectar a gran parte de los componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Muchos de los cambios que ocurren durante el envejecimiento y durante la progresión de ciertas enfermedades son una consecuencia del estrés oxidativo (Harman, 1956; Balaban et al., 2005; Giorgio et al., 2007).

Para evitar el daño producido por los radicales libres, las células han desarrollado sistemas de respuesta que pueden ser divididos en sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

### **1.4.1 Sistemas no enzimáticos**

Los antioxidantes no enzimáticos son biomoléculas de bajo peso molecular y de naturaleza no proteica, solubles y con la capacidad de reaccionar con las ROS evitando de este modo el daño a estructuras o moléculas celulares.

#### **1.4.1.1 Glutación (GSH)**

Es probablemente la más abundante de las moléculas encargadas de secuestrar las especies reactivas y tiene por lo tanto un papel muy importante en mantener el estado redox de las células. Es un tripéptido (glutamina-cisteína-glicina) donde la cisteína se encuentra en su forma reducida (-SH). Algunas especies reactivas y otros oxidantes incluyendo el HO•, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ONOO<sup>-</sup>, son capaces de oxidar dicha cisteína y producir un puente disulfuro con otra molécula de glutación para dar lugar a su forma oxidada (GSSG). Su reducción se lleva a cabo por la acción de la glutación reductasa, una enzima que reduce el glutación oxidado (GSSG) a GSH utilizando el NADPH como dador de electrones (Jamieson, 1998; Sies, 1999).

En condiciones normales el ambiente intracelular es altamente reductor, favoreciendo la existencia de GSH en una relación de GSH/GSSG de 30:1 a 100:1 (Hwang et al., 1992). Además de ejercer su función antioxidante eliminando los radicales libres directamente, la molécula de glutatión es el sustrato de la reacción de las enzimas glutatión peroxidasa, ambas implicadas en respuesta a estrés oxidativo, inactivando  $H_2O_2$  y otros peróxidos, vía la conversión de GSH en su forma oxidada (Radi et al., 1997).

En la levadura, el glutatión juega un papel importante en proteger a la mitocondria de los productos oxidativos resultantes de la respiración. Mutantes deficientes en GSH no son capaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables y son sensibles a  $H_2O_2$  y a agentes generadores de superóxido. Además en *S. cerevisiae*, GSH puede ser utilizada como fuente de nitrógeno y azufre bajo condiciones de deprivación de nutrientes (Jamieson, 1998). Así también, se ha relacionado al glutatión con la maduración de los centros Fe-S (Sipos et al., 2002).

El GSH es sintetizado principalmente en el hígado y viaja a través del sistema sanguíneo a otros tejidos pudiendo atravesar las membranas plasmáticas. Se lo ha visto implicado en transducción de señales, expresión génica y apoptosis, interviniendo en el estado redox de tioles, interacciones con proteínas y proliferación celular. Un campo de creciente interés es la regulación de su distribución subcelular y en el sistema nervioso (Sipos et al., 2002).

#### 1.4.1.2 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico o vitamina C ejerce su función antioxidante eliminando algunas ROS como el  $HO\cdot$ ,  $H_2O_2$  y peróxidos reactivos. Sus propiedades antioxidantes se deben a su capacidad de donar electrones y de esta manera funciona como un agente reductor. Por otro lado, presenta propiedades reductoras que le permiten reducir el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  necesario en la reacción de Fenton ejerciendo de este modo un papel pro-oxidante. Sin embargo, en condiciones fisiológicas normales existe muy poco metal de transición libre por lo tanto, los efectos antioxidantes del ácido ascórbico predominan sobre los pro-oxidantes (Evans et al., 2004). Entre sus funciones presenta también la habilidad de regenerar el  $\alpha$ -tocoferol y la de ser cofactor de hidroxilasas.

Aunque es un importante antioxidante en eucariotas superiores, en *S. cerevisiae* está presente en niveles muy bajos. Sin embargo se ha identificado ácido eritroascórbico tanto en *S. cerevisiae* como en *Cándida albicans* el cual presenta propiedades antioxidantes muy similares al ácido ascórbico (Jamieson, 1998).

#### 1.4.1.3 $\alpha$ -Tocoferol

Es el mayor constituyente de la vitamina E liposoluble que es la principal molécula antioxidante que actúa sobre la peroxidación lipídica. Actúa reduciendo al radical LOO• mediante la formación del radical  $\alpha$ -tocoferol que no presenta reactividad. Dicho radical es convertido a su forma reducida por la acción del ácido ascórbico (Halliwell, 1996). Se ha observado que la deficiencia de vitamina E en pacientes con defectos en la absorción de grasas produce neurodegeneración (Traber et al., 1987). Por otro lado, defectos en la absorción y en el metabolismo de la vitamina E resultan en ataxia, como por ejemplo la ataxia resesiva con deficiencia en vitamina E (AVED) cuyos afectados presentan bajos niveles de vitamina E en el plasma (Pandolfo, 2008). Dicha patología directamente relacionada con la deficiencia de las defensas antioxidantes, presenta una sintomatología similar a la ataxia de Friedreich (FRDA), la cual también muestra niveles bajos de vitamina E (Cooper et al., 2008). Una de las diferencias más importantes entre estas dos enfermedades es que la suplementación con vitamina E en los enfermos de AVED detiene la progresión de los síntomas neurológicos, hecho que no parece suceder en los enfermos de FRDA (Pandolfo, 2008).

En levadura existen estudios que demuestran que tanto el  $\alpha$ -tocoferol como el  $\beta$ -caroteno actúan como antioxidantes liposolubles protegiendo a las membranas del estrés oxidativo exógeno (Sohn et al., 2004)

#### 1.4.1.4 Coenzima Q (ubiquinol-10)

Como ya se ha mencionado, la ubiquinona 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. Su función la ejerce previniendo la iniciación de la propagación de la peroxidación lipídica en las membranas biológicas. Tiene la capacidad de reaccionar con radicales alquilo y peroxil. Su regeneración es catalizada por la proteína unida al complejo II (Radi et al., 1997).

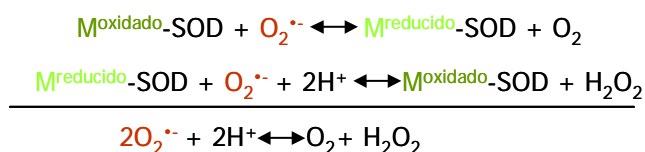
### 1.4.2 Sistemas enzimáticos

Dentro de los sistemas enzimáticos de protección frente al estrés oxidativo, existen aquellos que detoxifican directamente las ROS y aquellos que actúan regulando el estado redox de las proteínas.

#### 1.4.2.1 Superóxido Dismutasas

En condiciones normales, la tasa de generación de superóxido proveniente de la mitocondria produce muy poco daño, simplemente por la eficiente eliminación del mismo por parte de las enzimas superóxido dismutasas, las cuales catalizan la dismutación del ión superóxido a peróxido de hidrógeno y agua. Son un componente ubicuo del sistema antioxidante celular y constituyen la primera defensa contra el estrés oxidativo en muchos organismos. Disrupciones o mutaciones de los genes que codifican las superóxidos dismutasas están asociadas a diversas enfermedades en humanos como la arteriosclerosis (Kakko et al., 2003), diabetes mellitus (Ookawara et al., 1992; Haskins et al., 2004), síndrome de Down (Engidawork and Lubec, 2001) y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Rosen, 1993).

Todas las SODs requieren un metal de transición en su centro activo que dependiendo de la superóxido dismutasa de que se trate puede ser cobre, manganeso, hierro o níquel, siendo estos dos últimos metales requeridos en organismos procariontas. En cualquier caso su fin es dismutar el anión superóxido en dos pasos los cuales se detallan a continuación (Culotta et al., 2006):



#### *Cobre Zinc Superóxido Dismutasa (SOD1)*

Tanto en mamíferos como en *S. cerevisiae* la Sod1 está principalmente localizada en el citosol y en menor proporción en el espacio intermembranal de la mitocondria (Field et al., 2003). Así también se la localiza mediante el uso de métodos inmunohistoquímicos en núcleo, peroxisomas y lisosomas (Chang et al., 1988). Como se mencionó mas arriba la principal fuente de superóxido en las células es la cadena respiratoria mitocondrial, aunque puede ser producido a nivel citoplasmático por la enzima xantina oxidasa. La CuZn-SOD



posee del 90 al 95% de la actividad superóxido dismutasa en *S. cerevisiae* siendo dicha actividad esencial durante la fase estacionaria de dicho microorganismo. Se conoce menos acerca de su papel frente al estrés oxidativo en fases más tempranas de crecimiento, dado que dicha actividad no es esencial para el crecimiento aeróbico (Longo et al., 1996).

Sod1 está altamente expresada en riñón y es también muy abundante en neuronas motoras. Se ha observado que roedores con disrupción del gen *SOD1* presentan problemas asociados con el funcionamiento hepático, infertilidad, vulnerabilidad en neuronas motoras y acortamiento del tiempo de vida (Culotta et al., 2006).

La secuencia y estructura de la CuZn-SOD está altamente conservada desde procariotas a eucariotas. Dicha proteína es un dímero formado por dos subunidades con un sitio activo que contiene cada una un ion cobre y un ion zinc. La dimerización se realiza mediante puentes disulfuro entre dos cisteínas oxidadas de las cuatro que presenta la *SOD1* en su centro activo. La unión de los iones metálicos se realiza de manera independiente siendo el Zn no esencial para la dismutación del superóxido pero jugando un papel fundamental en la estabilidad térmica de la proteína. La pérdida de zinc de su sitio activo cambia las propiedades de Sod1 haciéndola tóxica para las neuronas (Maier and Chan, 2002). La inserción del cobre es realizada por la chaperona CCS quien adquiere el cobre por mecanismos desconocidos. Una vez unido al cobre Cu-CCS interacciona a través de sus cisteínas con la Sod1 que ya presenta unido el zinc. Luego, en presencia de oxígeno o superóxido genera un heterodímero intermedio unido mediante puentes disulfuros que transfiere el cobre al monómero de la Sod1.

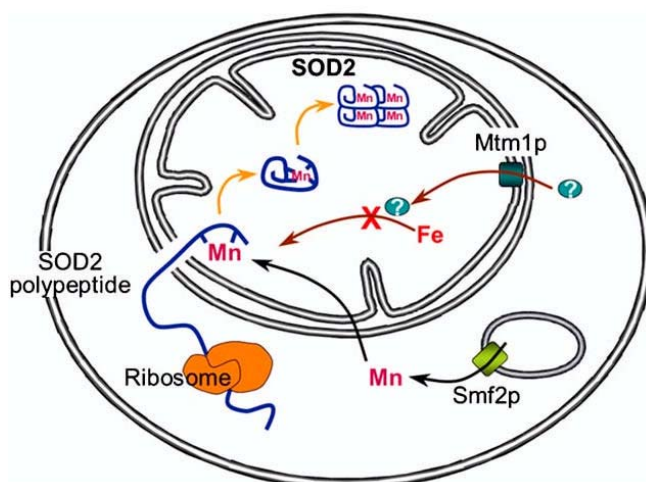
### *Manganeso Superóxido Dismutasa (SOD2)*

La Sod2 está altamente conservada desde procariotas primitivos hasta eucariotas superiores, pudiendo unir manganeso o hierro en su sitio activo. Basada en la alta homología del manganeso y el hierro uno puede esperar la fácil substitución del cofactor metálico. Por ejemplo, en *E. coli*, en la que se han descrito cuatro tipos activos de SODs (unida a Mn, Fe, CuZn y Ni), se ha observado igual afinidad por manganeso que por hierro por parte de la Mn-SOD, sin embargo dicha enzima es inactiva cuando se encuentra unida a hierro (Mizuno et al., 2004).

En eucariotas, tanto en levaduras como en mamíferos, la Sod2 activa está específicamente unida a manganeso y forma un tetrámero con subunidades de aproximadamente 21 kDa. La pérdida de *SOD2* conlleva severas consecuencias en la supervivencia del organismo ya que ejerce la función de dismutar el superóxido dentro de la mitocondria, sitio de la célula e n

donde el  $O_2^{\cdot -}$  se produce en mayor cantidad. La unión de hierro en su sitio activo provoca la inactivación permanente de la enzima, razón por la cual las células han desarrollado una serie de mecanismos encargados de impedir la incorporación de hierro en la Mn-SOD. Se ha observado que la incorporación errónea del metal puede ocurrir cuando la célula pierde la homeostasis del manganeso y/o del hierro o cuando existen problemas en la capacidad de captación de dichos metales (Culotta et al., 2006). Para adquirir el manganeso, la enzima recién sintetizada es translocada a la mitocondria a medida que va siendo transducida por el ribosoma que se encuentra juxtapuesto a la membrana externa de dicho organelo (Figura I 7). Este proceso de importación facilita la inserción del manganeso en su sitio activo (Ginsberg et al., 2003; Luk et al., 2005).

Estudios realizados en *S. cerevisiae*, Culotta y colaboradores identificaron dos transportadores de membrana necesarios para la incorporación del manganeso a Mn-SOD: Smf2 y Mtm1. Smf2, está asociado a la membrana de vesículas aunque parece tener un papel importante en la adquisición del manganeso desde la superficie celular ya que los mutantes deficientes en *SMF2* presentan muy bajos niveles de manganeso intracelular (Luk and Culotta, 2001). En estos mutantes se observa un déficit de la actividad de la enzima Mn-SOD debido a la falta de su cofactor que conlleva a la incorporación de hierro en su sitio activo. La suplementación del medio de cultivo con nivel no tóxicos de  $MnCl_2$  permite la recuperación de los niveles de manganeso y de la actividad Mn-SOD (Luk and Culotta, 2001).



**Figura I 7: Representación esquemática de la incorporación del manganeso en Sod2.** La transducción, el importe mitocondrial y la inserción del metal en Mn-SOD ocurren simultáneamente.

Cuando el polipéptido entra a la mitocondria Sod2 se encuentra lo suficientemente abierta para permitir la inserción del manganeso. Una vez, unida al manganeso y completada su entrada dentro de la matriz mitocondrial el polipéptido puede adoptar su estructura cuaternaria. El transportador

mitocondrial Mtm1 ayuda a prevenir la interacción del hierro con Sod2. El manganeso mitocondrial proviene de las vesículas intracelulares el cual es exportado por Smf2 (Fuente: Cultota et al., 2006)

El transportador Mtm1 está localizado en la membrana interna de la mitocondria y funciona intercambiando solutos entre el citosol y la mitocondria. La delección del gen *MTM1* en *S. cerevisiae* resulta en la inactivación de Sod2 debido a la deficiencia de manganeso en la enzima. Además, este mutante presenta una fuerte acumulación de hierro tanto a nivel mitocondrial como citoplasmático. La actividad Mn-SOD puede ser recuperada mediante la suplementación del medio de cultivo con cantidades tóxicas de  $MnCl_2$  o bajando la alta concentración de hierro intracelular. Mtm1 no funciona como un transportador de manganeso en la mitocondria pero juega un papel crítico en la homeostasis de metales dentro de la misma, siendo importante en la disponibilidad de manganeso versus hierro, lo cual impacta en última instancia en la actividad de la Mn-SOD (Luk et al., 2003)

Parece ser que la Mn-SOD existe en diferentes estados dependiendo de la cantidad de hierro y manganeso mitocondrial. Bajo condiciones normales, el hierro mitocondrial está en exceso con respecto al manganeso (de 1 a 2 órdenes de magnitud), pero la mayor parte de este hierro presenta un estado que no es accesible a la Mn-SOD por lo que no puede competir con el manganeso. Sin embargo, en una situación donde la homeostasis del hierro se encuentra alterada, la fracción del hierro accesible a Mn-SOD aumenta y reemplaza al manganeso produciendo la inactivación de la enzima. Así también, en condiciones de deficiencia de manganeso los bajos niveles de hierro en su estado accesible son suficientes para dejar inactiva a la enzima (Yang et al., 2006b).

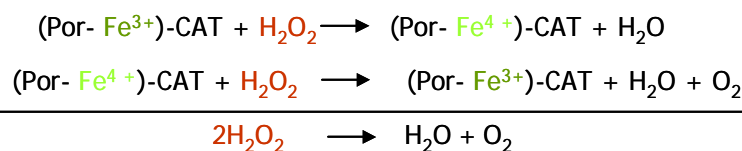
### *Superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD)*

EC-SOD es una isoforma de superóxido dismutasa que es liberada desde las células de mamíferos al espacio extracelular. Forma un tetrámero en el que cada subunidad presenta un ion cobre y un ion zinc que son incorporados a la proteína mediante un mecanismo diferente al observado en Sod1. Está codificada por el gen *SOD3* y su región central es homóloga a la CuZn-SOD. Su región N-terminal es importante para la formación del tetrámero y la C-terminal para la unión de EC-SOD a la superficie celular (Adachi et al., 1992; Stenlund et al., 1997). Se expresa principalmente en células del músculo liso vascular y es secretada al espacio extracelular donde se une a la matriz extracelular y a la superficie de componentes endoteliales. Se postula que sus funciones incluyen la prevención de la

inactivación dependiente de  $O_2^{\cdot-}$  de las enzimas endoteliales como también regulador de la disponibilidad  $NO\cdot$  (Petersen et al., 2003).

#### 1.4.2.1 Catalasa

La catalasa se encarga de detoxificar el peróxido de hidrógeno catalizando su descomposición en oxígeno y agua. De esta manera previene el posible daño que esta especie reactiva del oxígeno pueda causar a las células. Es un homotetrámero formada por cuatro subunidades monofuncionales de 60 kDa. Cada subunidad contiene un grupo hemo (ferriprotoporfirina IX,  $Fe^{3+}$ ) en el sitio activo y un grupo NADPH que previene la acumulación de la forma inactiva de la enzima ( $Fe^{4+}$ ) (Kirkman and Gaetani, 2007).

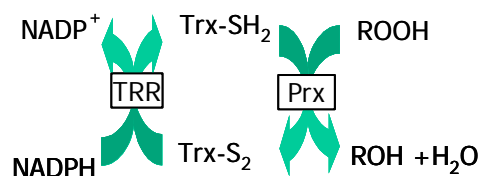


En *S. cerevisiae* existen dos isoenzimas de catalasa: la catalasa A, codificada por el gen *CTA1* y la catalasa T, codificada por el gen *CTT1*. La catalasa T está localizada en el citoplasma mientras que la catalasa A esta localizada principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias. Dependiendo de las condiciones de crecimiento, se puede observar un cambio en la expresión de la catalasa A entre estos dos organelos. Así, en condiciones de inducción de peroxisomas (fuente de carbono: ácido oléico) se observa una mayor actividad de la enzima en peroxisomas, aunque también una significativa cantidad en mitocondria. Por otro lado, en fuentes de carbono no fermentables la actividad catalasa A se observa principalmente en mitocondrias, siendo casi indetectable en peroxisomas (Petrova et al., 2004). Estos datos concuerdan con estudios previos en los cuales se observa actividad catalasa en mitocondrias de miocardio de mamíferos (Radi et al., 1991).

La función de la catalasa T parece estar implicada en la respuesta a estrés oxidativo, estrés osmótico y carencia de nutrientes (Davidson et al., 1996). La catalasa A por su lado es la encargada de eliminar el peróxido de hidrógeno producido durante la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas, o durante la respiración en la mitocondria.

### 1.4.2.2 Peroxiredoxinas

Las peroxiredoxinas (Prxs) son proteínas ubicuas que se encuentran desde bacterias a humanos. En *S. cerevisiae*, las peroxiredoxinas son llamadas también tioredoxina, peroxidasa o tiol peroxidasa porque utilizan el sistema tioredoxina/tioredoxina reductasa como donadores de electrones (Rhee et al., 2005). Su función consiste en reducir el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos a agua o el correspondiente alcohol, tal como se muestra en el siguiente esquema:



También se ha descrito que presentan capacidad para reducir peroxinitritos (Rhee et al., 2005). Existen dos clases de peroxiredoxinas que se clasifican según el número de cisteínas que poseen. Aquellas que contienen una sola cisteína conservada en el extremo N-terminal (donde se produce la oxidación por parte de los peróxidos que detoxifica) son llamadas Prxs 1-Cys. Las peroxiredoxinas Prxs 2-Cys, presentan una cisteína adicional. Existe una tercera subdivisión en mamíferos llamada Prx 2-Cys atípicas la cuales además de la cisteína conservada en su extremo N-terminal, requieren de otra cisteína en un residuo no conservado para su actividad.

*S. cerevisiae* posee cuatro Prxs 2-Cys y una Prx 1-Cys localizadas en diferentes compartimentos celulares y con diferente especificidad por el tipo de peróxido a detoxificar. Por su lado, los mamíferos presentan al menos seis isoformas de peroxiredoxinas: Prx I, II, III y IV son Prx 2-Cys; Prx V pertenece al grupo de las 2-Cys atípicas y por último la Prx VI necesita una única cisteína para su actividad.

En *S. cerevisiae*, la Prx 1-Cys es codificada por el gen *PRX1* (Pedrajas et al., 2000) y se la conoce también como peroxiredoxina mitocondrial, mTPx. El nivel de expresión de ésta peroxiredoxina depende del metabolismo celular siendo más elevada cuando la levadura crece en medio respiratorio. Por lo tanto, actuaría como mecanismo de defensa frente a las ROS que se forman en la mitocondria (Monteiro et al., 2002). En el caso de mamíferos se han localizado en mitocondria la Prx III y la V, encontrándose ésta última también en peroxisomas (Rhee et al., 2005).

El gen *TSA1* de *S. cerevisiae* codifica para la peroxiredoxina citosólica cTPxI (Chae et al., 1994) y presenta un 65% de identidad con la de mamíferos (Prx II). Es una Prx muy

abundante que además de jugar un papel antioxidante constitutivo, también está implicada en el control de la expresión y actividad de otros genes controlados por el regulador transcripcional Yap1 dentro de los cuales se encuentran muchos de respuesta a estrés oxidativo. Entre ellos cabe destacar el gen de la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, tioredoxina o el de la tioredoxina reductasa (Inoue et al., 1999; Ross et al., 2000). Su homóloga en *S. pombe*, Tpx1 es esencial en aerobiosis debido a que detoxifica los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se generan en el metabolismo aeróbico. Asimismo, es sensor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y transmisor de la señal de estrés oxidativo al factor de transcripción Pap1 que es homólogo a Yap1 de *S. cerevisiae* (Vivancos et al., 2004; Vivancos et al., 2006).

Ahp1 o cTPxIII, es otra Prx citosólica de levadura que presenta una homología del 86% con cTPxI, pero presenta una actividad cinco veces menor que esta última (Jeong et al., 1999; Lee et al., 1999; Park et al., 2000). Ahp1 parece estar activa únicamente a concentraciones bajas de peróxidos, ya que elevados niveles de ellos la inactivan (Prouzet-Mauleon et al., 2002).

La tercera peroxiredoxina citosólica se denomina cTPxII y está codificada por el gen *TSA2* el cual presenta menor homología con el resto de las peroxiredoxinas. Presenta mayor especificidad por hidroperóxidos orgánicos que por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como un papel muy importante como alquil hidroperóxido peroxidasa en la fase estacionaria de crecimiento de *S. cerevisiae* (Park et al., 2000). En humanos esta peroxiredoxina es denominada Prx I.

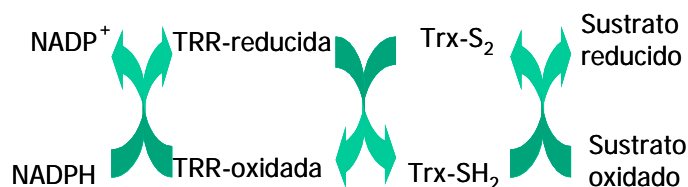
Existe una quinta peroxiredoxina localizada en el núcleo llamada nTPx que al igual que cTPxII presenta mayor especificidad por hidroperóxidos orgánicos. Su función parece estar relacionada con la protección del DNA frente a las ROS, siendo de mayor relevancia en la fase estacionaria de su crecimiento, actuando como la única peroxidasa nuclear en *S. cerevisiae* (Park et al., 2000; Cha et al., 2003).

#### 1.4.2.3 Tioredoxinas y Tioredoxina Reductasa

El sistema tioredoxina compuesto por las tioredoxina y la flavoenzima tioredoxina reductasa dependiente de NADPH, es ubicuo desde Archaea al hombre. Las tioredoxinas son enzimas diméricas de pequeño tamaño molecular que poseen dos cisteínas en el centro activo, siendo la secuencia del mismo: Trp-Cys-Gly-Pro-Cys. Funcionan como una tioloxidoreductasa y catalizan la reducción de puentes disulfuro de las proteínas utilizando para ello los residuos de cisteína reducidos de su centro activo (Holmgren, 1985).

Una de las actividades de las tioredoxinas es actuar como dador de electrones necesarios para el ciclo catalítico de diversas enzimas, como la ribonucleótido reductasa, las

peroxiredoxinas y metionina sulfóxido reductasa. La tioredoxina reductasa (TRR) se encarga de transferir los electrones procedentes del NADPH para reducir a las tioredoxinas. Una vez reducida, la tioredoxina participa en reacciones de transferencia de electrones a través de la oxidación reversible de sus dos cisteínas del centro activo (Holmgren, 1985; Eklund et al., 1991).



Otra función de la tioredoxina es proteger a las proteínas citoplasmáticas de la agregación y de su inactivación vía la formación oxidativa de puentes disulfuro intra o inter moleculares, ejerciendo de este modo una función de regulación redox sobre las mismas.

Las tioredoxinas de todos los organismos se caracterizan por tener la misma estructura tridimensional, el llamado dominio tioredoxina, el cual consiste en cinco hojas  $\beta$  rodeadas por tres o cuatro hélices  $\alpha$  (Holmgren, 1985).

*S. cerevisiae* contiene un sistema tioredoxina citoplasmático que comprende las tioredoxinas Trx1 y Trx2 y una tioredoxina reductasa Trr1, y un sistema tioredoxina mitocondrial que está formada por la tioredoxina Trx3 y la tioredoxina reductasa Trr2 (Trotter and Grant, 2005). Existen evidencias que sugieren que el sistema tioredoxina citoplasmático puede estar solapado con el sistema glutatión/glutarredoxina, hecho que no sucede con el sistema mitocondrial (Muller, 1996; Draculic et al., 2000).

La delección de *TRX1* o *TRX2* no muestra defectos de crecimiento o morfología. Sin embargo, la delección de los dos genes afecta al ciclo celular. Los mutantes deficientes en *TRX2* son extremadamente sensibles a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Muller, 1991; Muller, 1994).

El sistema tioredoxina mitocondrial parece tener un papel como donador de electrones de la peroxiredoxina mitocondrial, además de actuar frente a las ROS o regular la actividad de ciertas proteínas mitocondriales mediante un sistema de oxidación-reducción (Pedrajas et al., 1999).

A diferencia de bacterias, levaduras y plantas que presentan múltiples tioredoxinas, en células humanas sólo se ha encontrado una tioredoxina citoplasmática. Sin embargo, se ha observado movimientos entre los compartimentos celulares o su secreción a través de la membrana plasmática (Arner, 1999). También existe la tioredoxina mitocondrial Trx2 y la tioredoxina reductasa TRR2. Se sabe que las tioredoxinas de mamíferos son selenoproteínas (Tamura and Stadtman, 1996) y presentan la capacidad de catalizar la reducción de

compuestos con selenio como selenito o selenodiglutation. Los residuos de selenocisteína están conservados entre diferentes especies de mamíferos siendo estos esenciales para su actividad catalítica (Arner and Holmgren, 2000). Dentro de las funciones que puede ejercer la tioredoxina en mamíferos destacan: regulación de factores transcripcionales como NFκB y AP-1 ya sea activándolos o inhibiéndolos (Schenk et al., 1994); regulación de la apoptosis (Saitoh et al., 1998); inmunomodulación (Silberstein et al., 1993; Kang et al., 1998); implicación en la implantación del embrión y establecimiento del embarazo (Matsui et al., 1996); protección frente a la hipoxia durante el nacimiento (Das et al., 1999) y la supervivencia neuronal de las células de la glia en situaciones de isquemia/reperfusión (Hori et al., 1994).

#### 1.4.2.4 Glutaredoxinas

Las glutaredoxinas son proteínas de bajo peso molecular que presentan dos residuos de cisteína conservados en su centro activo (Holmgren, 1976). Al igual que las tioredoxinas, poseen actividad oxidoreductasa y pueden reducir puentes disulfuro. Las glutaredoxinas forman parte del sistema glutaredoxina donde los electrones son transferidos desde NADPH, a la glutatión reductasa (GR), luego al glutatión y finalmente la glutaredoxina (Holmgren, 1989).



Las glutaredoxinas se encuentran presentes a lo largo de la escala evolutiva en todos los organismos que presentan glutatión. En función de su estructura y de su centro activo, existen dos tipos de glutaredoxinas. Por un lado las ditiólicas, que poseen la secuencia conservada Cys-Pro-Tyr-Cys en el centro activo y se encargan de la reducción de los disulfuros de las proteínas mediante el mecanismo ditiol. Por otra parte, las glutaredoxinas monotiólicas contienen la secuencia Cys-Gly-Phe-Ser en el centro activo y llevan a cabo la reducción de los disulfuros mixtos entre las proteínas y la molécula de GSH a través del mecanismo monotiol (Yang and Wells, 1991; Bushweller et al., 1992; Tamarit et al., 2003) Hasta el momento han sido descritas siete glutaredoxinas diferentes y una posible octava en *S. cerevisiae* (Herrero et al., 2006). Entre ellas encontramos a dos ditiólicas (Grx1 y Grx2), las monotiólicas Grx3 y Grx4, las cuales presentan multidominios, la monotiólica Grx5 con

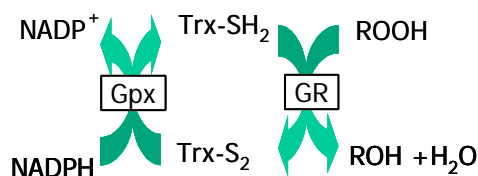


dominio simple y dos monotiolicas inusuales Grx6 y Grx7, ancladas a retículo endoplasmático/golgi (Luikenhuis et al., 1998; Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008). En *S. cerevisiae* Grx1 se localiza en el citosol y Grx2 tanto en el citosol como en la mitocondria, presentando por esta razón diferencia en sus funciones (Pedrajas et al., 2002). En cuanto a las glutarredoxinas monotiolicas de *S. cerevisiae*, Grx3 y Grx4 presentan localización nuclear, mientras que Grx5 está localizada en la mitocondria (Rodriguez-Manzaneque et al., 2002). Todas ellas están relacionadas con el metabolismo del hierro. Grx3 y Grx4 regulan la localización del sensor de hierro Aft1. Grx5 podría estar implicada en al biosíntesis de los centros Fe-S ya que en ausencia de Grx5 se observa una acumulación de hierro en la célula e inactivación de las enzimas que poseen centros hierro-azufre (Rodriguez-Manzaneque et al., 2002).

Las células humanas presentan cuatro glutaredoxinas. La glutarredoxina ditiolica Grx1 es homóloga funcional en *E. coli* y levadura. En el caso de la Grx2 mitocondrial existe una sustitución de serina por prolina en el centro activo, lo que le permite recibir electrones desde la TRR y los complejos con centros Fe-S (Johansson et al., 2004; Lillig et al., 2005). La Grx3 humana es una glutaredoxina monotiolica con multidominios y es homóloga a Grx3 y 4 de levadura (Isakov et al., 2000). Grx5 está muy bien conservada en las células eucariotas desde levadura hasta humanos (Sun et al., 2005; Lillig et al., 2008). La deficiencia de Grx5 en el pez zebra causa defectos en la biosíntesis del grupo hemo debido a que el ensamblaje de los centros Fe-S se encuentra dañado (Wingert et al., 2005). En humanos, la falta de Grx5 provoca anemia microcítica y acumulación de hierro (Camaschella et al., 2007).

#### 1.4.2.5 Glutación peroxidasas

Las glutatión peroxidasas (GPxs) son una familia de proteínas que realizan la misma tarea que las peroxiredoxinas dentro de la célula, es decir, reducen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los hidroperóxidos orgánicos a agua o el correspondiente alcohol, pero en este caso utilizan como reductor la molécula de glutatión. Existen dos tipos de GPxs, las clásicas y las específicas de peróxidos de la membrana lipídica. Las GPxs clásicas son normalmente tetraméricas y solubles, mientras que las específicas de membrana lipídica (PHGPxs) son monoméricas y se encuentran asociadas a las membranas (Ursini et al., 1995). La PHGPxs son consideradas las principales reparadoras de la peroxidación lipídica de membrana, la cual es una de las mayores consecuencias del estrés oxidativo.



En *S. cerevisiae* se identificaron tres GPxs a las que se denominaron Gpx1, GPx2 y GPx3 (Inoue et al., 1999). Sin embargo, al realizar alineamientos de secuencia de estas proteínas con GPxs de eucariotas superiores, se observó que las tres glutatión peroxidadasas de *S. cerevisiae* son del tipo PHGPxs (Avery and Avery, 2001).

GPx3 parece ser la glutatión peroxidasa más importante, puesto que el mutante nulo en esta peroxidasa, a diferencia de las otras dos, es hipersensible a hidroperóxidos y a metales como el cadmio y el aluminio. Además, su nivel de expresión basal es el más elevado de los tres. Por otro lado, Gpx3 juega un rol esencial como sensor y traductor de la respuesta al estrés oxidativo por parte del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de Yap1 (Delaunay et al., 2002).

*GPX2* es el único de los tres genes *GPX* de *S. cerevisiae* que aumenta su nivel de expresión en condiciones de estrés oxidativo de manera dependiente de Yap1, mientras que *GPX1* se induce por carencia de glucosa (Inoue et al., 1999).

#### 1.4.2.6 Sulfiredoxinas

Estas proteínas fueron descubiertas en levaduras pero se encuentran también presentes en eucariotas superiores, entre ellos la especie humana (Woo et al., 2003). Se encargan de reducir el ácido sulfínico de los residuos cisteína oxidados, siendo las peroxiredoxinas una de sus principales sustratos (Vivancos et al., 2005).

#### 1.4.2.7 Metionina sulfóxido reductasa

Es una enzima que se encarga de revertir la oxidación del sulfóxido de metionina hasta metionina (Moskovitz et al., 1997; Moskovitz et al., 1998). Este tipo de enzima tiene como función reparar la oxidación de las metioninas, puesto que junto con la cisteína, forman un grupo de aminoácidos susceptibles a la oxidación por las ROS. El donador de electrones para la reacción que catalizan es la tioredoxina (Mouaheb et al., 1998).

## 2. Metabolismo del hierro

La gran abundancia del hierro en la corteza terrestre explica porque los organismos lo han seleccionado en un gran número de procesos biológicos. El hierro es un componente vital del grupo hemo el cual es requerido tanto para transportar el oxígeno en la hemoglobina, como para su almacenamiento en la mioglobina. Formando parte del grupo hemo, también es requerido para la protección de la célula frente al estrés oxidativo (catalasa), para procesos de detoxificación (citocromos P<sub>450</sub>) y para la transferencia de electrones en los complejos de la cadena respiratoria. Asimismo, el hierro se encuentra formando parte de los centros Fe-S de proteínas involucradas en funciones celulares fundamentales como la síntesis de aminoácidos y vitaminas, replicación y reparación del DNA y en la respiración celular (Sheftel and Lill, 2009). Por esta razón, el hierro es un nutriente esencial para las células, sin embargo cuando se encuentra en exceso genera especies reactivas del oxígeno que, como se profundizó en el primer capítulo, reaccionan con las moléculas biológicas provocando daño oxidativo. Por esta razón los organismos, desde bacterias a humanos, han desarrollado mecanismos de control para mantener la homeostasis del hierro, regulando su absorción, reciclaje, movilización y almacenamiento. La disrupción de estos procesos puede causar graves problemas en la viabilidad de organismos unicelulares, como también, anemia o enfermedades relacionadas con la acumulación de hierro en humanos (Zhang and Enns, 2009).

### 2.1. Transporte de hierro

#### 2.1.2. Ferrireductasas

El primer paso en el transporte de hierro es la reducción de la forma Fe<sup>3+</sup> que es su forma más abundante pero a su vez insoluble. En el caso de la levadura, se conocen dos ferrireductasas de membrana llamadas Fre1 y Fre2, encargadas de reducir Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, codificadas por los genes *FRE1* y *FRE2* (Dancis et al., 1990; Georgatsou and Alexandraki, 1994). A pesar que ambos genes son altamente homólogos y que tienen funciones redundantes, su transcripción es controlada por diferentes factores, siendo *FRE1* regulado tanto por Aft1 (factor transcripcional de hierro) (Yamaguchi-Iwai et al., 1995) como por Mac1 (factor transcripcional de cobre) (Georgatsou and Alexandraki, 1994) y *FRE2* solo por Aft1 (Yamaguchi-Iwai et al., 1995).

En el caso de humanos y mamíferos superiores, el hierro que proviene principalmente de la comida en su forma  $\text{Fe}^{3+}$  se absorbe en el intestino donde debe atravesar las membranas de las células epiteliales para llegar al plasma. Este transporte requiere enzimas que cambien el estado de oxidación del hierro. La ferrireductasa denominada DCYTB ha sido identificada en la superficie apical de las células del duodeno (Shayeghi et al., 2005). La evidencia que compromete la necesidad de una ferrireductasa es el transportador de metal divalente 1 (DMT1; también conocido como NRAMP2 o DCT1) presente de manera abundante en la mucosa apical y que transporta  $\text{Fe}^{2+}$  (Gunshin et al., 1997; Gunshin et al., 2005; Fleming and Andrews, 1998). El rol principal de DCYTB sería la reducción del hierro férrico dietario antes de la absorción por parte de DMT1 (Figura I 10).

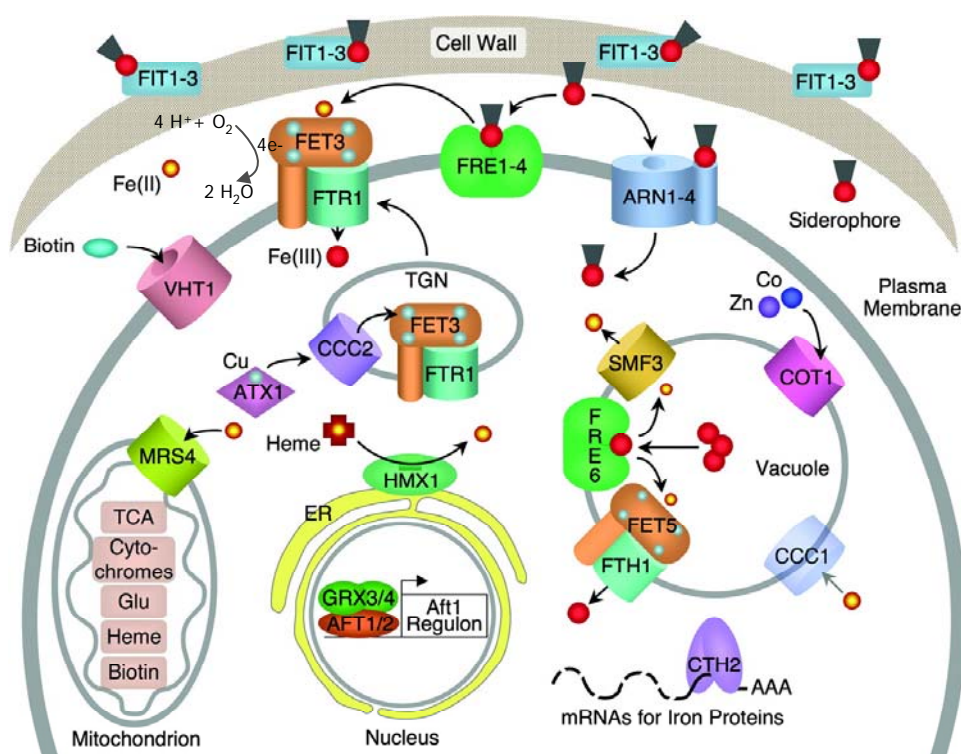
### **2.1.3. Transporte de hierro en *S. cerevisiae***

#### 2.1.3.1 Transporte de baja afinidad

Este sistema transporta hierro solo en su estado  $\text{Fe}^{2+}$  pero es capaz de transportar otros metales de transición como el  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  (Dix et al., 1994). La proteína de transmembrana encargada de dicho transporte es denominada Fet4 y está codificada por el gen *FET4*, el cual no está regulado por Aft1. En anaerobiosis, Fet4 se convierte en el transportador mayoritario de hierro (ter Linde et al., 1999). Se cree que *FET4* está controlado por factores de transcripción que se activan por anaerobiosis.

#### 2.1.3.2 Transporte de alta afinidad

Cuando el hierro se vuelve limitante, se activa un segundo sistema de transporte llamado de alta afinidad, el cual presenta una afinidad 200 veces mayor por el hierro que el sistema de baja afinidad (Eide et al., 1992). Dicho sistema está formado por dos proteínas, Ftr1 una permeasa de hierro transmembranal y Fet3 integrada a la membrana con un dominio extracelular multicobre oxidasa (Figura I 8). Las multicobre oxidasas son una pequeña familia de proteínas que contienen cobre y son capaces de oxidar un sustrato con la reducción concomitante de oxígeno molecular a agua (Askwith et al., 1994).



**Figura I 8: Modelo del transporte de hierro en *S. cerevisiae*.** El esquema representa la respuesta de la célula a la privación de hierro (Fuente: Philpott and Protchenko, 2008)

Fet3 media el transporte de hierro actuando como una ferroxidasa, convirtiendo hierro ferroso ó  $\text{Fe}^{2+}$  en hierro férrico ó  $\text{Fe}^{3+}$ , el cual es luego transportado por Ftr1 (De Silva et al., 1995). La acción combinada de la ferroxidasa y la permeasa podrían ser requeridos para impartir especificidad al sistema de alta afinidad (Eide et al., 1992). Ambos genes, *FET3* y *FTR1*, están relacionados entre si y son regulados por el factor transcripcional sensible a hierro, Aft1 (Van Ho et al., 2002).

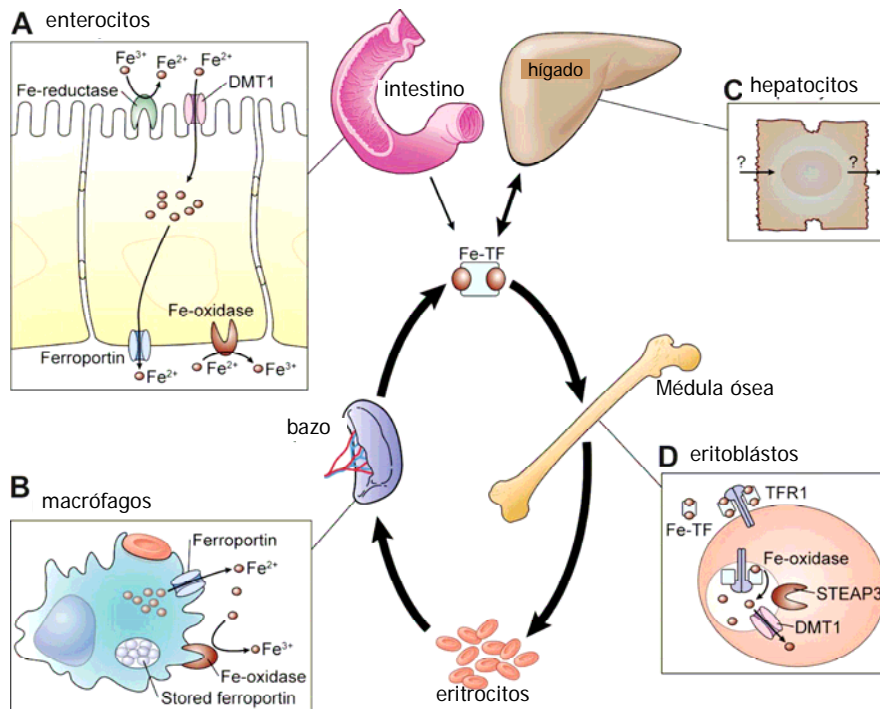
### 2.1.3.3 Sideróforos

A pesar de que las levaduras tienen la habilidad de tomar el hierro por medio de los transportes anteriormente descritos, también son capaces de acumularlo unido a moléculas orgánicas llamadas sideróforos. Los sideróforos son quelantes férricos de bajo peso molecular producidos tanto por bacterias como por hongos (Van Ho et al., 2002). Los sideróforos presentan una extraordinaria alta afinidad por el hierro. Por ejemplo, Desferrioxamina el cual es un sideróforo producido por *Streptomyces pilosus* tiene el doble

de afinidad por hierro que la transferrina. La función principal de los sideróforos es la de solubilizar el  $\text{Fe}^{3+}$  que normalmente se encuentra en estado insoluble. A pesar de que *S. cerevisiae* no produce sideróforos, tiene la habilidad de tomar el hierro de una variedad de complejos hierro-sideróforo (Lesuisse et al., 1998). Existen dos mecanismos mediante los cuales la levadura es capaz de extraer el hierro de los sideróforos. El primero consiste en la reducción del hierro unido al sideróforo de su forma  $\text{Fe}^{3+}$  a la  $\text{Fe}^{2+}$  por parte de las reductasas férricas (Fre1-4) de la superficie celular, lo cual disocia al hierro del sideróforo que es transportado por el sistema de alta afinidad compuesto por Fet3/Ftr1 (Lesuisse et al., 1998) (Figura I 8). El segundo mecanismo requiere la expresión de transportadores específicos pertenecientes a la familia de transportadores ARN/SIT, los cuales son regulados por *AFT1*. El hierro es disociado del sideróforo en la vacuola o bien puede servir como una molécula de almacenamiento de hierro (Moore et al., 2003; Philpott and Protchenko, 2008).

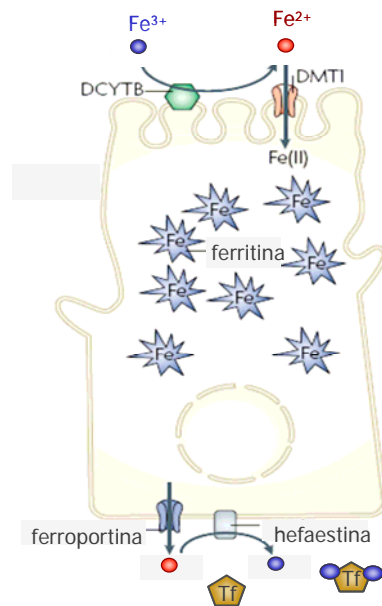
## 2.2 Transporte de hierro en eucariotas superiores

A diferencia de los organismos unicelulares, los mamíferos presentan un sistema de transporte donde el hierro debe, en primera instancia, atravesar las células del intestino o ser excretado por los macrófagos y luego ser transportado en el plasma hacia todas las células del organismo. Una vez en los tejidos, el hierro se internaliza en las células y luego se moviliza dentro de los diferentes organelos celulares donde es utilizado de diferentes maneras (Figura I 9).



**Figura I 9: Modelo del transporte de hierro en mamíferos.** El esquema representa la respuesta de la célula a la privación de hierro (Fuente:Andrews, 2008)

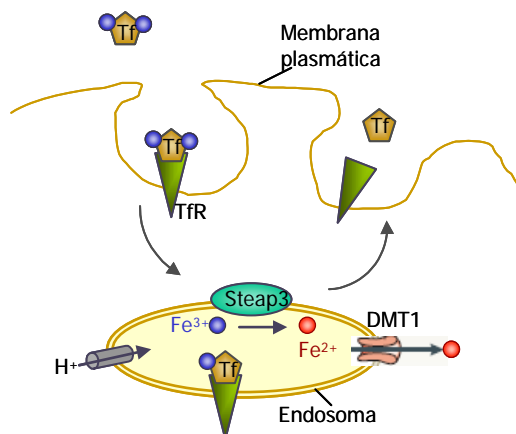
En un primer paso, el hierro proveniente de los alimentos, es transportado hacia el interior de las células del duodeno. El transportador DMT1 está altamente conservado desde procariontas a eucariotas. Es expresado en la superficie apical de los enterocitos del intestino y en los endosomas de todas las células. Además de  $Fe^{2+}$ , transporta otros metales divalentes. El hierro internalizado por DMT1 entra en el citosol de las células y puede ser almacenado en la molécula de ferritina o exportado al plasma mediante la ferroportina (Figura I 10) (De Domenico et al., 2008). La ferroportina es la única exportadora de hierro celular y se expresa en la mucosa del duodeno, en macrófagos y en las células de la placenta. Transporta  $Fe^{2+}$  y se ha observado una relación crucial entre ella y la familia de las multicobre oxidadas (ceruloplasmina y hefaestina) que convierten el  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  (Roeser et al., 1970). La falta o mutaciones de estas proteínas producen anemias y defectos neurológicos entre otros (Ragan et al., 1969; Harris et al., 1998). En ausencia de ferrooxidadas, el  $Fe^{2+}$  no puede ser exportado a través de la ferroportina acumulándose en el citosol unido a la ferritina (De Domenico et al., 2008).



**Figura I 10: Transporte de hierro a través de enterocitos.** El  $Fe^{3+}$  proveniente de la dieta es convertido en  $Fe^{2+}$  por medio de la ferreductasa DCYTB, localizada en la mucosa apical de los enterocitos de la mucosa del duodeno. El  $Fe^{2+}$  es transportado por medio de DMT1, el cual puede ser incorporado a ferritina o puede ser transportado hacia la superficie basolateral de los enterocitos. Allí es excretado hacia el plasma por medio de la ferroportina. El  $Fe^{2+}$  exportado es convertido a  $Fe^{3+}$  por una ferroxidasa asociada a la membrana, llamada hefaestina. El  $Fe^{3+}$  se une a la transferrina disuelta en el plasma, la cual se encarga de transportarlo al resto de las células del cuerpo (Fuente: De Domenico et al., 2008).

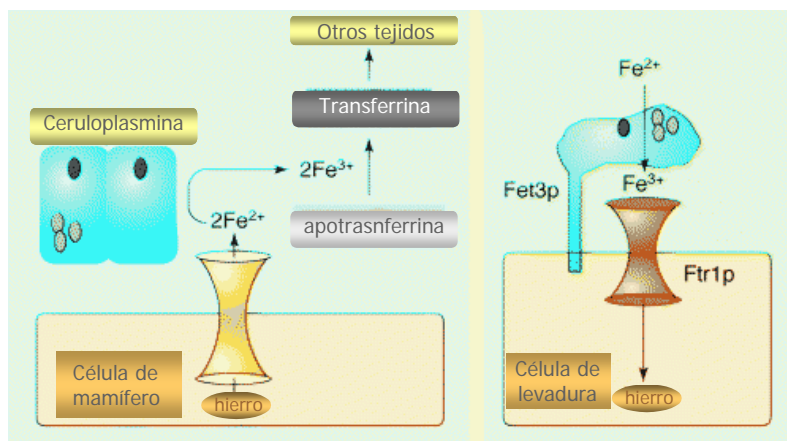
Una vez que el hierro es exportado al plasma mediante la ferroportina, éste se une a la transferrina. La transferrina es una glicoproteína de 80 kDa que presenta dominios de unión a hierro. A pH neutro, como el de la sangre, la transferrina es capaz de unir dos átomos de  $Fe^{3+}$ . De esta manera ejerce dos funciones, por un lado mantener el hierro en una forma incapaz de generar radicales libres y por otro, dirigir el hierro hacia las células que expresen receptores de transferrina. Existen dos tipos de receptores de transferrina: TfR1 es expresado en todas las células que se dividen, y se encuentra en mayor cantidad en los precursores de eritrocitos; TfR2 por su parte, está expresado principalmente en el hígado y se une al complejo transferrina- $Fe^{3+}$  con una afinidad mucho menor que TfR1 (Aisen, 2004; Cheng et al., 2004)





**Figura I 11: Transporte de hierro en células que expresan el receptor de la transferrina.** La transferrina (Tf) unida a dos átomos de  $\text{Fe}^{3+}$ , se une al receptor de la transferrina (TfR) expresado en la superficie de las células. El complejo Tf-TfR es internalizado por endocitosis. El endosoma se acidifica lo que provoca la liberación del hierro por parte de la Tf. El  $\text{Fe}^{3+}$  convertido a  $\text{Fe}^{2+}$ , mediante la reductasa Steap3, es transportado hacia el citoplasma mediante DMT1. El complejo Tf-TfR es excitado mediante el reciclado del endosoma.

Como se observa en la Figura I 11, después de unirse al receptor, el complejo transferrina- $\text{Fe}^{3+}$ -TfR1, es rápidamente internalizado mediante endocitosis. La vesícula internalizada (un endosoma) se acidifica por la acción de una bomba de protones dependiente de ATP que baja el pH a 5.5. El cambio de pH provoca la liberación del  $\text{Fe}^{3+}$  del complejo, el cual es reducido por STEAP3 a  $\text{Fe}^{2+}$  y luego transportado hacia el citosol mediante DMT1 (Sipe and Murphy, 1991; Bali et al., 1991; Ohgami et al., 2005). Por su parte, el complejo apotransferrina-TfR1 es reciclado en la superficie celular, donde a pH neutro la apotransferrina se disocia del receptor y queda libre para unirse a hierro nuevamente (van Renswoude et al., 1982; Dautry-Varsat et al., 1983). Podemos comparar el transporte de hierro dependiente de una oxidasa en levadura y mamíferos. Como se observa en la Figura I 12, en mamíferos la glicoproteína ceruloplasmina la cual se encuentra en el plasma, media la oxidación del hierro, facilitando su exportación desde la célula hacia el resto del cuerpo. En levadura, Fet3, una proteína integral de membrana es la que media la oxidación del hierro, resultando en un transporte de hierro a través de la permeasa Ftr1.



**Figura I 12: Comparación del transporte de hierro dependiente de oxidasa en levadura y mamíferos.** Los círculos negros y grises representan moléculas de cobre en las multicobre oxidosas (Fuente: Askwith and Kaplan, 1998)

### 2.3 Almacenamiento del hierro

En lo que concierne al almacenamiento de hierro, las levaduras parecen presentar mayor analogía con las plantas que con eucariotas superiores. En este sentido, tanto las levaduras como las plantas almacenan el hierro en la vacuola. En *S. cerevisiae* la vacuola presenta sistemas de transportadores de hierro, el de baja afinidad formado por Smf3 puede funcionar tanto como un transportador de  $Fe^{2+}$  como de  $Mn^{2+}$  y el transporte de alta afinidad, compuesto por los genes *FET5/FTH1*, es una oxidasa/ permeasa homóloga a *FET3/FTR1* (Spizzo et al., 1997; Urbanowski and Piper, 1999). Ambos sistemas se encargan de movilizar el metal desde la vacuola hacia el citosol. Asimismo existe un transportador de hierro denominado Ccc1, que internaliza el hierro dentro de la vacuola y que por lo tanto juega un papel importante en el almacenamiento del mismo (Figura I 8) (Li et al., 2001). Dicho transportador está regulado por la cantidad de hierro citoplasmático, aumentando su expresión vía el regulador de transcripción YAP5 o vía la degradación del RNA mensajero cuando la concentración de hierro es elevada. CCC1 presenta un homólogo en *Arabidopsis thaliana* pero no así en eucariotas superiores (Li et al., 2008).

En eucariotas superiores el almacenamiento de hierro se realiza en la ferritina. Esta proteína es ubicua y se expresa en muchas eubacterias, arqueas y plantas, con la notable excepción de levaduras. La ferritina es una proteína multimérica formada por 24 subunidades ensambladas que forman una esfera alrededor de un corazón central capaz de almacenar 4500 átomos de hierro. Las subunidades de aproximadamente 20 kDa que forman dicha macroestructura pueden ser de dos tipos diferentes, las L y las H. En mamíferos, la

proporción de cada tipo varía dependiendo del tejido, así los órganos que acumulan hierro como el hígado o el bazo, tienen alto contenido de cadena L, mientras que aquellos tejidos que requieren propiedades detoxificantes del hierro como el corazón y el cerebro, contienen mayor proporción de la cadena H (Lewin et al., 2005). El sustrato de la ferritina es  $\text{Fe}^{2+}$ , el cual es oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  mediante un centro ferroxidasa ubicado en las cadenas H y depositado dentro de la cavidad de la proteína. A pesar que se conoce muy bien el mecanismo mediante el cual el hierro es incorporado en la ferritina, poco se sabe acerca de cómo el hierro es liberado y de la regulación de dicho proceso. Estudios *in vivo*, indican que la liberación del hierro de la ferritina puede necesitar la degradación de la proteína por parte del lisosoma y/o proteosoma. Esto indica que el hierro entra en la ferritina por un mecanismo diferente al del que es liberado (De Domenico et al., 2008)

Además de realizar la función de almacenamiento para evitar la pérdida del metal, la ferritina secuestra el hierro libre impidiendo que éste se oxide mediante la reacción de Fenton y produzca las tóxicas ROS. La ferritina es mayoritariamente citosólica, pero es encontrada también en el núcleo y mitocondria, aunque también puede ser secretada. Las cadenas H de ferritina pueden translocarse al núcleo de algunos tipos celulares para proteger al DNA de la toxicidad del hierro. En mamíferos existe una ferritina mitocondrial, que posee actividad ferroxidasa y es capaz de almacenar hierro (Levi et al., 2001; Corsi et al., 2002) y de esta manera proteger a la mitocondria de la toxicidad del hierro y el daño oxidativo (Arosio et al., 2008).

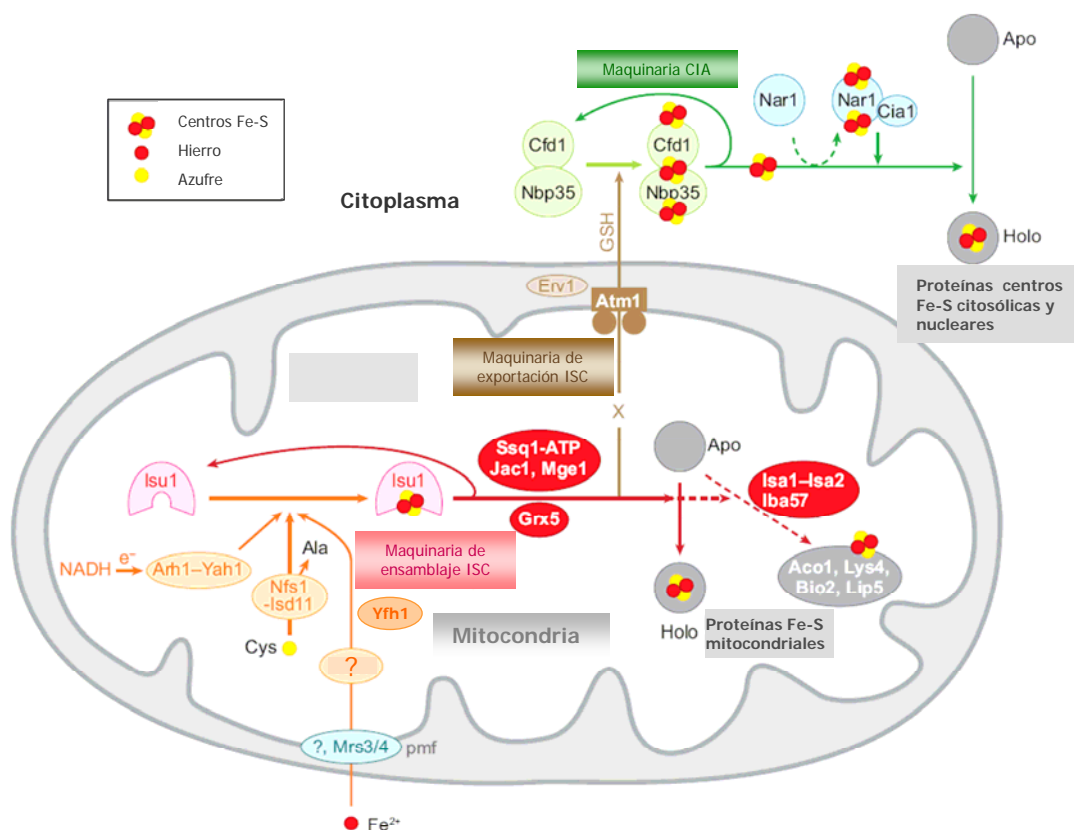
## 2.4 Biosíntesis y regulación de los centros Fe-S

Las proteínas que contienen centros Fe-S están localizadas en la mitocondria, citoplasma y el núcleo y en cada uno de dichos compartimentos celulares realizan funciones vitales para la célula (Napier et al., 2005). La habilidad que presentan los centros de deslocalizar electrones, tanto sobre los átomos de Fe como sobre los de S, hacen de los centros Fe-S ideales para mediar el transporte de electrones en los diferentes procesos biológicos de los que forman parte (Glaser et al., 2000).

En la mitocondria encontramos centros Fe-S en las proteínas de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones, en enzimas del ciclo del ácido cítrico como la aconitasa y la succinato deshidrogenasa, y en proteínas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos y en la biosíntesis de los propios centros Fe-S. También se las encuentra en el citosol participando de la regulación de la adquisición de hierro (IRP1 de humanos), en la biogénesis de centros Fe-S, en la biosíntesis de aminoácidos (Sheftel and Lill, 2009).

Asimismo existen proteínas con centros Fe-S localizadas en el núcleo involucradas en la síntesis y en la reparación de DNA así como en el ensamblaje de los ribosomas (Napier et al., 2005).

La gran mayoría de los estudios sobre los mecanismos de biogénesis de las proteínas con centros Fe-S han sido realizados en bacterias y levaduras. En estudios recientes se ha observado la existencia de un alto grado de conservación de dicho proceso entre eucariotas superiores y *S. cerevisiae* (Frazzon et al., 2002; Lill and Muhlenhoff, 2008). Si bien la síntesis de los centros Fe-S se realiza exclusivamente en la mitocondria, el ensamblaje de dichos centros en las apoproteínas puede también llevarse a cabo en el citoplasma. Para tal fin, existen dos maquinarias específicas que se encargan del ensamblaje y maduración de los centros Fe-S. Ellas son la maquinaria mitocondrial ISC (del inglés Iron-Sulfur Cluster) y la maquinaria CIA (del inglés cytosolic Fe-S protein assembly) localizada en el citoplasma (Figura I 13).



**Figura I 13: Modelo de la biosíntesis de los centros Fe-S en eucariotas.** (Fuente: Lill and Muhlenhoff, 2008).

Hasta la fecha, se conocen 15 proteínas que forman parte de la maquinaria de ensamblaje ISC. En un primer paso se produce la formación del centro con las moléculas de hierro y azufre en la proteína de ensamblaje Isu1, una de las proteínas mejor conservadas en la evolución y presentes virtualmente en todos los eucariotas (Tokumoto et al., 2004). El azufre es liberado de la cisteína e incorporado en Isu1 por medio de Nfs1 (Muhlenhoff et al., 2004). El hierro, por su parte entra en la mitocondria en su estado  $Fe^{2+}$  por medio de la proteína de membrana Mrs3/4 (Foury and Roganti, 2002). La transferencia del hierro a Isu1 es menos conocida, aunque algunos autores atribuyen dicha función a la frataxina o Yfh1, debido a que ha sido observada interaccionando con Isu1-Nfs1 (Gerber et al., 2003) y porque presenta la capacidad de unir hierro (Bencze et al., 2006). Sin embargo, como se explica en el siguiente capítulo y por los resultados presentados en esta tesis, como también por otros autores, frataxina no parece tener un papel esencial en la síntesis de los centros Fe-S. Por su parte, IscA es una proteína con gran capacidad de unir hierro que forma parte de la maquinaria de ensamblaje de los centros Fe-S en bacterias (Zheng et al., 1998), levadura (Isa) (Jensen and Culotta, 2000) y humanos (HiscA) (Cozar-Castellano et al., 2004). El hierro unido a IscA puede ser movilizado a través de L- cisteína y transferido a IscU (el homólogo de Isu en bacterias), razón por la cual es considerada como una chaperona encargada de unir el hierro libre y transportarlo para el ensamblaje de los centros Fe-S (Yang et al., 2006a). Este mismo grupo de trabajo comparó la función del homólogo de Yfh1 en bacterias (denominado CyaY) con IscA demostrando que ambas proteínas funcionarían como donadoras de hierro pero bajo diferentes condiciones, siendo CyaY tan solo necesaria bajo condiciones de estrés oxidativo (Ding et al., 2007). Sin embargo, otros autores asocian a las proteínas Isa1, Isa2 y Iba57 con un rol específico en la maduración de un grupo específico de apoproteínas, el cual incluye a las del tipo aconitasa (Muhlenhoff et al., 2007).

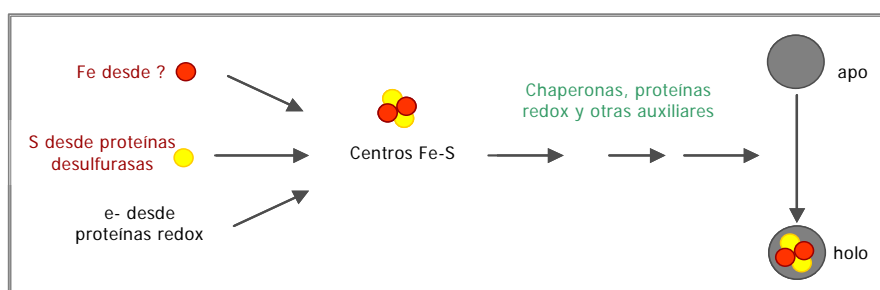
El ensamblaje de los centros Fe-S en Isu1 también depende de la transferencia de electrones provenientes de NADH por parte de Arh1 y Yah1 (Lange et al., 2000; Muhlenhoff et al., 2004).

En un segundo paso, el centro es liberado de Isu1 y transferido a las apoproteínas receptoras por coordinación con residuos específicos de los aminoácidos, para formar las holoproteínas funcionales. En este proceso participan al menos cuatro proteínas: Grx5, las chaperonas Ssq1, Jac1 y Mge1 (Vickery and Cupp-Vickery, 2007; Lill and Muhlenhoff, 2008). Parece claro que la función de la maquinaria de ensamblaje mitocondrial ISC es crítica para la formación de proteínas con centros Fe-S extramitocondriales. Existe un sistema de transporte, llamado maquinaria de exportación ISC, encargada de transportar los componentes necesarios para la maduración de las proteínas con centros Fe-S fuera de la

mitocondria. El componente central de dicha maquinaria es el transportador de tipo ABC, Atm1 (Kispal et al., 1999), como también lo son Erv1 y el glutatión.

Fuera de la mitocondria, la maquinaria CIA es la encargada del ensamblaje y maduración de las proteínas no mitocondriales con centros Fe-S. Esta maquinaria está formada por cuatro proteínas las cuales son esenciales para la viabilidad celular. Cfd1 y Nbp35 forman la plataforma donde son ensamblados los centros Fe-S que son transferidos a las apoproteínas; para ello se requiere la presencia de Nar1 y Cia1. La maquinaria CIA está altamente conservada en eucariotas (Lill and Muhlenhoff, 2008).

A modo de esquema general se puede resumir la biosíntesis de los centros Fe-S en la siguiente figura:



**Figura I 14: Esquema general de la biosíntesis de los centros Fe-S en eucariotas.**

## 2.5 Homeostasis del hierro

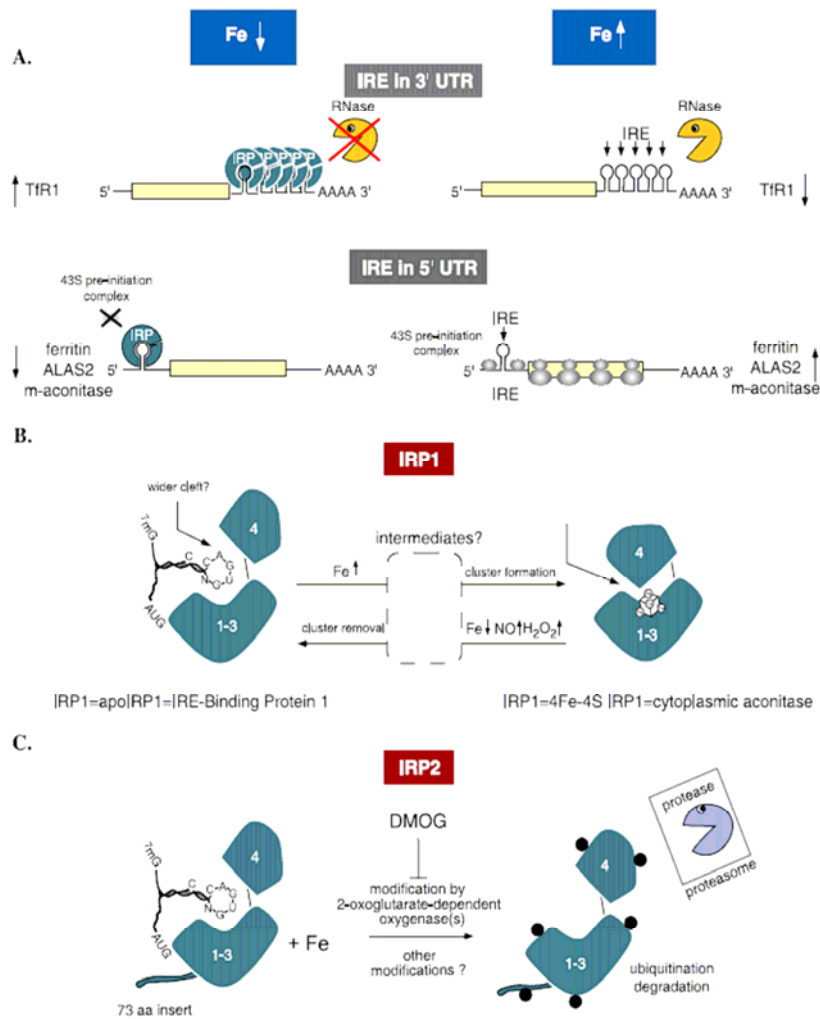
El balance de los niveles de hierro en las células u organismos, debe estar meticulosamente regulado tanto para proveer del hierro necesario y en las cantidades requeridas, como para impedir la toxicidad asociada a la excesiva acumulación del mismo. Esto conlleva una acción coordinada regulada por diferentes señales en respuesta a distintos estímulos. De esta manera, existen mecanismos de homeostasis que operan para balancear la excreción, absorción y almacenamiento del hierro mediante procesos de regulación transcripcional o post-transcripcional, tanto a nivel del organismo entero como a nivel celular.

La mayoría del hierro adquirido por la célula culmina en la mitocondria donde es incorporado a grupos prostéticos. En levaduras, el conjunto de genes que responden a adquisición y distribución de hierro en respuesta a la disponibilidad del hierro extracelular, están bajo el control de los activadores transcripcionales Aft1 y Aft2 (Philpott and Protchenko, 2008). Debido a que la delección en *AFT2* está asociada con defectos fenotípicos leves, se considera a Aft1 como el factor transcripcional de respuesta a hierro más importante. Bajo condiciones de falta de hierro Aft1 es translocado desde el citosol al núcleo mediante la interacción con

Pse1, donde activa genes relacionados con la adquisición del hierro a través de la pared celular, membranas y endosomas, así como los genes involucrados en la distribución del hierro en los diferentes compartimentos celulares (Yamaguchi-Iwai et al., 1995). La proteína de unión a RNA, Cth2, la cual se encarga de promover la degradación de los RNA mensajeros de enzimas que contienen hierro, también se encuentra bajo el control de Aft1 (Puig et al., 2005). La deficiencia en componentes de la maquinaria ISC pero no de los componentes de la maquinaria CIA provocan la activación de los factores transcripcionales Aft1/2. La delección en Grx5, Yfh1, Nfs1, Atm1 provocan la translocación de Aft1 al núcleo, provocando la entrada masiva de hierro en la célula. La activación de Aft1 requiere la presencia de las glutaredoxinas Grx3 y Grx4 y de otras dos proteínas Fra1 y Fra2 (Kumanovics et al., 2008). Todas ellas parecen estar implicadas en la ruta de señalización desde la mitocondria al núcleo detectando el correcto ensamblaje de los centros Fe-S, para ajustar la expresión de los genes involucrados en la adquisición y movilidad del hierro dentro de la célula. De esta manera, la respuesta de la levadura a bajas concentraciones de hierro celular, está más relacionada con la capacidad de formación de los centros Fe-S por parte de la mitocondria, que a su propia capacidad para adquirir el metal.

Al contrario de lo que sucede con la regulación del hierro por parte de los centros Fe-S, deficiencias en la síntesis de grupos hemo no provocan un aumento en los niveles de hierro celular. Por el contrario, en ausencia de hemo en levaduras, se observa una disminución de la transcripción de los genes relacionados con la adquisición y distribución de hierro y de cobre (Crisp et al., 2003).

En el caso de las células de mamíferos, la respuesta a los cambios en la capacidad de adquirir el hierro se realiza a través de mecanismos post-transcripcionales. Los RNA mensajeros que codifican para proteínas cruciales en la homeostasis del hierro (como la transferrina, ferritina, ferroportina, aconitasa, DMT1, etc.) contienen en su región 3' o 5' UTRs una o más estructuras en forma de horquilla conocidas como elementos de respuesta al hierro (IREs: *iron responsive elements*). Dos proteínas reguladoras de hierro, IRP1 y IRP2, se unen a dichos IREs y de esta manera desestabilizan o estabilizan el RNA mensajero. IRP1 es una proteína citosólica que cuando contiene un centro Fe-S presenta actividad aconitasa, mientras que en ausencia del mismo (en condiciones de bajo hierro y/o estrés oxidativo) resulta en una proteína con alta afinidad a los IREs. IRP2 por su parte no presenta unión a centro Fe-S y parece estar regulada postranscripcionalmente vía degradación dependiente de hierro (Sheftel and Lill, 2009).



**Figura I 15: Sistema regulatorio IRP/IREs.** A, la disminución de los niveles de hierro activa la unión de los IRPs a los IREs, resultando en la estabilización del mRNA del receptor de la transferrina y la inhibición transcripcional de la ferritina, ALAS2 y la aconitasa mitocondrial. Contrariamente, los IRPs no se unen a los IREs en las células con abundante hierro, permitiendo la degradación del mRNA del receptor de la transferrina y la transcripción de los RNAs de ferritina, ALAS y la aconitasa mitocondrial. B, Regulación post-transcripcional del bifuncional IRP1 en respuesta a hierro, NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. C, Degradación dependiente de hierro de IRP2 por un mecanismo que involucra oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato. (Fuente: Papanikolaou and Pantopoulos, 2005)

## 2.6 Desregulación de la homeostasis de hierro y sus consecuencias

Altos niveles de hierro mitocondrial han sido asociados al descenso de las proteínas con centros Fe-S o la biosíntesis de hemo, tanto en muestras de tejido animal como de enfermedades humanas. Entre los ejemplos de enfermedades asociadas a la falta de



proteínas mitocondriales implicadas en el metabolismo el hierro se encuentran las siguientes (Sheftel and Lill, 2009):

- ✓ La deficiencia en ISU provoca miopatía con intolerancia al ejercicio.
- ✓ La deficiencia en Grx5 conduce a una anemia hipocrómica en pez cebra y anemia microcítica en humanos.
- ✓ Mutaciones en *ABCB7* causan un tipo de anemia sideroblástica ligada al cromosoma X con ataxia.
- ✓ La deficiencia en los transportadores de hierro mitocondrial Mrs3/4 y mitoferrina causan una variante de la protoporfiria eritropoyética.
- ✓ La deficiencia en frataxina causa la Ataxia de Friedreich.

### 3 La Ataxia de Friedreich

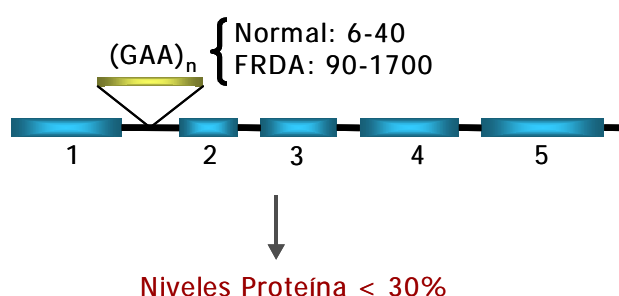
La ataxia de Friedreich (FRDA) fue descrita en 1863 por Nicholas Friedreich. Es una enfermedad neurodegenerativa, con herencia autosómica recesiva que afecta a 1 de cada 50.000 caucásicos. Es causada por la disminución de la expresión de la proteína mitocondrial llamada frataxina. Esta disminución se debe a la presencia de largas expansiones del triplete GAA en el primer intron del gen nuclear que codifica para la proteína (Campuzano et al., 1996). Los síntomas iniciales de la FRDA aparecen alrededor del principio de la segunda década de la vida de las personas afectadas. Además de los problemas neurológicos como la ataxia, la pérdida sensorial y el temblor muscular, existen otros síntomas comunes como la escoliosis, deformidad de los pies, hipertrófia y cardiomiopatía (Rotig et al., 2002). Aproximadamente el 10% de los pacientes de FRDA desarrollan diabetes. La neuropatía en el ganglio raquídeo está acompañada por la pérdida de fibras nerviosas sensoriales periféricas y por la degeneración de la columna posterior de la médula espinal. Dependiendo de la severidad de la enfermedad, muchos de los pacientes pueden perder la capacidad de caminar, mantenerse de pie, o sentarse a los 10 o 15 años de la aparición de la enfermedad, lo que resulta en muchos casos en la necesidad de silla de ruedas. Como es el caso de casi todas las enfermedades neurodegenerativas, no existe un tratamiento probado hasta el momento capaz de detener la evolución de la enfermedad (Pandolfo, 2009).

#### 3.1 El gen *FXN* y la frataxina

El gen *FXN* está localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (Jiralerspong et al., 1997). El RNA mensajero transcrito tiene un tamaño de 1,3 Kb y contiene 5 exones (Figura I 16) (Campuzano et al., 1996). La proteína codificada por dicho gen se denomina frataxina y contiene 210 aminoácidos. La frataxina presenta un péptido señal en su N-terminal que dirige su localización a la mitocondria. *FXN* se expresa en todas las células pero con niveles variables, los cuales dependen del contenido de mitocondrias de cada tipo celular (Campuzano et al., 1996). De este modo, en humanos adultos, el mRNA de *FXN* es más abundante en el corazón y en la médula espinal, seguidas por el hígado, músculo esquelético y el páncreas.

La mayoría de los individuos con FRDA tienen expansiones del triplete GAA en el primer intrón de los dos alelos del gen *FXN*, observándose en un número reducido de casos mutaciones puntuales en el gen *FXN* (Campuzano et al., 1996). Los alelos normales presentan pocas repeticiones (6-40) mientras que los enfermos pueden presentar hasta

1700 repeticiones del triplete (Figura I 16) (Pandolfo, 1999). Existen dos hipótesis que explican los mecanismos por los cuales las expansiones en los tripletes GAA son capaces de reducir la expresión de frataxina: la primera mediante la formación de estructuras triples de DNA llamadas "sticky DNA" las cuales interfieren en la elongación transcripcional (Ohshima et al., 1998), o bien mediante cambios epigenéticos que provocan la formación de heterocromatina y de este modo impiden la transcripción del gen (Herman et al., 2006). El tamaño de la expansión del triplete se relaciona inversamente con la expresión de la frataxina y con la edad de aparición de la enfermedad y directamente con la severidad de la misma (Durr et al., 1996).

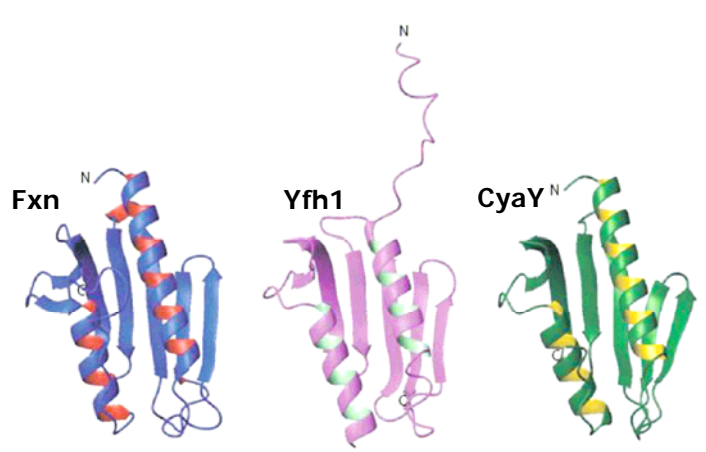


**Figura I 16: Representación esquemática del gen de la frataxina**

La frataxina es una proteína soluble de la matriz mitocondrial, asociada a la membrana interna de la mitocondria. Es sintetizada en el citosol como una molécula precursora de mayor tamaño (aprox. 25 kDa) y durante su internalización en la mitocondria la proteína es objeto de dos cortes proteolíticos produciendo la forma intermedia (aprox. 19 kDa) y por último la madura (aprox. 17 kDa) (Pandolfo, 2009). Sin embargo, en estudios recientes se ha encontrado que el procesamiento in vivo de la frataxina genera una proteína aún más corta. Ésta forma de 130 aminoácidos, parece ser la forma mayoritaria de la proteína madura siendo además completamente funcional (Schmucker et al., 2008). La proteína responsable de la maduración de la frataxina es la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) (Branda et al., 1999). Son necesarias también, Tim44 y Ssq1, que probablemente intervienen en el correcto plegamiento de la frataxina, haciendo que sea más accesible a los cortes de la MPP (Koutnikova et al., 1998).

La frataxina es una proteína esencial cuya deficiencia causa problemas metabólicos en los que se incluye el estrés oxidativo, el déficit de los centros Fe-S, defectos en la síntesis de hemo, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo energético, respuesta a estrés y función mitocondrial (Pandolfo and Pastore, 2009). La región C-terminal de la proteína (fxn, en

humanos; yfh1, en levaduras y CyaY, en bacterias) está altamente conservada desde bacterias a humanos, mostrando una identidad de secuencia del 25% y una similitud del 70%, indicando que dicha región es funcionalmente importante (Gibson et al., 1996). Estudios estructurales y bioquímicos llevados a cabo en dichos ortólogos, muestran que la proteína está formada por 5 a 7 láminas  $\beta$  antiparalelas que forman una plataforma plana donde se asientan un par de hélices  $\alpha$  paralelas entre sí, para formar un sándwich  $\alpha\beta$  compacto (Figura I 17) (Dhe-Paganon et al., 2000).



**Figura I 17: Estructura de los ortólogos de frataxina.** Comparación estructural del grado de similitud entre la frataxina humana (Fxn, Protein Databank número 1eKg); la de levadura (Yfh1, 2fql) y la de bacteria (CyaY; 1ew4).

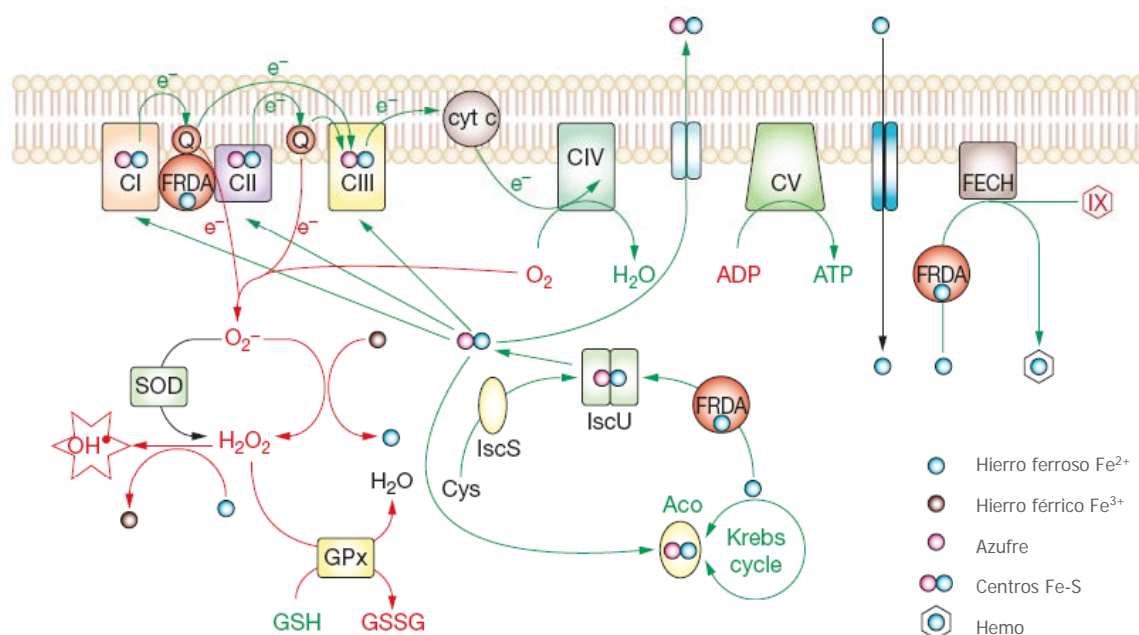
Tanto la estructura general de la proteína como también la superficie aniónica que la recubre está muy conservada en eucariotas, incluyendo, plantas, animales y levadura, y en procariontes. La distribución de los aminoácidos que forman parte de su superficie le permite a la frataxina unir hierro de forma directa. Esta capacidad parece estar relacionada con su función y con el metabolismo del hierro dentro de las células.

### 3.2 Posibles funciones de frataxina

Comprender la función de la frataxina en la mitocondria es fundamental para entender los mecanismos implicados en la patogénesis de la Ataxia de Friedreich. A pesar de una gran cantidad de trabajos realizados hasta la fecha con el fin de conocer el rol de la frataxina, aún no se conoce con certeza su función principal dentro de la célula.

Dentro de las posibles funciones, se ha observado que la frataxina está involucrada en diferentes aspectos del metabolismo intracelular del hierro y se la ha asociado con el control

del transporte mitocondrial de hierro (Babcock et al., 1997), como dador del hierro a la ferroquelatasa en el último paso de la biosíntesis de los grupos hemo (Yoon and Cowan, 2004), con la biosíntesis de los centros Fe-S (Huynen et al., 2001; Yoon and Cowan, 2003), en la reconstitución de la holo-aconitasa (Bulteau et al., 2004; Bulteau et al., 2005) y con el almacenamiento de hierro (Cavadini et al., 2002). Por otro lado se ha sugerido su implicación en la cadena respiratoria involucrada en la transferencia de electrones a la ubiquinona (Gonzalez-Cabo et al., 2005).

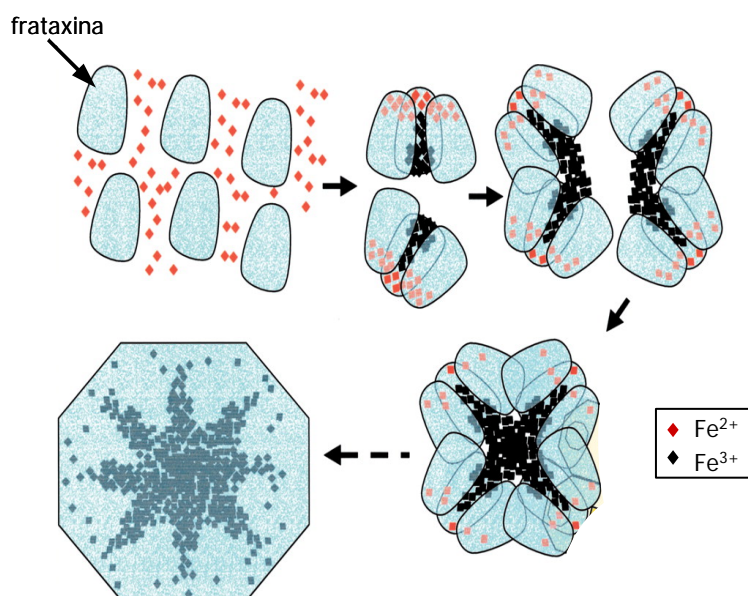


**Figura I 18: Posibles funciones de frataxina y el estrés oxidativo en la Ataxia de Friedreich.** Las flechas y el texto en color verde indican las moléculas y las vías que presentan disminuida su actividad en deficiencia de frataxina; flechas y texto en color rojo indican moléculas y vías que incrementan su actividad en deficiencia de frataxina. (Fuente: Pandolfo, 2008)

También se ha sugerido que frataxina podría tener un rol en el control de la supervivencia, debido a que numerosos trabajos demuestran que las células deficientes en frataxina son más sensibles al estrés oxidativo (Wong et al., 1999; Tan et al., 2001; Condo et al., 2007) y a que se encuentra tanto muerte autofágica y apoptótica en modelos animales deficientes en frataxina (Cossee et al., 2000; Simon et al., 2004).

### 3.2.1 Frataxina como almacenadora o detoxificadora de hierro

Si bien la estructura de frataxina difiere bastante de la de ferritina, estudios *in vitro* revelan que es capaz de almacenar hierro en un estructura central de forma y composición similar a la ferritina (Nichol et al., 2003; Park et al., 2003). Esto se debe a que Yfh1 oligomeriza cuando es expuesta a grandes cantidades de hierro, formando agregados de 48 subunidades capaces de unir hasta 50 átomos de hierro por monómero de proteína (Figura I 19) (Park et al., 2002; Park et al., 2003). CyaY de bacterias también presenta tendencia a agregarse, sin embargo no parece ser el caso de la frataxina humana, que solo lo hace cuando es sobreexpresada en *E. coli* (Cavadini et al., 2002). Además, se ha demostrado que la oligomerización de la proteína no es necesaria para su funcionamiento (Aloria et al., 2004), por lo que se ha sugerido que la frataxina podría jugar papeles diferentes dependiendo de las necesidades metabólicas de las células. Todo esto parece indicar que en el caso de poseer función de almacenamiento de hierro, no es al menos la más importante, más si tenemos en cuenta que en humanos existe una ferritina mitocondrial encargada de realizar dicha función (Levi et al., 2001).



**Figura I 19: Mecanismo postulado de oligomerización de Yfh1.** En situaciones de Fe<sup>2+</sup> saturantes, Yfh1 sería capaz de agruparse y formar una estructura similar a la ferritina. (Fuente: Park et al., 2003)

Otra de las posibles funciones propuestas para frataxina es la de estar involucrada en el control celular del estrés oxidativo mediante la reducción de la producción de las ROS. De este modo, se ha observado que la frataxina protege al DNA del daño oxidativo (O'Neill et al., 2005; Gakh et al., 2006). Este rol puede relacionarse con el de chaperona y/o de molécula de almacenamiento de hierro. Así, la frataxina sería capaz de unir el prooxidante  $Fe^{2+}$  y transformarlo en inerte  $Fe^{3+}$  a través de su actividad ferroxidasa (Park et al., 2002) y retenerlo unido (Park et al., 2003), impidiendo que reaccione con superóxido para generar ROS mediante la reacción de Fenton (Figura I 19).

### **3.2.2 Frataxina como chaperona de hierro en la formación de los centros Fe-S**

La implicación de frataxina en la biogénesis de los centros Fe-S fue sugerida por diferentes estudios que demostraron deficiencia de las proteínas que contenían centros Fe-S, tanto en enfermos de FRDA, en levaduras deficientes en Yfh1, como en ratones *Knockout* condicionales (Babcock et al., 1997; Foury and Cazzalini, 1997; Rotig et al., 1997; Foury, 1999; Puccio, 2009). Además se observó interacción experimental entre frataxina y el complejo de formación de los centros Fe-S, Isu1/Nifs (Gerber et al., 2003). Estas observaciones sugieren que la frataxina podría estar involucrada e la síntesis *de novo* de los centros Fe-S. De manera que fue postulado, pero no concluyentemente probado, que el rol de frataxina sería el de transportar y donar el hierro necesario para la formación de los centros Fe-S (Pandolfo and Pastore, 2009). Recientemente se ha propuesto que la frataxina podría actuar como un sensor de hierro y mediante la interacción entre CyaY y IscS regular la formación de los centros Fe-S, ajustando la cantidad de los mismos dependiendo de la disponibilidad de las apoproteínas (Adinolfi et al., 2009).

Por otro lado, existen evidencias que parecen indicar que la frataxina no es esencial para la síntesis de los centros Fe-S. Por ejemplo, en los estudios realizados por Foury y colaboradores, los cuales observaron que cuando el mutante de levadura deficiente en *YFH1* es cultivado en presencia de agentes quelantes de hierro, se logra la recuperación de los complejos respiratorios como la succinato deshidrogenasa, la cual presenta un centro Fe-S (Foury, 1999). Esto indicaría que la disminución de las actividades de proteínas con centros Fe-S se debe al daño causado por el exceso de hierro celular. Este hecho fue apoyado por los resultados obtenidos por otro grupo de trabajo que lograron la recuperación de la respiración y las actividades de proteínas con centros Fe-S, mediante la sobreexpresión del

gen *CCC1* que permitía recuperar los niveles normales de hierro en el citosol del mutante deficiente en *YFH1* (Chen and Kaplan, 2000).

### **3.3 Modelos de estudio de la ataxia de Friedreich**

#### **3.3.1 Levaduras**

El alto grado de conservación evolutiva de la frataxina y del resto de componentes mitocondriales, ha permitido el desarrollo de un modelo de la enfermedad en eucariotas unicelulares. Tanto frataxina como Yfh1 se localizan en la matriz mitocondrial (Babcock et al., 1997). En levaduras, la delección de *YFH1* puede ser sustituida por *FXN* indicando que las dos proteínas son funcionales y estructuralmente homólogas. El mutante deficiente en *YFH1* ( $\Delta yfh1$ ) acumula hierro y muestra un descenso de actividades de enzimas que contienen centros Fe-S (Babcock et al., 1997), de forma análoga a lo que sucede en las células de los enfermos de FRDA. Por estas razones, el modelo de *Saccharomyces cerevisiae* contribuye a comprender la función de frataxina, permitiendo además poner a prueba diferentes enfoques terapéuticos. En este contexto, *Candida albicans* también ha sido utilizada como modelo en el estudio del rol de la frataxina, donde su homólogo parece no estar implicado en la síntesis de los grupos hemo (Santos et al., 2004). La levadura es por lo tanto, un importante modelo mediante el cual se puede conocer el rol de la frataxina en la regulación y el tráfico intracelular de hierro, la biogénesis de los centros Fe-S y el metabolismo oxidativo (Puccio, 2009).

#### **3.3.2 Líneas celulares**

En los últimos años se han desarrollado diferentes modelos celulares, con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los organismos unicelulares como las levaduras. Entre ellos destaca la línea celular obtenida a partir de carcinoma embrionario de ratón, denominada P19 EC. Estas células presentan la característica de diferenciarse a diferentes tipos celulares dependiendo del tratamiento que se les aplique. De este modo, Santos y colaboradores diferenciaron dichas células a un fenotipo neuronal y a cardiomiocitos. Seguidamente fue realizado el silenciamiento de la frataxina mediante RNA antisentido en su modelo celular. Observaron un aumento del estrés oxidativo, con un considerable aumento de la inducción de Mn-SOD, que provocaba apoptosis en las células que se diferenciaban al fenotipo neuronal (Santos et al., 2001). Por otro lado, modelos de líneas celulares humanas



como HeLa y HEK293T han sido utilizadas con el fin de conocer los efectos causados por la disminución o la falta de la frataxina. Con tal fin, la tecnología del RNA de interferencia (RNAi) es una herramienta útil para lograr bajos niveles de la proteína (Stehling et al., 2004; Shan et al., 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se ha desarrollado un buen modelo de tipo neuronal humano, que refleje los efectos de la falta de frataxina en este tipo de tejido.

### 3.3.3 Organismos multicelulares

La frataxina es esencial para todos los organismos multicelulares. Como sucede en ratón, la delección completa de *FXN* en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila* detienen el desarrollo embrionario. Por esta razón la tecnología de RNA de interferencia ha resultado fundamental para el silenciamiento de la expresión de la frataxina en estos organismos. Los resultados obtenidos en el modelo de *C. elegans* son controvertidos debido a que algunos efectos encontrados son contradictorios entre distintos estudios. Este es el caso del efecto de la falta de frataxina sobre la vida media del organismo, siendo significativamente extendida en un caso (Ventura et al., 2005), pero disminuída según los resultados obtenidos por otro grupo de trabajo (Zarse et al., 2007).

Por otro lado, recientemente ha sido descrito el gen homólogo de frataxina en *Arabidopsis thaliana* el cual se denomina *AtFH*. Este gen es capaz de complementar al mutante nulo de levadura, indicando similaridad en sus funciones. El mutante *Knock-down Atfh1* presenta niveles reducidos de frataxina y disminución de actividades de enzimas con centros Fe-S como la aconitasa mitocondrial y la succinato deshidrogenasa. Asimismo, la deficiencia en frataxina, da lugar a niveles elevados de óxido nítrico, lo que los autores relacionan con el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo mediado por hierro (Martin et al., 2009).

#### 3.3.3.1 Modelos murinos de FRDA

Los modelos murinos proporcionan valiosa información de la cascada de acontecimientos asociadas a la FRDA, particularmente los estadios tempranos de la enfermedad que raramente son estudiados en humanos. Existen diferentes modelos de ratón para la enfermedad. Ellos son:

- ✓ Ratón knockout clásico, en el cual el gen *FXN* esta constitutivamente inactivado. El homocigota *Knockout* para frataxina muere en estadio embrionario. Por su parte, el heterocigota presenta un 50% de expresión de la frataxina, sin que ello lo lleve a un fenotipo patológico (Cossee et al., 2000).

- ✓ Diferentes modelos condicionales: a) delección de frataxina en neuronas, los cuales desarrollan cardiomiopatía, defectos en el movimiento y déficit en enzimas con centros Fe-S (el complejo I y III de la cadena de transporte de electrones y la aconitasa) sin embargo no se observaron depósitos de hierro (Puccio et al., 2001). b) delección de la frataxina en músculo estriado y corazón, donde se observa déficit de enzimas con centro Fe-S, disminución de la actividad total de SODs y acumulación de hierro al final de la vida, (Puccio et al., 2001; Chantrel-Groussard et al., 2001). c) delección de frataxina en células  $\beta$  del páncreas, para conocer la relación entre la FRDA y la diabetes (Ristow et al., 2003). d) delección inducible de la frataxina en neuronas, mostraron rasgos neurológicos, sensoriales e histológicos muy similares a los enfermos de FRDA, depósitos de hierro y deficiencia moderada en enzimas con centros Fe-S (Simon et al., 2004).
- ✓ Modelos basados en expansiones de las repeticiones del triplete GAA. Encontramos dos tipos: a) el denominado KIKO, obtenido a partir del cruzamiento de ratones *Knockin* con repeticiones del triplete GAA en el gen *FXN* y ratones *Knockout*. Estos ratones mostraron niveles de expresión de la frataxina del 25-30%, los cuales parecen ser compatibles con una función neurológica y un metabolismo del hierro normal. Por otra parte, los ratones *Knockin Knockin* (KIKI), mostraron una correlación entre el número de repeticiones del triplete GAA y la expresión de la frataxina similar a la observada en los enfermos de FRDA, por lo que parece un buen modelo para estudiar in vivo tratamientos terapéuticos encaminados a mejorar la expresión de frataxina (Miranda et al., 2002; Rai et al., 2008). b) el llamado modelo "humanizado" de repeticiones GAA, que convina el modelo *Knockout* constitutivo con la expresión transgénica de un cromosoma artificial de levadura (YAC) que contiene el locus humano de la frataxina con las expansiones del triplete GAA derivadas de un enfermo. Este modelo muestra un fenotipo neurodegenerativo progresivo con deficiencia locomotora, con síntomas muy similares a los que desarrollan los enfermos, como defecto de la actividad aconitasa y acúmulo de hierro en corazón, estrés oxidativo, defectos respiratorios, etc (Al-Mahdawi et al., 2004; De Biase et al., 2007).

Todos estos modelos son complementarios entre sí, permitiendo el estudio de diferentes aspectos de los mecanismos patofisiológicos involucrados en la enfermedad y pueden permitir probar diferentes enfoques terapéuticos (Puccio, 2009).

### 3.4 Posibles estrategias terapéuticas para la FRDA

Al hablar de tratamiento para las personas que padecen la ataxia de Friedreich, podemos remontarnos a los tiempos en que el gen *FXN* no había sido descrito. Entonces se asumía la estrecha relación entre la enfermedad y el estrés oxidativo, posiblemente basada en la falta de vitamina E. Tratamientos con la vitamina E en combinación con otro antioxidante como la coenzima Q10, así como los tratamientos con N-acetil cisteína (NAC), parecen ser alentadores (Hart et al., 2005). Sin embargo el antioxidante más ampliamente utilizado es el análogo de la coenzima Q llamado Idebenona (Pandolfo, 2008). Utilizado en homogenados de corazón, se observó que es capaz de proteger el complejo II, a lípidos y a la aconitasa del daño ejercido por el hierro. Estos estudios mostraron que el  $\text{Fe}^{2+}$  y no el  $\text{Fe}^{3+}$ , incrementa la lipoperoxidación y disminuye la actividad del complejo II de la cadena de transporte de electrones. Los resultados de un estudio realizado con un grupo placebo controlado y de doble ciego, llevado a cabo con idebenona parecen ser alentadores en cuanto a su tolerancia y a la posible eficacia de dicha droga incrementando las funciones neurológicas (Di Prospero et al., 2007; Schulz et al., 2009). Otra estrategia terapéutica se basa en el uso de quelantes de hierro. El quelante de hierro desferrioxamina logró proteger al complejo II del daño oxidativo, pero produjo la disminución de la actividad aconitasa (Rustin et al., 1999), lo que nuevamente pone de manifiesto la estrecha relación entre el estrés oxidativo y el exceso de hierro en ésta enfermedad. En este sentido y conociendo los elevados niveles de hierro mitocondrial en las mitocondrias de las células con déficit de frataxina, diversos investigadores iniciaron los estudios con quelantes de hierro como posible herramienta terapéutica. En este contexto, es de destacar que el quelante deferiprona mostró reducción de neuropatía y ataxia en pacientes con FRDA (Boddaert et al., 2007). Por su lado, en estudios realizados en fibroblastos de enfermos de FRDA, el quelante PCTH (2-piridylcarboxaldehído 2-tiofenocarboxil hidrazona) demostró ser más eficaz en la prevención de la citotoxicidad producida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (aumentando un 70% la viabilidad) comparado con otros quelantes como la deferiprona o la desferrioxamina (rescata la viabilidad entre un 1 y un 5%). La ventaja de este quelante parece ser su rápida penetración lo que resulta crucial para la células a la hora de protegerse del daño mediado por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Lim et al., 2008). Este hecho confirma que el daño oxidativo inducido por hierro juega un rol relevante en ésta enfermedad lo cual podría extenderse a otras enfermedades que muestren acumulación de hierro. A partir de estos resultados, parece lógico pensar que la combinación de tratamientos con antioxidantes, como la idebenona y quelates de hierro como el PCTH, podrían ser los siguientes estudios a tener en cuenta en los enfermos en FRDA.

## **II. MATERIALES Y METODOS**



## 1. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo se enumeran en la Tabla II 1.

**Tabla II 1:** Lista de las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizan en este trabajo, en la cual se incluye genotipo y comentarios correspondientes.

Nombre	Genotipo relevante	Comentarios y origen
W303-1A	<i>MATa</i> ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1	Cepa silvestre.
W303-1B	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1	Cepa silvestre.
MML298	<i>MATa</i> , <i>yfh::kanMX4</i>	Interrupción del gen <i>YFH1</i> en W303-1A, Dr. E. Herrero.
MML348	<i>MATa</i> , <i>aft1-<math>\Delta</math>5::URA3</i>	Interrupción del gen <i>AFT1</i> en W303-1A, Dr. E. Herrero.
MML350	<i>MAT<math>\alpha</math></i> ; <i>aft1-<math>\Delta</math>5::URA3</i>	Interrupción del gen <i>AFT1</i> en W303-1B, Dr. E. Herrero.
BQS100	<i>MATa</i> , <i>aft1-<math>\Delta</math>5::URA3 yfh1::kanMX4</i>	Producto del cruce de MML298 x MML350.
BQS102	<i>MATa</i> , <i>sod1d::URA 3</i>	Interrupción del gen <i>SOD1</i> en W303-1A.
BY4741	<i>MATa</i> , <i>his3 <math>\Delta</math>1; leu2 <math>\Delta</math>0; met15 <math>\Delta</math>0;ura3 <math>\Delta</math>0</i>	Cepa silvestre.
Y02769	<i>MATa</i> , <i>ydl059c::KanMX4</i>	Interrupción del gen <i>GRX5</i> en BY4741, EUROSCARF*.
96686 <sup>TM</sup>	<i>MATa</i> , <i>leu2-3, leu2-112 ura3-52 trp1-289 his3d-1</i>	Cepa silvestre.
96687 <sup>TM</sup>	<i>MATa</i> , <i>sod1d::URA 3</i>	Interrupción del gen <i>SOD1</i> en 96686 <sup>TM</sup> , Dr. E. Herrero (ATCC**).

\*European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Funcional Analysis (Universidad de Frankfurt), <http://web.unifrankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf>. \*\*American Type Culture Collection, <http://www.atcc.org>.

### 1.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las levaduras fueron crecidas en medio rico en presencia de 2% de glucosa (YPD) o 3% glicerol (YPG). También fueron utilizados medios sintéticos (SC) con glucosa o rafinosa. El medio sintético contiene una mezcla de bases nitrogenadas, aminoácidos y vitaminas, que son la combinación de los ingredientes mínimos con los requerimientos auxotróficos de la cepa. Esta mezcla es llamada "Drop-out". Se agrega al medio antes de ser esterilizado en autoclave. Su composición se muestra en la Tabla II 2.

**Tabla II 2:** Compuestos que forman parte del "Drop-out" y su cantidad en gramos por litro (Sherman, 2002).

<i>Aminoácido</i>	<i>g/l</i>	<i>Aminoácido</i>	<i>g/l</i>	<i>Aminoácido</i>	<i>g/l</i>
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
Asparagina	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

La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla a continuación:

<i>YPD</i>	
Glucosa	20g/l
Extracto de levadura	10g/l
Peptona	20g/l

<i>YPG</i>	
Glicerol	30g/l
Extracto de levadura	10g/l
Peptona	20g/l

<i>SC Glucosa</i>	
Glucosa	20g/l
YNB(yeast Nitrogen base)	6,7g/l
Drop-out	1,32g/l

<i>SC Rafinosa</i>	
Rafinosa	20g/l
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	5g/l
YNB ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> )	6,7g/l
Drop-out	1,32g/l

Los cultivos se hicieron crecer en un agitador orbital de calor seco a 180 rpm y temperatura constante a 30°C.

Asimismo, las placas de cultivo se realizaron del mismo modo que los medios líquidos pero con la adición de agar al 2% antes de ser autoclavados lo que permitía su solidificación.

Para los cultivos bacterianos de *Escherichia coli* se utilizó medio LB (Luria-Bertani) (Ausubel et al., 1989). Cuando era necesario se le agregaba ampicilina a una concentración final de 0,05 mg/ml. Las células se dejaban crecer a 37°C en agitador orbital a 200 rpm.

<i>LB</i>	
Extracto de levadura	5g/l
NaCl	10g/l
Triptona	5g/l

## 1.2. Medidas de tiempos de generación

Con el fin de conocer los tiempos de generación de las cepas de *S. cerevisiae* bajo diferentes tratamientos y condiciones, se realizaron cultivos a OD<sub>600</sub> inicial de 0.05 en placas de 24 pozos (Falcon). Las placas de cultivo (1ml por pozo) fueron incubadas en el lector de placas (*PowerWave, Biotek*) con agitación orbital a 30°C durante 18 horas. Las placas se cubrían 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 mediante Microsoft Excel.

## 2. TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.1. Extracción de DNA genómico

Para la obtención del DNA genómico de la *S. cerevisiae* las células fueron lisadas y el DNA extraído utilizando el kit comercial: *GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma). Se cuantificó el DNA extraído a 260 nm y la relación 260/280 nm utilizando NanoDrop 3.0.0, (Coleman Technologies Inc., USA). También se comprobó la cantidad y calidad del DNA extraído mediante electroforesis en gel de agarosa.

Esta purificación se realizó con el fin de transferir el cassette de delección del gen SOD1 de la cepa 96687<sup>TM</sup> al fondo genético W303.



## 2.2. Amplificación por PCR

Para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de DNA, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction, PCR*). La composición de la mezcla de reacción era la siguiente:

Mezcla de reacción		
Reactivo	Volumen( $\mu$ l)	Concentración final
DNA molde	5	2,4 $\mu$ g/ml
Oligonucleótido F	2	4 $\mu$ M
Oligonucleótido R	2	4 $\mu$ M
dNTPs	2,5	0,5 mM
Tampón de reacción	5	1x
H <sub>2</sub> O milli Q	33	
Volumen Final	50	

Se preparaba la mezcla sin la enzima y se iniciaba el programa en el termociclador. Pasados los primeros 5 minutos a 95°C se agregaba 0,5  $\mu$ l de Taq Polimerasa (*Accu Taq polymerase*, Sigma) y se continuaba según el siguiente programa:

### Programa

95°C 5min	} 30 ciclos
95°C 1min	
52°C 1min	
68°C 6min	
68°C 20min	

La amplificación por PCR se llevó a cabo con el fin de obtener el cassette de delección SOD1 de la cepa 96687<sup>TM</sup>. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Forward: 5'AAGAGAATTGGGCTCGAAGA3'  
Reverse: 5'CATATACATGCCCCGAGATCG3'3

## 2.3. Purificación de los productos de PCR

Una vez terminada la amplificación se retiraba el tubo de la placa del termociclador y se procedía a la purificación de los productos de PCR utilizando el kit comercial: *High Pure PCR product purification kit* (Roche). El fin de dicha purificación es eliminar los componentes de la reacción de amplificación que no son de interés y que pueden interferir en futuras aplicaciones como los oligonucleótidos, sales, nucleótidos no incorporados, DNA polimerasa, etc.

Una vez purificados los productos de la PCR, se procedía a comprobar su calidad y cantidad leyendo su absorbancia a 260/280 nm NanoDrop y electroforesis de DNA en gel de agarosa.

#### 2.4. Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA en gel de agarosa es el método más habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de DNA. En este estudio el porcentaje de agarosa utilizado fue de 0,8%.

Los diferentes fragmentos migran en función de su tamaño y conformación. El voltaje que se aplica depende de la resolución requerida, pero en general, se utilizan 1-10 V/cm (distancia entre electrodos).

La visualización de los fragmentos de DNA se consigue mediante la incorporación al gel de bromuro de etidio. Este agente se intercala entre las bases del DNA y emite fluorescencia.

Protocolo:

- Calentar 0,8 g de agarosa en 100 ml de TAE hasta que quede totalmente disuelta.
- Colocar la agarosa disuelta dentro del molde y colocar el peine.
- Dejar solidificar el gel y sacar el peine.
- Llenar la cubeta de electroforesis horizontal con TAE 1x.
- Cargar marcador de DNA (estándar DNA 1kB, Invitrogen).
- Cargar las muestras con *Loading Buffer* (LB).
- Aplicar voltaje constante a 100 V durante 45-50 min.
- Sumergir el gel en una solución con bromuro de etidio (0,5-1 µg-ml) durante 20-30 min e iluminarlo con luz ultravioleta a 354 nm para su visualización.

La composición de los tampones de carrera y del *loading buffer* eran los siguientes:

<i>TAE(1x) pH 8,5</i>	
Tris Base	40mM
Ácido acético glacial	20mM
EDTA	2mM

<i>Loading buffer 5X (LB)</i>	
Ficoll	15%(w/v)
Na <sub>2</sub> EDTA pH 8	0,1M
Azul de bromofenol	0,25%(w/v)

## 2.5. Obtención de DNA plasmídico

Para extraer el DNA plasmídico de *E. coli* se utilizaron dos kits comerciales: *Mini NucleoSpin Plasmid QuickPure kit (Macherey-Nagel)* y *Maxi Qiagen plasmid purification (Qiagen)* siguiendo los protocolos indicados por las casas comerciales.

La base del primer kit *Mini NucleoSpin Plasmid QuickPure* consiste en un primer paso donde las células bacterianas son resuspendidas y el DNA plasmídico es liberado mediante una lisis alcalina con SDS. Luego, el DNA plasmídico se une a una membrana de sílice, eliminándose todos los contaminantes. Por último el DNA es eluído.

El kit *Qiagen plasmid purification* se utilizó para la extracción de grandes cantidades de plásmido con el fin de producir lentivirus. Está basado en una lisis alcalina seguida por la unión del DNA plasmídico a una resina de intercambio iónico. EL DNA plasmídico es eluído en un tampón con alto contenido de sal que luego es eliminado y concentrado por precipitación con isopropanol.

## 2.6. Transformación celular

La transformación genética consiste en la introducción de DNA foráneo dentro de una célula y su posterior recombinación con el genoma de la célula. Existen diferentes tratamientos que alteran la permeabilidad de la membrana plasmática y permiten así la entrada de largos fragmentos de DNA dentro de la célula como por ejemplo, la exposición a sales de elevada fuerza iónica, descargas eléctricas, etc.

### 2.6.1. Transformación en *E. coli*

Con el fin de amplificar la cantidad de plásmido de interés, fueron transformadas células de *E. coli*.

Se utilizó la cepa *DH5 $\alpha$*  que fue sometida a tratamiento con CaCl<sub>2</sub> para producir las llamadas células competentes (Sambrook et al,1989). El proceso de transformación en bacterias se basa en someter a estas células a un choque térmico para permitir la entrada de DNA plasmídico.

Protocolo:

- Preparar 150  $\mu$ l de células competentes.
- Agregar 50 ng de DNA plasmídico.

- Mezclar y dejar en hielo 10 min.
- *Shock* térmico a 42°C durante 2 min.
- Enfriar 1 min en hielo.
- Agregar 900 µl de medio LB.
- Incubar 1 hora a 37°C a 350 rpm en Thermomixer Confort (Eppendorf)
- Centrifugar 2 min a 5000 rpm.
- Extraer 800µl de sobrenadante.
- Sembrar el resto en una placa de medio LB con ampicilina.
- Dejar crecer en estufa 37°C.
- Al día siguiente tomar una colonia y resembrar en LB con ampicilina.
- Glicerinar: tomar una colonia y crecer en medio LB líquido con ampicilina.

Tomar 600 µl de glicerol 50% y agregar 900 µl de cultivo crecido, conservar a 80°C.

La selección de las bacterias que incorporaron el plásmido se realizó mediante la adición de ampicilina, ya que los plásmidos de interés poseen resistencia a dicho antibiótico. Una vez seleccionadas se hicieron crecer en medio LB durante toda la noche y se le realizó extracción plasmídica.

### **2.6.2. Transformación en *S. cerevisiae***

En este trabajo se realizaron dos transformaciones en levadura. La primera se realizó con el fin de incorporar el plásmido pYC G-YDL120w (derivado del plásmido pRS416). Dicho plásmido contiene el gen *YFH1* con sus secuencias reguladoras.

La segunda transformación en *S. cerevisiae* se realizó con producto de amplificación de PCR. El objetivo en este caso, fue el cambio de cepa de la delección del gen *SOD1* al fondo de estudio W303. El protocolo utilizado fue el siguiente:

Protocolo:

- Recoger 10 ml de cultivo a  $OD_{600}=0,5$ .
- Lavar con 20 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril.
- Centrifugar 3 min a 3.000 rpm.
- Resuspender en 1 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril.
- Centrifugar 3 min a 3.000 rpm.
- Lavar con 1 ml de TE / Acetato de Lítio (LiAc) 0,1M pH 7,5.
- Centrifugar 3 min a 3.000 rpm.

- Resuspender en 500  $\mu$ l de TE /LiAc 0,1M pH 7,5.
- Hacer tantas alícuotas de 50  $\mu$ l como transformaciones se quieran realizar.
- A cada alícuota agregar 20  $\mu$ l de ssDNA de esperma de salmón, que actúa como *carrier*. Dicho ssDNA se descongela previamente durante 5 min a 95°C para desnaturalizarlo y luego se transfiere a 4°C.
- Agregar la cantidad de plásmido necesaria (aprox. 1 $\mu$ g).
- Agregar 300  $\mu$ l de 40% polietilenglicol (PEG)/ TE /LiAc 0,1M pH 7,5.
- Incubar 30 min a 30°C 800 rpm en Thermomixer.
- Incubar 15 min a 42 °C.
- Centrifugar 2 min a 3.000 rpm.
- Lavar con 1 ml de TE.
- Centrifugar 3 min a 3.000 rpm.
- Decantar el sobrenadante y con el resto de líquido que no se elimina resuspender el pellet. Sembrar dicho volumen en placas de medio SC complementadas con los complementos necesarios para la correcta selección de los transformantes.
- Incubar las placas a 30°C hasta visualizar colonias individuales.
- Analizar el crecimiento en placa y seleccionar una colonia.
- Amplificar una colonia en medio líquido.
- Comprobar la integración génica.

TE	
Tris	10mM
EDTA	1mM

## 2.7. Cruzamiento de cepas por esporulación

*S. cerevisiae* posee dos tipos sexuales:  $a$  y  $\alpha$ , determinados por sendos alelos heterocigotos:  $MATa$  y  $MAT\alpha$ . Si se cultiva una mezcla de dos cepas haploides en las que una de las dos cepas sea  $MATa$  y la otra  $MAT\alpha$ , se formará un cigoto que dará lugar a su vez a células diploides  $MATa/MAT\alpha$ . Estos diploides pueden mantenerse como tales o 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, las cuales 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 contenidos en cada una de las ascas. 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 et al, 2002).

En este trabajo cruzamos la cepa  $\Delta yfh1 MATa$ , con la cepa  $\Delta aft1 MAT\alpha$ , para dar lugar al doble mutante  $\Delta yfh1 \Delta aft1$ . Ambas cepas presentan marcadores diferentes ( $\Delta yfh1 MATa$  tiene el gen kanMX4 y  $\Delta aft1 MAT\alpha$  el gen URA3) y por lo tanto los diploides formados durante la esporulación fueron seleccionados en placas con geneticina y sin uracilo (gen+ura-).

Protocolo:

#### *Diploides y esporulación*

- Crecer en placa de YPD las cepas  $MATa$  y  $MAT\alpha$  específicas y cultivar 24 horas en estufa a 30°C.
- Hacer un *patch* mezclando la cepa  $MATa$  y  $MAT\alpha$  en la placa de YPD.
- Dejar crecer a 30°C para la formación de cigotos. A las 6 horas de incubación hacer una siembra por agotamiento en placa SC -ura +gen e incubar a 30°C durante 36-40 horas. Se distinguen colonias grandes (posibles diploides) y pequeñas (haploides).
- Resuspender 3 colonias grandes en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril y verificar al microscopio si presentan la forma alimonada típica de los diploides.
- Sembrar los diploides en *patch* en placa de YPD e incubar a 30°C durante 24-48 horas.
- Tomar cada *patch* de células y colocarlos en la placa de esporulación tratando que ocupen la menor superficie posible.
- Cerrar la placa y colocarla dentro de una bolsa dentro de estufa a 25°C durante 7-10 días.

#### *Procesamiento de esporas, separación de haploides*

- Verificar la formación de esporas al microscopio
- Mezclar 50  $\mu$ l de sorbitol 1M con 2,5  $\mu$ l de liticasa 10 mg/ml, en un tubo de 1,5 ml estéril.
- Agregar las células con las esporas con asa o palillo.
- Incubar a 30°C 10 min
- Parar la reacción introduciendo el tubo en hielo y agregar lentamente 150  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril.

- Comprobar la digestión de las tétradas al microscopio.
- Tomar 5-10  $\mu$ l y expandir en placa de YPD.
- Separar en micromanipulador (*SINGER MSM MODEL 300*).
- Incubar a 30°C durante 5 días.

#### *Selección de haploide doble mutante*

- Diluir cada colonia haploide en 100  $\mu$ l de PBS 1x estéril, tomando una muestra con un palillo.
- Sembrar 2  $\mu$ l de cada dilución en tres placas de selección diferentes: Placa YPD donde crecerán todas las colonias, Placa YPD con geneticina donde crecerán las que tengan la deleción en *YFH1* y placa SC –ura donde crecerán los que tengan deleción en *AFT1*. Aquellos clones que crezcan tanto en YPD con geneticina como en SC sin uracilo serán haploides doble mutantes  $\Delta yfh1\Delta aft1$ .

### **3. MÉTODOS DE ESTUDIO DE PROTEÍNAS**

#### **3.1. Obtención de extractos celulares totales**

La rotura de las células de *S. cerevisiae* se realizó mecánicamente mediante su agitación en presencia de tampón y *glass beads* en un agitador (Fast prep. FP120, Thermo Savant ó de MP Biomedicals). El tampón de lisis contiene los siguientes inhibidores de proteasas: 1mM fluoruro de fenilmetil sulfonil (PMSF), 0,1 mM *N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona* (TPCK) y 1  $\mu$ M pepstatina A.

Se utilizaron distintos tampones de extracción dependiendo del tipo de experimento a realizar. Ellos fueron: Tampón Tris-HCl ó Tampón Urea.

Protocolos:

##### a) Tampón Tris-HCl

- Recoger de 5 a 7 OD's de cultivo y lavar 2 veces con H<sub>2</sub>O fría.
- Resuspender las células en el tampón de lisis Tris-HCl 50mM pH 8.
- Agregar las *glass beads* y romper en dos ciclos de 30 seg a velocidad 5.0 (FastPrep).
- Centrifugar 5 min a 5.000 rpm.
- Recuperar el sobrenadante.
- Cuantificar el contenido de proteína por el método de Bradford.

b)Tampón Urea

- Recoger de 5 a 7 OD´s de cultivo y lavar 2 veces con H<sub>2</sub>O fría.
- Resuspender las células en 150 µl de tampón Urea 8 M, Tris-HCl 25 mM pH 8.0.
- Agregar las *glass beads* y romper en dos ciclos de 30 seg a velocidad 5.0 (FasPrep).
- Realizar un agujero mediante una aguja en el fondo del tubo de 1,5 ml y colocar otro por debajo.
- Centrifugar 2 min a 1.000 rpm.
- Descartar el tubo superior y agregar al de abajo 150 µl de Urea 8 M, CHAPS 4%, DTT 50mM.
- Mezclar utilizando vortex.
- Centrifugar 10 min a 12.000 rpm.
- Cuantificar el contenido de proteína por Bradford o NanoDrop.

**3.2. Obtención de extractos enriquecidos en su fracción mitocondrial**

Se realizó el enriquecimiento de la fracción mitocondrial de *S. cerevisiae* con el fin de determinar las actividades enzimáticas.

Protocolo:

- Recoger 1 g de células y lavar con H<sub>2</sub>O fría.
- Agregar 2 ml de Solución Reductora.
- Incubar 30 min a 30°C (600rpm en Thermomixer).
- Centrifugar 4 min a 3.500 rpm.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5,3 ml de buffer A.
- Centrifugar 4 min a 3.000 rpm.
- Resuspender el pellet en 2 ml de Buffer A y 15,5 µg de liticasa.
- Incubar a 60 min a 30°C (600 rpm Thermomixer).
- Centrifugar 7 min a 5.000 rpm a 4°C.
- Resuspender el pellet en 600 µl de Buffer A y 1.800 µl de Buffer B.
- Sonicar 20 seg a 3 micras (SoniPrep 150, Braun Biotech) en tubo de vidrio, en baño de hielo.
- Centrifugar 10 min a 2.000 xg.
- Tomar el sobrenadante y centrifugar 10 min a 10.000 rpm. La fracción mitocondrial queda en el pellet.



- Resuspender el pellet en 400  $\mu$ l de fosfato de sodio 25 mM pH 7.0. Este paso permite lavar y romper la membrana externa de las mitocondrias. Dividir en 4 tubos y centrifugar 10 min a 12.000 rpm.
- El pellet corresponde a la matriz mitocondrial. Congelar en nitrógeno líquido y conservar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

<i>Solución reductora</i>	
Tris-HCl pH 9,3	0,1 M
DTT	10 mM

<i>Buffer A</i>	
Fosfato sódico pH 7	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
EDTA	1 mM
Sorbitol	2 M

<i>Buffer B</i>	
Fosfato sódico pH 7	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
EDTA	1 mM
Sorbitol	0,2 M

### 3.3. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína en las diferentes muestras fue determinada mediante distintos métodos. El más utilizado fue el *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad) basado en el método de Bradford, utilizando como reactivo de cuantificación. Como patrón se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones.

Cuando la muestra presentaba SDS o algún otro reactivo que interfiriera con el método anterior, se utilizó *micro DC* de Bio-Rad basado en el método de Lowry. En este caso también se utilizó una curva patrón con BSA disuelta en una concentración de SDS igual a la muestra que se quería determinar.

Alternativamente se utilizó la absorbancia a 280 nm como medida de cuantificación de proteína. Para ello fue utilizado el espectrofotómetro NanoDrop que presenta la ventaja de requerir tan solo 2  $\mu$ l de muestra para su lectura.

También se utilizó el método fluorométrico Qubit™ -Invitrogen.

### 3.4. Sistemas electroforéticos

#### 3.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

En este tipo de electroforesis desnaturalizante se utiliza el detergente dodecilsulfato sódico (SDS), para permitir que las proteínas sean separadas según su peso molecular en un sistema de electroforesis discontinuo. Se utilizó el sistema *Mini-Protean 3* (Bio-Rad) principalmente para monodimensionales y el *Protean II xi cell* para bidimensionales de 18 cm x 18 cm (Bio-Rad).

Protocolo:

##### 1. Gel SDS-PAGE

<i>GEL CONCENTRADOR</i>	
Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,8)(p/p)	5% (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
Persulfato amónico	0,005% (w/v)
TEMED	0,025% (v/v)

<i>GEL SEPARADOR</i>	
Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM
Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,8)(p/p)	7-15% (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
Persulfato amónico	0,005% (w/v)
TEMED	0,025% (v/v)

##### 2. Preparación de las muestras

Previamente a la carrera, las proteínas presentes en las muestras a analizar se solubilizaban incubándose en presencia de SDS (5%),  $\beta$ -mercaptoetanol (5%) y EDTA (10mM) durante 3 min a 100°C. Posteriormente se agregaba sacarosa (5%) y azul de bromofenol (0,0125%). En el caso de cultivos celulares, a los extractos protéicos obtenidos con el tampón de lisis I (apartado 12), se les agregó el Tampón de carga (5X: Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 15%, azul de bromofenol 0,005%).

##### 3. Condiciones de carrera

La composición del tampón de electroforesis era el siguiente : Tris-HCl 25 mM pH 8.8; Glicina 192 mM; SDS 0,1%(w/v) . La carrera se desarrolló con una intensidad de corriente

de 15 mA por gel mientras las proteínas se encontraban en el gel concentrador y de 20-25 mA por gel cuando las proteínas se encontraban en el gel separador.

### **3.4.2. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes**

En la electroforesis nativa las proteínas migran en función de su carga, forma y peso molecular debido a que no se añaden detergentes iónicos ni ningún tipo de agente desnaturalizante a la muestra. Con este tipo de geles se pueden realizar estudios de la funcionalidad de las proteínas separadas, como por ejemplo actividades enzimáticas.

Los extractos celulares se obtenían según los protocolos del apartado 4.1. o 9. Previamente a la corrida se les agregaba sacarosa (5%) y azul de bromofenol (0,0125%). La corrida se realizaba a 4°C en las mismas condiciones eléctricas que en el caso anterior.

La composición del gel concentrador como del separador era igual a la descrita en el apartado 3.4.1 pero sin la presencia de SDS.

### **3.4.3. Electroforesis Bidimensional (2D)**

Esta técnica se basa en separar las proteínas de una determinada muestra biológica según su punto isoeléctrico (pI) mediante isoelectroenfoque y en segunda instancia según su peso molecular utilizando un sistema SDS-PAGE.

En este trabajo se utilizaron tiras IPG de rango de pH 3-10 no lineal de 7 ó 18 cm (Bio-Rad y Amersham). La mayoría de los geles utilizados para realizar la segunda dimensión fueron de 18 cm x 18 cm.

Protocolo:

#### **1. Preparación de la muestra**

Se utilizaron dos protocolos distintos para la obtención de las muestras:

##### **1.1. Precipitación con acetona**

- Obtener los extractos celulares según los protocolos del apartado 3.1 a) de Materiales y Métodos.
- Precipitar los extractos proteicos con 9 volúmenes de Acetona durante 45 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 5 min a 5.000 rpm.
- Lavar con 1 ml de Acetona 2 veces centrifugando a 5 min a 5.000 rpm.

- Resuspender el pellet en 100  $\mu$ l de tampón de rehidratación (RHB) y resuspender a temperatura ambiente en Thermomixer por un mínimo de 2 horas.
- Centrifugar 2 min a 10.000 rpm.
- Cuantificar la proteína por Bradford o NanoDrop.

### 1.2. Extracción con Urea

- Obtener los extractos celulares según los protocolos del apartado 3.1 b) de materiales y métodos.

### 2. Isoelectroenfoque (primera dimensión)

- Colocar las tiras en cubeta de rehidratación y cargar las proteínas disueltas en el RHB, para las tiras de 7 cm se cargaban de 40 a 60  $\mu$ g de proteína en 150  $\mu$ l de RHB y para las de 18 cm de 50 a 300  $\mu$ g de proteína en 340  $\mu$ l de RHB.
- Cubrir las tiras con aceite mineral.
- Colocar la cubeta en *Protean IEF cell* de Bio-Rad y rehidratar durante 16 horas a 20°C.
- Cambiar las tiras a la cubeta de isoelectroenfoque e iniciar el programa.

#### i. Tiras de 7 cm:

1. 250 V [↻] 15min
2. 6.000 V [↗] 2h
3. 6.000 V [↻] 24.000 V.h
4. 500 V [↻] 2 h

#### ii. Tiras de 18 cm:

1. 250 V [↻] 15min
2. 10.000 V [↗] 5h
3. 10.000 V [↻] 60.000 V.h
4. 500 V [↻] 2 h

- Una vez terminado el IEF retirar las tiras de la cubeta, eliminar el exceso de aceite mineral y congelar a -20°C.

### 3. Segunda Dimensión

- Descongelar las tiras durante 15 min y proceder a equilibrar las tiras.
- Equilibrar la tira durante 15 min con el tampón equilibrador I y 15 min con el tampón equilibrador II.

- Colocar las tiras en un gel SDS-PAGE preparado como se indica en apartado 3.4.1 y fijarlas con 1 ml de solución de agarosa (previamente fundida y atemperada).
- Llenar la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis y aplicar una intensidad de corriente de 6 a 9 mA por gel, dejándose correr toda la noche.

La composición de los tampones utilizados fue la siguiente:

<i>Tampón de rehidratación (RHB)</i>	
Urea	9 M
CHAPS	4% (w/v)
DTT	50 mM
Amfolitos	0,5% (v/v)
Azul de bromofenol	0,00125% (w/v)

<i>Tampón equilibrador I</i>	
Tris-HCl pH 8.8	0,375 M
Urea	6 M
SDS	2% (w/v)
DTT	130 mM
Glicerol	20% (w/v)

<i>Tampón equilibrador II</i>	
Tris-HCl pH 8.8	0,375 M
Urea	6 M
SDS	2% (w/v)
Iodoacetamida	135 mM
Glicerol	20% (w/v)

<i>Solución de agarosa</i>	
Tampón de electroforesis	1x (apartado 5.1)
Agarosa	0,5% (w/v)
Azul de bromofenol	0,002% (w/v)

#### 3.4.4. Tinción y análisis

En este trabajo se utilizaron tres tinciones diferentes: la tinción con colorante Azul de Coomassie; tinción con nitrato de plata y la tinción fluorescente.

*Azul de Coomassie:* se incubaban los geles durante 30 min en una solución colorante que contenía: Azul de Coomassie G250 0,1% (W/V), ácido acético 10% (V/V), isopropanol 25% (V/V). Posteriormente, se transfería a una solución decolorante: ácido acético 10% (V/V) y alcohol isopropílico 10% (V/V). Se la utilizó fundamentalmente para la tinción de proteínas en geles monodimensionales.

*Tinción con nitrato de plata:* fue utilizada principalmente para la visualización de las proteínas en geles bidimensionales. Se siguieron las indicaciones de los kits utilizados: Silver Staining kit Protein de GE Healthcare y ProteoSilver™ Plus de Sigma.

*Tinción fluorescente:* Los geles fueron incubados en una solución de fijación (metanol 10% y ácido acético 7%) durante 1 hora y luego transferidos a la de *Sypro Ruby* (Bio-Rad) donde se incubaron durante un mínimo de 3 horas protegidos de la luz. Esta tinción presenta la ventaja de ser compatible con MALDI-TOF, por lo que fue utilizada para teñir los *spots* de proteínas que luego se recortaron para ser identificados.

La adquisición de la imagen se realizó en el Densitómetro GS800 (Bio-Rad) para las tinciones Azul de Coomassie y nitrato de plata. El *Chemi Doc XRS* (Bio-Rad) fue utilizado para la visualización de las proteínas teñidas con *Sypro Ruby*. Las imágenes se analizaron mediante *Quantity One Software*, para el caso de monodimensionales o *PDQuest Software*, para bidimensionales(Bio-Rad).

### 3.5. Inmunodetección de proteínas

Las proteínas previamente separadas en un sistema SDS-PAGE pueden ser transferidas a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico. Una vez en la membrana estas proteínas pueden ser detectadas mediante anticuerpos específicos. En este trabajo han sido utilizadas mayoritariamente membranas de PVDF (Millipore). Para la inmunodetección de frataxina en extractos de cultivos celulares se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Invitrogen).

Protocolo:

1. Electrotransferencia de las proteínas del gel a membrana
  - Incubar la membrana PVDF con metanol durante 15 seg. La membrana de nitrocelulosa se incuba directamente con su tampón de transferencia.
  - Pasar la membrana a tampón de transferencia e incubar durante 15 min en agitación.
  - Incubar el gel a transferir en tampón de transferencia durante 1 min.
  - Hacer la transferencia con el sistema "Semidry" (Hoeffer Semiphor) aplicando una intensidad de corriente de 1 mA/cm<sup>2</sup> de membrana durante 1 hora.

La composición de los tampones utilizados se indican en las siguientes tablas:

<i>Tampón de Transferencia (PVDF)</i>	
Tris-HCl	480 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,0375 % (w/v)
Metanol	10% (v/v)

<i>Tampón de Transferencia (nitrocelulosa)</i>	
Tris-HCl	48 mM
Glicina	3,9 mM
Metanol	20% (v/v)

## 2. Inmunodetección

- Incubar la membrana con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación.
- Incubar con el anticuerpo primario de interés durante 1 hora. Las diluciones de anticuerpos utilizadas, así como el origen de las mismas se indican en la tabla adjunta.
- Realizar 3 lavados de 5 min con el tampón BI (TBS-T 95%, solución de bloqueo 5%).
- Incubar con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido en tampón BI.
- Realizar 5 lavados de 5 min con TBS-T.
- Incubar 5 min con sustrato de peroxidasa (*ECL Plus y ECL Advance Western Blotting Detection system de GE Healthcare*).
- Adquirir la imagen con *Chemidoc XRS* (Bio-Rad) y analizar mediante *Quantity One software* ó para el caso de geles bidimensionales mediante *PDQuest software* (Bio-Rad).

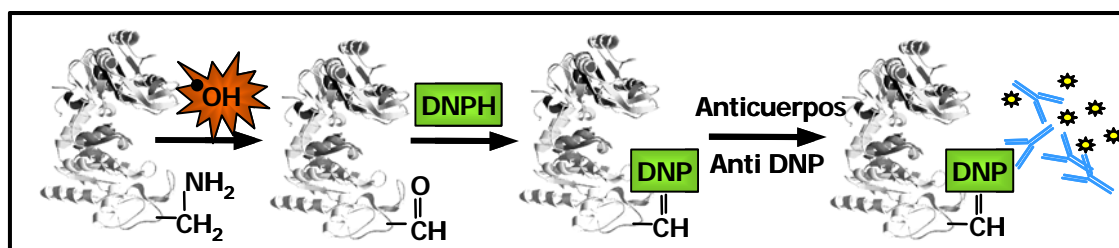
<i>Solución de bloqueo en PBS</i>	
I-Block (Tropix)	0,2%(w/v)
Tween-20	0,1% (v/v)

<i>TBS-T</i>	
Tris-HCl pH 8.0	20mM
NaCl	125mM
Tween-20	0,1%(v/v)

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Origen</i>
Anti-DNP	1:5000	DAKO (V0401)
Anti-aconitasa1	1:2000	Dr. R.Lill, Marburg, Alemania
Anti-SDH2	1:1000	Dr. B. Lemire, Universidad de Alberta
Anti-porina	1:1000	Molecular Probes (A6449)
Anti-frataxina	1:2500	Chemicon (MAB1594)
	1:200	Mitoscience (MSF01)
Anti-aconitasa2	1:1000	Sigma (HPA001097)
Anti-VDAC-1	1:5000	Invitrogen (A31855)
Anti-tubulina	1:50000	Sigma (T5168)
Anti-sod1	1:2000	Chemicon (AB1237)
Anti-sod2	1:2000	Stressgen (SOD-111)

### 3.5.1 Determinación de grupos carbonilo

La oxidación de los aminoácidos de las proteínas puede llevar a la formación de grupos carbonilo en las cadenas laterales de algunos los aminoácidos. Aunque existen diferentes compuestos que reaccionan con dichos grupos, el empleado en este trabajo ha sido la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Como resultado de la reacción se forman 2,4-dinitrofenilhidrazonas. La presencia del grupo dinitrofenilo (DNP) puede ser detectada mediante anticuerpos anti-DNP (Figura II 1). En este trabajo se ha utilizado el método de derivatización de grupos carbonilos descrito por Levine y colaboradores (Levine et al., 1994).



**Figura II 1: Esquema de la detección de los grupos carbonilo.** El ataque de un radical  $\text{HO}\cdot$  a la cadena lateral de un aminoácido genera un grupo carbonilo. El DNPH reacciona específicamente con el grupo carbonilo formándose una hidrazona estable que puede ser detectada inmunológicamente por medio de anticuerpos específicos anti-DNP.

Protocolo:

- Obtener los extractos celulares según el protocolo del apartado 3.1. de materiales y métodos.
- Cuantificar el contenido de proteínas por Bradford e igualar a  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
- Agregar un volumen de 24 % SDS hasta una concentración final de 6%.



- Calentar la muestra 3 min a 100°C y dejarla atemperar.
- Derivatizar agregando 1 Volumen de DNPH 10mM (Sigma) disuelto en 10% TFA (ácido trifluoroacético, Fluka).
- Incubar 10 min a 25°C (ser muy riguroso con el tiempo de incubación de cada tubo)
- Agregar 1 volumen de solución de neutralización (Tris-HCl 2M, Glicerol 30% (v/v), β-mercaptoetanol 15%(v/v)). La subida de pH a ~7 hace que la derivatización se detenga.

En el caso de monodimensionales cargar en un gel SDS-PAGE directamente con la muestra, transferir a una membrana PVDF y realizar el western blot anti-DNP.

Cuando se deseaba realizar la inmunodetección de grupos carbonilos mediante geles 2D, la derivatización se realizaba en las tiras de IPG tras la primera dimensión. En este caso las proteínas eran extraídas con urea (apartado 3.4.3 de materiales y métodos), se realizaba el IEF y se congelaban las tiras a -20°C. Luego se derivatizaba según el siguiente protocolo:

Protocolo:

- Lavar con 5-10 ml de H<sub>2</sub>O milliQ dependiendo del tamaño de las tiras (4 ml para tiras de 7 cm y 10 ml para tiras de 18 cm).
- Incubar con 5-10 ml de la solución de derivatización (10mM DNPH en TFA 10%) durante 20 min a temperatura ambiente y en agitación.
- Se procede al lavado, neutralización y equilibrado de las tiras antes de la segunda dimensión tal como se indica en el apartado 3.4.3 de Materiales y Métodos.
- Se transfieren las proteínas del gel a membrana de PVDF y se realiza la inmunodetección de los grupos carbonilo mediante el uso del anticuerpo específico.

### 3.6. Identificación de proteínas por huella peptídica

Los *spots* de proteínas a identificar fueron extraídos de geles previamente teñidos con plata o *Sypro Ruby* y dispuestos en placas *ZipPlate* (Millipore). En el caso de extraerse de un gel teñido con plata, se procedió a desteñir la porción del gel extraído siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Millipore).

Los fragmentos de gel fueron lavados con Bicarbonato de Amonio 50 mM y deshidratado con acetonitrilo, seguido por: (i) la reducción de cisteínas con DTT 10 mM, (ii) alquilación de las cisteínas libres con Iodoacetamida 55 mM, y (iii) digestión *in situ* con 170 ng de tripsina con incubación a 30°C durante toda la noche. La extracción de los péptidos del gel fue realizada

en la misma *ZipPlate* siguiendo las recomendaciones de Millipore. Dichos péptidos fueron disueltos en TFA 0,1%, acetonitrilo 50% y colocados sobre una placa de MALDI en presencia de la matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4 hidroxicinámico. Los espectros fueron obtenidos con un espectrómetro de masas *Voyager de PRO MALDI-TOF* (Applied Biosystems) operando en modo reflector. Se obtuvieron espectros con una resolución mayor a 8000. La calibración externa se realizó con la mezcla de calibración de Applied Biosystems. Los espectros fueron procesados con el programa *Data Explorer* (versión 4.0). La identificación de las proteínas se realizó mediante huella peptídica con la búsqueda en la base de datos *Swiss-Prot* utilizando *MASCOT* como herramienta de búsqueda. Fueron utilizadas las opciones: residuos de metionina oxidados (opcional) y residuos de cisteína carbamidometilados (opcional). En la búsqueda también se permitió un máximo de un corte tríptico perdido y una tolerancia máxima y un error en la masa del péptido de 100 ppm.

#### 4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

##### 4.1. Métodos espectrofotométricos

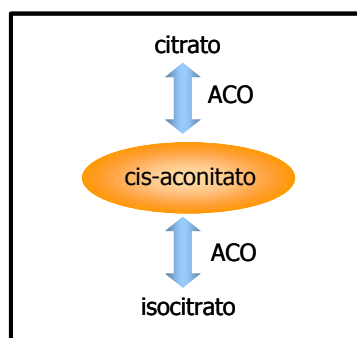
La determinación de las actividades enzimáticas fueron realizadas en el espectrofotómetro Shimadzu UV-2401.

Los extractos proteicos se obtuvieron siguiendo el apartado 3.1 a) con algunas variaciones en el tampón de extracción que serán indicadas en cada caso.

##### 4.1.1. Aconitasa (ACO)

La aconitasa cataliza la isomerización del citrato a isocitrato, tras la formación del intermediario cis-aconitato.

La actividad enzimática se realizó siguiendo el protocolo de Robinson (Robinson et al., 1987) en el cual se mide la desaparición de cis-aconitato.



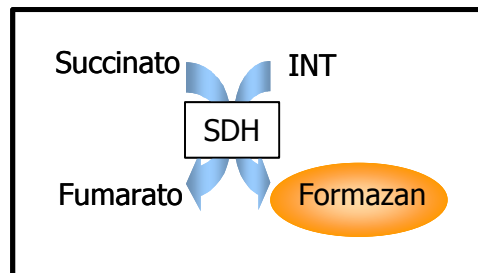
Protocolo:

- Las proteínas fueron extraídas con el tampón indicado en 3.1 a) pero centrifugando 2 min a 10.000 rpm.
- Mezclar en una cubeta de ensayo de cuarzo:
  - ✓ 500  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 40 mM, NaCl 50 mM pH 7,4.
  - ✓ 4  $\mu$ l de cis-aconitato a una concentración 7 mg/ml.
  - ✓ 4-8  $\mu$ l de extracto proteico.
- Medir la disminución de la absorbancia a 240 nm durante 1 min a 25°C.

Una unidad de enzima ACO se define como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1  $\mu$ mol de cis-aconitato por minuto. El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del cis-aconitato es 4,28 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2. Succinato Deshidrogenasa (SDH)

Esta enzima forma parte del complejo II de la cadena de transporte de electrones y contiene un centro Fe-S. La actividad enzimática fue determinada midiendo la formación de Formazán como se indica en la figura. Se utilizó el cloruro de iodonitrotetrazolio (INT) como aceptor de electrones (Munujos et al., 1993).



Protocolo:

- La extracción de proteínas se realizó como se indica en 3.1 a) de Materiales y Métodos con tampón a pH 8,3.
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno (340-800 nm):
  - ✓ 900  $\mu$ l de Reactivo A
  - ✓ 100  $\mu$ l succinato 200 mM
  - ✓ 5-10  $\mu$ l de extracto
- Mezcla de reacción inespecífica:
  - ✓ 900  $\mu$ l de Reactivo A

- ✓ 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ
- ✓ 5-10  $\mu\text{l}$  de extracto proteico.

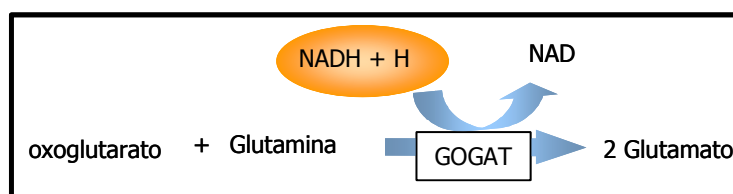
Reactivo A	
Tris-HCl (pH 8,3)	100 mM
EDTA	10 mM
INT	1 mg/ml
Cremophor EL	12 mg/ml

La absorbancia se medió durante 5 min a 500 nm a 25 °C. La actividad se calculaba tomando la porción lineal de la recta, descartando la subida inicial. A ésta actividad se descontaba la actividad inespecífica medida en las mismas condiciones.

Una unidad de enzima SDH se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de formazán por minuto ( $\epsilon_{\text{formazán}} = 19.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ):

#### 4.1.3. Glutamato sintasa (GOGAT)

Es una enzima mitocondrial que presenta centros Fe-S. La actividad de esta enzima se midió utilizando la tasa de oxidación de la nicotina adenina dinucleótido (NADH) (Cogoni et al., 1995).



Protocolo:

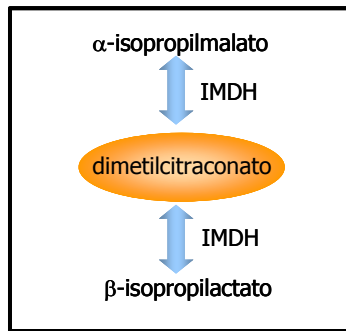
- La extracción de proteínas se realizó como se indica en 3.1 a) de Materiales y Métodos con tampón a fosfato de potasio pH 7,0 100mM. Y se centrifugó a 12.000 rpm 5min.
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno:
  - ✓ 50  $\mu\text{l}$  de oxoglutarato 100 mM.
  - ✓ 50  $\mu\text{l}$  de glutamina 100 mM
  - ✓ 50  $\mu\text{l}$  de NADH 3,2 mM.
  - ✓ 800-850  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaKPO}_4$  pH=7.0 100 mM.
  - ✓ +/- 50  $\mu\text{l}$  de azaserina 100mM.
  - ✓ 10-20  $\mu\text{l}$  de extracto proteico.

Se midió la absorbancia a 340 nm durante 2 min a 25°C. La actividad se calculaba descontando la actividad obtenida con azaserina en la mezcla de reacción (inhibidor específico de la actividad glutamato sintasa).

Una unidad de enzima glutamato sintasa se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.4. Isopropil Malato Deshidratasa (IMDH)

Esta enzima es una isomerasa citoplasmática que presenta un centro hierro azufre e interviene en la síntesis de la leucina. Se midió la actividad según Kohlhaw (Kohlhaw, 1988).



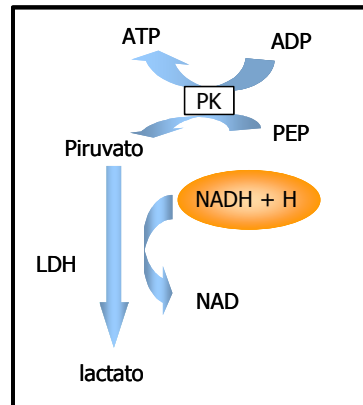
Protocolo:

- La extracción de proteínas se realizó como se indica en 3.1 a) de Materiales y Métodos con tampón a fosfato de potasio 100 mM pH 7,0 y se centrifugó a 12.000 rpm 5min.
- Mezcla de reacción en una cubeta de cuarzo de paso de luz de 1mm:
  - ✓ 300  $\mu\text{l}$  de citraconato ácido 3,3 mM disuelto en  $\text{NaKPO}_4$  100 mM pH 7.0.
  - ✓ 10  $\mu\text{l}$  de extracto.
- Mezcla de reacción inespecífica:
  - ✓ 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaKPO}_4$  100 mM pH 7.0.
  - ✓ 10  $\mu\text{l}$  de extracto proteico.
- Medir la actividad a 235 nm durante 7 min a 25°C. Calcular la actividad descontando la actividad intrínseca de extracto sin sustrato (reacción inespecífica).

Una unidad de enzima IMDH se define como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1  $\mu\text{mol}$  de dimetilcitraconato por minuto ( $\epsilon_{\text{dimetilcitraconato}} = 4,53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.5. Piruvato Quinasa (PK)

Esta es una enzima de la vía de la glucólisis, que cataliza la formación de piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP. Se midió acoplando la producción de piruvato a la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) tal como se observa en la figura (Fenton and Blair, 2002).



Protocolo:

- La extracción de proteínas se realizó como se indica en 3.1 a) de Materiales y Métodos con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 y centrifugándose a 12.000 rpm durante 5 min.
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno:
  - ✓ 730-740 µl de MES/KOH (pH 6,2) 0,1 M
  - ✓ 120 µl de PEP (fosfoenolpiruvato) 100 mM
  - ✓ 0,5 µl ADP 100mM
  - ✓ 10 µl NADH 30mM
  - ✓ 10 µl KCl 1M
  - ✓ 10 µl LDH 100u/ml
  - ✓ 100 µl MgCl<sub>2</sub> 100mM
  - ✓ 5-10 µl de extracto proteico.

En el caso de medir esta actividad en proteína pura, la mezcla de reacción en la cubeta presentaba los siguientes cambios:

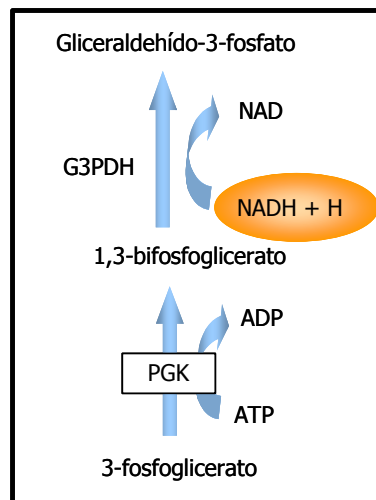
- ✓ 23,4 µl ADP 100mM
- ✓ 9 µM de proteína piruvato kinasa pura.

Se midió la actividad a 340 nm durante 1 min a 25°C.

Una unidad de enzima PK se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.6. Fosfoglicerato Quinasa (PGK)

Es una enzima que forma parte de la glucólisis e interviene en la conversión del 1,3-bifosfoglicerato a 3-fosfoglicerato. Se midió su actividad acoplándola a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) a través de la oxidación de NADH (Maitra and Lobo, 1971).



Protocolo:

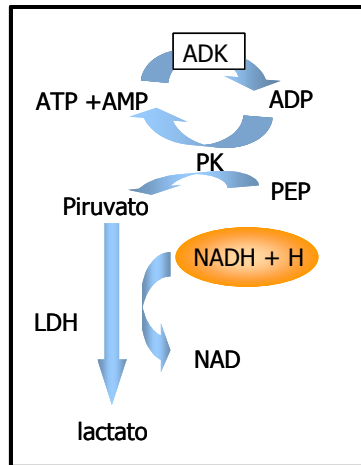
- La extracción de proteínas se realizó como se indica en 3.1 a) de Materiales y Métodos con tampón a fosfato de sodio pH 7,4 50 mM, EDTA 1 mM y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5min.
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno:
  - ✓ 940-950  $\mu\text{l}$  de fosfato de sodio 50 mM pH 7,4
  - ✓ 10  $\mu\text{l}$  de ATP 100 mM
  - ✓ 10  $\mu\text{l}$  NADH 3 mM
  - ✓ 10  $\mu\text{l}$  DTT 2 mM
  - ✓ 10  $\mu\text{l}$  G3PDH 100 U/ml
  - ✓ -/+10  $\mu\text{l}$  3P Glicerato
  - ✓ 5-10  $\mu\text{l}$  de extracto proteico.

Se midió la absorbancia a 340 nm durante 1 min a 25°C, sin y con 3PGlicerato. La actividad se calculó restando la actividad inespecífica (sin 3PGlicerato).

Una unidad de enzima PGK se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.7. Adenilato Quinasa (ADK)

Es una enzima que mantiene el equilibrio entre los nucleótidos de adenina en el citosol (ADP, AMP y ATP). Se midió su actividad acoplándola a la Piruvato quinasa (Konrad, 1988).



Protocolo:

- La extracción de proteínas se realizó como se indica en 3.1 a) de Materiales y Métodos con tampón Tris-HCl 50mM pH 7,5, KCl 50 mM y centrifugándose a 12.000 rpm durante 5min.
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno:
  - ✓ 900  $\mu$ l de Tris-HCl 0,42 M pH 7,5
  - ✓ 5  $\mu$ l de PEP 100 mM
  - ✓ 20  $\mu$ l ATP 100 mM
  - ✓ 20  $\mu$ l AMP 100 mM
  - ✓ 10  $\mu$ l NADH 25 mM
  - ✓ 10  $\mu$ l KCl 1 M
  - ✓ 10  $\mu$ l LDH 1000 U/ml
  - ✓ 10  $\mu$ l  $MgCl_2$  100 mM
  - ✓ 10  $\mu$ l PK 5000 U/ml
  - ✓ +/- 10  $\mu$ l de  $P^1, P^5$ -Di(Adenosina-5') penta-fosfato 100 mM.
  - ✓ 5  $\mu$ l de extracto proteico.

Se midió la actividad a 340 nm durante 5 min a 25°C. Se descontó la actividad inespecífica mediante el uso del inhibidor específico  $P^1, P^5$ -Di(Adenosina-5') penta-fosfato.

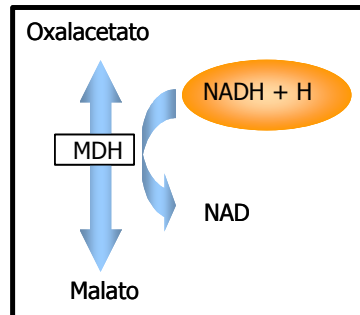
A cada muestra le fue restada la actividad obtenida con inhibidor.

Una unidad de enzima ADK se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu$ mol de NADH por minuto ( $\epsilon_{NADH} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).



#### 4.1.8. Malato Deshidrogenasa (MDH)

Es una enzima del Ciclo del Ácido Cítrico que convierte el malato en oxalacetato (OAA). La actividad se mide por la oxidación del NADH cuando se agrega OAA como sustrato en la mezcla de reacción (Robinson et al., 1987).



Protocolo:

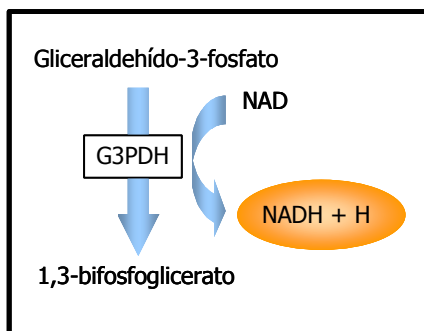
- La extracción de proteínas se realizó como se indica en 3.1 a) de Materiales y Métodos con tampón Fosfato de Potasio 100mM pH 7,4, centrifugándose a 10.000 rpm durante 5 min.
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno:
  - ✓ 960  $\mu$ l de Fosfato de Potasio 100 mM pH 7,4
  - ✓ 20  $\mu$ l NADH 5 mg/ml
  - ✓ 10  $\mu$ l OAA 6,4 mg/ml
  - ✓ 10  $\mu$ l de extracto proteico.

Se midió la actividad a 340 nm durante 1 min a 25°C.

Una unidad de enzima MDH se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu$ mol de NADH por minuto ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.9. Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa (G3PDH)

Esta enzima interviene en la glucólisis. En este caso se mide la formación de NADH siguiendo el protocolo de McAlister (McAlister and Holland, 1985).



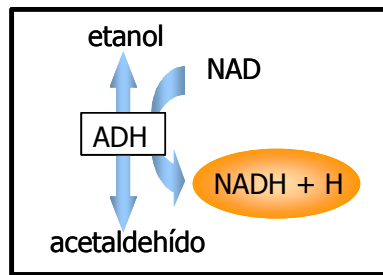
Protocolo:

- La extracción de proteínas se realizó como se indica en 3.1 a) de Materiales y Métodos con tampón Fosfato de Potasio 100 mM pH 7,4, centrifugándose a 10.000 rpm durante 5 min.
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno:
  - ✓ 860  $\mu$ l de Fosfato de Potasio 100 mM pH 7,4
  - ✓ 100  $\mu$ l EDTA 100 mM
  - ✓ 20  $\mu$ l  $\text{NAD}^+$  66 mg/ml
  - ✓ 13  $\mu$ l gliceraldehído-3-fosfato 306 mM
  - ✓ 10  $\mu$ l DTT 10mM.
  - ✓ 10  $\mu$ l de extracto proteico.
- Medir la actividad a 340 nm durante 1 min a 25°C.

Una unidad de enzima ADK se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu$ mol de NADH por minuto ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.10. Alcohol Deshidrogenasa (ADH)

La Alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) cataliza la conversión de acetaldehído a etanol. Esta enzima está formada por cuatro subunidades. El sitio activo de cada subunidad presenta un átomo de Zinc. En el presente trabajo se midió la formación de NADH en presencia de etanol.



Protocolo:

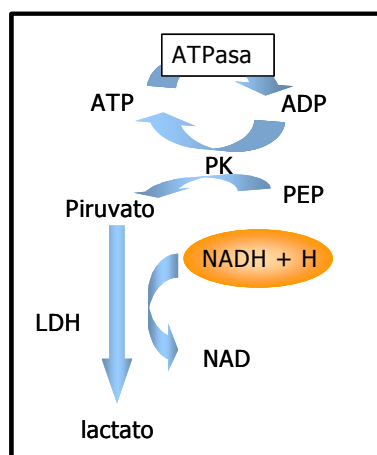
- En este caso se trabajó con proteína pura (Fluka ref. 05635) dializada en Tris-HCl 0,1M pH 7,0.
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno:
  - ✓ 890  $\mu$ l de Tris-HCl 0,1M pH 7,5
  - ✓ 100  $\mu$ l etanol 3 M
  - ✓ 10  $\mu$ l  $\text{NAD}^+$  62,5 mM
  - ✓ 2,5  $\mu$ l de extracto proteico.

Se midió la actividad a 340 nm durante 1 min a 25°C.

Una unidad de enzima ADH se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la reducción de 1  $\mu$ mol de  $\text{NAD}^+$  por minuto ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.11. $\text{F}_1\text{F}_0$ ATP Sintasa

Esta enzima está compuesta de dos complejos: uno anclado a la membrana interna de la mitocondria llamado  $\text{F}_0$  y otro encarado a la matriz mitocondrial llamado  $\text{F}_1$ . Está encargada de sintetizar ATP a partir de ADP; un grupo fosfato y la energía suministrada por un gradiente de protones ( $\text{H}^+$ ).



En presencia de bajas concentraciones de detergentes no iónicos, el fragmento  $F_1$  puede liberarse y adquirir actividad ATPasa. Esta actividad fue medida acoplada a la actividad PK y LDH (Mueller, 1988)

Protocolo:

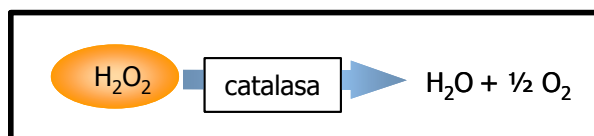
- La extracción de proteínas se realizó a partir de la fracción mitocondrial enriquecida como se indica en el apartado 3.2 de materiales y métodos. Las mitocondrias fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de HEPES/KOH (pH=8,0) 50 mM, glicerol 20% (v/v) y Triton X-100 0.4% (v/v).
- Mezcla de reacción en la cubeta de poliestireno:
  - ✓ 900  $\mu$ l de HEPES/KOH (pH= 8,0) 50 mM, glicerol 20%(v/v)
  - ✓ 10  $\mu$ l  $MgCl_2$  100 mM
  - ✓ 1  $\mu$ l ATP 100 mM
  - ✓ 10  $\mu$ l NADH 30 mM
  - ✓ 10  $\mu$ l PEP 100 mM
  - ✓ 10  $\mu$ l LDH 3 mg/ml
  - ✓ 10  $\mu$ l PK 1500 U/ml
  - ✓ -/+ 3  $\mu$ l 2 mg/ml oligomicina
  - ✓ 5  $\mu$ l de extracto mitocondrial

Se midió la absorbancia a 340 durante 3 min a 25°C. La oligomicina es un inhibidor de la actividad ATPasa. Se mide la actividad durante 1 min con toda la mezcla de reacción menos la oligomicina. En la misma cubeta se agrega la oligomicina y se mide durante 2 minutos más. Se calcula la actividad específica descontando el primer minuto.

Una unidad de enzima ATP sintasa se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu$ mol de NADH por minuto ( $\epsilon_{NADH} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.12. Catalasa

La actividad catalasa se basa en la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La disminución del  $H_2O_2$  se midió a 240 nm según el método descrito por (Jakubowski et al., 2000).



Protocolo:

- ✓ Los extractos proteicos fueron obtenidos con tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0 y como se indica en el apartado 3.1 a).
- ✓ Agregar los extractos proteicos a una solución extemporánea de 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ✓ Esperar 5 segundos y medir la velocidad de disminución de la absorbancia a 240 nm durante 1 min.

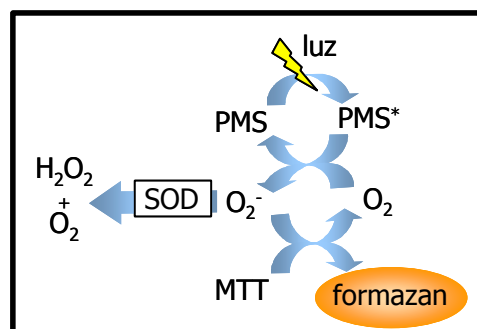
Una unidad de enzima catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la descomposición de 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto ( $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} = 4,56 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.2. Actividades Enzimáticas en gel: Zimograma

##### 4.2.1. Superóxido Dismutasa (SOD)

Este ensayo se basa en 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 superóxido generado por la reacción del PMS excitado con el oxígeno. La excitación del PMS se consigue mediante la exposición de la mezcla de reacción a la luz.

La eliminación del superóxido evitará la formación del precipitado formazán y aparecerán en el gel bandas claras que corresponden a la actividad SOD.



Protocolo:

- Preparar un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (apartado 3.4.2 de materiales y métodos).
- Obtener los extractos proteicos (apartado 3.1.a ó 9 de materiales y métodos).
- Cargar de 15-30 μg de proteína por carril y correr el gel a 15-20 mA a 4°C.
- Incubar el gel en la solución de tinción en presencia de luz con agitación. Las bandas de actividad de SOD aparecen claras sobre un fondo oscuro.

- Lavar con agua y capturar la imagen en densitómetro.
- Analizar y cuantificar con *Quantity-One* (Bio-Rad).

<i>Solución de Tinción</i>	
Tampón Tris-HCl 50mM pH 8.5	80 ml
MTT	10mg
PMS	6mg
MgCl <sub>2</sub>	15mg

## 5. OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS POR ASCORBATO Y HIERRO

Las proteínas fueron obtenidas de Sigma (piruvato quinasa, ref. P1506; fosfoglicerato quinasa ref. P7634). La pureza de las preparaciones fue testada en SDS-PAGE y su identidad fue verificada mediante huella peptídica tras su digestión trípica. Se confirmó que ellas correspondían a piruvato quinasa de conejo (Swiss-Prot No. P11974) y fosfoglicerato quinasa de levadura (Swiss-Prot No. P00560). También se utilizó Alcohol deshidrogenasa I (ADH1) como control (Fluka ref. 05635). Las preparaciones comerciales de PGK y ADH1 fueron dializadas en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7,3, durante 1 h a 4°C en mini unidades de diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce). Con el fin de eliminar el fosfato tetrasodio presente en la preparación comercial de PGK se realizó un lavado en una columna de gel filtración *Hi-Trap desalting* (GE Healthcare), utilizándose el sistema cromatográfico AKTA (GE Healthcare) y como solvente el tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7,3.

La inactivación de las enzimas fue realizada en tubos de 1,5 ml de polipropileno en un Thermomixer a 20°C y 1000 rpm. La mezcla de reacción (20µl) contenía 180 pmol de piruvato quinasa o fosfoglicerato quinasa y las cantidades indicadas en Resultados (apartado 2.4. y 2.5.) de ascorbato, FeCl<sub>3</sub>, sulfato de amonio ferroso, ATP, CTP ó MgCl<sub>2</sub>.

## 6. DETERMINACIÓN DE METALES E IONES

### 6.1. Determinación del contenido de hierro intracelular total

Para la cuantificación de hierro total se utilizó el método desarrollado por Fish modificado para levadura (Tamarit et al, 2006- Artículos Publicados). Este método se basa en la reducción y solubilización del hierro presente en la muestra y la posterior cuantificación

colorimétrica debido al cambio de absorbancia que sucede cuando un quelante de hierro (batofenantrolina disulfonato, BPS) se une a este metal.

Protocolo:

- Tomar 5 OD's ( $2 \times 10^8$  de células) y lavar 2 veces con  $H_2O$  milliQ.
- Resuspender el pellet en ácido nítrico al 3%(v/v).
- Incubar a  $98^\circ C$  durante 12 h.
- Centrifugar 5 min a 10.000 rpm.
- Tomar 400  $\mu l$  del sobrenadante y agregar 160  $\mu l$  de ascorbato de sodio 38 mg/ml y 126  $\mu l$  de solución de acetato de amonio (acetato de amonio saturado diluido 1/3).
- Medir la diferencia entra la absorbancia a  $\lambda=535nm$  y  $\lambda=680 nm$ .
- Agregar BPS para que quede a una concentración final de 34  $\mu g/ml$ .
- Medir de nuevo la diferencia de absorbancia entre  $\lambda=535$  y  $\lambda=680 nm$ . Descontar 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 subtrae 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).

## 6.2. Determinación de la cantidad de hierro intracelular quelable

La cuantificación del hierro quelable o libre fue realizada utilizando microscopía confocal y el quelante de hierro fluorescente *Phen Green SK diacetato* (Molecular Probes). Dentro de las células, esta sonda se une al hierro lo que apaga su fluorescencia. La unión entre *Phen Green SK* y el hierro es revertida por la adición de fenantrolina que es un quelante de hierro permeable a la membrana plasmática. El aumento de fluorescencia permite estimar el hierro quelable intracelular en células vivas, como ilustra el esquema adjunto.



Protocolo:

- Tomar 1 OD de cultivo creciendo en medio YPD en fase exponencial.
- Centrifugar 2 min a 12.000 rpm.
- Lavar con 1 ml de medio SC y centrifugar 2 min a 12.000 rpm.
- Resuspender en 300  $\mu$ l de medio SC + 20  $\mu$ M de *Phen Green SK diacetato*.
- Incubar 20 min sobre un cubreobjeto previamente tratado con concanavalina A (Sigma ref. C2010) 1mg/ml que permite unir las células al cubreobjetos.
- Montar el cubreobjetos en la cámara de confocal invertido y lavar 3 veces con 500  $\mu$ l de medio SC.
- Agregar 300  $\mu$ l de medio SC y colocar en el microscopio confocal (Olympus FV500) .
- Las imágenes fueron tomadas con el láser de argón ( $\lambda_{\text{excitación}}$  488 nm) y un filtro 505 nm *long-pass*. El objetivo utilizado fue 60x/1,40 NA Olympus PlanApo.
- Medir la liberación dinámica del hierro de la sonda *Phen Green SK diacetato* tomando un total de 60 imágenes cada 5 segundos.
- En la imagen 12 (1min) agregar 3  $\mu$ l de 1,10-fenantrolina 0,4 M (preparada extemporáneamente).
- Analizar los datos utilizando el programa *Olympus Fluoview* y *Microsoft Excel*.

### 6.3. Determinación del contenido de manganeso intracelular

El contenido de manganeso fue efectuada por la técnica de absorción atómica de horno de grafito en un equipo *Varian SpectrAA* con corrector Zeeman, en condiciones estándares.

Las células fueron resuspendidas en ácido nítrico como se indica en el apartado 6.1. Se tomaron 200  $\mu$ l del sobrenadante y se enviaron a los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona, donde fueron analizados.

### 6.4. Determinación del superóxido intracelular

Se utilizó la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE) (Fluka). Esta sonda tiene la capacidad de reaccionar con el ión superóxido intracelular convirtiéndose en etidio cuya fluorescencia puede ser cuantificada.

Protocolo:

- Tomar 1 ml de cultivo creciendo en YPG a  $OD_{600}=0,5$



- Centrifugar a 6.000 rpm durante 4 min, eliminar el medio.
- Resuspender en 1 ml de PBS + 0,1 % de glicerol.
- Agregar 5  $\mu$ g/ml de DHE (disuelto en DMSO) y colocar en la cubeta de fluorescencia
- Medir en el espectrofluorímetro (RF-5000, Shimadzu) el incremento en la fluorescencia durante un total de 30 min a una  $\lambda_{\text{excitación}}=520$  nm,  $\lambda_{\text{emisión}}=590$  nm.
- Hacer el blanco con células sin sonda.
- La concentración de superóxido intracelular es directamente proporcional a la tasa de oxidación de DHE.

## 7. CULTIVOS CELULARES

Como modelo de estudio se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- SH-SY5Y
- HEK293T

Dentro de este bloque se describirán sus condiciones de cultivo y el tipo de experimentos que se llevaron a cabo con ellas.

### 7.1. SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y son el tercer subclon sucesivo de la línea SK-N-SH obtenido de una biopsia de un neuroblastoma de la médula ósea. Su cariotipo es muy similar al de una célula humana normal. Presenta la característica de poder ser diferenciable a neuronas tras su tratamiento con ácido retinóico y BDNF ( Encinas et al, 2000).

#### 7.1.1. Mantenimiento de la línea

Las células se mantuvieron en cultivo en placas de 100x20 mm de diámetro (P100) sin necesidad de ser tratadas. Cuando las células crecían hasta cubrir toda la superficie de la placa de cultivo (confluentes) se las despegaba con la ayuda de tripsina según el siguiente protocolo.

Protocolo (placas 100x20mm, Falcon):

- Aspirar el medio y lavar las células con 4 ml de PBS a 37°C.
- Agregar 3 ml de una solución de 0,25 g/l de tripsina y 0,038 g/l EDTA (GIBCO, Invitrogen)

- Incubar de 1 a 2 min.
- Parar la reacción de tripsinización agregando 5 ml de medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, GIBCO, Invitrogen) suplementado con 15% albúmina de suero bovino inactivada por calor (*Fetal Bovine Serum- heat inactivated*, FBS-HI; Invitrogen).
- Recoger las células y centrifugarlas 5 min a 1.000 rpm.
- Aspirar el medio y resuspender las células en 3 ml de DMEM 15% FBS-HI.
- Dividir las células en 3 placas p100.
- Colocar las placas en incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>
- En el caso que se desee congelar las células, resuspender la células en 1 ml de medio de congelación y dejarlas a -80°C durante 3 días. Posteriormente mantenerlas en nitrógeno líquido.

<i>Medio DMEM 15% FBS-HI</i>	
DMEM high glucose	500ml
FBS-HI	85ml
Penicilina/estreptomicina 15µg/ml	1ml

Los sueros deben ser inactivados antes de ser añadidos al medio base. Para ello se descongelan a una temperatura de 4°C 24 horas antes de su preparación. Posteriormente se sumerge la botella en un baño a 56°C durante 30 min, y se alicuota en la campana. Se conserva a -20°C.

<i>Medio de congelación</i>	
FBS-HI	90%
DMSO	10%

### 7.1.2. Diferenciación

Las células SH-SY5Y pueden ser diferenciadas hasta adquirir un fenotipo de carácter neuronal mediante el tratamiento que comprende la administración de ácido retinóico (RA, Sigma ref. R2625), durante 5 días y la posterior adición del factor neurotrófico *brain derived neurotrophic factor* (BDNF). El RA induce la expresión de TrkB permitiendo que las células respondan a BDNF. El BDNF pertenece a la familia de las neurotrofinas, un grupo de factores neurotróficos que promueven la supervivencia de distintos tipos de neuronas tanto *in vitro* como *in vivo*. Además las neurotrofinas modulan el crecimiento y la proliferación axonal y dendrítico entre otras funciones.

Tras 5 días con RA, éste es removido y se agrega BDNF en medio DMEM libre de suero. En estas condiciones el cultivo puede ser mantenido durante al menos 3 semanas sin mostrar reversión del tipo neuronal siempre que el medio se cambia cada 3 días (Encinas et al., 2000).

Protocolo:

- A partir de una placa confluyente despegar las células (como se indica en el apartado anterior)
- Centrifugar 5 min a 1.000 rpm y resuspender en medio DMEM 15% FBS-HI.
- Contar las células en cámara de Neubauer.
- Tomar las células necesarias para plantar  $10^3$  células/cm<sup>2</sup>.
- Agregar el ácido retinóico a una concentración final de 10  $\mu$ M.
- Plantar las células en placas tratadas previamente con colágeno (apartado 10).
- Incubarlas durante 5 días.
- Al quinto día aspirar el medio y lavar una vez con DMEM sin suero (conteniendo penicilina/estreptomicina).
- Agregar medio DMEM sin suero que contenga 50ng/ml de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*, Prepotech ref 450-02).
- Cambiar el medio cada 3-4 días por nuevo DMEM libre de suero y BDNF.

## 7.2. HEK293T (Human Embryonic Kidney)

Las células HEK293T provienen de riñón embrionario humano.

### 7.2.1. Mantenimiento de la línea

Para el pase de las HEK293T, las células deben estar confluentes. No se utiliza tripsina.

Protocolo (para placas 100 x 20 mm):

- Despegar las células utilizando la pipeta de 1ml y centrifugar 5 min a 1.000 rpm.
- Aspirar el medio y resuspender en 1-3 ml de DMEM 10% FBS-HI.
- Dividir en 3 placas p100.
- Colocar en incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>

- En el caso que se desee congelar las células, resuspender la células en 1 ml de medio de congelación y dejarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 3 días. Posteriormente mantenerlas en nitrógeno líquido.

<i>Medio DMEM 10% FBS-HI</i>	
DMEM high glucose	500ml
FBS-HI	55ml
Penicilina/estreptomicina 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1ml

## 8. INTERFERENCIA DE FRATAXINA UTILIZANDO shRNA

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo natural que silencia la expresión de un gen de manera transitoria. A partir del estudio de este mecanismo se han desarrollado técnicas que permiten el silenciamiento de genes. Entre ellas, la transformación o transducción de una célula con secuencias de DNA que codifican para un tipo de RNAs denominado shRNA. Dicho shRNA (short hairpin), permite el silenciamiento de un gen de interés a largo plazo. En el presente trabajo se utilizó este tipo de estrategia con el fin de disminuir la expresión de frataxina.

Existen diferentes aproximaciones que facilitan la entrada del DNA dentro de la célula. En este trabajo se utilizó la técnica de infección con lentivirus. La transducción con lentivirus presenta la ventaja de integrar la secuencia de interés dentro del cromosoma de la célula huésped, consiguiendo así su expresión estable a largo plazo.

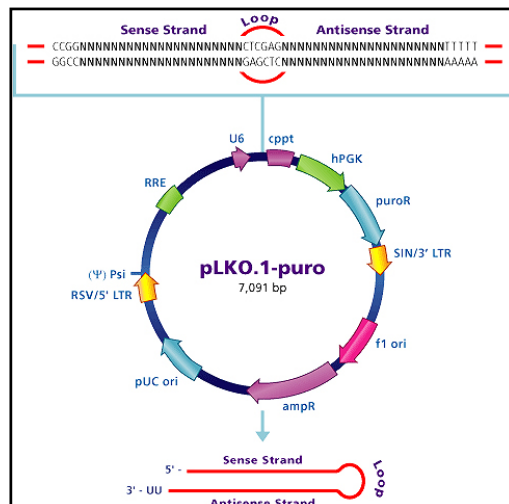
### 8.1. Plásmidos lentivirales

Los plásmidos que contienen las secuencias codificantes de los shRNA, fueron obtenidos de Sigma. Las distintas secuencias de interferencia se indican en la tabla adjunta. Todos ellos derivan del plásmido *pLKO.1-puro*. Los plásmidos fueron amplificados en *E. coli* y purificados según el apartado 2.5 de Materiales y Métodos.

<i>Nombre</i>	<i>secuencia</i>
<b>TRCN0000010996</b>	CCGGCCATACGTTTTGAGGACTATCTCGAGATAGTCTCAAACGTGTATGGTTTTT
<b>TRCN0000006136</b>	CCGGCCCATCTGTAAATGAGAGAACTCGAGTTCTCTCATTTAACAGATGGGTTTTT
<b>TRCN0000006137</b>	CCGGGCAGACGCCAAACAAGCAAATCTCGAGATTTGCTTGTTTTGGCGTCTGCTTTTT
<b>TRCN0000006138</b>	CCGGGCTGGACTCTTTAGCAGAGTTCTCGAGAACTCTGCTAAAGAGTCCAGCTTTTT
<b>TRCN0000006139</b>	CCGGCAACCAGATTTGGAATGTCAACTCGAGTTGACATTCAAATCTGGTTGTTTT

Como controles se contaba con los siguientes plásmidos:

- MISSION™ Non-Target shRNA Control Vector: este vector contiene una secuencia shRNA que no posee blanco en ningún gen humano ni de ratón. Fue utilizado como control negativo en nuestros experimentos de silenciamiento de frataxina. En el texto se lo refiere como Scrambled (SCR).
- MISSION™ TurboGFP™ Control Vector: este vector contiene un gen bajo el control del promotor CMV que codifica para TurboGFP. Dicho vector fue utilizado como control positivo de la transfección y/o transducción en nuestras células de interés, como así también para el calculo de la probabilidad de infección (MOI) de los virus utilizados en el presente trabajo. La TurboGFP es una variante mejorada de la proteína verde fluorescente copGFP clonada del copépodo *Pontellina plumata*.



**Figura II 2: Esquema del vector lentiviral.** Las secuencias de interés son clonadas en el plásmido pLKO.1-puro. Dicho vector presenta las secuencias que permiten su propagación y selección en *E. coli* además de la expresión ya sea transitoria o estable en células de mamíferos.

## 8.2. Transfección de HEK293T para la producción de lentivirus

La transfección consiste en la introducción de material genético externo dentro de una célula huésped de mamífero.

La obtención de lentivirus se realizó transfectando, la línea celular HEK293T utilizando un polímero catiónico llamado polietilenimina (PEI) (ALDRICH cat, 40, 872-7) con tres plásmidos diferentes: el vector lentiviral de interés (shRNA) y los dos vectores que forman el envoltorio y la cápside del lentivirus.

## Protocolo:

- Pretratar con colágeno las placas a utilizar.
- El día anterior a la transfección plantar de  $1,5$  a  $2 \times 10^6$  células HEK293T en placas  $100 \times 20$  mm.
- Preparar la mezcla DNA-OptiMEM (medio con suero reducido: DMEM modificado, tamponado con HEPES y bicarbonato de sodio, suplementado con hipoxantina, timidina, piruvato sódico, L-glutamina y factores de crecimiento)(GIBCO, Invitrogen).

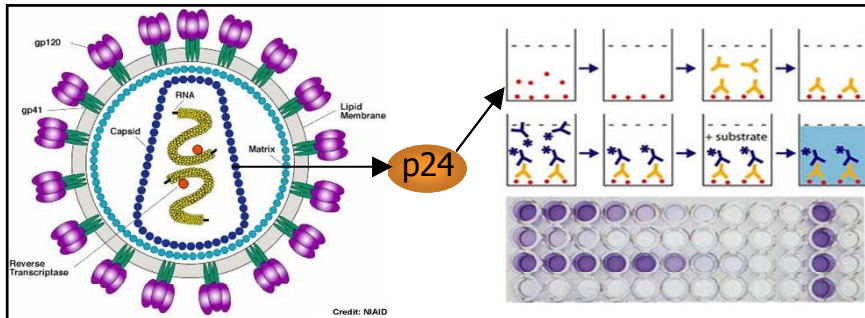
<i>DNA-OptiMEM</i>	
Vector lentiviral	20 $\mu$ g
Empaquetador ( $\Delta$ R=#627)	13 $\mu$ g
Envoltorio (pVSV-G=#628)	7 $\mu$ g
Opti-MEM	1,5 ml

- Preparar PEI-Opti-MEM: agregar 240  $\mu$ l de PEI 5,45 mM gota a gota sobre 1,5 ml de OptiMEM.
- Añadir la mezcla PEI-OptiMEM sobre la mezcla DNA-OptiMEM.
- Mezclar con vortex a 1800 rpm durante 2-3 seg
- Incubar 10 min a temperatura ambiente con la luz de la campana apagada.
- Preparar las células HEK293T: aspirar el medio y lavar con 2 ml de OptiMEM.
- Añadir la mezcla de DNA sobre la placa y luego añadir 4 ml de OptiMEM.
- Incubar 1 h a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ .
- Aspirar la mezcla de DNA y añadir medio (Neurobasal™ (medio formulado para el cultivo de neuronas sin glucosa) o DMEM 10%)
- Recoger el medio que contiene los virus a los 3 días.
- Centrifugar 5 min 1000 rpm.
- Filtrar el sobrenadante con filtros de  $0,45 \mu\text{m}$ .
- Alicuotar y congelar a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 8.3. Titulación de lentivirus

Para conocer la cantidad de lentivirus producidos en las HEK293T se realizó su titulación utilizando *QuickTiter Lentivirus Quantification Kit (HIV p24 ELISA, Cell Biolabs)*. Este es un inmunoensayo enzimático desarrollado para la detección y cuantificación de la proteína HIV-1 p24 que forma parte del envoltorio interno del lentivirus (Figura II 3). Dicho kit, que cuenta con una placa de 96 pocillos que contienen el anticuerpo monoclonal contra HIV-1 p24, se utilizó siguiendo las indicaciones del de la casa comercial.

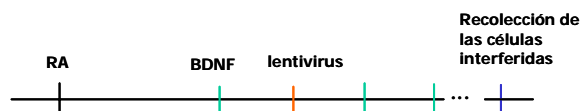
La cantidad del antígeno HIV p24 en las muestras lentivirales se determina comparando su absorbancia con la curva de p24 recombinante de concentración conocida. Su sensibilidad de detección tiene un límite de 1 ng/ml de HIV 24. Se considera que cada partícula lentiviral contiene aproximadamente 2000 moléculas de p24.



**Figura II 3: Inmunoensayo para la titulación de partículas lentivirales.** El kit *QuickTiter Lentivirus Quantification Kit* contiene el anticuerpo contra HIV-1 p24 en los pozos de la placa de 96 pocillos. El antígeno p24 presente en la muestra o en los estándares se unen al anticuerpo presente en las placas. A continuación el anticuerpo anti p24 conjugado con FITC se une al antígeno capturado por el primer anticuerpo. Luego de incubaciones y lavados, se incuba con el anticuerpo anti FITC conjugado con HRP, el cual reconoce y se une al FITC. Posteriormente se agrega el sustrato que reacciona con HRP y se produce un producto coloreado que es proporcional a la cantidad de antígeno p24 presente en la muestra. La reacción es detenida por la adición de un ácido y la absorbancia medida a 450 nm. Una curva estándar es preparada con proteína recombinante HIV-1 p24.

#### 8.4. Transducción de SH-SY5Y

El silenciamiento de la expresión del gen de la frataxina se realizó en células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo neuronal (apartado 7.1.2. de Materiales y Métodos). Tras 3 o 4 días con BDNF fue cambiado el medio de cultivo de las células SH-SY5Y por el extraído de las células HEK293T que contenía los virus. Dicho medio fue complementado con BDNF y las células fueron cultivadas durante 3 días, tras los cuales se les cambio el medio por medio nuevo.



Las células fueron mantenidas en cultivo cambiando su medio cada tres días y recogidas para su posterior análisis, como se observa en el esquema.

## 9. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES TOTALES

Los lisados celulares fueron obtenidos de diferente manera dependiendo de la finalidad del experimento.

En el caso de ser utilizados para *western blot*, se los obtuvo en condiciones denaturalizantes.

Protocolo:

- Aspirar el medio.
- Lavar las células con PBS frío.
- Agregar el Tampón de Lisado I (Tris-HCl 125 mM pH=6,75, 2% SDS) y raspar la placa hasta despegar y lisar todas las células.
- Colocar el lisado celular en un tubo de 1,5 ml y calentar 5 min a 95°C.
- Guardar a -20°C (opcional)
- Sonicar para romper las estructuras celulares y disolver las proteínas
- Cuantificar la proteína por el método de Lowry o por Qubit.

Para obtener las proteínas en su forma nativa con el fin de medir actividades enzimáticas se realizó el siguiente protocolo.

Protocolo:

- Aspirar el medio.
- Lavar las células con PBS frío.
- Recoger las células con PBS o con tripsina-EDTA en el caso de las SHSY-5Y sin diferenciar ( apartado 8.1.1).
- Centrifugar 5 min a 1000 rpm y aspirar el PBS.
- Guardar a -20°C (opcional)
- Resuspender en Tampón NP40 (Tris-HCl 50mM pH=8.0, *nonidet* NP40 (Fluka) 1%(v/v)) o en el Tampón Tritón x-100 (Sigma) (Tris-HCl 50mM pH=8.0, Tritón 1%) en ambos casos suplementado con inhibidores de proteasas.
- Incubar 15 min a 4°C.
- Centrifugar 3min a 3000 rpm.
- Cuantificar la proteína por el método de Lowry o por Bradford.



## 10. TRATAMIENTO DE LAS PLACAS CON COLÁGENO

El tratamiento con colágeno permite a las células una mayor adhesión a la placa, se utilizó al plantar las SHSY-5Y para su diferenciación y con las HEK293T para la producción de virus.

Protocolo:

- Cubrir las placas con la solución de colágeno (0,75  $\mu\text{g/ml}$  en 0,02 N de ácido acético).
- Dejar secar a temperatura ambiente con el flujo encendido de la campana durante toda la noche.

<i>Placas</i>	<i>ml de colágeno</i>
P4 (NUNC)	0,350
m24 (Falcon)	0,350
35mm (Falcon)	1,5
60mm (Falcon)	2
100mm (Falcon)	4

### **III. RESULTADOS**



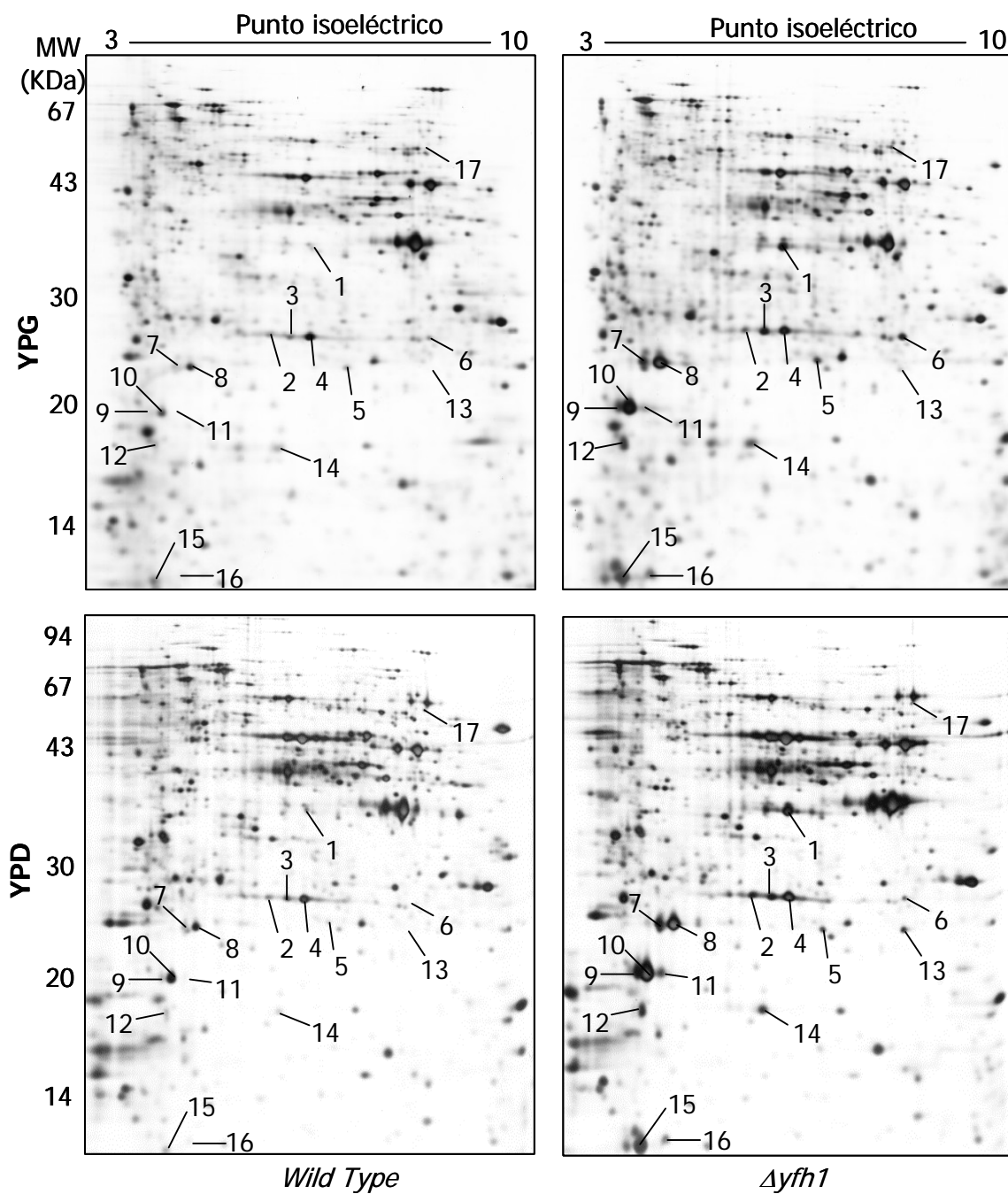
1. **CAPITULO 1:** ESTUDIO PROTEOMICO DEL MUTANTE  $\Delta yfh1$ , RELACIÓN CON LA Mn-SOD, Y SU IMPLICACIÓN EN LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON CENTROS Fe-S.

### 1.1. ESTUDIO PROTÉOMICO DE LAS CÉLULAS $\Delta yfh1$

Como punto de partida se realizó el análisis proteómico de la cepa silvestre (wt: wild type) y el mutante deficiente en frataxina ( $\Delta yfh1$ ). Dicho análisis se desarrolló con el fin de encontrar diferencias a nivel de expresión de proteínas entre las cepas en estudio.

Las células de levadura fueron crecidas en los medios de cultivos YPG e YDP, lo que permitió la comparación de dos tipos de metabolismo diferentes. En un medio con fuente de carbono no fermentable como el YPG, las levaduras exhiben una tasa de respiración alta mientras que en YPD el metabolismo es básicamente fermentativo. Partiendo del conocimiento de que la frataxina es una proteína mitocondrial y que su falta podría causar problemas en el funcionamiento de dicho organelo, se optó por realizar los estudios principalmente con medio YPG. Otra razón por la que se optó por un metabolismo respiratorio fue el hecho de que los tejidos más afectados en la Ataxia de Friedreich son el corazón y el sistema nervioso, conocidos por su elevado metabolismo oxidativo (Rotig et al., 2002). Los mutantes  $\Delta yfh1$  presentan deficiencias cuando crecen en YPG. En algunos fondos genéticos, como en el utilizado en este trabajo, se ha observado crecimiento lento (Foury and Cazzalini, 1997; Foury and Talibi, 2001; Duby et al., 2002), mientras que en otros resulta imposible su crecimiento (Karthikeyan et al., 2003).

La aproximación proteómica utilizada consistió en la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional, en geles de 18x18 cm y su posterior tinción con plata. Las imágenes fueron adquiridas en un densitómetro GS-800 y analizadas mediante el programa PDQuest (Figura III 1).



**Figura III 1: Análisis del proteoma de wild type y  $\Delta yfh1$  mediante 2D.** Las células fueron crecidas en medio YPG ó YPD y los extractos celulares (40  $\mu\text{g}$  de proteína total) fueron separado mediante electroforesis bidimensional. Los geles fueron teñidos con plata y analizados mediante el programa *PDQuest*.

Se realizó por triplicado el análisis comparativo de los geles por parejas (wt- $\Delta yfh1$ ). Aquellos *spots* que presentaron una diferencia repetitiva de al menos 2 veces en la cantidad relativa de proteína entre ambas cepas fueron digeridos con tripsina y analizados según se describe

en Materiales y Métodos. Las proteínas extraídas fueron identificadas mediante huella de masas peptídicas utilizando MASCOT como herramienta de búsqueda (Tabla III 1).

**Tabla III 1: Identificación de las proteínas expresadas de forma diferencial en wt y  $\Delta yfh1$ .**

Se indica el nombre de la proteína; su correspondiente gen; el o los *spots* a los que corresponden (indicados en la Figura III 1); el porcentaje de cobertura obtenido en la identificación mediante huella de masas peptídicas y la inducción relativa de cada proteína  $\Delta yfh1/wt$  en medio YPG e YPD (media de 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar) considerando todos los *spots* identificados como la misma proteína. Los valores con el símbolo > son estimados e indican que el *spot* correspondiente en la muestra wild type es demasiado bajo para ser utilizado como valor de referencia.

Proteína	Gen	Spots	Cobertura %	Inducción YPD $\Delta yfh1/wt$	Inducción YPG $\Delta yfh1/wt$																																																																		
<b>Tioredoxina-peroxidasa1 (cTPxI)</b>	TSA1	7	30.6	10.6 $\pm$ 3.1	7.1 $\pm$ 3.0																																																																		
		8	50.2			<b>Tioredoxina-peroxidasa2 (cTPxII)</b>	TSA2	13	13.4	>21.0	>14.0	9	70.4	<b>Peroxiredoxina tiol-específica (cTPxIII)</b>	AHP1	10	62.0	5.6 $\pm$ 2.7	8.5 $\pm$ 0.6	11	22.2	12	39.1	16	35.6	<b>Tioredoxina reductasa</b>	TRR1	1	37.7	>25.0	>20.0	<b>Tioredoxina 1</b>	TRX2	15	37.8	3.9 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 4.5	<b>Peroxiredoxina mitocondrial</b>	PRX1	6	30.3	5.3 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.6	<b>Superóxido Dismutasa 1</b>	SOD1	14	70.0	5.5 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.3	<b>Superóxido Dismutasa 2</b>	SOD2	5	42.0	4.0 $\pm$ 0.9	3.0 $\pm$ 0.3	<b>Catalasa A</b>	CTA1	17	18	ND	6.1 $\pm$ 1.7	<b>Adenilato quinasa citosólica</b>	ADK1	3	35.6	2.1 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 1.3	<b>Triosafofato isomerasa</b>	TPI1	2	22.7
<b>Tioredoxina-peroxidasa2 (cTPxII)</b>	TSA2	13	13.4	>21.0	>14.0																																																																		
		9	70.4			<b>Peroxiredoxina tiol-específica (cTPxIII)</b>	AHP1	10	62.0	5.6 $\pm$ 2.7	8.5 $\pm$ 0.6	11	22.2			12	39.1			16	35.6	<b>Tioredoxina reductasa</b>	TRR1	1	37.7	>25.0	>20.0	<b>Tioredoxina 1</b>	TRX2	15	37.8	3.9 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 4.5	<b>Peroxiredoxina mitocondrial</b>	PRX1	6	30.3	5.3 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.6	<b>Superóxido Dismutasa 1</b>	SOD1	14	70.0	5.5 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.3	<b>Superóxido Dismutasa 2</b>	SOD2	5	42.0	4.0 $\pm$ 0.9	3.0 $\pm$ 0.3	<b>Catalasa A</b>	CTA1	17	18	ND	6.1 $\pm$ 1.7	<b>Adenilato quinasa citosólica</b>	ADK1	3	35.6	2.1 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 1.3	<b>Triosafofato isomerasa</b>	TPI1	2	22.7	1.9 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.9	4	66.2
<b>Peroxiredoxina tiol-específica (cTPxIII)</b>	AHP1	10	62.0	5.6 $\pm$ 2.7	8.5 $\pm$ 0.6																																																																		
		11	22.2																																																																				
		12	39.1																																																																				
		16	35.6																																																																				
<b>Tioredoxina reductasa</b>	TRR1	1	37.7	>25.0	>20.0																																																																		
<b>Tioredoxina 1</b>	TRX2	15	37.8	3.9 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 4.5																																																																		
<b>Peroxiredoxina mitocondrial</b>	PRX1	6	30.3	5.3 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.6																																																																		
<b>Superóxido Dismutasa 1</b>	SOD1	14	70.0	5.5 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.3																																																																		
<b>Superóxido Dismutasa 2</b>	SOD2	5	42.0	4.0 $\pm$ 0.9	3.0 $\pm$ 0.3																																																																		
<b>Catalasa A</b>	CTA1	17	18	ND	6.1 $\pm$ 1.7																																																																		
<b>Adenilato quinasa citosólica</b>	ADK1	3	35.6	2.1 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 1.3																																																																		
<b>Triosafofato isomerasa</b>	TPI1	2	22.7	1.9 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.9																																																																		
		4	66.2																																																																				

De forma general se puede decir que las células deficientes en *YFH1* exhiben un claro aumento en la cantidad de enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo tanto en células crecidas en YPG como en YPD. Cuatro de las enzimas que están sobreexpresadas en  $\Delta yfh1$  son formas isoenzimáticas de tiol peroxidasa. Dichas isoenzimas presentan la capacidad de eliminar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y alquil hidroperóxidos (ROOH) utilizando como donadores de electrones la tioredoxina (*TRX2*) y la tioredoxina reductasa (*TRR1*) (Rhee et al., 2005). Es de destacar que estas últimas enzimas fueron identificadas por estar aumentadas 14,7 y 20 veces respectivamente en el mutante deficiente en *YFH1* con respecto al control.

A su vez, fueron identificadas otras dos enzimas involucradas en respuesta a estrés oxidativo que son las superóxido dismutasas 1 y 2 correspondientes a las isoenzimas citosólica y mitocondrial respectivamente. Ambas enzimas se encargan de dismutar el ión superóxido a peróxido de hidrógeno utilizando para ello su centro metálico, que en el caso de Sod1 es un centro cobre-zinc (CuZn) y para Sod2 es de manganeso (Culotta et al., 2006). Por último la catalasa, al igual que la peroxiredoxina mitocondrial, se encarga de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la formación de H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> (Kirkman and Gaetani, 2007). La isoenzima catalasa A identificada en este trabajo, se localiza tanto en el peroxisoma como en la mitocondria dependiendo de las condiciones de crecimiento. Se ha observado que bajo un metabolismo respiratorio la catalasa A es eficientemente transportada a la matriz mitocondrial donde ejerce su función (Petrova et al., 2004).

Otra manera de observar cambios en la expresión de genes es la utilización de *microarrays* de DNA. Foury y colaboradores realizaron dicho tipo de análisis en el mutante *Δyfh1* utilizando el mismo fondo genético que el del presente trabajo. Sin embargo, ellos no fueron capaces de observar cambios en la expresión de enzimas antioxidantes pero sí en algunas otras proteínas, principalmente transportadores de membrana (Foury and Talibi, 2001). Una posible explicación para esta discordancia es que las proteínas de membrana no son bien resueltas en geles bidimensionales. No es de extrañar la falta de concordancia entre el análisis proteómico y el transcriptómico, ya que este fenómeno ha sido observado en otras ocasiones (de Nobel et al., 2001; Cox and Mann, 2007). Esto remarca la importancia de contar con ambas aproximaciones, ya que pueden aportar datos complementarios.

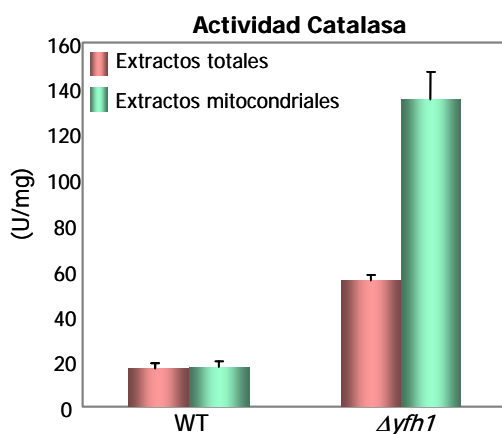
Las dos últimas proteínas identificadas como sobreexpresadas en nuestro análisis proteómico son adenilato quinasa y triosa fosfato isomerasa. Ambas son enzimas que intervienen en el metabolismo energético de la célula y no están involucradas en la respuesta al estrés oxidativo. La adenilato quinasa se encarga de mantener los nucleótidos de adenina en equilibrio (2ADP >> ATP+AMP). Por otro lado, la triosa fosfato isomerasa interviene en el quinto paso de la glicólisis catalizando la formación de gliceraldehido-3-fosfato que posteriormente dará lugar a la producción de energía (ATP).

## 1.2. INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA

Una manera de corroborar los datos obtenidos a partir del estudio proteómico es utilizando técnicas como la de *western blot* que nos permiten comparar las cantidades de proteínas entre dos condiciones. Otra forma de comprobar la inducción de proteínas es a través de la determinación de actividades enzimáticas. Dado que no existen anticuerpos específicos



contra la mayoría de las proteínas identificadas, se optó por medir la actividad catalasa como ejemplo de una de las enzimas inducidas en el mutante deficiente en frataxina. Dicha actividad fue medida en extractos totales y mitocondriales de células cultivadas en medio YPG. Como puede observarse en la Figura III 2 la actividad catalasa está 6,5 veces aumentada en  $\Delta yfh1$  con respecto a la cepa silvestre en los extractos mitocondriales, mientras que en extractos totales la inducción era de 3 veces más en  $\Delta yfh1$  (Figura III 2). La diferencia en la actividad catalasa entre los dos tipos de extracciones, indica que bajo dichas condiciones de crecimiento, la sobreexpresión de catalasa A en  $\Delta yfh1$  es de localización mitocondrial. Estos datos de actividad enzimática, reafirman los resultados obtenidos a través de la aproximación proteómica.

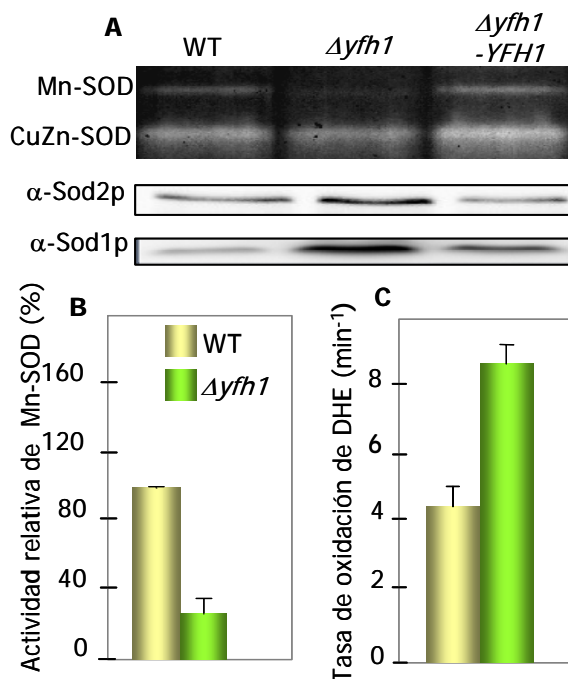


**Figura III 2: Aumento de la actividad catalasa en  $\Delta yfh1$ .** La actividad catalasa fue medida en extractos totales y en preparaciones mitocondriales de wild type y  $\Delta yfh1$ . Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes.

### 1.3. LA CEPA $\Delta yfh1$ PRESENTA BAJO NIVELES DE ACTIVIDAD Mn-SOD

Dentro del grupo de las proteínas inducidas en  $\Delta yfh1$  se encuentran las superóxido dismutasas. Estas enzimas son muy importantes en la defensa de la célula contra los radicales libres ya que son las únicas enzimas capaces de eliminar el ión superóxido. Por esta razón corroboramos la inducción de Sod 1 y 2 mediante *western blot* con el uso de anticuerpos específicos,  $\alpha$ -Sod1p y  $\alpha$ -Sod2p (Figura III 3 A). Así también, medimos su actividad catalítica mediante zimogramas. Paradójicamente observamos que la actividad de Mn-SOD (producto del gen *SOD2*), se encontraba aproximadamente un 70% disminuida con respecto al wild type (Figura III 3 A y B). Para corroborar si esta marcada disminución en la

actividad Mn-SOD resultaba en un aumento en los niveles de anión superóxido dentro de la célula, fue medida la cantidad de superóxido su cantidad fue medida utilizando la sonda específica dihidroetidio (DHE).



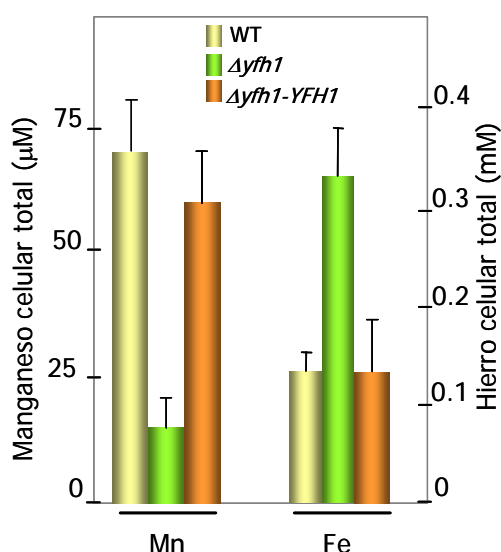
**Figura III 3: Descenso de la actividad superóxido dismutasa en  $\Delta yfh1$ .** A, Análisis de las actividades Mn-SOD y CuZn-SOD de las distintas cepas mediante zimograma. Análisis por *western blot* de Sod1p y Sod2p en extractos celulares totales. B, cuantificación relativa de la actividad Mn-SOD (obtenida a partir del análisis densitométrico de los zimogramas) entre las dos cepas de estudio. C, comparación de la tasa de oxidación de DHE en wild type y  $\Delta yfh1$ . Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de al menos tres experimentos diferentes.

Como se observa en la Figura III 3B se observó un incremento de 2 veces más en la tasa de oxidación de dicha sonda en la levadura deficiente en frataxina que en el control, lo que indica una mayor concentración de iones superóxido e la cepa  $\Delta yfh1$ .

#### 1.4. LA DEFICIENCIA DE MANGANESO EXPLICA LA FALTA DE ACTIVIDAD Mn-SOD

Una de las características de la levadura deficiente en *YFH1* es la acumulación de hierro total intracelular. Basándonos en este hecho pensamos en un posible desequilibrio en el contenido de otros metales como el manganeso en nuestra cepa de estudio, ya que una de las razones

que podrían provocar un descenso en la actividad Mn-SOD es una deficiencia en su cofactor. Con el fin de corroborar nuestra hipótesis se analizó el contenido total de manganeso dentro de las células. Los resultados mostraron un marcado descenso de los niveles de este metal dentro del mutante, sugiriendo que el transporte de manganeso podría estar alterado en  $\Delta yfh1$  (Figura III 4). Para confirmar que esta alteración fenotípica es una consecuencia de la falta de *YFH1*, transformamos la cepa  $\Delta yfh1$  con el plásmido pYC G-YDL120w que contiene el gen *YFH1* bajo su propio promotor.

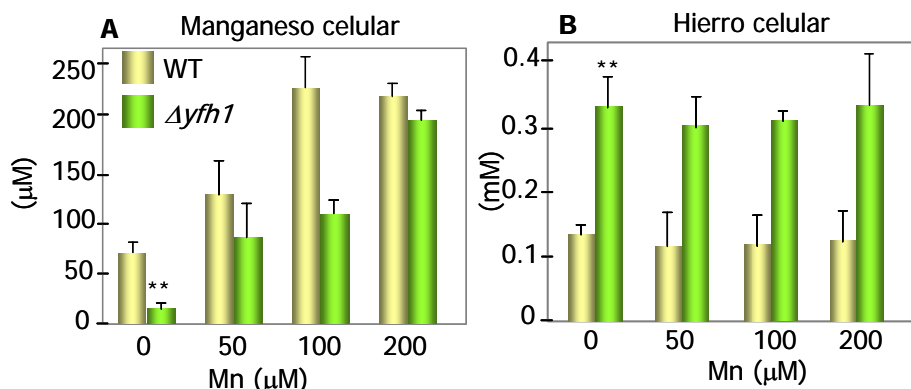


**Figura III 4: Medida de la concentración celular de manganeso y hierro total dentro de las células.** Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Al analizar los transformantes  $\Delta yfh1$ -YFH1 observamos que tanto los niveles de proteína Sod1 y Sod2 como el contenido en los metales hierro y manganeso alcanzaban valores similares a los observados en la cepa wild type (Figura III 4).

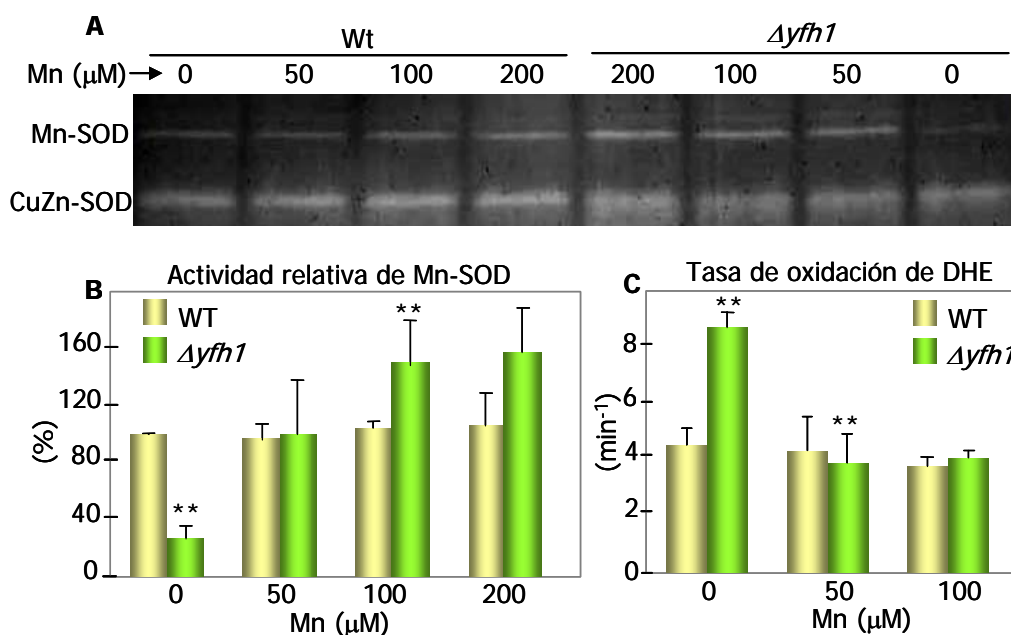
Con el fin de comprobar si la deficiencia de manganeso en  $\Delta yfh1$  era la causa de la falta de actividad de superóxido dismutasa, los medios de cultivo (YPG) fueron suplementados con concentraciones crecientes de cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ ). Como se puede observar en la Figura III 5A en la cepa  $\Delta yfh1$  los niveles de manganeso celular propios de una célula wt eran recuperados con 50  $\mu M$  de  $MnCl_2$ . La concentración de manganeso intracelular aumentaba de una manera dosis dependiente en ambas cepas, alcanzando niveles similares en la concentración de 200  $\mu M$ . Este hecho confirma la existencia de una deficiente capacidad para la adquisición del manganeso por parte de las células  $\Delta yfh1$ . Por otro lado, el

tratamiento con manganeso no afectó al contenido en hierro total en ninguna de las dos cepas de estudio (Figura III 5 B).



**Figura III 5: Efecto de la suplementación con manganeso en el contenido de manganeso y hierro total en la cepa silvestre y  $\Delta yfh1$ .** Las células creciendo en YPG fueron suplementadas con concentraciones crecientes de manganeso tras lo cual se midió su contenido de manganeso intracelular (A) y hierro total (B). Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de al menos tres experimentos diferentes. Existen diferencias significativas en el contenido de manganeso y hierro entre wt y  $\Delta yfh1$  (representado con doble asterisco sobre la barra del mutante sin suplementación con manganeso), y una recuperación significativa del contenido celular de manganeso con 100  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  \*\* $p < 0.001$ .

Quisimos saber si la actividad superóxido dismutasa se veía afectada una vez recuperados los niveles de manganeso intracelular en nuestra cepa mutante. Mediante zimograma, se observó la recuperación de la actividad Mn-SOD de una manera dosis-dependiente (Figura III 6A y B).



**Figura III 6: Efecto de la suplementación con manganeso sobre la actividad Mn-SOD en *Δyfh1*.** A, Análisis de la actividad SOD (zimograma) luego de la suplementación con manganeso en el medio de cultivo. B, cuantificación relativa de la actividad Mn-SOD entre las dos cepas de estudio luego de los tratamientos con concentraciones crecientes de MnCl<sub>2</sub>. C, comparación de la tasa de oxidación de DHE en wild type y *Δyfh1* y el efecto de la suplementación con manganeso. Los datos están representados como medias ± su desviación estándar de cuatro experimentos diferentes. Se observaron diferencias significativas en la actividad Mn-SOD entre wt y *Δyfh1* (representado con doble asterisco sobre la barra del mutante sin suplementación con manganeso), y recuperación significativa (\*\* $p < 0.001$ ) de dicha actividad con 100 μM MnCl<sub>2</sub> (B). Tratamientos con 50 μM MnCl<sub>2</sub> fueron suficiente para igualar el contenido en iones superóxido entre ambas cepas (C) \*\* $p < 0.001$ .

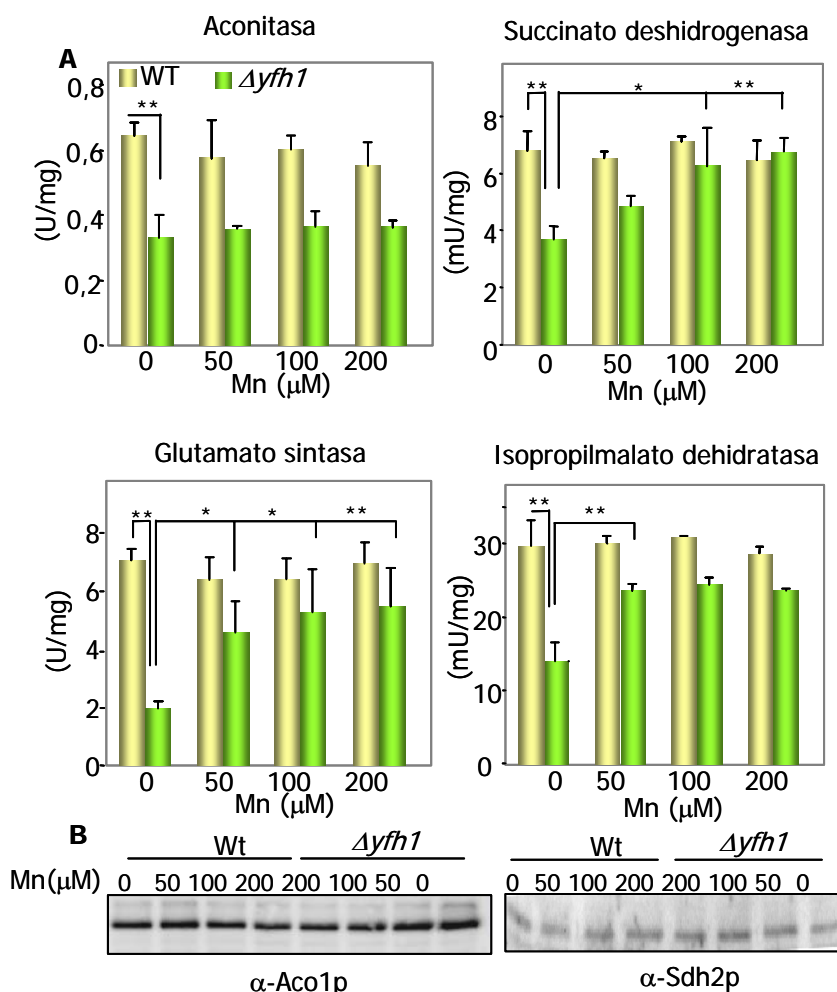
De esta manera podemos concluir que la falta de actividad Mn-SOD en el mutante *YFH1* es consecuencia de una deficiencia celular de manganeso. En concordancia con estos resultados se observó un claro descenso en los niveles de anión superóxido en el *Δyfh1* tras el tratamiento con manganeso, llegando a valores casi idénticos a los de la cepa silvestre (Figura III 6 C).

### 1.5. LA FALTA DE MANGANESO ES LA RESPONSABLE DE LA DISMINUCIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CON CENTROS HIERRO-AZUFRE

Una de las funciones que se le atribuyen a frataxina es la de estar implicada en la biosíntesis de los centros Fe-S. Esta hipótesis está basada en el hecho de que muchas de las enzimas con centros Fe-S presentan deficiencia en sus actividades en el mutante deficiente en frataxina (Rotig et al., 1997).

Así también, distintos investigadores observaron una interacción física y genética entre frataxina e Isu1, una proteína que interviene en la biosíntesis de los centros Fe-S (Gerber et al., 2003; Yoon and Cowan, 2003). Sin embargo, la disminución en la actividad de enzimas que contienen centros Fe-S también ha sido observada en organismos deficientes en otros genes como, por ejemplo, levaduras deficientes en *SOD2* (Strain et al., 1998) y en ratones *knock-out* para Mn-SOD (Li et al., 1995). Teniendo en cuenta que el mutante  $\Delta yfh1$  presenta una clara deficiencia en la actividad Mn-SOD, pensamos en una relación directa entre la disminución en la actividad de las enzimas que contienen centros Fe-S y la falta de manganeso. En este contexto, esta falta de actividad podría deberse al estrés oxidativo generado dentro de la mitocondria debido a la falta de actividad Mn-SOD.

Con el fin de evaluar esta hipótesis, se analizaron las actividades enzimáticas de tres enzimas mitocondriales con centros Fe-S (aconitasa, glutamato sintasa y succinato deshidrogenasa) y una citosólica (isopropilmalato deshidratasa) en células de la cepa silvestre y de  $\Delta yfh1$  creciendo en medio YPG suplementado con distintas concentraciones de manganeso (Figura III 7).



**Figura III 7: Actividades de enzimas con centros Fe-S en wt y  $\Delta yfh1$ .** A, actividades enzimáticas en extractos proteicos totales antes y después de la suplementación con manganeso en el medio de cultivo. Se observaron diferencias significativas entre wt y  $\Delta yfh1$  en las cuatro enzimas analizadas. Diferentes concentraciones de  $MnCl_2$  fueron necesarias para la recuperación de la actividad enzimática de tres de ellas \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ . B, medida de la cantidad de aconitasa y succinato deshidrogenasa mediante *western blot*. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de al menos tres experimentos diferentes.

Los valores observados en las actividades de wt y  $\Delta yfh1$  en medios no suplementados fueron similares a los obtenidos por otros autores (Foury, 1999; Duby et al., 2002; Foury and Roganti, 2002; Gonzalez-Cabo et al., 2005). Todas las enzimas muestran una clara recuperación de sus actividades al ser tratadas con manganeso, con la excepción de aconitasa. Esto nos indica que es la falta de la actividad Mn-SOD y el estrés originado por dicha falta lo que causa la inactivación de las enzimas con centros Fe-S en el mutante  $\Delta yfh1$ . Además, sugiere que *YFH1* no es esencial para la biosíntesis de los centros Fe-S, excepto

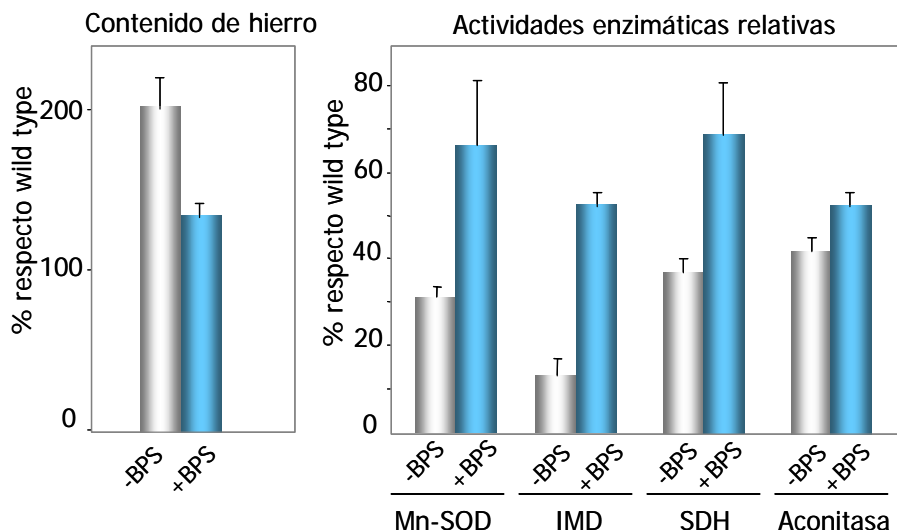
quizás para aconitasa. Esta excepción puede ser explicada si tenemos en cuenta los trabajos que vinculan directamente a la frataxina con la aconitasa mediante una interacción directa que sería esencial para la reconstitución del centro [4Fe4S] de la aconitasa (Bulteau et al., 2004; Bulteau et al., 2005).

#### 1.6. EL EXCESO DE HIERRO ES LA CAUSA INICIAL DE LA FALTA DE ACTIVIDAD DE Mn-SOD Y DE ENZIMAS CON CENTROS HIERRO-AZUFRE

En un trabajo previo de Foury y colaboradores, se observó que la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en el mutante  $\Delta yfh1$  podía recuperarse limitando los niveles de hierro del medio de cultivo. Esto se conseguía mediante la adición del quelante de hierro batofenantrolina (BPS) al medio de cultivo (en este caso SC-rafinosa). De esta forma se lograba prevenir la acumulación de hierro total dentro de la célula del mutante deficiente en frataxina. Sin embargo bajo estas mismas condiciones no se lograba una recuperación de la actividad aconitasa (Foury, 1999). Con el fin de comprobar el efecto de este tratamiento sobre la actividad de Mn-SOD y sobre la actividad de las enzimas con centro Fe-S, las células de ambas cepas fueron crecidas en medio SC-rafinosa suplementado con BPS. Este medio sintético ofrece una fuente de carbono que no reprime la respiración y bajas concentraciones de hierro (aún sin la adición de BPS). Como se puede observar en la Figura III 8A en condiciones control, en este medio la cepa  $\Delta yfh1$  presenta también acumulación de hierro y baja actividad de las enzimas Mn-SOD, aconitasa, succinato deshidrogenasa y isopropil malato deshidratasa. Sin embargo, en una situación de hierro limitante tras la adición de BPS, logramos revertir en gran parte la acumulación de hierro total del mutante. Lo que es aún más importante, logramos recuperar las actividades de las enzimas con centros Fe-S, exceptuando nuevamente la aconitasa. Estos datos confirman los anteriormente publicados (Foury, 1999) y además muestran también la recuperación de Mn-SOD e isopropilmalato deshidratasa bajo estas condiciones.

De esta manera, podemos correlacionar el desequilibrio de metales (exceso de Fe y requerimiento de Mn) con la falta de actividad Mn-SOD y a su vez ésta con la falta de actividad en las enzimas Fe-S. Luego, la disminución de la actividad de esta enzima lleva a una situación de estrés que afecta entre otras cosas a las actividades de enzimas con centros Fe-S.

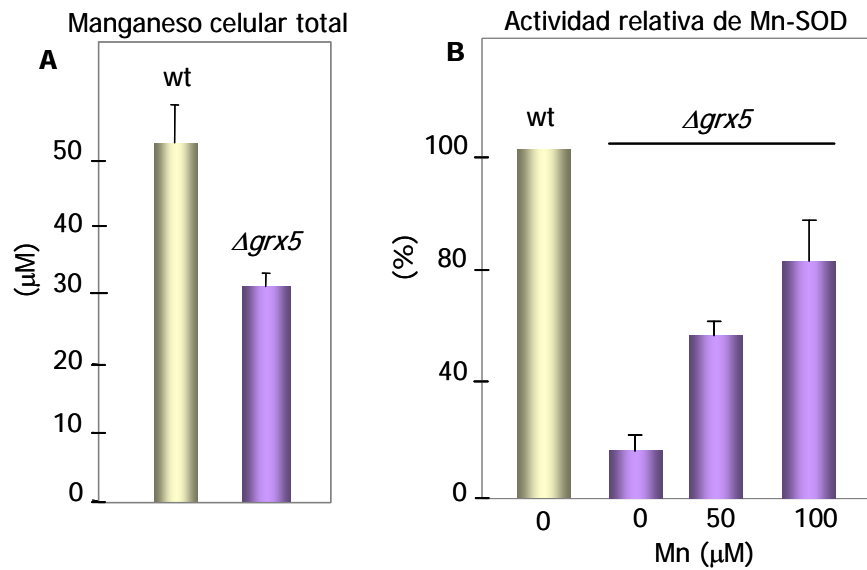




**Figura III 8: Actividades de Mn-SOD y de enzimas con centros Fe-S en células  $\Delta yfh1$  cultivadas bajo condiciones de hierro limitante.** Las células fueron crecidas en medio SC rafinosa control o suplementado con 10  $\mu$ M BPS. Los gráficos muestran el contenido de hierro y las actividades enzimáticas en  $\Delta yfh1$  relativo a los valores de wt creciendo bajo las mismas condiciones. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de al menos tres experimentos diferentes.

#### 1.7. LA ACUMULACIÓN DE HIERRO ES RESPONSABLE DEL BAJO CONTENIDO DE MANGANESO Y POR LO TANTO DE LA DEFICIENCIA EN LA ACTIVIDAD DE Mn-SOD.

De los resultados anteriores podemos concluir que el mutante  $\Delta yfh1$  presenta una situación de estrés que esta generada por la falta de actividad superóxido dismutasa, deficiencia en manganeso y acumulación de hierro. Esta situación puede ser revertida tanto por suplementación con manganeso o por disminución de la concentración de hierro del medio. De ambas maneras logramos la recuperación de las actividad Mn-SOD y a su vez la de las enzimas con centros Fe-S. Sin embargo los tratamientos con manganeso no revierten la acumulación de hierro, ni otras características fenotípicas de  $\Delta yfh1$  como, por ejemplo, su tasa (velocidad) de crecimiento más lenta. Con el fin de saber si la acumulación de hierro es la responsable de la deficiencia de manganeso, decidimos estudiar otra cepa mutante en la que también se ha descrito una acumulación significativa de hierro intracelular. La cepa de *S. cerevisiae* utilizada fue  $\Delta grx5$  que presenta deficiencia en la proteína mitocondrial glutaredoxina 5. Dicha cepa presenta valores de hierro 5 veces superiores a los normales, así como la deficiencia en las actividades enzimáticas de aconitasa y succinato deshidrogenasa (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002).



**Figura III 9: Deficiencia de manganeso y descenso en la actividad Mn-SOD en  $\Delta grx5$ .** A, células wt (BY4741) y  $\Delta grx5$  fueron crecidas en medio YPD y se analizó el contenido de manganeso total. B, Medida de la actividad Mn-SOD mediante zimograma en cultivos suplementados con distintas concentraciones de manganeso. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Se pudo comprobar como en esta cepa el contenido de manganeso total estaba disminuido hasta un 60% con respecto a su cepa control. Asimismo, al medir la actividad de la enzima Mn-SOD observamos una fuerte deficiencia en su actividad de forma similar a la observada en  $\Delta yfh1$ . Por último, al suplementar el medio de cultivo con manganeso se observó la recuperación de la actividad de esta enzima (Figura III 9). Estos datos indican que la deficiencia en manganeso y actividad Mn-SOD está ligada a la acumulación de hierro y que pueden ser una característica común a diversas cepas que presentan sobrecarga de hierro.

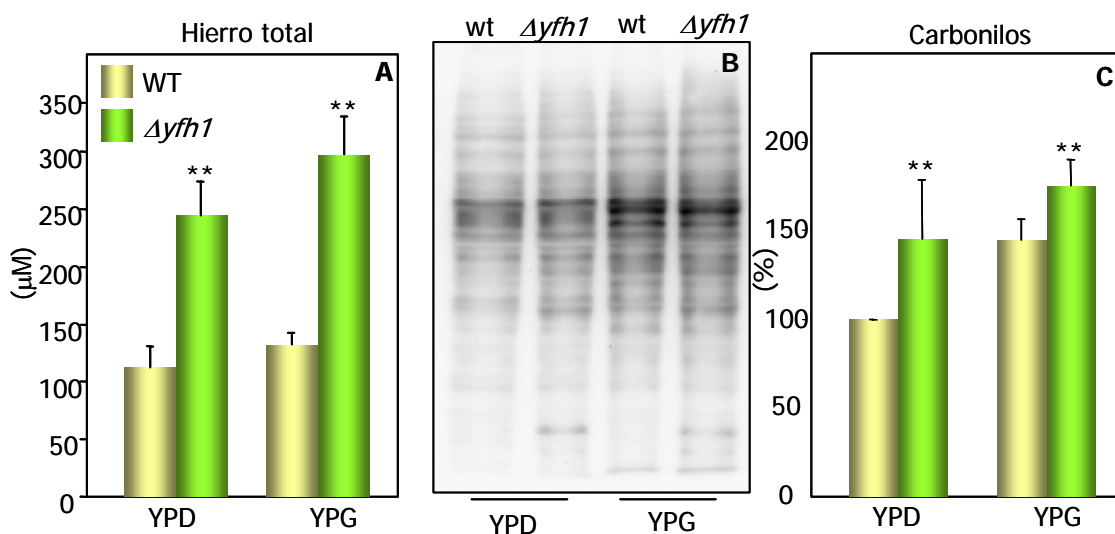


2. **CAPITULO 2:** ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL MUTANTE *Δyfh1*, PAPEL DEL HIERRO QUELABLE EN LA CARBONILACIÓN E INACTIVACIÓN DE ENZIMAS.

## 2.1. AUMENTO DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL MUTANTE DEFICIENTE EN FRATAXINA.

A partir del análisis proteómico del apartado anterior llegamos a la conclusión que el mutante  $\Delta yfh1$  presenta una situación de estrés oxidativo endógeno que se debe en gran parte a la acumulación de hierro intracelular. Dicho estrés puede afectar a las distintas estructuras celulares. Uno de los componentes más afectados por los radicales libres son las proteínas, las cuales sufren una gran variedad de modificaciones que pueden ser de carácter transitorio o muchas veces, irreversible. La formación de grupos carbonilo en las cadenas laterales de algunos aminoácidos son un tipo de modificación irreversible. Este tipo de modificación puede ser detectada mediante la derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) la cual reacciona con los grupo carbonilos de las proteínas dando lugar a 2,4-dinitrofenilhidrazonas, que son detectadas por medio de anticuerpos específicos que reconocen dicho grupo (ver Materiales y Métodos apartado 3.5.1). Dicha técnica ha sido utilizada por diferentes grupos de trabajo y está aceptada como una forma simple y fiable de medir el efecto del estrés oxidativo en proteínas (Buss et al., 1997; Robinson et al., 1999; Davies et al., 2001; Levine and R, 2006; Levine, 2006).

Con el fin de observar si existen modificaciones oxidativas en proteínas en el mutante  $\Delta yfh1$  se analizó el contenido total de carbonilos, realizando la derivatización en los extractos crudos de ambas cepas. El contenido de carbonilos totales en extractos proteicos de la cepa silvestre y la mutante, fue comparado mediante un sistema SDS-PAGE monodimensional y *western blot*. Para ello, las células fueron crecidas en medio YPD o YPG. Así mismo, se realizó el análisis del contenido total de hierro en las células de ambas cepas.



**Figura III 10: Incremento del daño oxidativo en  $\Delta yfh1$ .** A, cuantificación del contenido total de hierro en wt y  $\Delta yfh1$  creciendo en medio YPD e YPG. B, las proteínas carboniladas fueron detectadas mediante *western blot* tras electroforesis monodimensional utilizando el anticuerpos anti-DNP. C, cuantificación relativa del contenido de carbonilos utilizando la señal quimioluminiscente correspondiente a cada carril del *western blot*. Los niveles de carbonilos de wt crecidos en YPD fueron utilizados como referencia del 100%. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de seis experimentos diferentes y mostraron un incremento significativo tanto del contenido de Fe como de carbonilos con un  $**p < 0.001$ .

Como puede observarse en la Figura III 10 existe un incremento del contenido de hierro total intracelular en la cepa de estudio. Dicha acumulación fue de 2,5 veces cuando las células crecían en medio YPD y de 3 veces cuando crecían en medio YPG. Una posible explicación al diferente grado de incremento en el contenido de hierro dependiendo del medio de cultivo podría ser la diferencia en su metabolismo. Así, en medio rico suplementado con glucosa la levadura presenta un metabolismo principalmente fermentativo y por lo tanto no utiliza la mitocondria con fines energéticos. Sin embargo cuando la levadura es cultivada en medio con glicerol como fuente de carbono, se ve obligada a utilizar el metabolismo oxidativo, obteniendo la energía utilizando la maquinaria mitocondrial. Se sabe que la falta de frataxina ocasiona daño a nivel mitocondrial afectando por ejemplo a la actividad de las enzimas con centros Fe-S entre las que se encuentran componentes de la cadena de transporte de electrones. Por lo tanto, es probable que bajo un metabolismo respiratorio un mutante deficiente en frataxina presente más estrés y como consecuencia se produzca un incremento mayor de hierro en el medio YPG.

Esta acumulación de hierro se corresponde con un aumento en el contenido de grupos carbonilo. Tal como puede observarse en la Figura III 10 B y C, el mutante  $\Delta yfh1$  mostró un aumento significativo del contenido de carbonilos tanto en medio YPD como YPG. Se observó un incremento del 40 y 30% respectivamente. El contenido de carbonilos fue calculado midiendo la intensidad de quimioluminiscencia de cada carril de *western blot* mediante el uso del programa *Quantity One* (ver Materiales y Métodos). Se utilizó el contenido de carbonilos de la cepa silvestre crecida en YPD como valor relativo de referencia (100%). Es interesante señalar que cuando las células crecen en medio con fuente de carbono respirable (YPG) partimos de una situación basal de mayor daño oxidativo. La diferencia en el grado carbonilación entre los medios YPD e YPG ha sido publicada previamente por nuestro grupo (Cabisco et al., 2000). Por otro lado, se puede apreciar en la Figura III 10B que existen bandas que muestran un incremento de intensidad más grande que el resto, lo que confirma que la carbonilación es un proceso selectivo que ocurre en proteínas específicas. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por otros grupos de trabajo en diferentes cepas con deficiencias en *YFH1* (Karthikeyan et al., 2003; Desmyter et al., 2004; Bulteau et al., 2007)

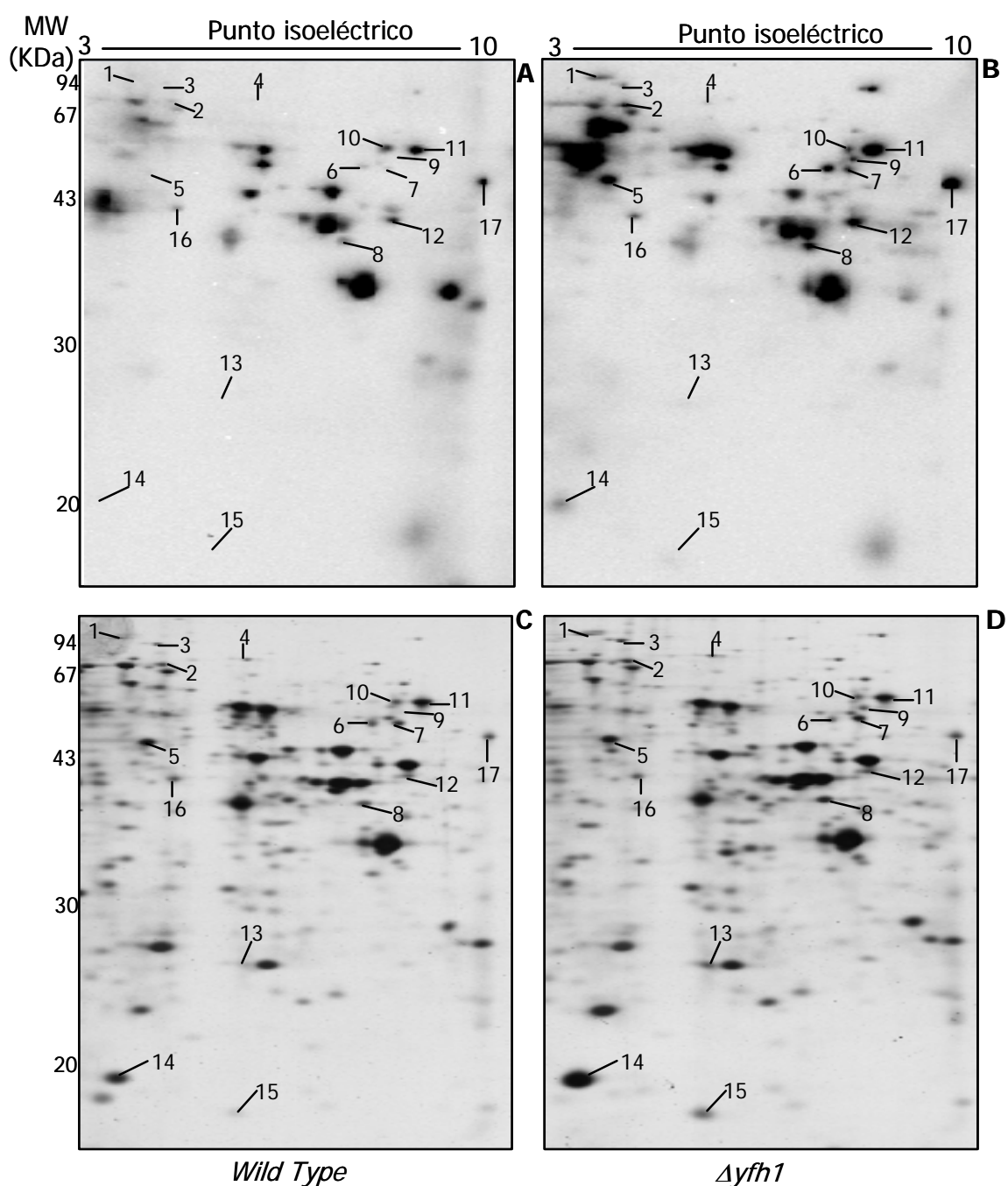
## 2.2. OXIDACIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS EN EL MUTANTE $\Delta yfh1$ .

A partir de las diferencias observadas en el oxi-blot (detección mediante *western blot* de carbonilos) de  $\Delta yfh1$ , nos planteamos utilizar una aproximación que nos permitiera identificar las proteínas que se veían selectivamente carboniladas en la cepa mutante. Con tal fin, realizamos el análisis comparativo entre la cepa silvestre y  $\Delta yfh1$  utilizando electroforesis bidimensional como método de separación de proteínas, seguido por *western blot* con el anticuerpo específico anti-DNP. En este caso, las proteínas fueron derivatizadas con DNPH una vez separadas según su punto isoeléctrico (derivatización en tira). Con el objetivo de generar la menor variación en la manipulación de las muestras a comparar, en la segunda dimensión de la 2D las dos tiras de IPG de 7 cm (rango 3-10 no lineal) fueron colocadas en paralelo en un mismo gel de 18x18 cm. Una tira contenía las proteínas de wt y la otra las de  $\Delta yfh1$ . De esta manera, en un mismo gel se separaron las proteínas de ambas cepas en idénticas condiciones. Posteriormente, una única membrana fue incubada con la misma solución de anticuerpos y luego de sustrato.

Se decidió utilizar YPG como medio de cultivo, debido a que su metabolismo energético se aproxima a las células más afectadas en los pacientes que sufren la Ataxia de Friedreich. Las

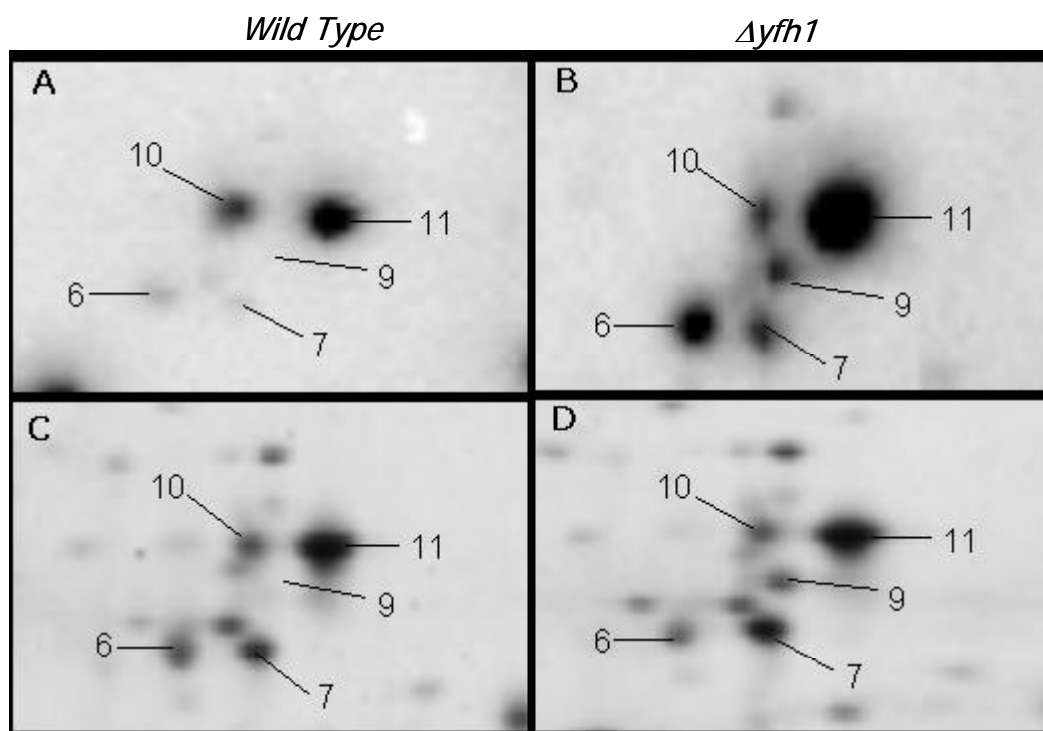
células fueron recolectadas en su fase exponencial y se realizó la detección de carbonilos tal como se describe en Materiales y Métodos. Las imágenes obtenidas a partir de las membranas sometidas al *western blot* anti-DNP fueron analizadas por el programa *PDQuest* (Figura III 11 A y B). A partir de ellas, fueron seleccionados aquellos *spots* que presentaron un nivel de señal de al menos dos veces superior en el mutante deficiente en frataxina (Tabla III 2). Con el objetivo de visualizar las proteínas a las cuales correspondían los *spots* en la membrana, se realizaron electroforesis bidimensionales en paralelo en las mismas condiciones que las utilizados para *western blot* y que fueron reveladas mediante tinción con plata (Figura III 11 C y D). Estos geles permitieron el cálculo del grado de carbonilación de cada proteína con relación a la cantidad de la misma haciendo una relación entre la cantidad de oxidación y la cantidad de proteína en cada caso (oxidación/proteína; Tabla III 2).





**Figura III 11: Análisis del proteoma y oxiproteoma de wild type y  $\Delta yfh1$  en medio YPG mediante 2D.** Las células fueron crecidas en medio YPG y 40  $\mu\text{g}$  del lisado celular fueron separados por electroforesis bidimensional. A y B, los gels fueron transferidos a membranas de PVDF y se detectaron las proteínas oxidadas con anticuerpos anti-DNP. La imagen A corresponde a wild type y la B a  $\Delta yfh1$ . C y D gels revelados mediante tinción de plata. La imagen C corresponde a wt y la D a  $\Delta yfh1$ . Todas las imágenes fueron analizadas por el programa PDQuest en busca de spots que mostraran una diferencia reproducible de más de 2 veces en su grado de carbonilación entre ambas cepas en al menos tres experimentos independientes (Tabla III 2).

Una vez localizados las proteínas, se realizaron electroforesis bidimensionales preparativas con el objetivo de identificar las proteínas oxidadas. Estas 2D se realizaron con mayor cantidad de proteína (400 µg) y tan solo con los extractos crudos de *Δyfh1* ya que era el que presentaba las proteínas modificadas. Las proteínas de dichos geles fueron teñidas con Sypro Ruby (Bio-Rad). Esta tinción fluorescente presenta la ventaja de no interferir con la ionización tipo MALDI necesaria para su identificación. Los *spots* fueron recortados del gel y colocados en las *ZipPlate* donde se procedió a su digestión enzimática con tripsina. Su posterior análisis se realizó mediante el uso de MALDI-TOF. La identificación de las proteínas se realizó por huella de masas peptídicas utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Materiales y Métodos).



**Figura III 12: Ampliación de una zona de la figura 11.** A y B, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF y se detectaron las proteínas oxidadas con anticuerpos anti-DNP. La imagen A corresponde a wild type y la B a *Δyfh1*. C y D geles revelados mediante tinción de plata La imagen C corresponde a wt y la D a *Δyfh1*. Los números corresponden a las proteínas de la Tabla III 2 y la Figura III 11.

En la Figura III 12 puede observarse la ampliación de una zona de los geles mostrados en la Figura III 11. En esta ampliación observamos como la diferencia en carbonilación no se corresponde con una mayor cantidad en proteína total (Figura III 12 C y D). Este hecho

demuestra la especificidad y selectividad de la técnica utilizada para la detección de daño oxidativo a proteínas.

Algunas de las proteínas inducidas en  $\Delta yfh1$  en el análisis proteómico presentado en el capítulo 1 de estos resultados, fueron también identificadas como oxidadas. Ellas son Adk1, Cta1, Ahp1 y Sod1. De este modo podemos considerar que estas proteínas además de estar inducidas, presentan un grado de carbonilación específico que excede a su cantidad en  $\Delta yfh1$ . Por ejemplo, la catalasa (*spot 9*) se observa inducida en el mutante unas 6 veces con respecto al wt (Figura III 12C y D; Tabla III 2) pero a su vez presenta casi 50 veces mayor nivel de señal en los oxi-blots, lo que nos deja una oxidación relativa de 8 veces superior en  $\Delta yfh1$  con respecto a wt. Sin embargo, al medir la actividad de dicha enzima encontramos un aumento de hasta 6,5 veces más actividad catalasa en  $\Delta yfh1$  con respecto a wt (Figura III 2), hecho que indica que no toda la proteína se encuentra oxidativamente inactivada.

**Tabla 2: Identificación de las proteínas carboniladas en  $\Delta yfh1$ .** Se indica el nombre de la proteína, su correspondiente gen, el o los *spots* a los que corresponden en las membranas y geles de la Figura III 11. El grado de oxidación en  $\Delta yfh1$  respecto a wt fue cuantificado de los oxi-blot de la Figura III 11 A y B. La cantidad de proteína en  $\Delta yfh1$  con respecto a wt fue cuantificado de los geles teñidos con plata (Figura III 11 C y D). Los valores de la última columna son la relación entre el grado de oxidación y los niveles de proteína y representan el incremento relativo del daño oxidativo en cada proteína identificada en  $\Delta yfh1$ . Los distintos *spots* correspondientes a una misma proteína fueron tratados de manera independiente. Los datos se representan como la media de 3 experimentos  $\pm$  la desviación estándar.

Proteína	Gen	Spots	Grado de Oxidación $\Delta yfh1/wt$	Cantidad de Proteína $\Delta yfh1/wt$	Oxidación/ Proteína $\Delta yfh1/wt$
<b>Proteína mitocondrial de choque térmico</b>	SSC1	1	3.41 $\pm$ 2.24	0.87 $\pm$ 0.46	3.92
		3	3.13 $\pm$ 0.41	1.30 $\pm$ 0.60	2.40
<b>Chaperona de la matriz mitocondrial Homóloga citoplasmática de la proteína de choque térmico</b>	HSP78	4	14.61 $\pm$ 1.20	0.95 $\pm$ 0.35	15.34
<b>ATP sintasa F1FO subunidad <math>\alpha</math></b>	ATP1	6	5.45 $\pm$ 0.73	1.20 $\pm$ 0.28	4.54
		7	12.14 $\pm$ 3.72	1.0 $\pm$ 0.42	12.14
<b>ATP sintasa F1FO subunidad <math>\beta</math></b>	ATP2	5	3.37 $\pm$ 1.45	0.71 $\pm$ 0.38	4.74
<b>Acetohidroxiácido reductoisomerasa</b>	ILV5	8	10.26 $\pm$ 2.51	1.06 $\pm$ 0.55	9.67
<b>Piruvato quinasa 1</b>	CDC19	10	3.48 $\pm$ 1.31	0.90 $\pm$ 0.14	3.86
		11	2.76 $\pm$ 0.93	0.80 $\pm$ 0.28	3.45
<b>3-fosfoglicerato quinasa</b>	PGK1	12	3.92 $\pm$ 1.80	1.05 $\pm$ 0.35	3.73
<b>Adenilato quinasa</b>	ADK1	13	8.23 $\pm$ 2.50	2.50 $\pm$ 0.52	3.30
<b>Catalasa A</b>	CTA1	9	49.7 $\pm$ 6.17	6.17 $\pm$ 1.73	8.05
<b>Peroxiredoxina tiol-específica</b>	AHP1	14	16.32 $\pm$ 4.37	4.36 $\pm$ 1.06	3.74
<b>Superoxido dismutasa CuZn</b>	SOD1	15	14.88 $\pm$ 5.26	5.26 $\pm$ 2.00	2.83
<b>Actina, cadena <math>\alpha</math></b>	ACT1	16	2.61 $\pm$ 0.41	0.76 $\pm$ 0.06	3.43
<b>Factor de elongación traduccional EF-1<math>\alpha</math></b>	TEF2	17	9.12 $\pm$ 1.61	1.28 $\pm$ 0.59	7.12

Las proteínas identificadas pueden agruparse según diferentes parámetros como por ejemplo su localización celular. De esta manera, 6 de las 14 proteínas identificadas que muestra la tabla 2 son de localización mitocondrial (Scc1, Hsp78, Cta1, Atp1, Atp2 y Ilv5) lo que es congruente con un mayor grado de estrés oxidativo en la mitocondria debido al déficit de frataxina. La catalasa se localiza principalmente en el peroxisoma, aunque también ha sido localizada en la mitocondria, especialmente en células crecidas en medio YPG (Petrova et al., 2004).

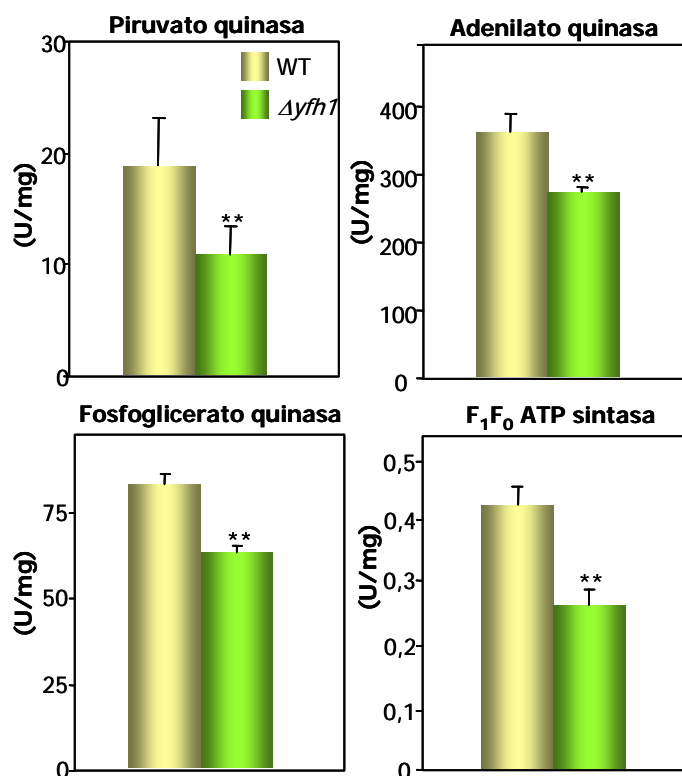
Otra manera de agruparlas es según su función celular. Así tendremos tres chaperonas (Ssc1, Hsp78 y Sse1); seis enzimas implicadas en el metabolismo energético de la célula (Atp1, Atp2, Ilv5, Cdc19, Pgc1 y Adk1); y tres enzimas antioxidantes, previamente

identificadas como sobreexpresadas en  $\Delta yfh1$  (Cta1, Ahp1 y Sod1). La actina que es parte del citoesqueleto y al igual que el factor de elongación de la traducción EF-1 quedarían fuera de estos grupos.

Por último, y como hecho más interesante, 11 de las 14 proteínas identificadas presentan en común la capacidad de unir iones de magnesio. Ellas son: Ssc1, Hsp78, Sse1, Atp1, Atp2, Ilv5, Cdc19, Pgc1, Adk1, Act1 y Tef2. A su vez, podemos subdividir este grupo en aquellas que son capaces de unir el magnesio directamente a las cadenas laterales de los aminoácidos (Cdc19, Ilv5, Atp1 y Atp2) o que las que lo presentan unido a través de nucleótidos (Ssc1, Hsp78, Sse1, Pgc1, Adk1, Act1 y Tef2).

### 2.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS OXIDADAS.

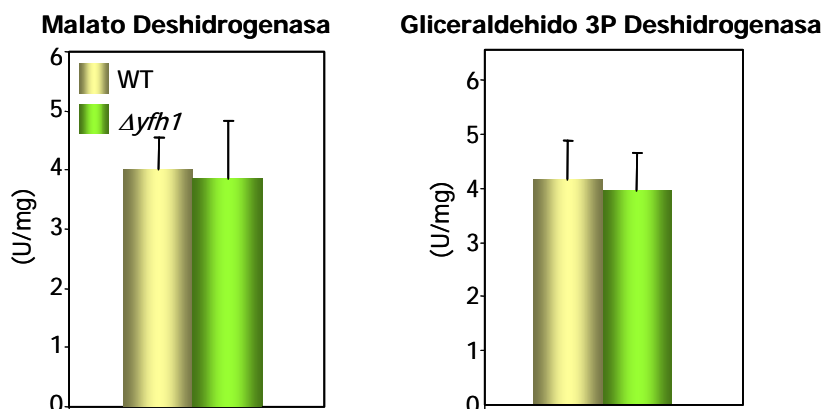
Como se ha comentado, algunas de las proteínas identificadas en este trabajo como dianas de oxidación por estrés oxidativo son enzimas. Con el objetivo de determinar si la carbonilación resultaba en una disminución en su actividad, ésta se analizó en el caso de piruvato quinasa, fosfoglicerato quinasa (ADK), adenilato quinasa y  $F_1F_0$  ATP sintasa. Las tres primeras enzimas son citoplasmáticas y para su determinación se utilizaron extractos totales de proteínas que fueron obtenidos a partir de rotura mecánica de las células (*glass beads*, Materiales y Métodos) y en un buffer adecuado dependiendo de la actividad, tanto en la cepa silvestre como de la mutante. La actividad de ADK se corrigió en  $\Delta yfh1$  teniendo en cuenta los cambios en su cantidad (2,5 veces) calculados a partir de los geles 2D y que pueden ser observados en la tabla III 2. La actividad mitocondrial de  $F_1F_0$  ATP sintasa fue medida en extractos enriquecidos en la fracción mitocondrial. Mediante *western blot* anti-porina, así como midiendo la actividad mitocondrial citrato sintasa, se comprobó que el contenido de proteína mitocondrial en cada preparación de extracto mitocondrial era similar.



**Figura III 13: Actividades enzimáticas específicas de proteínas carboniladas en wt y  $\Delta yfh1$ .** Las actividades enzimáticas piruvato quinasa, adenilato quinasa y fosfoglicerato quinasa fueron medidas en extractos crudos totales. La actividad de adenilato quinasa fue corregida tal como se indica en el texto. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa fue medida en preparaciones mitocondriales. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de al menos tres experimentos diferentes. Se observó una disminución significativa de las actividades enzimáticas en  $\Delta yfh1$  (\*\* $p < 0.01$ ).

Como se observa en la Figura III 13 la actividad de las cuatro enzimas analizadas se encuentra significativamente disminuida en  $\Delta yfh1$ . Este hecho confirma que el estrés producido por la acumulación de hierro en el mutante genera la carbonilación específica de proteínas, produciendo una disminución de su actividad biológica.

Como se indica anteriormente, las enzimas piruvato quinasa y ATP sintasa unen magnesio directamente mientras que la fosfoglicerato quinasa y adenilato quinasa lo presentan unido a través de un nucleótido. Como control de actividades enzimáticas que no presentaran unión a magnesio, se ensayaron las actividades de dos enzimas, malato deshidrogenasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Figura III 14).



**Figura III 14: Actividades enzimáticas específicas de proteínas que no presentan unión a magnesio en wt y  $\Delta yfh1$ .** Actividades enzimáticas en extractos crudos totales de malato deshidrogenasa y gliceraldehido deshidrogenasa. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Los datos indican que no existe diferencia entre la cepa silvestre y la mutante en la actividad enzimática de ninguna de las dos enzimas ensayadas. Esto indica que la inactivación de las enzimas con unión a magnesio es específica.

#### 2.4. LA INACTIVACIÓN DE PIRUVATO QUINASA ESTA MEDIADA POR HIERRO.

De la lista de proteínas modificadas oxidativamente podemos observar que casi el 80% de las proteínas blanco de carbonilación tienen la capacidad de unir magnesio. Además, se ha demostrado que  $\Delta yfh1$  presenta una gran acumulación de hierro que puede llegar a ser 3 veces mayor en las células crecidas en medio YPG. Una hipótesis que relaciona ambos datos es la del reemplazo de metales, donde el hierro sustituiría al magnesio de su sitio de unión a las proteínas y una vez allí podría promover la generación de especies reactivas del oxígeno. Este mecanismo, conocido como "oxidación catalizada por metales" (MCO) está muy localizado en el espacio, de manera que los radicales del oxígeno se generan en el mismo sitio activo de la proteína, lo que da como resultado en muchas ocasiones la inactivación de las enzimas (Levine, 1983; Stadtman, 1990; Tamarit et al., 1998).

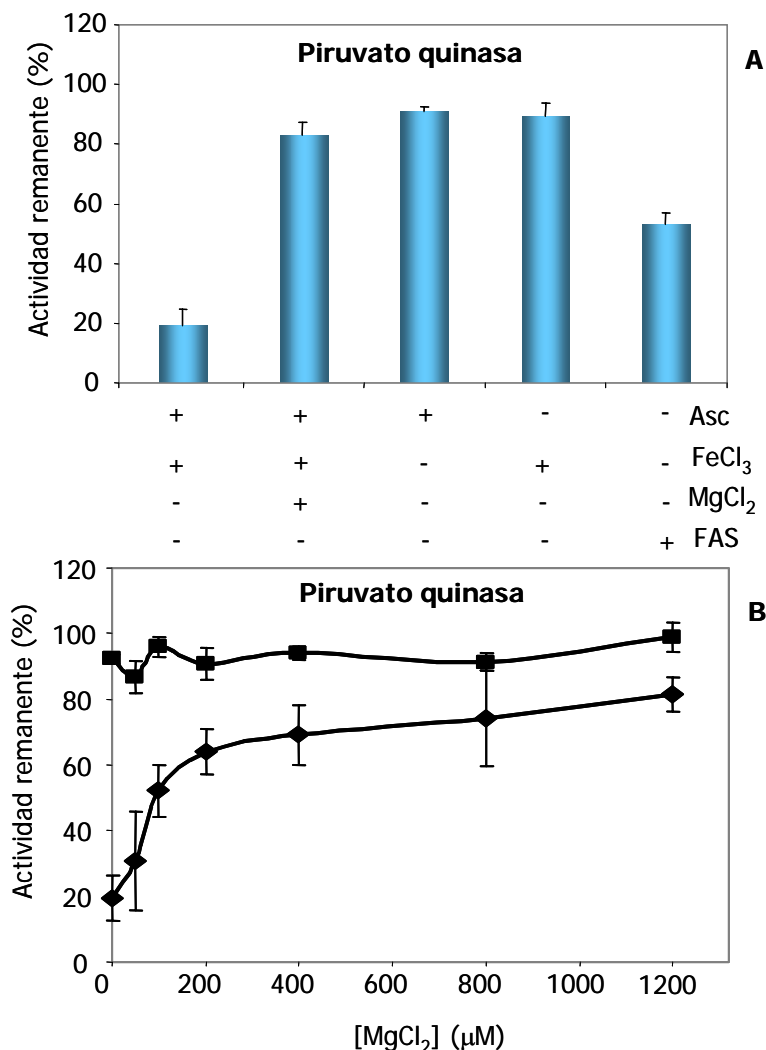
Con el fin de analizar si el hierro era capaz de unirse a las proteínas en los sitios del magnesio y así causar la inactivación de las enzimas, preparaciones puras de piruvato quinasa de conejo fueron incubadas en un sistema pro-oxidante ascorbato/ $Fe^{3+}$ . De esta manera, generamos un sistema MCO que promueve la inactivación de las enzimas siempre y cuando éstas sean capaces de unir hierro en la proximidad de su centro activo (Levine,

1983). La incubación se realizó en presencia de 10 mM de ascorbato y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  durante 20 minutos y luego se midió su actividad. Como muestra la Figura III 15 A, tanto la presencia de ascorbato como la de hierro eran necesarias para promover la inactivación de la enzima, ya que por separado no causaron ningún efecto sobre la actividad. Esto sugiere que el hierro puede unirse a la piruvato quinasa en la vecindad de su centro activo y desde allí promover la generación de ROS que posteriormente causan la inactivación de la enzima. El grado de inactivación de piruvato quinasa fue similar a la observada en otras enzimas sensibles al sistema MCO, bajo condiciones similares en nuestro laboratorio (Cabiscol et al., 1994; Tamarit et al., 1997).

Por otro lado quisimos saber si la capacidad del hierro de causar la inactivación de la enzima dependía de su estado de reducción es decir en su forma  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ . Para ello, en la mezcla de reacción se agregó sulfato de amonio ferroso (FAS) en lugar de  $\text{FeCl}_3$ . Como se puede observar en la Figura III 15 A, el FAS por sí solo promueve una cierta inactivación de la piruvato quinasa. De esta manera queda demostrado que el hierro en su forma reducida es capaz de unirse al sitio de unión del magnesio.

Con el fin de corroborar que el hierro se estaba uniendo en el sitio específico del magnesio, se analizó si el magnesio era capaz de prevenir la inactivación de la piruvato quinasa en el sistema ascorbato-hierro. En la Figura III 14 A se aprecia que con una concentración de 0,4 mM de  $\text{MgCl}_2$  logramos una protección de la inactivación del 80%. Para estudiar mejor este efecto, preparaciones puras de la enzima piruvato quinasa (9  $\mu\text{M}$ ) fueron incubadas con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  y con concentraciones crecientes de  $\text{MgCl}_2$  (50, 100, 200, 400, 800 y 1200  $\mu\text{M}$ ) en presencia de 10mM ascorbato o en su ausencia. Como se observa en la Figura III 15 B, el magnesio previene la inactivación de la enzima de una manera dosis-dependiente, lográndose la mitad de la protección máxima con aproximadamente 85  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ .



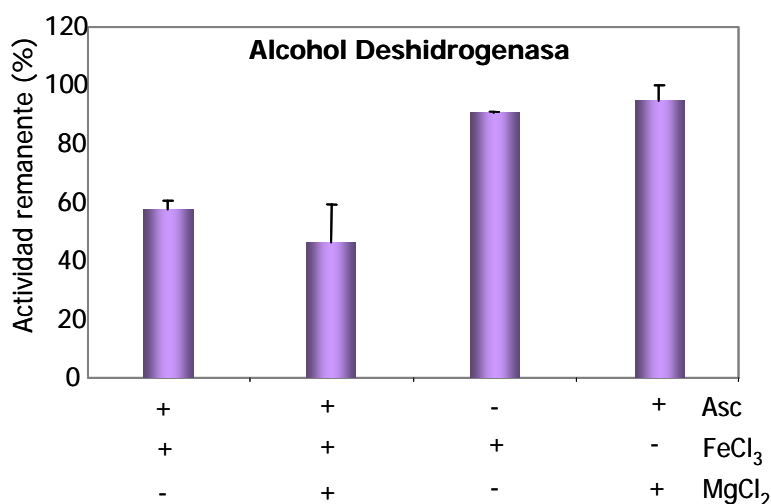


**Figura III 15: Inactivación de piruvato quinasa en el sistema ascorbato-hierro. A,**

Preparaciones puras de piruvato quinasa se incubaron con los siguientes compuestos: 50 μM FeCl<sub>3</sub>, 10 mM ascorbato, 50 μM sulfato de amonio ferroso (FAS) y 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>. Después de 20 min a 20°C se midió su actividad enzimática. B, Preparaciones puras de piruvato quinasa fueron incubadas con FeCl<sub>3</sub> y distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> en presencia ( ) o ausencia ( ) de ascorbato. Los resultados en A y B están representados como medias ± su desviación estándar de al menos tres experimentos diferentes.

Con el fin de comprobar que el efecto de protección del magnesio sobre la piruvato quinasa no era debido a la inactivación inespecífica del sistema ascorbato-hierro, se estudió la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa 1 de *S. cerevisiae* bajo las mismas condiciones. La enzima alcohol deshidrogenasa no tiene la capacidad de unir nucleótidos ni magnesio por lo tanto no debería producirse un efecto de protección por parte del Mg. Preparaciones puras de alcohol deshidrogenasa 1 fueron incubadas con 10 mM ascorbato y

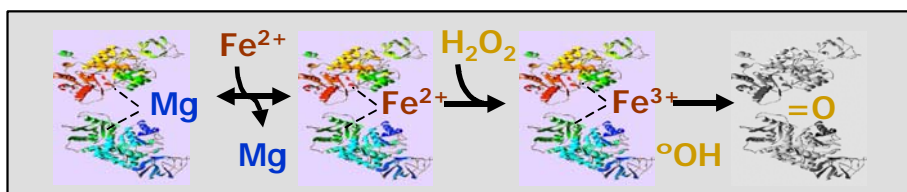
100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ , observándose una inactivación del 40% de la actividad enzimática. Cabe destacar, que en el caso de la piruvato quinasa 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  eran suficientes para causar el 80% de su inactivación. Mientras que en el caso de ADH1 esta misma concentración producía solamente un 20% de la inactivación (dato no mostrado). Esto demuestra la diferente sensibilidad de las proteínas que seguramente es atribuida a su capacidad de unión del hierro. Al incubar la alcohol deshidrogenasa 1 en el sistema ascorbato-hierro y en presencia de 0,4 mM  $\text{MgCl}_2$  no se aprecia protección en su grado de inactivación (Figura III 16).



**Figura 16: Inactivación de alcohol deshidrogenasa 1 de *S. cerevisiae* en el sistema ascorbato-hierro.** Preparaciones puras de alcohol deshidrogenasa se incubaron con 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ , 10 mM Ascorbato y 0.4 mM  $\text{MgCl}_2$ . Después de 20 min a 20°C se midió su actividad enzimática. Se observa un menor grado de inactivación con mayor concentración de hierro y no se aprecia protección de dicha inactivación por parte del Mg. Los resultados están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Estos resultados nos indican que en el caso de piruvato quinasa, efectivamente existe un reemplazo del magnesio por parte de hierro que en último caso promueve la inactivación de la enzima mediante la oxidación catalizada por metales. El esquema de la Figura III 17 muestra el mecanismo por el cual las proteínas que unen magnesio pueden ser más sensibles a la MCO. El exceso de hierro promueve el desplazamiento del magnesio dejando el hierro unido a la proteína en su centro activo. Este hierro tiene la capacidad de reducir al  $\text{H}_2\text{O}_2$  dando lugar a un radical hidroxilo que atacaría a los aminoácidos cercanos del centro

activo, produciendo la formación de grupos carbonilo y en última instancia la pérdida de actividad en el caso de las enzimas.

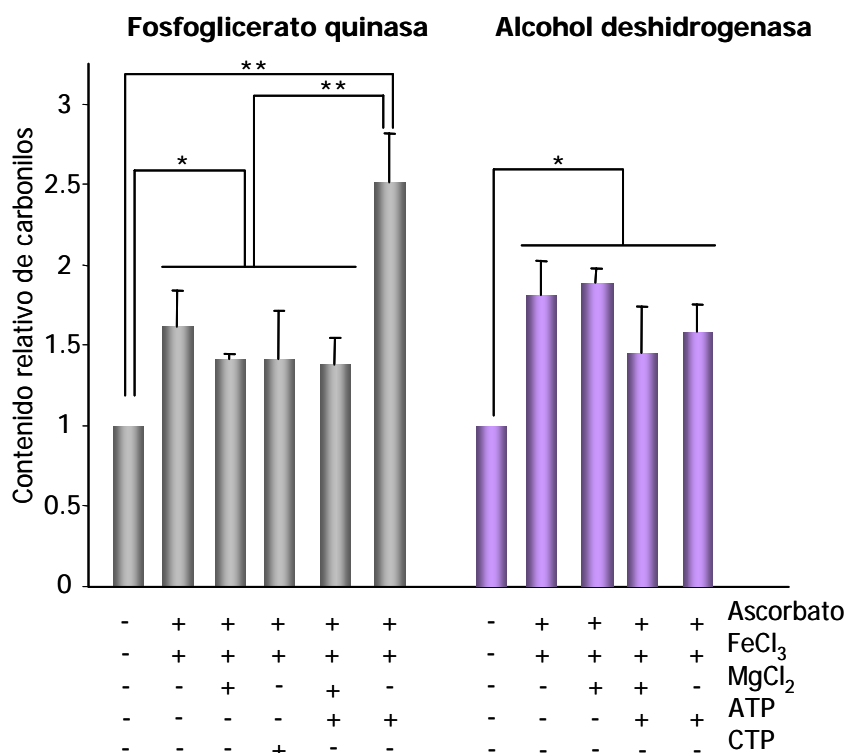


**Figura III 17: Esquema del posible mecanismo de inactivación de las proteínas que unen magnesio bajo condiciones de acumulación de hierro.** Estructura tridimensional de la piruvato quinasa con la unión a metales esquematizada. La pérdida de color de la misma indicaría su inactivación. El mecanismo podría considerarse para todas las proteínas que unen magnesio.

## 2.5. LA CARBONILACIÓN DE FOSFOGLICERATO QUINASA ESTA MEDIADA POR ATP.

A partir de los resultados obtenidos con la piruvato quinasa, nos planteamos el estudio del proceso de la oxidación de las enzimas con sitios de unión a nucleótidos. La mitad de las proteínas identificadas como carboniladas en el mutante deficiente en *YFH1* tienen esta característica en común. Nuestra hipótesis de trabajo se basaba en la conocida capacidad de los nucleótidos de formar complejos con el hierro. Con el propósito de llevar a cabo dicho estudio se eligió la enzima fosfoglicerato quinasa, que presenta un lugar de unión a adenosina tri-fosfato (ATP). En esta ocasión la oxidación fue medida a través del incremento en contenido de grupos carbonilo.

Preparaciones puras de fosfoglicerato quinasa de levadura ( $9\mu\text{M}$ ) fueron incubadas con: 10 mM ascorbato,  $50\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ ,  $25\mu\text{M}$  ATP,  $25\mu\text{M}$  CTP y  $0,4\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ . Luego de la incubación durante 5 minutos a  $20^\circ\text{C}$  en presencia de oxígeno, la fosfoglicerato quinasa fue derivatizada con DNPH y separada en un gel monodimensional. El contenido de grupos carbonilo fue cuantificado mediante *western blot*. Se tomó como referencia el contenido en carbonilos de las muestras no oxidadas (en cuya mezcla de reacción no fueron agregados ninguno de los componentes antes mencionados). Como se aprecia en la Figura III 18 la presencia de ascorbato junto con hierro promueve un aumento del contenido relativo de grupos carbonilo en todas las condiciones probadas.

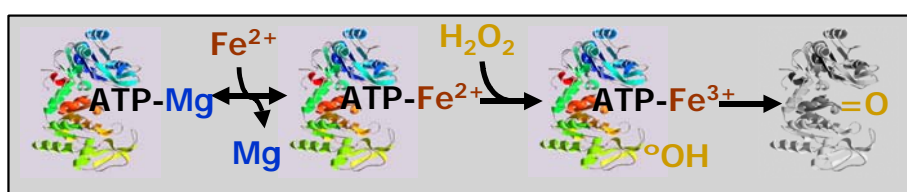


**Figura III 18: La oxidación catalizada por metales en la fosfoglicerato quinasa mediante el sistema ascorbato-hierro se ve incrementada por ATP.** Preparaciones puras de fosfoglicerato quinasa de levadura se incubaron en las condiciones indicadas en el texto. Los datos están representados como las medias  $\pm$  su desviación estándar de seis experimentos diferentes. Se puede observar un incremento significativo en el contenido de carbonilos (\*\* $p < 0.01$ ) cuando las preparaciones contienen ATP, comparado con las que no lo contienen o en aquellas que contienen ATP y magnesio. Como control se ensayó la enzima alcohol deshidrogenasa que fue procesada en paralelo. En este caso, el sistema ascorbato-hierro provoca un incremento significativo de los carbonilos (\* $p < 0.05$ ) que no se ve modificado en presencia de ATP.

En este caso el magnesio no es capaz de prevenir la inactivación provocada por el sistema ascorbato-hierro, lo cual concuerda con el hecho de que esta proteína no presenta sitio directo de unión a magnesio. A su vez, la presencia de 25  $\mu\text{M}$  ATP en la mezcla de reacción incrementa significativamente el contenido de carbonilos en la enzima. En este caso, el magnesio es capaz de revertir este incremento, llegando a los niveles de carbonilación en el ensayo donde se omitió el ATP. Este último resultado nos indica que el ATP es capaz de promover la oxidación de fosfoglicerato quinasa en presencia de hierro. De esta manera, cuando el magnesio compite por el sitio de unión al ATP y reemplaza al hierro se revierte el mecanismo impidiendo el daño oxidativo. Con el fin de asegurarnos que los efectos

observados en fosfoglicerato quinasa eran debidos a su capacidad de unir el complejo ATP-Fe, todos los experimentos fueron llevados a cabo en paralelo con la enzima alcohol deshidrogenasa 1. Los datos muestran que el sistema ascorbato-hierro induce significativamente el contenido en grupos carbonilos de esta enzima, pero en presencia de ATP no se observa ningún efecto adicional sobre el contenido de los mismos. Este hecho reafirma que el ATP debe estar unido a la proteína para causar el daño promovido por el hierro. Otra manera de corroborar la especificidad del daño provocado en la fosfoglicerato quinasa a través del complejo ATP-Fe, es utilizar otro nucleótido que no presente unión a la proteína. La incubación en presencia de CTP en lugar de ATP no muestra ningún efecto en el grado de carbonilación de la proteína, lo que corrobora nuestros resultados.

Al extrapolar estos resultados a un mecanismo de acción más general, podemos concluir que en una situación en donde la célula sufra acumulación de hierro, aquellas proteínas que presenten unión a nucleótidos tendrán mayor posibilidad de ser blanco del daño oxidativo. Este mecanismo puede ser visualizado en el esquema de la Figura III 19.



**Figura III 19: Esquema del posible mecanismo de oxidación de las proteínas que unen magnesio a través de ATP bajo condiciones de acumulación de hierro.** Estructura

tridimensional de la fosfoglicerato quinasa con la unión a ATP-metales esquematizada. La pérdida de color de la misma indicaría su inactivación por carbonilación.

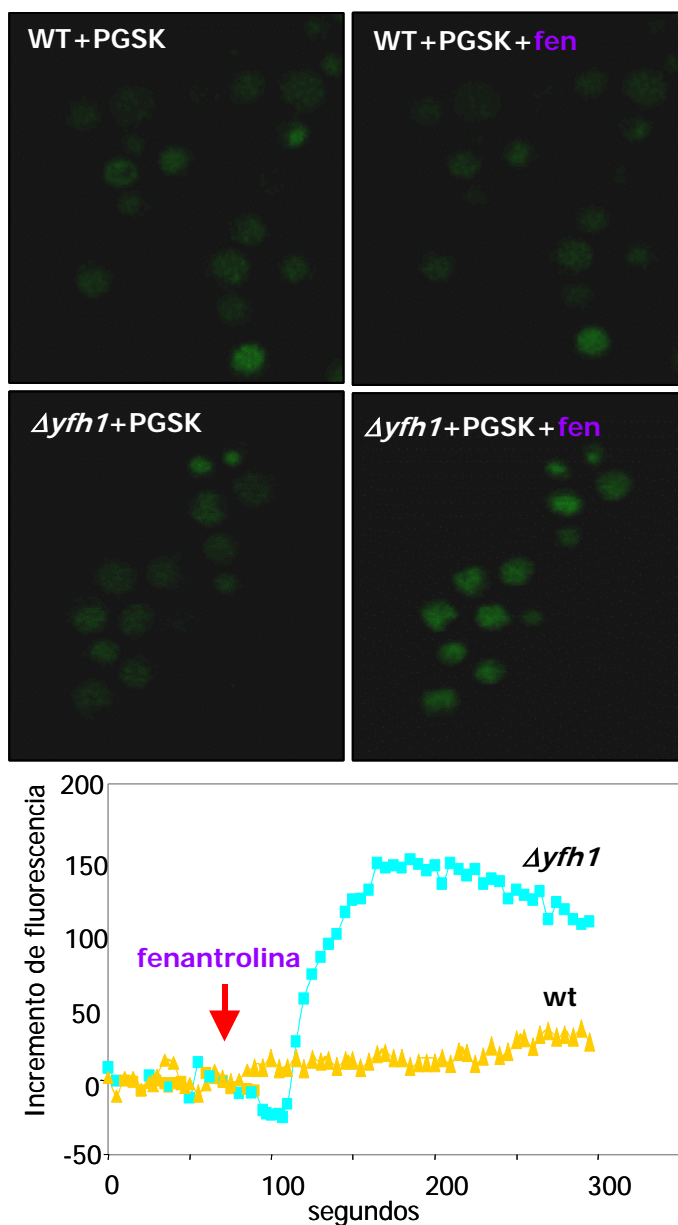
## 2.6. EL MUTANTE $\Delta yfh1$ PRESENTA UN INCREMENTO EN EL CONTENIDO DE HIERRO QUELABLE.

Como se ha demostrado anteriormente, el mutante deficiente en *YFH1* presenta altos niveles de hierro intracelular. Sin embargo, la naturaleza de este hierro no ha sido estudiada. Existe una fracción del hierro celular denominada hierro quelable debido a que puede ser detectado y/o eliminado por quelantes. Dicha fracción es transitoria y es considerada como la directamente involucrada en la toxicidad del hierro ya que es capaz de catalizar la generación de especies reactivas del oxígeno con gran facilidad. Se utilizan diferentes términos que le dan nombre, entre ellos están los de "hierro libre", "hierro redox activo" o "fracción de hierro lábil". Consiste en ambas formas iónicas del hierro ( $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ ) asociada

a diversos ligandos entre los que se encuentran aniones orgánicos (fosfatos y carboxilatos), polipéptidos y componentes de las superficies de membranas. Así también, se ha encontrado unido a moléculas de bajo peso molecular como ATP, citrato y a proteínas en lugares inespecíficos. El hierro unido a estos compuestos se encuentra en equilibrio y puede participar potencialmente de ciclos redox (Petrat et al., 2001; Kakhlon and Cabantchik, 2002).

Con el objetivo de caracterizar más a fondo el tipo de hierro presente en nuestro mutante, analizamos la presencia de hierro quelable. Con tal propósito, utilizamos la sonda fluorescente *Phen Green SK*. Esta sonda presenta el quelante fenantrolina asociado a un grupo fluorescente modificado cuya fluorescencia desaparece tras la unión del hierro. Dentro de las células, esta sonda se une al hierro quelable y por lo tanto no presenta fluorescencia. La unión entre *Phen Green SK* y el hierro es revertida por la adición de un quelante de hierro permeable a la membrana plasmática: 1,10-fenantrolina. De esta manera, cuanto más hierro quelable se haya unido a la sonda, mayor incremento de fluorescencia se obtendrá al añadir la fenantrolina y por lo tanto mayor será el contenido de la fracción de hierro oxidativamente activo.

El contenido de hierro quelable fue estimado en células creciendo en medio YPD. Estas células fueron lavadas con medio sintético y posteriormente incubadas con 20  $\mu$ M de *Phen Green SK*. La incubación se realizó a temperatura ambiente, protegidas de la luz y sobre cubreobjetos previamente tratados con concanavalina A, una lectina que permite la inmovilización de las células a la superficie del cubreobjetos. Las células fueron lavadas nuevamente con medio sintético y se midió su fluorescencia mediante un microscopio confocal. Tras medir la fluorescencia basal durante 1 minuto, se añadía la fenantrolina y a continuación se registraba el aumento de la señal que era directamente proporcional a la cantidad de hierro quelable presente en las células. Dicho aumento fue 7 veces superior en el mutante  *$\Delta yfh1$*  respecto al wt. Para realizar los cálculos fueron consideradas un mínimo de 30 células por cada punto de la curva y este experimento fue repetido tres veces (la Figura III 20 muestra un experimento representativo).



**Figura III 20: Incremento del hierro quelable en  $\Delta yfh1$ .** Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, fueron tomadas antes de añadir la fenantroline (Wt+PGSK y  $\Delta yfh1$ +PGSK) y 90 segundos después (Wt+PGSK+fen y  $\Delta yfh1$ +PGSK+fen). El gráfico muestra un experimento representativo. Cada símbolo representa el promedio de la fluorescencia de 30 células en un mismo campo (unidades arbitrarias). La flecha indica el momento en el que se añade la fenantroline.

Estos resultados demuestran que las células  $\Delta yfh1$  presentan un alto contenido de hierro quelable, que es estadísticamente significativo cuando se lo compara con cepas que no presentan acumulación de hierro. Por otro lado conocemos la acción pro-oxidante del hierro unido a proteínas y nucleótidos (Yamazaki and Piette, 1990; Tamarit et al., 1997; Pierre and Fontecave, 1999; Eaton and Qian, 2002). Si tenemos en cuenta ambos hechos podemos

sugerir que en el mutante deficiente en *YFH1* el hierro quelable es capaz de remplazar al magnesio que se encuentra directamente unido a las proteínas o a través de nucleótidos, causando la oxidación de dichas proteínas.

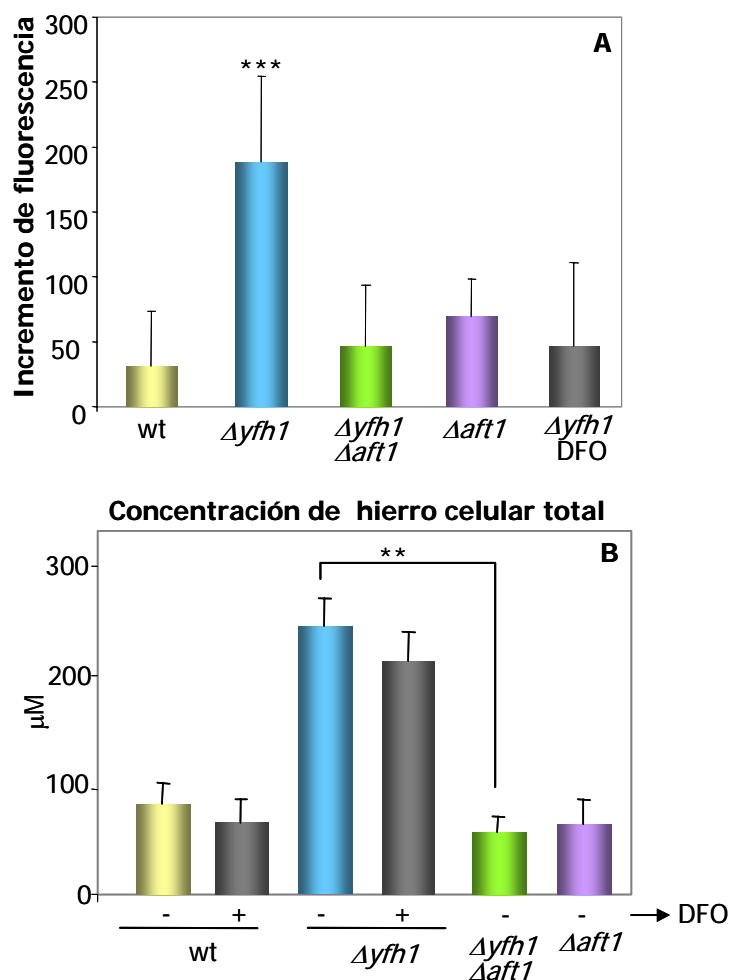
## 2.7. EL INCREMENTO DE HIERRO QUELABLE EN $\Delta yfh1$ ES PREVENIDO CON DESFERRIOXIAMINA O CON LA MUTACIÓN EN EL GEN *AFT1*.

Con el fin de analizar el impacto de la acumulación de hierro sobre la oxidación de proteínas, se desarrollaron dos estrategias para prevenir la acumulación de hierro en  $\Delta yfh1$ ; la mutación del gen *AFT1* y el tratamiento con el quelante desferrioxamina (DFO).

Aft1 es un factor de transcripción de *Saccharomyces cerevisiae* que está implicado en el metabolismo de hierro intracelular. Es capaz de migrar del citoplasma al núcleo cuando detecta la falta de hierro dentro de la célula. Una vez en el núcleo promueve la transcripción de genes implicados en el transporte de hierro intracelular, lo que provoca la entrada del metal. Foury y colaboradores observaron en un estudio transcripcional que en el mutante  $\Delta yfh1$  se encuentra activado *AFT1*, lo que provoca a su vez la inducción de los genes involucrados en la maquinaria transportadora de hierro dentro de la célula (*FTR1*, *FET3*, *FRE1*, *FRE2*, etc.). Esto demuestra que la acumulación de hierro en las células deficientes en *YFH1* se debe a la activación de *AFT1* (Foury and Talibi, 2001). Con el fin de profundizar en la relación entre estos dos genes y el metabolismo del hierro, se deletionó el gen *AFT1* en las células deficientes en *YFH1*. Este doble mutante se realizó cruzando un  $\Delta yfh1$  *MAT $\alpha$*  con un  $\Delta aft1$  *MAT $\alpha$*  en el fondo genético W303 (Materiales y Métodos 2.7). Cabe destacar que el mutante  $\Delta aft1$  crece de forma muy lenta en medios con fuente de carbono no fermentables, por lo tanto todos los experimentos llevados a cabo con este mutante y sus derivados se realizaron en medio YPD.

Con el fin de estudiar el contenido de hierro quelable en la nueva cepa  $\Delta yfh1\Delta aft1$ , se utilizó la sonda *Phen Green SK* bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Como se observa en la Figura III 21 A los valores de hierro quelable del doble mutante fueron muy similares a la del  $\Delta aft1$  y a su vez ambas presentaron valores muy parecidos a los de la cepa W303. Los valores de hierro total también volvían a la normalidad.





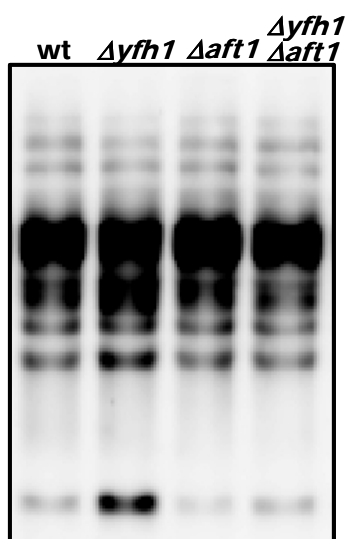
**Figura III 21: Niveles relativos del hierro quelable y hierro total en wt,  $\Delta yfh1$ ,  $\Delta aft1$  y  $\Delta yfh1 \Delta aft1$ .** A, los valores corresponden al incremento de fluorescencia (unidades arbitrarias) observados por segundos tras la adición de la fenantrolina. Los datos están representados como la media  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes. En cada experimento se cuantificó la fluorescencia de al menos 30 células. Los valores mostraron diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.0001$ ; ANOVA). Se utilizó el test de Tukey para analizar los grupos que presentaran diferencias significativas. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa (\*\*\*) cuando el  $\Delta yfh1$  fue comparado con wt,  $\Delta aft1$ ,  $\Delta yfh1 \Delta aft1$  o  $\Delta yfh1$  tratado con desferrioxamina ( $\Delta yfh1$  DFO). No se encontró ninguna otra diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados. B, las células wild type,  $\Delta yfh1$ ,  $\Delta aft1$ ,  $\Delta yfh1 \Delta aft1$  fueron crecidas en medio YPD, suplementados o no (+ ó -) con 0.5 mM desferrioxamina. La concentración del hierro total en las células fue determinada como se indica en Materiales y Métodos. DFO no promueve un descenso significativo de la concentración de hierro total en wt ni en  $\Delta yfh1$ , mientras que la disrupción de *AFT1* en  $\Delta yfh1$  produce una disminución estadísticamente significativa del contenido de hierro total (\*\*  $p < 0.01$ ).

Por último, se añadió 0,5 mM del quelante de hierro desferrioxamina (DFO) a las células  $\Delta yfh1$  creciendo en YPD. Este quelante puede penetrar en las células y formar un complejo

con el hierro en su forma  $\text{Fe}^{3+}$  que luego es eliminado de la célula. A la concentración utilizada, la DFO tiene la capacidad de unirse solo al hierro libre y no al que está formando parte de proteínas como los citocromos. Como se aprecia en la Figura III 21 A, el mutante deficiente en *YFH1* tratado con DFO baja el nivel de hierro quelable a valores similares al control, confirmando su naturaleza quelable. Sin embargo al medir el contenido de hierro total dentro de las células no encontramos un descenso significativo del contenido de hierro total con el tratamiento con DFO (Figura III 21 B). Esto nos indica que el hierro quelable es sólo una pequeña parte del hierro total que acumulan las células deficientes en *YFH1*.

## 2.8. EL DAÑO OXIDATIVO DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A MAGNESIO EN $\Delta yfh1$ ES CONSECUENCIA DEL INCREMENTO EN HIERRO QUELABLE.

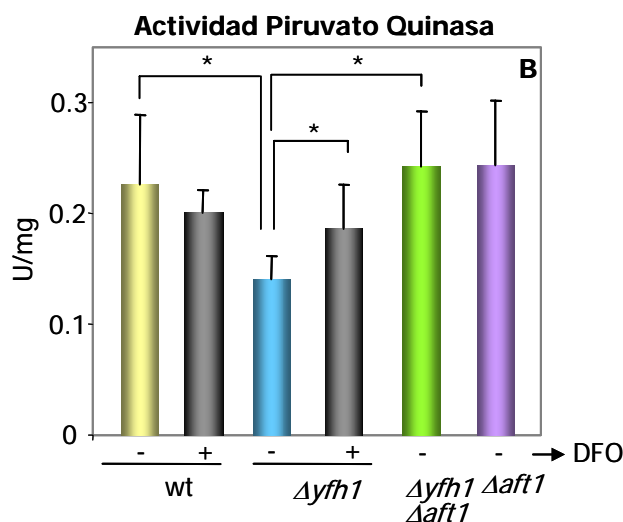
Con el fin de demostrar que el contenido de hierro quelable en  $\Delta yfh1$  es el responsable del daño oxidativo en las proteínas, analizamos el contenido de carbonilos en las células  $\Delta aft1$  y  $\Delta yfh1\Delta aft1$  como indicador de daño total a proteína, así como la actividad piruvato quinasa, como indicador de daño a proteína de unión a Mg. (Figura III 22).



**Figura 22. Daño oxidativo en wt,  $\Delta yfh1$ ,  $\Delta aft1$  y  $\Delta yfh1\Delta aft1$ .** Las proteínas carboniladas fueron detectadas mediante *western blot* de electroforesis monodimensional utilizando un anticuerpos anti- DNP. Las células fueron crecidas en medio YPD.

Al analizar el daño oxidativo de las proteínas totales mediante *western blot* monodimensional, observamos que el contenido de carbonilos de  $\Delta aft1$  y  $\Delta yfh1\Delta aft1$  fue prácticamente indistinguible con respecto a la cepa control. Estos resultados concuerdan con los de la Figura III 21 en donde observamos que en la cepa doble mutante no existe

acumulación ni de hierro libre ni de hierro total. Por lo tanto, al restablecer los niveles de hierro en  $\Delta yfh1$  mutando el gen *AFT1* logramos una protección contra el daño oxidativo general.



**Figura III 23: Actividad Piruvato Quinasa en células  $\Delta yfh1$  privadas de hierro.** La actividad enzimática de piruvato quinasa fue medida en extractos crudos totales. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de cuatro experimentos distintos. La actividad en  $\Delta yfh1$  fue significativamente menor que la de wt,  $\Delta yfh1 \Delta aft1$  o el  $\Delta yfh1$  tratado con DFO (\* $p > 0.05$ ).

Como muestra la Figura III 23 B, la actividad piruvato quinasa fue recuperada a niveles similares al wt en las cepas  $\Delta aft1$  y  $\Delta yfh1 \Delta aft1$ . Para confirmar que el aumento de hierro quelable es la fracción de hierro responsable del daño oxidativo en  $\Delta yfh1$ , tratamos las células deficientes en *YFH1* con el quelante de hierro desferrioxamina. Como se observa en la Figura III 21 el tratamiento con DFO provoca un marcado descenso del contenido de hierro quelable en  $\Delta yfh1$ . Al eliminar esta fracción de hierro pro-oxidante recuperamos la actividad de la enzima piruvato quinasa de manera significativa (Figura III 23), demostrando así que el hierro quelable es el responsable de su inactivación.

Estos resultados nos indican que en las células  $\Delta yfh1$  los altos niveles de hierro quelable desplazan a los metales unidos a las proteínas, dando lugar a la oxidación e inactivación de las mismas.

Finalmente cabe señalar que, a pesar de que la mayoría de las proteínas carboniladas en  $\Delta yfh1$  presentan unión a magnesio, otras proteínas de unión a metales han sido identificadas

como proteínas oxidadas o inactivadas. Un ejemplo sería la superóxido dismutasa 1, que presenta un centro metálico (CuZn). Este hecho sugiere que el mecanismo de inactivación descrito en este capítulo puede ser extendido a otras metaloproteínas.



3. **CAPITULO 3:** LA DISMINUCIÓN EN LA ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA 1  
DESCENCADENA DAÑO OXIDATIVO EN LAS LEVADURAS DEFICIENTES EN YFH1

### 3.1. DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD CuZn-SOD EN LAS CÉLULAS $\Delta yfh1$ .

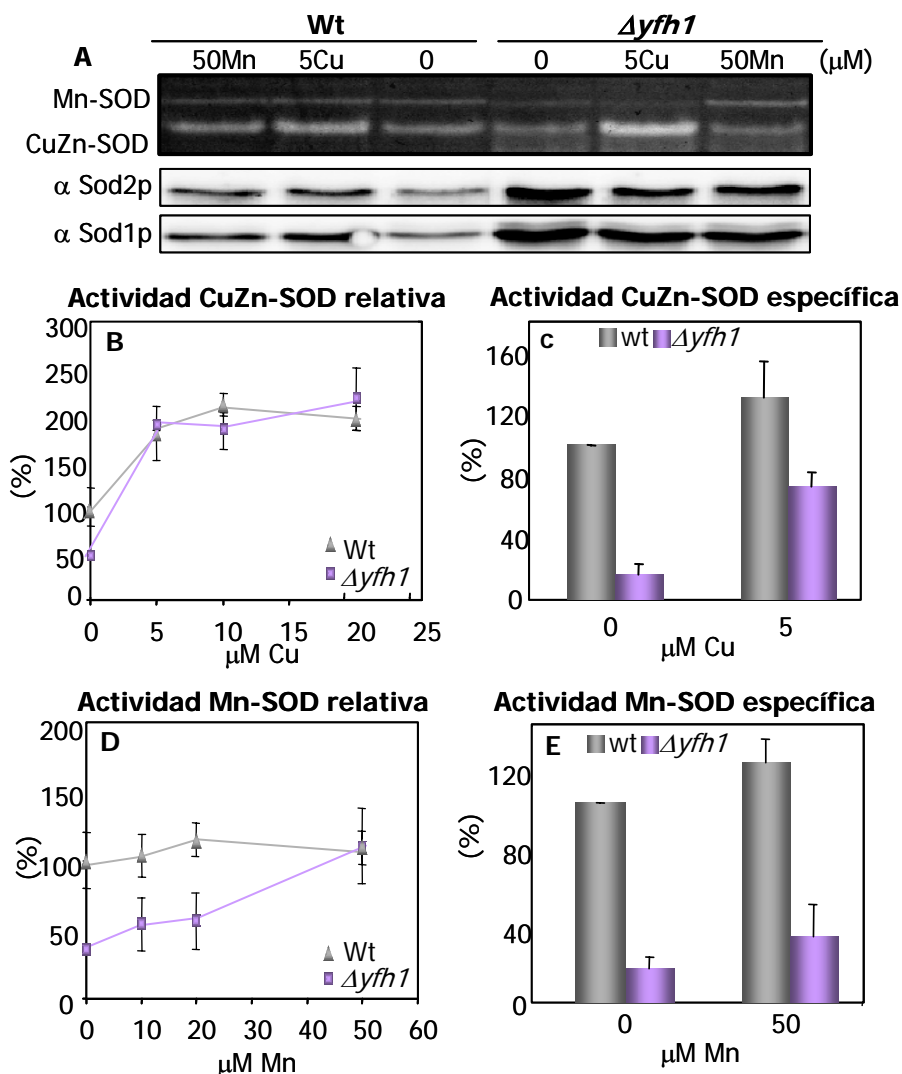
A partir del primer estudio proteómico realizado en este trabajo se llegó a la conclusión de que existe una situación de estrés en el mutante deficiente en *YFH1* dado que se observa la inducción de un gran número de enzimas implicadas en su respuesta. Entre las enzimas inducidas se encuentran las superóxido dismutasas. Sin embargo, al cuantificar la actividad enzimática de estas enzimas observamos una disminución de la actividad de ambas (Figuras III 3 y 6). En un principio nos centramos en la Sod2 porque presentaba un mayor descenso de su actividad enzimática y por su clara implicación en la eliminación de ROS en la mitocondria. Por otro lado, en el segundo capítulo observamos que el estrés oxidativo inducido por el hierro provoca la carbonilación de Sod1 de manera selectiva (Figura III 11). El grado de carbonilación ( $14.88 \pm 5.26$ ) excede al incremento en la cantidad de la proteína ( $5.2 \pm 1.0$ ), lo que nos deja una oxidación casi 3 veces mayor en las células deficientes en *YFH1* con respecto a la salvaje. Esto nos indica que existe una fracción de Sod1 que podría estar dañada en las células  $\Delta yfh1$ . Una manera de corroborar si la carbonilación afecta a la proteína es midiendo su actividad enzimática. Con tal fin, se midió la actividad tanto de Sod1 como de Sod2 en zimogramas de geles nativos teñidos para la actividad superóxido dismutasa.

En la Figura III 24 A podemos observar un descenso de la actividad Sod1 que se hace más evidente cuando la actividad enzimática es referida a la cantidad total de la proteína medida mediante *western blot* (Figura III 24 C). La causa de este descenso en la actividad CuZn-SOD podría ser la carbonilación. Sin embargo, el hecho que sólo el 20% de dicha proteína esté activa en el  $\Delta yfh1$  nos hizo pensar en otra posible causa de inactivación. Como se ha descrito anteriormente, la isoenzima Mn-SOD se encuentra inducida pero inactivada en las células  $\Delta yfh1$  y dicha falta de actividad es causada por la deficiencia en su cofactor, manganeso. Sería lógico pensar entonces que la CuZn-SOD también presentara una limitación a nivel de sus cofactores. El cobre es necesario para el funcionamiento de otras proteínas además de la superóxido dismutasa citoplasmática, entre las que se encuentran la citocromo oxidasa y la multicobre oxidasa Fet3 (O'Halloran and Culotta, 2000). Esta última proteína requiere cuatro iones de cobre y junto con Ftr1 forman el complejo de alta afinidad de transporte de hierro en las células de levadura (Van Ho et al., 2002). Asimismo, en el mutante  $\Delta yfh1$ , *AFT1* se encuentra activado lo que se ha descrito que produce tanto la inducción de *FET3* como la deprivación del cobre citosólico (Foury and Talibi, 2001; Van Ho et al., 2002; Li and Kaplan, 2004). Todo ello nos llevó a pensar que la falta de actividad CuZn-SOD podría ser causada por la falta de cobre en el centro activo de la misma. Para

corroborar esta hipótesis las células de *Δyfh1* fueron crecidas en medio YPG suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Como muestra la Figura III 24 A, B y C, la concentración 5  $\mu$ M de cobre fue suficiente para restablecer la actividad de CuZn-SOD del mutante a niveles similares a los de la cepa silvestre. Asimismo, se observa un aumento en la actividad de Sod1 en wt tratado con cobre que se corresponde con un leve aumento en la cantidad de dicha proteína (*western blot*  $\alpha$ sod1p).

Sin embargo, como se observa en el gráfico de la Figura III 24 C la recuperación total de la actividad CuZn-SOD no es alcanzada si tenemos en cuenta su cantidad de proteína en el mutante deficiente en *YFH1*. Este hecho podría indicar que además de la privación del cobre citoplasmático, habría otro factor que provoca que una fracción de la CuZn-SOD continúe inactiva en *Δyfh1*. Esta fracción de proteína incapaz de recuperar su actividad podría ser la anteriormente descrita como carbonilada.





**Figura III 24: Efecto de la suplementación con cobre y manganeso sobre la actividad CuZn-SOD y Mn-SOD en  $\Delta yfh1$ .** A, Análisis de la actividad SOD (zimograma) luego de la suplementación con cobre y manganeso en el medio de cultivo y análisis de la cantidad de proteína mediante *western blot*  $\alpha$ -Sod1p y  $\alpha$ -Sod2p. B, cuantificación relativa de la actividad CuZn-SOD entre las dos cepas de estudio luego de los tratamientos con concentraciones crecientes de  $\text{CuSO}_4$ . C, estimación de la actividad específica de CuZn-SOD, obtenida de la relación entre la actividad relativa y la cantidad de proteína. D, cuantificación relativa de la actividad Mn-SOD en las dos cepas de estudio luego de los tratamientos con concentraciones crecientes de  $\text{MnCl}_2$ . E, estimación de la actividad específica de Mn-SOD, obtenida de la relación entre la actividad relativa y la cantidad de proteína. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes.

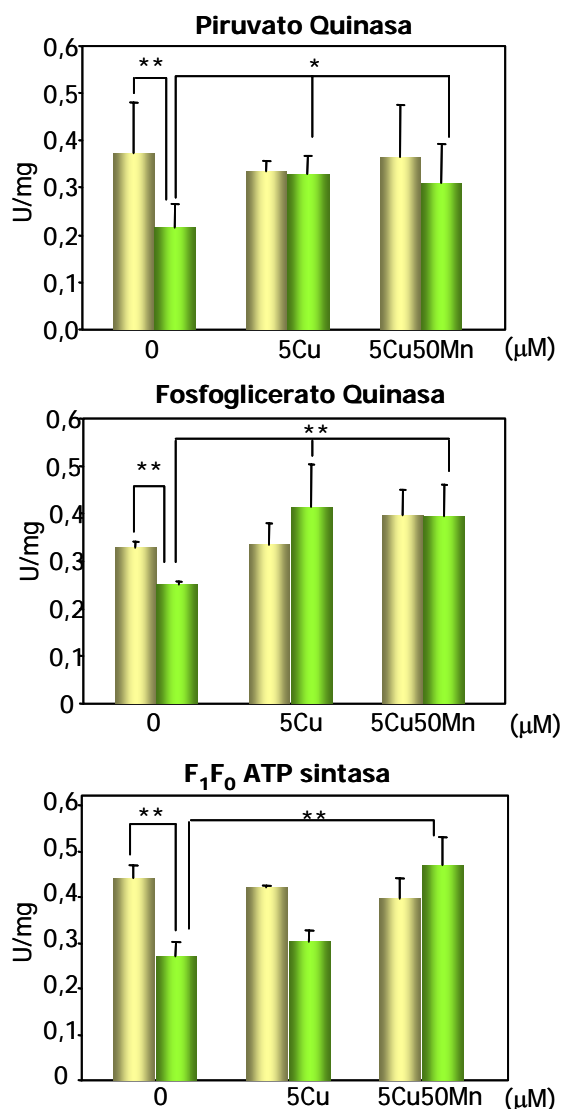
Por otro lado, realizamos el mismo análisis de actividad con respecto a la cantidad de proteína para Mn-SOD. En este caso observamos que a pesar de recuperar la actividad enzimática a niveles muy similares a los de la wild type con la suplementación de manganeso

(50  $\mu\text{M}$ ), existe un 70% de la proteína que permanece inactiva en las células  *$\Delta yfh1$* . La explicación a este dato podría encontrarse en el hecho demostrado de que bajo situaciones de falta de manganeso y/o acumulación de hierro la Mn-SOD puede ser capaz de unir hierro en lugar del manganeso (Yang et al., 2006). En esta forma (Fe-SOD) la enzima es inactiva y puede sufrir oxidación catalizada por metales. Además, hay que tener en cuenta que son los metales (manganeso ó hierro) en su forma libre o quelable los que compiten por la unión a la Sod2 (Culotta et al., 2006). Hemos demostrado en los apartados anteriores que las células  *$\Delta yfh1$*  presentan 7 veces más hierro quelable y 3 veces menos manganeso que una célula silvestre. El mecanismo por el cual el hierro reemplazaría al manganeso en la Mn-SOD parece similar a lo observado en las proteínas de unión a magnesio. En ambos casos se produce la inactivación de las enzimas.

### 3.2. RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS CARBONILADAS EN *$\Delta yfh1$* .

Las células deficientes en *YFH1* presentan comprometida la actividad de diversas enzimas. Entre ellas están las superóxido dismutasas descritas en el apartado anterior, pero también otros grupos de proteínas están inactivadas en este mutante. A partir del estudio del oxiproteoma de  *$\Delta yfh1$*  observamos la carbonilación y la inactivación de enzimas que en su mayoría presentaban unión a magnesio. Así también, en la primera parte del trabajo observamos la disminución de la actividad de enzimas que presentan centros hierro-azufre en su estructura.

En la primera parte del presente trabajo logramos la recuperación de enzimas con centros Fe-S al restablecer la concentración de manganeso intracelular y de esta manera activar la Mn-SOD. Con el fin de conocer la contribución del descenso de las actividades superóxido dismutasas sobre las proteínas de unión a magnesio, se midieron sus actividades enzimáticas en medios suplementados con cobre y manganeso. Se utilizaron concentraciones combinadas de 5  $\mu\text{M}$  cobre y 50  $\mu\text{M}$  manganeso, que son las necesarias para la recuperación de ambas isoenzimas SOD (Figura III 24).



**Figura III 25: Actividades de enzimas inactivadas en  $\Delta yfh1$  y su recuperación con tratamientos con cobre y manganeso.** wt ■  $\Delta yfh1$  ■ Las actividades enzimáticas piruvato quinasa y fosfoglicerato quinasa fueron medidas en extractos crudos totales. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa fue medida en preparaciones mitocondriales y la actividad fue corregida por la cantidad de porina presente en cada preparación mitocondrial. Las células fueron crecidas en YPG suplementadas o no con sólo 5 μM CuSO<sub>4</sub> o una combinación de 5 μM CuSO<sub>4</sub> y 50 μM MnCl<sub>2</sub>. Los datos están representados como medias ± su desviación estándar de cuatro experimentos diferentes. Se observó una disminución significativa (\*\* $p < 0.01$ ) de las actividades enzimáticas y su recuperación con la suplementación con cobre o manganeso (\* $p < 0.05$ ) en  $\Delta yfh1$ .

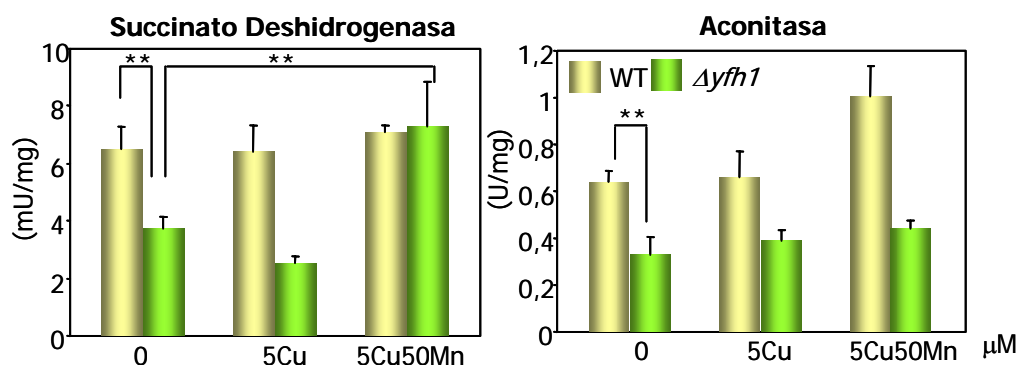
La Figura III 25 muestra la actividad enzimática de piruvato quinasa, fosfoglicerato quinasa y F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa, creciendo en medio YPG con y sin suplementación con CuSO<sub>4</sub> y MnCl<sub>2</sub>. Una observación interesante es que las enzimas citoplasmáticas recuperan su actividad con el tratamiento con cobre, mientras la enzima mitocondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa requiere el

tratamiento con ambos metales. Esto nos indicaría que la falta de actividad CuZn-SOD contribuye al estrés que causa la inactivación de las enzimas citoplasmáticas.

Estos resultados parecen indicar que la inactivación de estas enzimas son responsables del incremento de los niveles de superóxido tanto mitocondrial como intracelular en el mutante *Δyfh1*, originados por la falta de actividad SOD.

### 3.3. RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SUCCINATO DESHIDROGENASA PERO NO DE ACONITASA EN *Δyfh1*.

Como se comentó anteriormente la actividad de las enzimas con centros Fe-S se encuentra disminuida en el mutante deficiente en *YFH1*. Quisimos averiguar si dicha inactivación es causa del estrés dentro de la mitocondria o si está afectada también por los niveles de superóxido intracelulares. Para ello se analizaron las actividades de las enzimas mitocondriales succinato deshidrogenasa y aconitasa en células cultivadas en medio YPG suplementado o no con cobre sólo o con cobre y manganeso. Como muestra la Figura III 26, succinato deshidrogenasa recupera su actividad con tratamientos combinados de 5  $\mu\text{M}$  cobre y 50  $\mu\text{M}$  manganeso, pero no con sólo 5  $\mu\text{M}$  cobre. Un dato interesante es que la recuperación de succinato deshidrogenasa también se logra agregando sólo manganeso en el medio de cultivo pero para lograr una recuperación del 100% se necesita una concentración de 200  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  (Figura III 6). Esto nos indicaría que las enzimas con centros Fe-S se ven afectadas por los niveles citoplasmáticos de superóxido, ya que al restablecer la actividad CuZn-SOD se requiere una concentración menor de manganeso para recuperar la actividad de succinato deshidrogenasa.



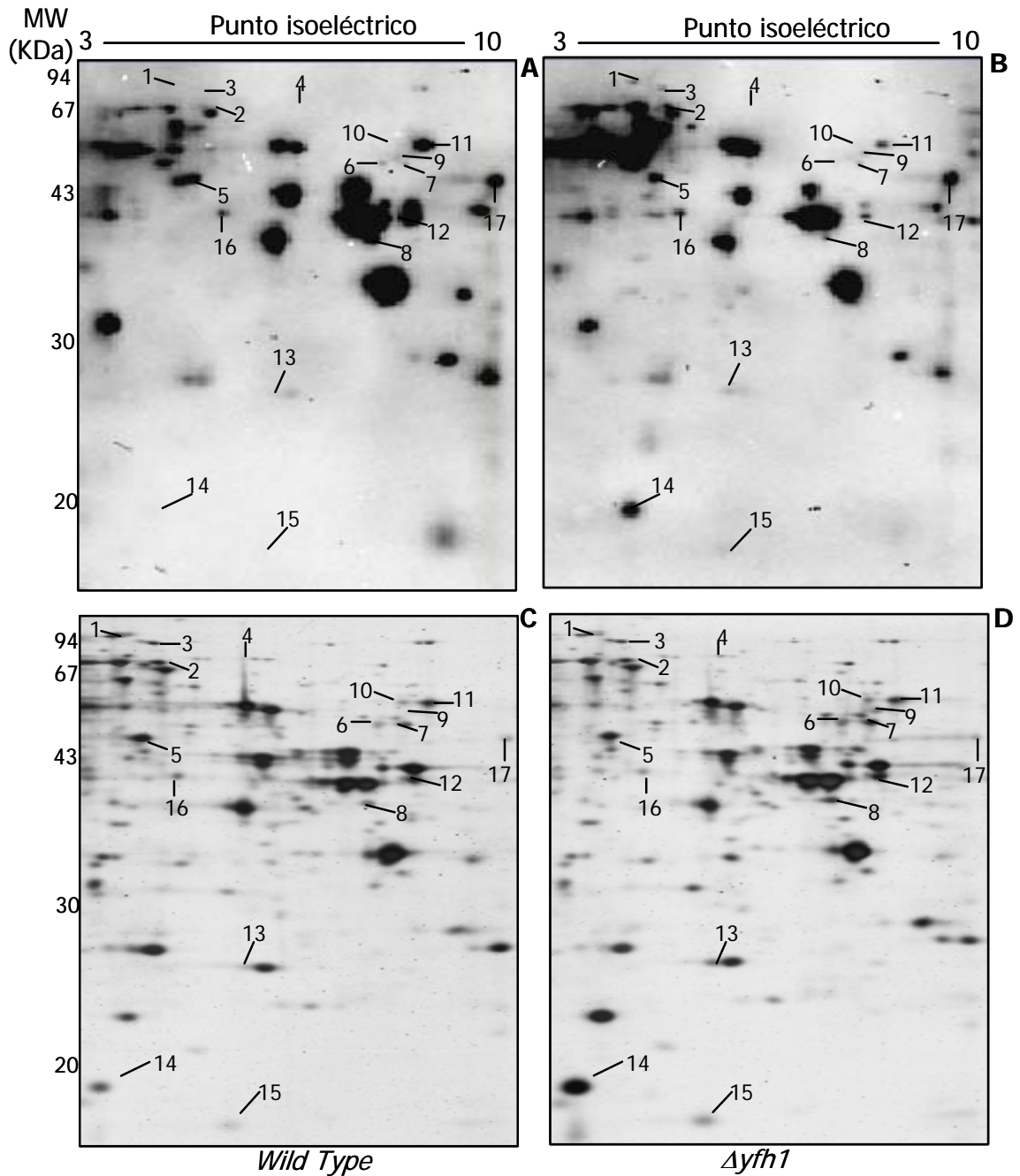
**Figura III 26: Actividades de enzimas con centros Fe-S en células wt y  $\Delta yfh1$**

**suplementadas con cobre o cobre y manganeso.** Actividades enzimáticas en extractos totales antes y después de la suplementación con metales (cobre o cobre combinado con manganeso) en el medio de cultivo. Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes. Se observa una disminución significativa de la actividad de ambas enzimas (\*\* $p < 0.01$ ) y la recuperación de succinato deshidrogenasa con el tratamiento combinado de 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  más 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ .

Por otro lado, no fuimos capaces de recuperar la actividad enzimática de aconitasa con ninguno de los tratamientos realizados, tal como habíamos observado anteriormente con tratamientos con  $\text{MnCl}_2$ . Estos resultados confirman las observaciones previas de que la aconitasa debe ser de alguna manera más dependiente de la presencia de *YFH1* que el resto de enzimas con centros Fe-S.

#### 3.4. PROTECCIÓN CONTRA LA OXIDACIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS CON TRATAMIENTOS COMBINADOS DE COBRE Y MANGANESO EN EL MUTANTE $\Delta yfh1$ .

Partiendo de la recuperación de las actividades enzimáticas de piruvato quinasa, fosfoglicerato quinasa y  $\text{F}_1\text{F}_0\text{ATP}$  sintasa que habían sido identificadas como carboniladas, nos preguntamos en que medida la recuperación de la actividad Sod1 podía contribuir a la disminución del daño oxidativo observado en el mutante  $\Delta yfh1$ . Con tal fin, realizamos el estudio del oxiproteoma de las células de la cepa control y de la deficiente en *YFH1* crecidas en YPG y tratadas con 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  y 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ .



**Figura III 27: Análisis del proteoma y oxiproteoma de wild type y  $\Delta yfh1$  en medio YPG suplementado con cobre y manganeso.** Las células fueron crecidas en medio YPG y 40  $\mu\text{g}$  de proteína del lisado celular fueron separados por electroforesis bidimensional. A y B, los gels fueron transferidos a membranas de PVDF y se detectaron las proteínas oxidadas con anticuerpos anti-DNP. La imagen A corresponde a wild type y la B a  $\Delta yfh1$ . C y D gels revelados mediante tinción de plata. La imagen C corresponde a wt y la D a  $\Delta yfh1$ . Todas las imágenes fueron analizadas por el programa PDQuest para la detección de spots anteriormente identificados (Tabla III 3).

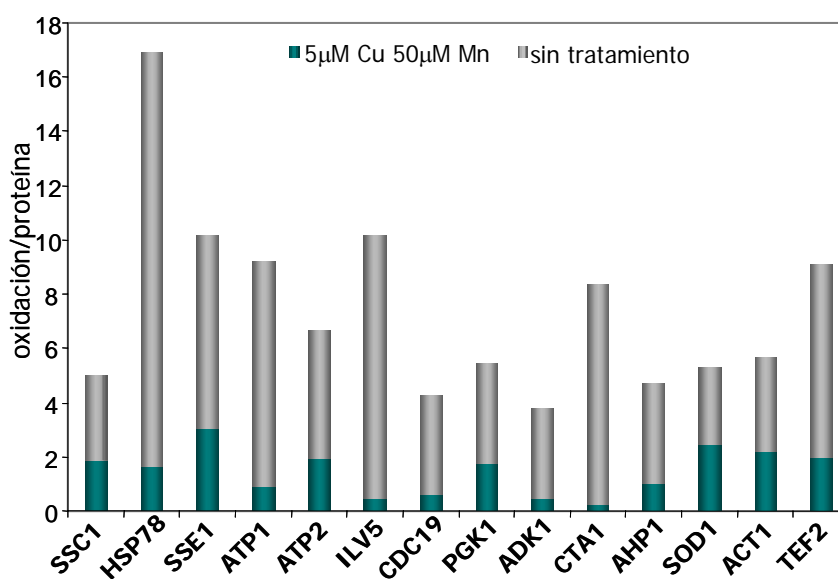
Dicho estudio se realizó de forma análoga al estudio descrito en el apartado 2.1 de estos Resultados. Analizamos las imágenes del oxi-blot por *PDQuest* en busca de las 14 proteínas antes identificadas como carboniladas en el mutante (Figura III 27). En la Tabla III 3 se muestra el análisis del grado de oxidación relativo ( $\Delta yfh1$  sobre *wt*) de los 17 *spots* seleccionados y de la cantidad relativa de cada proteína ( $\Delta yfh1$  sobre *wt*). Se calculó el grado de carbonilación de cada proteína en relación a la cantidad de la misma haciendo la relación entre la cantidad de oxidación y la cantidad de proteína en cada caso (oxidación/proteína; Tabla III 3).

**Tabla III 3: Grado de carbonilación de las proteínas oxidadas en  $\Delta yfh1$  tratadas con Cu y Mn.** Se indica el nombre de la proteína; su correspondiente gen; el o los *spots* a los que corresponden en las membranas y geles de la Figura III 26. El grado de oxidación en  $\Delta yfh1$  sobre *wt* fue cuantificado a partir de los oxi-blots de la Figura III 26 A y B. La cantidad de proteína en  $\Delta yfh1$  con respecto a *wt* fue cuantificado de los geles teñidos con plata (Figura III 26 C y D). Los valores de la última columna corresponden a la relación entre el grado de la oxidación y la cantidad de proteína ( $\Delta yfh1$  sobre *wt*) y representan la cantidad relativa del daño oxidativo en cada proteína identificada en  $\Delta yfh1$ . Entre paréntesis se indica el incremento relativo de oxidación obtenido anteriormente en las células sin suplementación (Tabla III 2). Los *spots* correspondientes a una misma proteína fueron tratados de manera independiente. Los datos se representan como la media de 3 experimentos  $\pm$  la desviación estándar.

Proteína	Gen	Spots	Grado Oxidación $\Delta yfh1/wt$	Cantidad de Proteína $\Delta yfh1/wt$	Oxidación/ Proteína $\Delta yfh1/wt$
<b>Proteína mitocondrial de choque térmico</b>	SSC1	1	1.15 $\pm$ 0.33	0.78 $\pm$ 0.54	1.47 (3.9)
		3	1.68 $\pm$ 0.42	0.74 $\pm$ 0.20	2.25 (2.4)
<b>Chaperona de la matriz mitocondrial Homóloga citoplasmática de la proteína de choque térmico</b>	HSP78	4	2.19	1.35 $\pm$ 0.65	1.62 (15.3)
<b>ATP sintasa F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> subunidad <math>\alpha</math></b>	ATP1	6	1.56 $\pm$ 0.79	1.98 $\pm$ 0.92	0.78 (4.5)
		7	1.72 $\pm$ 0.82	1.64 $\pm$ 0.42	1.05 (12.1)
<b>ATP sintasa F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> subunidad <math>\beta</math></b>	ATP2	5	1.43 $\pm$ 0.67	0.74 $\pm$ 0.25	1.93 (4.7)
<b>Acetohidroxiácido reductoisomerasa</b>	ILV5	8	1.02 $\pm$ 0.54	2.28 $\pm$ 0.87	0.45 (9.7)
<b>Piruvato quinasa 1</b>	CDC19	10	1.02 $\pm$ 1.42	1.85 $\pm$ 1.2	0.55 (3.9)
		11	1.32 $\pm$ 0.06	2.03 $\pm$ 1.51	0.65 (3.4)
<b>3-fosfoglicerato quinasa</b>	PGK1	12	1.71 $\pm$ 0.51	0.98 $\pm$ 0.51	1.73 (3.7)
<b>Adenilato quinasa</b>	ADK1	13	1.71 $\pm$ 0.51	3.54 $\pm$ 0.92	0.48 (3.3)
<b>Catalasa A</b>	CTA1	9	2.17 $\pm$ 0.86	8.85 $\pm$ 5.30	0.24 (8.1)
<b>Peroxiredoxina tiol-específica</b>	AHP1	14	6.76 $\pm$ 2.31	6.53 $\pm$ 0.92	1.03 (3.7)
<b>Superoxido dismutasa CuZn</b>	SOD1	15	5.20 $\pm$ 1.44	2.11 $\pm$ 0.38	2.46 (2.8)
<b>Actina. cadena <math>\alpha</math></b>	ACT1	16	1.24 $\pm$ 0.50	0.55 $\pm$ 0.17	2.24 (3.4)
<b>Factor de elongación traduccional EF-1<math>\alpha</math></b>	TEF2	17	1.87 $\pm$ 0.73	0.95 $\pm$ 0.07	1.97 (7.1)

La Figura III 28 muestra una comparativa entre el grado de carbonilación de las distintas proteínas estudiadas en presencia o ausencia de cobre o manganeso. Puede observarse como la carbonilación de las proteínas estudiadas disminuyó cuando el medio de cultivo fue suplementado.

Es interesante observar como los *spots* correspondientes a las dos subunidades de la  $F_1F_0$  ATP sintasa, piruvato quinasa, fosfoglicerato quinasa y adenilato quinasa, mostraron un claro descenso de carbonilación, lo que explicaría la recuperación de su actividad enzimática (Tabla III 3; Figura III 25 y 28).



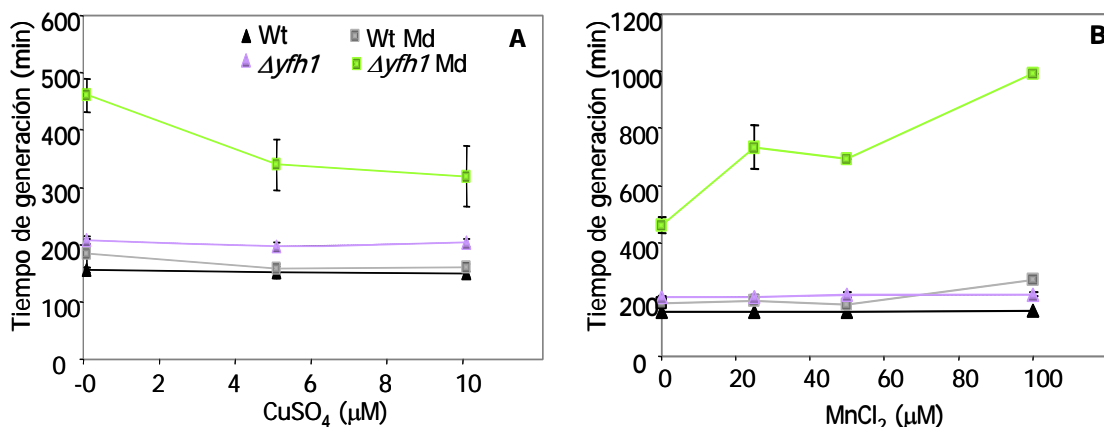
**Figura III 28: Análisis comparativo del descenso de la carbonilación en las células  $\Delta yfh1$  en medio YPG suplementado con cobre y manganeso.** Datos obtenidos del oxi-proteoma de wt y  $\Delta yfh1$  tanto de las células cultivadas en YPG solo, como suplementado con 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  y 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ . Los datos representan el promedio de carbonilación de todos los spots identificados de una determinada proteína y están referidos a la cantidad de proteína cuantificada a partir de los geles teñidos con plata.

Por otro lado, podemos observar que en el caso de la CuZn-SOD, el descenso en el grado de carbonilación es de tan solo el 50% (Figura III 28). Este resultado concuerda con el bajo nivel de actividad específica de Sod1 con 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (Figura III 24) y demuestra que gran parte de la proteína inducida se encuentra inactivada probablemente debido a la carbonilación.



### 3.5. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON COBRE Y MANGANESO EN EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS $\Delta yfh1$ Y SU SENSIBILIDAD A MENADIONA.

Al observar el efecto preventivo que ejercen los tratamientos con cobre y manganeso en las células  $\Delta yfh1$  quisimos investigar si los beneficios de estos tratamientos repercutían sobre la capacidad de proliferación de las células. El mutante deficiente en *YFH1* presenta una tasa de crecimiento más lenta que la cepa control, que se hace más evidente cuando las células son crecidas en medio YPG. Con el fin de probar diferentes combinaciones y concentraciones de los metales, fueron realizados experimentos en medio líquido en placas "multipozos". Cultivos de 1 ml que contenían diferentes concentraciones de cobre y manganeso en medio YPG fueron incubadas durante 18 horas en placas de 24 pozos (Falcon) en un aparato Biotek PowerWave XS. Este experimento permite observar pequeñas variaciones en las tasas de crecimiento. Al comenzar el experimento, fueron inoculadas las mismas cantidades de células en cada pozo y se midió la densidad óptica cada 30 minutos. Los tiempos de generación máximos fueron calculados para cada cultivo considerando un periodo de al menos 4 horas. Tal como puede observarse en la Figura III 29, las células  $\Delta yfh1$  presentaban tiempos de generación más largos (208 minutos) comparados con los de las células wild type (156 minutos). Ninguna de las combinaciones y concentraciones de metales probadas (cobre solo, manganeso solo o combinados) afectaron significativamente estos parámetros. Estos resultados parecen indicar que los tiempos de generación más elevados observados en las células que carecen de Yfh1 no están influenciados por el daño oxidativo que afecta tanto a las proteínas de unión a magnesio como a las enzimas con centros Fe-S, las cuales fueron recuperadas con los tratamientos con cobre y manganeso.



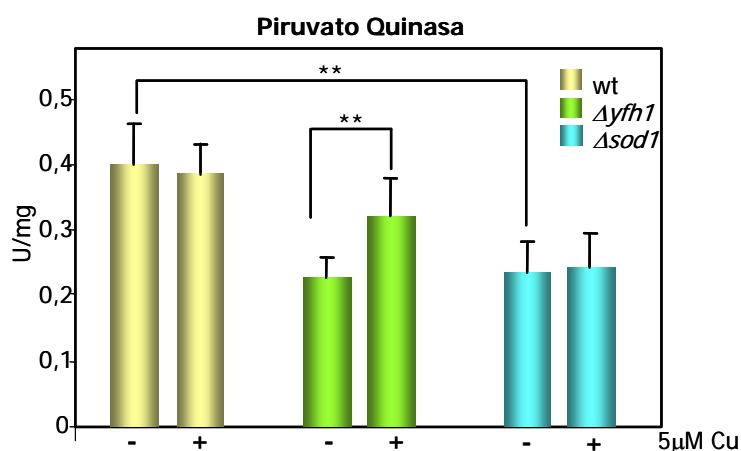
**Figura III 29: Efecto de la menadiona el cobre y el manganeso sobre el tiempo de generación de las células wt y  $\Delta yfh1$ .** Las células wild type y  $\Delta yfh1$  fueron cultivadas en placas de 24 pozos en medio YPG que contenía las cantidades de cobre (A) o manganeso (B) indicadas ya sea estresadas con 2,5  $\mu\text{M}$  menadiona (wt Md;  $\Delta yfh1$  Md) o no estresadas. Los tiempos de generación fueron calculados como se describe en Materiales y Métodos. Los datos están representados como la media  $\pm$  el intervalo de confianza de seis cultivos independientes.

Por otro lado, nos preguntamos si la presencia de un agente generador de superóxido afectaría de manera diferente a ambas cepas y si esta sensibilidad se vería afectada por la suplementación con metales. Con este fin, las células fueron crecidas con las diferentes combinaciones de cobre y manganeso durante 4 horas. Después, se agregó el tratamiento con 2,5  $\mu\text{M}$  del agente generador de superóxido menadiona y se monitorizó el crecimiento durante 14 horas adicionales. Los tiempos de generación máximos fueron calculados como se describe más arriba. Pudimos observar que la menadiona ejerce un fuerte efecto en el tiempo de generación del  $\Delta yfh1$ , el cual pasó de 208 a 461 minutos. Estos resultados nos indican que éstas células tardan más del doble de tiempo en duplicarse cuando están sometidas a mayor cantidad de superóxido. Sin embargo en las células wild type no se observó ningún efecto en el tiempo de generación con los tratamientos con menadiona.

Los tratamientos con menadiona luego del pre-tratamiento con cobre y manganesos tuvieron efectos divergentes en cuanto a la sensibilidad de la cepa mutante. El cobre disminuye la sensibilidad a menadiona, mientras que el manganeso la incrementa de una manera dosis dependiente (Figura III 28). Estos resultados confirman que las células  $\Delta yfh1$  son más sensibles al estrés oxidativo que las wild type. Por otro lado, todo parece indicar que la sensibilidad a superóxido de las células deficientes en *YFH1* es debida principalmente a la disminución de la actividad CuZn-SOD.

### 3.6. LA INACTIVACIÓN DE PIRUVATO QUINASA ES CONSECUENCIA DE LA FALTA DE ACTIVIDAD CuZn-SOD EN LAS CÉLULAS $\Delta yfh1$ .

Con el objetivo de investigar de qué manera el descenso de la actividad CuZn-SOD contribuye a la oxidación específica de las proteínas, analizamos la actividad piruvato quinasa en el mutante deficiente en *SOD1*. Este mutante que fue generado en este trabajo (ver Materiales y Métodos), no crece en medios con fuentes de carbono no fermentables, por lo que los experimentos fueron llevados a cabo con las células creciendo en YPD.



**Figura III 30: Actividad piruvato quinasa en *wt*,  $\Delta yfh1$  y  $\Delta sod1$  y su respuesta a**

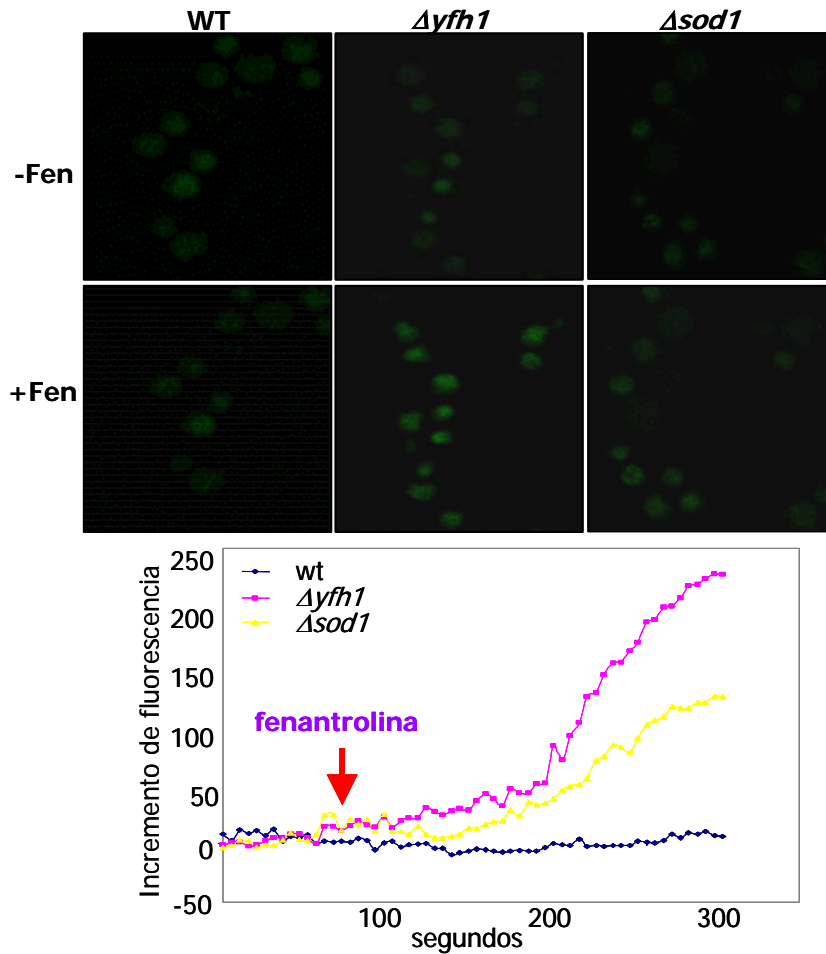
**tratamientos con cobre.** La actividad enzimática piruvato quinasa fue medida en extractos protéicos totales. Las células fueron crecidas en YPD suplementados o no con 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Los datos están representados como medias  $\pm$  su desviación estándar de cinco experimentos diferentes. Se observó una disminución significativa (\*\* $p < 0.01$ ) de la actividad enzimática en  $\Delta yfh1$  y  $\Delta sod1$  y la recuperación con cobre en  $\Delta yfh1$  pero no en  $\Delta sod1$ .

Como se puede observar en la Figura III 30 las células deficientes en *SOD1* presentan disminuida la actividad piruvato quinasa en valores muy similares a los de las  $\Delta yfh1$ . Sin embargo, la suplementación con 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  no recupera esta actividad tal como ocurre en el mutante deficiente en frataxina. Esto indica que la recuperación de la actividad piruvato quinasa en el  $\Delta yfh1$  mediante los tratamientos con cobre es consecuencia de la recuperación de la actividad CuZn-SOD.

### 3.7. CONTENIDO DE HIERRO QUELABLE EN $\Delta sod1$ .

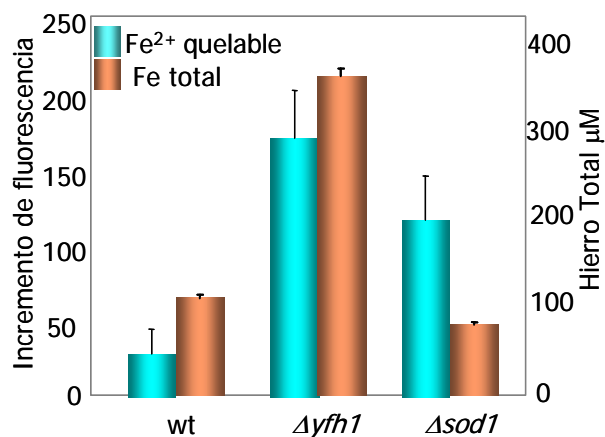
Con el fin comprender la causa de inactivación de la piruvato quinasa tanto en  $\Delta yfh1$  como en  $\Delta sod1$  pensamos en una característica en común entre ambas cepas que fuera capaz de producir daño a las proteínas. Como se indicó en los resultados del capítulo 2 de Resultados, el hierro quelable es el responsable del daño oxidativo en las proteínas de las células  $\Delta yfh1$ . Con el fin de encontrar el nexo entre ambos mutantes, quisimos saber si la fracción de hierro libre estaba aumentada en el mutante deficiente en  $SOD1$ . La estimación del hierro quelable se realizó en células de wt,  $\Delta yfh1$  y  $\Delta sod1$  crecidas en medio YPD mediante la sonda *Phen Green SK* en microscopio confocal tal como se indica en Materiales y Métodos y en el apartado 2.6 de Resultados.

Se midió la fluorescencia basal durante 1 minuto y su incremento tras la adición de fenantrolina. La Figura III 31 muestra la imagen de wt,  $\Delta yfh1$  y  $\Delta sod1$ , antes y después de la adición de fenantrolina de un experimento representativo. Se puede apreciar el aumento de fluorescencia tanto en  $\Delta yfh1$  como en  $\Delta sod1$  que llega a un plató cuatro minutos después de la adición de fenantrolina.



**Figura III 31: Incremento del hierro quelable en  $\Delta yfh1$  y  $\Delta sod1$ .** Las imágenes fueron obtenidas por microscopio confocal, tomadas antes de añadir la fenantrolina (-Fen) y 90 segundos después (+fen). El gráfico muestra un experimento representativo, cada símbolo de la gráfica representa el promedio de la fluorescencia de 30 células en un mismo campo. La flecha indica el momento en el que se añade la fenantrolina.

Como se observa en la Figura III 32 ambos mutantes exhiben un incremento en la cantidad de hierro quelable. En contraste con  $\Delta yfh1$ ,  $\Delta sod1$  no mostró un incremento significativo de la concentración del hierro total. Esto nos indica que las proteínas del mutante deficiente en *SOD1* están sometidas a una situación de estrés promovido por el incremento de hierro libre de un modo que podría ser similar al que sucede en  $\Delta yfh1$ .



**Figura III 32: Hierro quelable y hierro total en wt,  $\Delta yfh1$  y  $\Delta sod1$ .** Las células fueron crecidas en medio YPD. Los valores relativos de hierro quelable fueron obtenidos utilizando la sonda *Phen Green SK*. Los datos están representados como la media  $\pm$  su desviación estándar de tres experimentos diferentes. En cada experimento se cuantificó la fluorescencia de 30 células. El hierro total se cuantificó como se indica en Materiales y Métodos a partir de digestión ácida de las células.



4. **CAPÍTULO 4:** EFECTOS DE LA DISMINUCIÓN DE FRATAXINA EN LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y DIFERENCIADAS A UN FENOTIPO NEURONAL.

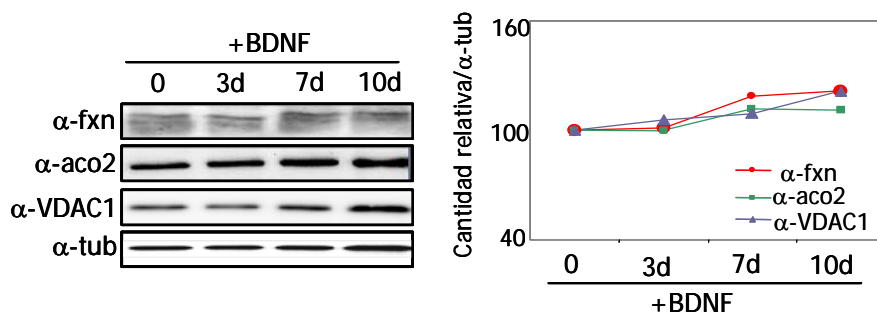


#### 4.1. DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y A UN FENOTIPO NEURONAL Y SU REPERCUSIÓN EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.

Debido a la implicación del sistema nervioso en enfermedades neurodegenerativas como lo es la Ataxia de Friedreich, nos pareció de gran interés el estudio de la deficiencia en frataxina en un modelo neuronal humano. Con tal fin nos adentramos en la manipulación de la línea celular SH-SY5Y y su consecuente diferenciación.

La línea celular SH-SY5Y derivada de un neuroblastoma humano presenta la característica de poder ser diferenciada a un fenotipo neuronal tras su tratamiento con ácido retinóico y BDNF (7.1.2. Materiales y Métodos). Encinas y colaboradores demostraron que dichas células diferenciadas, presentan la expresión de diversos marcadores neuronales, la parada del ciclo celular en la fase G1, así como la dependencia de un soporte neurotrófico para la supervivencia y diferenciación. Éstas características entre otras, hacen que las células obtenidas con este tratamiento sean muy similares a neuronas (Encinas et al., 2000).

La diferenciación de esta línea celular conlleva a cambios morfológicos, así como de niveles de expresión de diferentes proteínas. Sin embargo, no se conoce la respuesta de las proteínas mitocondriales al proceso de diferenciación. Por lo tanto, como punto de partida, realizamos el análisis mediante *western blot* con el fin de conocer el nivel de expresión de algunas proteínas mitocondriales en distintos estadios de la diferenciación de las células SH-SY5Y. En la Figura III 33 se puede observar la expresión de frataxina, aconitasa 2 y porina mitocondrial (VDAC1) esta última utilizada generalmente como control de carga mitocondrial. Se puede apreciar el nivel de expresión de dichas proteínas a los 5 días de tratamiento con ácido retinóico (+RA) a los tres días de la primera administración de BDNF (3d), después de la segunda administración (7d) y por último después del tercer cambio de BDNF que corresponde a los 10 días de la primera administración del factor neurotrófico. Se puede apreciar un pequeño incremento de la cantidad de las proteínas mitocondriales a medida que las células se diferencian a un fenotipo neuronal. Este hecho podría ser explicado por la necesidad de un cambio metabólico global que favorecería el aumento de la cantidad de mitocondrias.



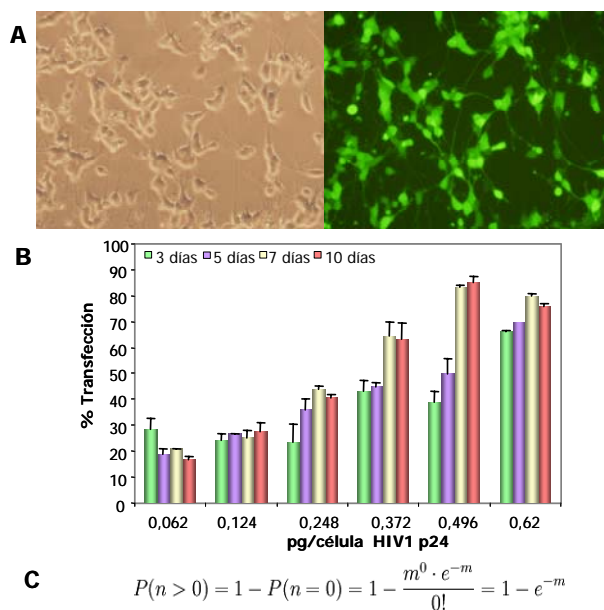
**Figura III 33: Expresión de proteínas mitocondriales en las células SH-SY5Y durante la diferenciación con BDNF.** Las células fueron cultivadas con 10 $\mu$ M ácido retinóico (RA) durante 5 días en medio DMEM 10% FBS-HI tras los cuales se cambió el medio por DMEM libre de suero y 50 ng/ml de BDNF. El medio de cultivo fue renovado cada 3 ó 4 días. Las células fueron recogidas a los 3, a los 7 y a los 10 días con BDNF. Posteriormente fueron analizadas por *western blot* mediante los anticuerpos indicados:  $\alpha$ -frataxina,  $\alpha$ -aconitasa2,  $\alpha$ -porina (VDAC1) y como control de carga  $\alpha$ -tubulina.

#### 4.2. PRODUCCIÓN, TITULACIÓN Y CÁLCULO DE LA PROBABILIDAD DE INFECCIÓN DE LOS LENTIVIRUS UTILIZADOS

Una vez puesto a punto el proceso de diferenciación, comenzamos la producción de los lentivirus con el fin de interferir la síntesis de frataxina. Para tal fin se utilizaron plásmidos derivados de *pLKO.1-puro* que contienen secuencias codificantes para los shRNA diseñados para el silenciamiento específico de frataxina (las secuencias de interferencias están indicadas en la tabla del apartado 8.1 de Materiales y Métodos). La obtención de lentivirus se realizó transfectando, la línea celular HEK293T con tres plásmidos diferentes utilizando un polímero catiónico (PEI). Los plásmidos necesarios fueron: el vector lentiviral de interés (shRNA) o los controles y los dos vectores que forman el envoltorio y la cápside del lentivirus.

Las partículas lentivirales presentes en el medio de cultivo precedentes de las HEK293T fueron tituladas utilizando un inmunoensayo enzimático desarrollado para la detección y cuantificación de la proteína HIV-1 p24 que forma parte del envoltorio interno del lentivirus. A partir de conocer el número de partículas lentivirales presentes en nuestro medio de cultivo se estimó la probabilidad de infección (MOI: *multiplicity of infection*) utilizando el vector TurboGFP<sup>TM</sup>. Para ello se transfectaron células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo neuronal con distintas cantidades de partículas lentivirales extraídas de las células HEK293T productoras de lentivirus. Se realizó la evaluación del porcentaje de transfección contando

las células que presentaban GFP y realizando la relación de éstas sobre las células totales (Figura III 33 A y B). A partir de estos resultados se pudo estimar que la transfección con 0,496 pg de p24 por cada célula permitían obtener un 85% de células transfectadas. Mediante la utilización de la fórmula de la Figura III 33 C, se pudo calcular que este valor correspondía a un MOI de 1,8.

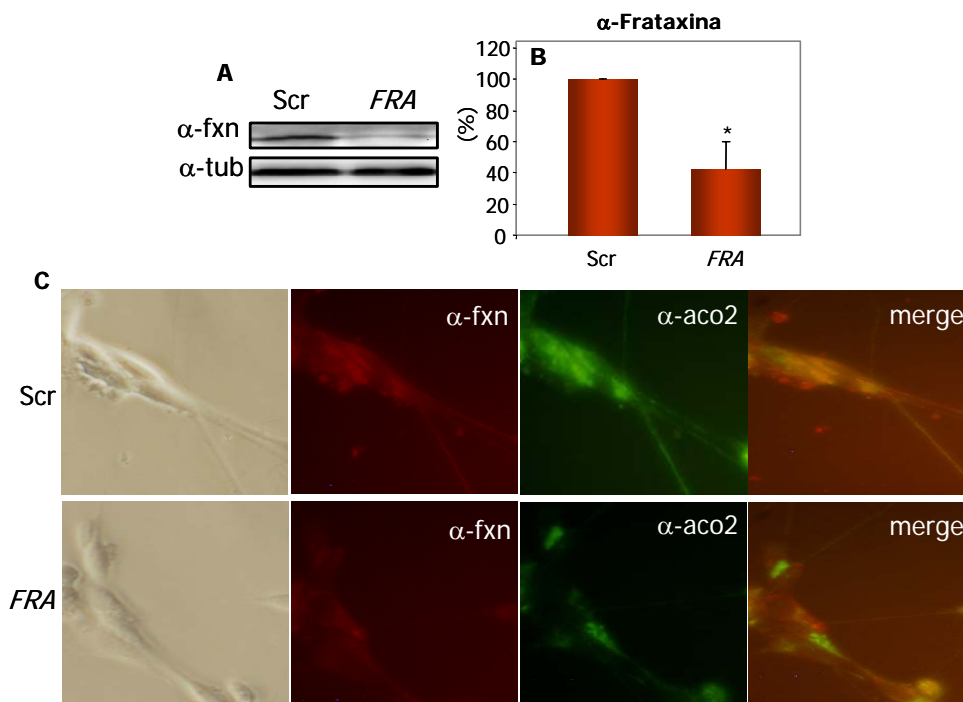


**Figura III 33: Transfección del vector GFP en células SH-SY5Y diferenciadas.** A, imagen de las células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo neuronal transfectadas con lentivirus que contenían el vector GFP que corresponden a 0,496 pg de p24 por cada célula a los 7 días de transfección. B, El porcentaje de transfección se evaluó a diferentes días (3, 5, 7 y 10 días) tras la adición distintas cantidades de lentivirus (0,062; 0,124; 0,248; 0,372; 0,496 y 0,62 pg/célula de HIV1 p24)., Fórmula utilizada para el cálculo del MOI, donde m es la multiplicidad de infección o MOI, n es el número de agentes infecciosos que son capaces de entrar en una célula y P(n) es la probabilidad que una célula sea infectada por un agente infeccioso (n).

#### 4.3. DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE FRATAXINA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE shRNA.

Con el objetivo de disminuir los niveles de frataxina en nuestro modelo celular, las células SH-SY5Y diferenciadas con tratamientos de 5 días de ácido retinóico y 3 ó 4 días con BDNF fueron transfectadas con lentivirus que contenían secuencias shRNA de interferencia para frataxina (*FRA*: indicada en la tabla de Materiales y Métodos de la sección 8.1 con terminación 38) y con lentivirus control que presentaban una secuencia shRNA llamado "scrambled" (Scr) que no es capaz de interferir ningún gen humano. Al comparar las células transfectadas con los dos tipos de lentivirus (Scr, *FRA*) observamos que existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de frataxina entre ambos grupos. Así pues, mediante *western blot* se observó que las células *FRA* muestran en promedio un 60% menos frataxina que las células Scr (Figura III 34 A y B).

Esta disminución de la expresión de frataxina también puede ser apreciada mediante inmunofluorescencia (Figura III 34 C). Como se observa, las células transfectadas con lentivirus que contienen shRNA scrambled presentan niveles más elevados de aconitasa que las células *FRA* donde se puede apreciar bajos niveles de frataxina. Este hecho podría estar indicando que la disminución de la expresión de frataxina conlleva a una bajada en la cantidad de aconitasa ya sea por una relación directa entre ambas proteínas o por la pérdida de mitocondrias en las células *FRA*. Sin embargo, se puede apreciar células negativas para frataxina pero positivas para aconitasa y por lo tanto cuando se superponen ambas imágenes ("merge") se observan verdes. El hecho de observar aconitasa en las células que no presentan frataxina cobraría más relevancia si conociéramos la actividad catalítica de dicha enzima en las células interferidas para frataxina. Por último cabe destacar la clara co-localización de ambas proteínas mitocondriales frataxina y aconitasa.



**Figura III 34: Disminución en la expresión de frataxina en células SH-SY5Y diferenciadas mediante la utilización de shRNA.** Las células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo neuronal

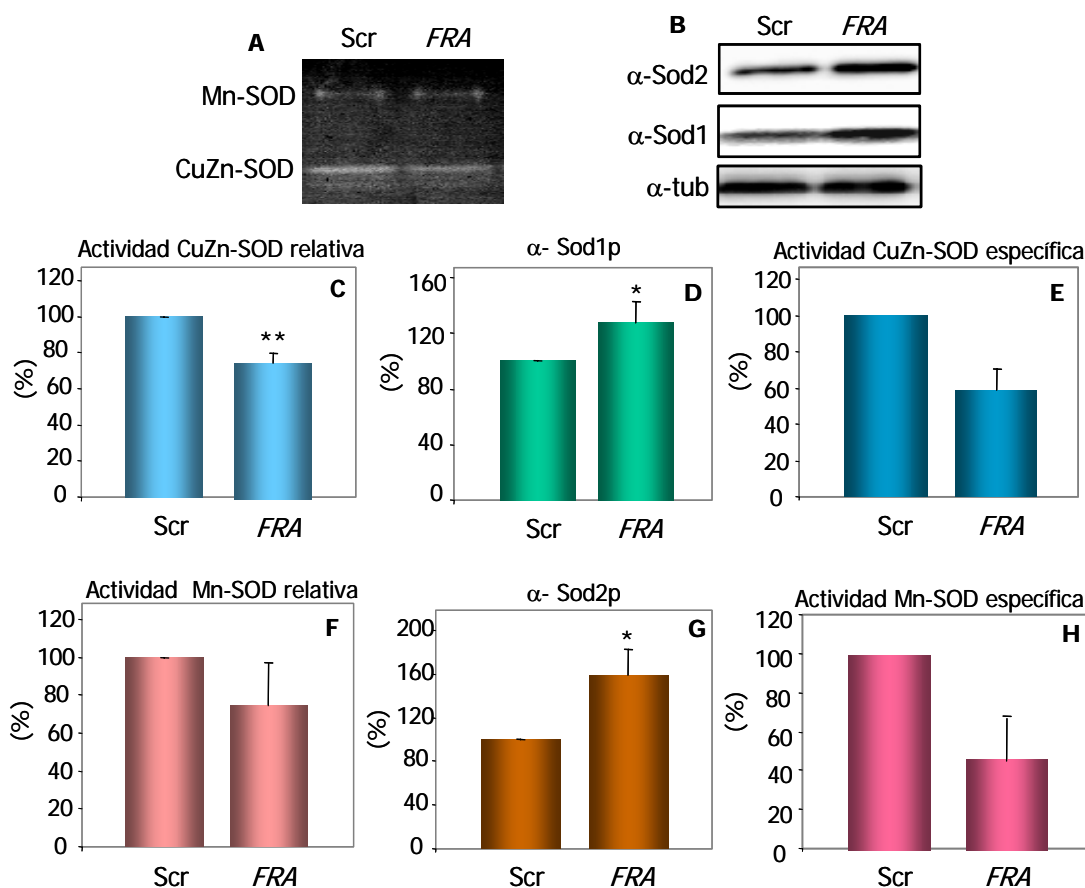
fueron transfectadas con lentivirus que contenían secuencias control (Scr) y lentivirus con la secuencia de interferencia para frataxina (*FRA*). A, los niveles de frataxina en dichas células fueron analizados mediante *western blot*  $\alpha$ -frataxina. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga (experimento representativo). B, cuantificación relativa del contenido de frataxina en relación a tubulina, utilizando la señal quimioluminiscente correspondiente a las bandas de interés. La cantidad de frataxina en las células Scr fue utilizada como referencia del 100%. Los datos están representados como medias  $\pm$  sus intervalos de confianza de tres experimentos diferentes y mostraron disminución significativa del contenido de frataxina en las células *FRA* con un  $*p < 0.05$ . C, imagen representativa de la expresión de frataxina utilizando inmunofluorescencia de frataxina. Se realizó la detección inmunofluorescente de frataxina (Chemicon, dilución 1:300; secundario  $\alpha$ -mouse red rodamina, dilución 1:200) y después de aconitasa (Sigma, dilución 1:300; secundario  $\alpha$ -rabbit Alexa fluor, dilución 1:200). La última columna "merge", muestra la superposición de la imagen con los dos anticuerpos.

#### 4.4. DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD CuZn-SOD EN LAS CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS E INTERFERIDAS PARA FRATAXINA.

En los capítulos anteriores se demostró el importante papel que juega el estrés oxidativo en las células de *S. cerevisiae* en ausencia de *YFH1*. Por esta razón, una vez disminuidos los niveles de frataxina en las células SH-SY5Y diferenciadas decidimos analizar como primer parámetro el contenido de las enzimas superóxido dismutasa 1 y 2. Se observó mediante *western blot* un aumento significativo en la expresión de ambas isoenzimas, como puede observarse en la Figura 35 B, D y G. Posteriormente quisimos averiguar la actividad enzimática de *sod1* y *sod2*. Mediante zimogramas se observó una deficiencia en la actividad CuZn-SOD en las células interferidas con *FRA* que fue más evidente cuando su actividad fue referida a la cantidad de proteína *sod1* (Figura III 35 A, C, D y E). En el caso de la superóxido dismutasa 2, su actividad enzimática no se vio significativamente disminuida. Sin embargo, podemos observar un descenso en su actividad enzimática cuando es referida a la cantidad total de la proteína (Figura III 35 H).

Estos datos parecen indicar que la disminución de los niveles de frataxina en nuestro modelo celular lleva a una situación de estrés oxidativo endógeno que puede estar en parte asociada a la falta de actividades superóxido dismutasas.

Es importante señalar, que los resultados tanto de cantidad como de actividad de superóxido dismutasa 1 confirman los anteriormente observados en *S. cerevisiae*, lo que nos lleva a pensar que la falta de actividad CuZn-SOD puede ser un efecto muy relacionado con la falta de frataxina. En el caso de Mn-SOD, a pesar de que no se aprecia una disminución significativa de la actividad, sí que puede observarse un claro descenso de su actividad específica de forma análoga a la levadura.



**Figura III 35: Actividad CuZn-SOD y Mn-SOD en las células SH-SY5Y diferenciadas e interferidas para frataxina.** Se utilizaron células SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo neuronal e

interferidas con secuencias de shRNA "scrambled" (Scr) y de frataxina (*FRA*) A, Análisis de la actividad SOD (zimograma). B, análisis de la cantidad de proteína mediante *western blot*  $\alpha$ -Sod1,  $\alpha$ -Sod2 y  $\alpha$ -tub. C, cuantificación relativa de la actividad CuZn-SOD en los dos grupos de células transfectadas. D, cuantificación de la cantidad de proteína sod1 obtenida mediante *western blot*. E, estimación de la actividad específica de CuZn-SOD, obtenida de la relación entre la actividad y la cantidad de proteína.

F, cuantificación relativa de la actividad Mn-SOD en los dos grupos de células transfectadas. G, cuantificación de la proteína sod2 obtenida mediante *western blot*. H, estimación de la actividad específica de Mn-SOD, obtenida de la relación entre la actividad relativa y la cantidad de proteína. Los

datos están representados como medias  $\pm$  sus intervalos de confianza de tres experimentos diferentes. Se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio con un  $*p < 0.05$  y

$**p < 0.01$ , respectivamente.

## **IV. DISCUSIÓN**





## 1. LA FRATAXINA NO ES ESENCIAL EN LA SÍNTESIS DE LOS CENTROS Fe-S.

Desde que se descubrió la proteína cuya disminución causa la Ataxia de Friedreich, diversos grupos de trabajo están intentando clarificar su función. A pesar de la cantidad de trabajos realizados hasta la fecha en un gran número de modelos diferentes, aun no se ha llegado a un consenso de cual es el rol preciso de la frataxina dentro de la célula. Desde un principio se relacionó la falta de frataxina con la homeostasis de hierro, debido a que una de las primeras características observadas tanto en los pacientes como en la levadura carente de Yfh1, fue la desregulación del metabolismo del hierro, un aumento del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial. En realidad estos tres rasgos están relacionados y encadenados entre sí. Esto es debido a que el aumento de hierro provoca un aumento de los radicales libres como el radical HO• capaz de causar peroxidación lipídica, daño a DNA y a proteínas. Algunas de las proteínas más afectadas por las ROS son aquellas que presentan centros Fe-S como las de los complejos I, II y III de la cadena respiratoria mitocondrial y la aconitasa, proteínas que se han visto afectadas tanto en enfermos como en diferentes modelo de estudio (Babcock et al., 1997; Foury and Cazzalini, 1997; Rotig et al., 1997; Foury, 1999; Puccio, 2009). Estas observaciones llevaron al planteamiento de la hipótesis más aceptada sobre la posible función de frataxina como pieza clave en la biosíntesis de los centros Fe-S. El hecho que la frataxina tenga la capacidad de unir hierro y de interaccionar con Isu1, pareció dejar clara su implicación directa en el transporte del hierro hacia ésta proteína de ensamblaje donde se forman los centros Fe-S. Sin embargo, diversas evidencias parecen ir en contra de esta hipótesis. Un ejemplo es el hecho que la frataxina parece interaccionar con varias proteínas y no sólo con Isu1. Así podría ceder el hierro a la ferroquelatasa, ya que se ha observado su interacción directa con frataxina que además es mucho más fuerte que con Isu1 (Yoon and Cowan, 2004). Por otro lado se la ha descrito interaccionando con aconitasa, lo que plantea la posibilidad de que frataxina actúe como chaperona de hierro ejerciendo una función vital en la reconstitución o la estabilidad de la holo aconitasa facilitando la transferencia de hierro al centro Fe-S de la misma (Bulteau et al., 2004; Bulteau et al., 2005). Pero la frataxina también interacciona con la succinato deshidrogenasa (Gonzalez-Cabo et al., 2005). Esta proteína que forma parte del complejo II de la cadena de transporte de electrones, está encargada de oxidar el succinato dando lugar a fumarato y transfiere los electrones a la cadena de transporte electrónico vía ubiquinona. La relación directa entre estas dos proteínas plantea dos posibles roles de la frataxina: uno implicando a frataxina como parte del transporte electrónico y el otro relacionándola directamente con la

estabilidad o el ensamblaje de la succinato deshidrogenasa, por el hecho que ésta presenta un centro Fe-S en su estructura.

El hecho de que la frataxina parece ser un tipo de proteína “pegajosa” con la capacidad de interaccionar con muchas otras proteínas, no implica que no esté relacionada con la biosíntesis de los centros Fe-S. Sin embargo, existen otras evidencias que desestiman esta hipótesis, yendo más a favor de que la deficiente formación de los centros Fe-S es un efecto secundario y no la función principal de frataxina. En este sentido, los resultados presentados en esta tesis parecen indicar que la frataxina no es esencial en la biosíntesis de los centros Fe-S y además dan una explicación de la posible causa de la inactivación de las enzimas con centros Fe-S en el modelo de levadura de FRDA.

Nuestros resultados sugieren que uno de los primeros efectos de la falta de frataxina es la acumulación de hierro. Se sabe que la falta de Yfh1 provoca la activación del factor transcripcional *AFT1* (Foury and Talibi, 2001) encargado de activar los genes de Fet3 y Ftr1 los cuales forman parte del transporte de alta afinidad del hierro en levadura (Van Ho et al., 2002). De esta manera, la desregulación de la homeostasis de éste metal causada por la falta de frataxina, genera en la célula una situación de sobrecarga de hierro y de falta de disponibilidad de otros metales como el manganeso y cobre. Demostramos que el mutante *Δyfh1* presenta una deficiencia en manganeso así como un exceso de hierro quelable. En nuestro modelo, la actividad Mn-SOD se ve seriamente afectada por dicha situación, dejando a la enzima con aproximadamente un 20% de su actividad y por lo tanto incapacitada para eliminar la gran cantidad de superóxido producido en la mitocondria (Figura III 3). Nuestros resultados indican también una clara deficiencia de la actividad CuZn-SOD. La falta de actividad de ambas isoenzimas SODs, las principales encargadas de dismutar el  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial y citosólico, sumado al exceso de hierro en su estado más reactivo, generan en las células deficientes en *YFH1* un estrés oxidativo endógeno, que entre otras posibilidades, podría ser el responsable de la inactivación de las enzimas con centros Fe-S.

La recuperación de las actividades Mn-SOD y CuZn-SOD se logra suplementando los medios de cultivo con  $MnCl_2$  y  $CuSO_4$ . Estos resultados demuestran que la falta de actividad de ambas enzimas es causada por la falta de disponibilidad de sus cofactores. Lo que es más importante aún, la recuperación de las actividades superóxido dismutasas y por lo tanto de los niveles normales de  $O_2^{\cdot-}$ , provocan la recuperación de las enzimas con centros Fe-S como la succinato deshidrogenasa.

La recuperación de actividades de enzimas con centros Fe-S en las células carentes de Yfh1, es la mejor prueba de que Yfh1 no es indispensable para la biogénesis de los centros Fe-S. Los resultados de otros grupos de trabajo apoyan ésta afirmación (Ding et al., 2007;

Campanella et al., 2008; Adinolfi et al., 2009). Por ejemplo, Chen y Kaplan logran la recuperación de la respiración y de este modo de la actividad de enzimas con centros Fe-S en las células carentes de Yfh1, mediante la sobreexpresión del gen *CCC1* lo cual conlleva la recuperación de los niveles normales de hierro en el citosol del mutante deficiente en *YFH1* (Chen and Kaplan, 2000). Asimismo, Foury observó la recuperación de la actividad succinato deshidrogenasa en células  $\Delta yfh1$  cultivadas en presencia del agente quelante de hierro BPS (Foury, 1999). En nuestros experimentos, en las mismas condiciones de cultivo, confirmamos la recuperación de succinato deshidrogenasa y observamos también la recuperación de Mn-SOD y de isopropilmalato deshidratasa (Figura III 8). Estos hechos ponen de manifiesto el papel de la sobrecarga de hierro sobre la inactivación de dichas enzimas. Así también, la recuperación de la actividad Mn-SOD permite la recuperación de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, indicando por tanto, que su interacción con frataxina no es indispensable para su actividad.

Cabe destacar que en ninguno de los ensayos por los cuales se recuperan las actividades de las enzimas con centros Fe-S se logra la recuperación de la enzima aconitasa. Una explicación plausible para este hecho, es la posible relación directa entre aconitasa y frataxina. Existen dos trabajos que demuestran que frataxina es necesaria para la reconstitución del centro [4Fe4S] de la aconitasa (Bulteau et al., 2004; Bulteau et al., 2005). Por otro lado, estudios en *Drosophila* han demostrado que frataxina es importante para la protección de aconitasa frente al estrés oxidativo o hiperoxia, un efecto no observado para otras enzimas con centros Fe-S (Llorens et al., 2007). Asimismo, estudios realizados en un modelo de FRDA en ratón, sugieren que la pérdida de la actividad aconitasa es un rasgo temprano de la enfermedad (Al-Mahdawi et al., 2006). Finalmente, la inactivación de aconitasa en mutantes  $\Delta yfh1$  no se observa en condiciones de anaerobiosis, pero sí en presencia de oxígeno (Bulteau et al., 2007). Todos estos hechos parecen ir a favor de un papel protector de la frataxina frente a la inactivación oxidativa de enzimas con centros Fe-S, siendo aconitasa la más sensible a la ausencia de dicha proteína.

La conexión entre la falta de actividad Mn-SOD y el exceso de hierro viene dada por el hecho de que la restitución de los niveles normales de hierro, mediante la adición del quelante BPS, provocan la recuperación de la enzima Sod2 y de forma consecuente la de las enzimas con centros Fe-S medidas en este trabajo. Asimismo, el doble mutante  $\Delta yfh1\Delta aft1$ , no presenta acumulación de hierro y mantiene unos niveles de actividad Mn-SOD similares al wt o al  $\Delta aft1$ . Otra prueba de que la inactivación de la enzima Mn-SOD es consecuencia de la desregulación de la homeostasis del hierro, queda demostrado en el experimento realizado

con el mutante *Δgrx5* plasmado en la Figura III 9. Este mutante que presenta una fuerte acumulación de hierro parece comportarse de modo muy similar al mutante *Δyfh1*, en cuanto al contenido de manganeso celular, actividad Mn-SOD y respuesta a la suplementación con manganeso en el medio de cultivo. De esta manera podemos afirmar que por lo menos en los mutantes *Δyfh1* y *Δgrx5* la deficiencia en manganeso y de forma consecuente, la actividad Mn-SOD se deben a la situación generada por la acumulación de hierro total intracelular. Estos resultados coinciden en parte con los presentados por Yang y colaboradores, en los que demuestran la inactivación de la Mn-SOD en otras cepas delecionadas para genes relacionados con la homeostasis del hierro como son *MTM1* y *SSQ1* (Yang et al., 2006). En este trabajo, la cepa *Δgrx5* se comportó del mismo modo que en nuestras manos en cuanto a su actividad Mn-SOD y a su respuesta a BPS. Sus resultados indican que la desregulación de la homeostasis del hierro provoca la sobrecarga de éste metal en su estado reactivo, el cual compite con el manganeso por el sitio de unión a la Sod2. En dicho trabajo, muestran resultados contrarios a los nuestros en cuanto a la actividad Mn-SOD de las células deficientes en *YFH1*. Cabe destacar que la cepa utilizada por Yang y colaboradores presenta un fondo genético (BY4741) diferente al nuestro (W303). El fondo BY4741 presenta deficiencia en Hap1, lo que lo hace inapropiado para el estudio del metabolismo mitocondrial. En este contexto, vale la pena mencionar, que la actividad Mn-SOD fue medida en nuestro laboratorio en otro fondo genético (FY), observándose también la disminución de la misma (datos no mostrados).

A pesar de lo expuesto, los resultados no explican como el exceso de hierro provoca la deficiencia en manganeso. Nuestra hipótesis, la cual debe ser comprobada, se basa en el transportador de alta afinidad de manganeso Smf2. Las células deficientes en *SMF2*, al igual que las deficientes en *YFH1*, muestran una carencia en el contenido de manganeso y en la actividad Mn-SOD, que es recuperada mediante la suplementación del medio de cultivo con manganeso (Luk and Culotta, 2001). Existen tres transportadores de manganeso en levadura ortólogos de DMT1 que son denominados Smf1, Smf2 y Smf3 los cuales están codificados por tres genes diferentes. Smf1, que no es específico para manganeso, se localiza en la superficie celular, Smf2 en las vesículas intracelulares y Smf3 en la membrana vacuolar (Portnoy et al., 2000). La mutación de *SMF1* (Supek et al., 1996) o de *SMF3* no provoca ningún cambio en el contenido de manganeso de la célula, mientras que la de *SMF2* conduce a la pérdida de la capacidad de adquirir el metal a concentraciones normales del mismo (Luk and Culotta, 2001). Este hecho parece indicar que existe otro transportador de manganeso ubicado en la superficie celular. En situaciones de falta de manganeso, Smf1 sufre un cambio conformacional que previene su degradación ubicándose en la membrana plasmática para

facilitar la entrada de manganeso. Smf2 por su parte, es dirigido a los endosomas para movilizar el manganeso que pueda entrar vía Smf1 (Portnoy et al., 2000). Es importante tener en cuenta que la actividad de Smf2 (la cual no está regulada por Aft1) se ve disminuida mediante regulación post-trasduccional en situaciones de elevados niveles de hierro. De esta manera, Smf2 podría ser capaz de sensar el alto contenido de hierro en la cepa  $\Delta yfh1$  y provocar la deficiencia de manganeso en las células, mediante la disminución del transportador de alta afinidad de dicho metal. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que la falta de manganeso ligado a la acumulación de hierro, podría ser una situación general y no sólo aplicable a la FRDA. Los resultados obtenidos con el mutante  $\Delta grx5$ , así como con otras células deficientes en genes que provocan la disrupción de la homeostasis del hierro (Yang et al., 2006), indicarían que este hecho puede ser un fenómeno más general que puede estar ocurriendo en enfermedades que muestran acumulación de hierro.

## 2. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN $\Delta yfh1$ PROVOCA DAÑO A PROTEÍNAS ESPECÍFICAS.

La existencia de estrés oxidativo en FRDA ha sido cuestionado por algunos trabajos (Seznec et al., 2005) en los que no fueron capaces de identificar marcadores de estrés oxidativo en diversos modelos de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los resultados publicados van a favor de la existencia de estrés oxidativo tanto en células provenientes, de los pacientes como en la mayoría de los modelos estudiados (Santos et al., 2004; Santos et al., 2001; Karthikeyan et al., 2003; Pastore et al., 2003; Bulteau et al., 2007; Sutak et al., 2008). En los pacientes con FRDA, el estrés oxidativo es revelado por niveles elevados de productos de peroxidación lipídica como malondialdehído (Emond et al., 2000), daño a DNA medido como la presencia de 8-hidroxideoxiguanosina (Schenk et al., 1994), la disminución de glutatión y el aumento de la actividad glutatión S-transferasa en plasma (Tozzi et al., 2002). Las primeras evidencias que nuestros resultados mostraron a favor de un estrés oxidativo endógeno en las células que no presentan Yfh1, se observan a partir del estudio proteómico de las mismas. En dicho estudio, se puede observar la clara inducción de enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo. Destacan cuatro peroxiredoxinas, la tioredoxina, tioredoxina reductasa y catalasa A, así como las superóxido dismutasas. Como ya se ha mencionado, a pesar de su sobreexpresión existe deficiencia en la actividad de ambas superóxido dismutasas y sus niveles de inducción se mantienen a pesar de la recuperación de las actividades con la suplementación de sus cofactores metálicos en el medio de cultivo. Este hecho parece indicar que la sobrecarga de hierro que continúa

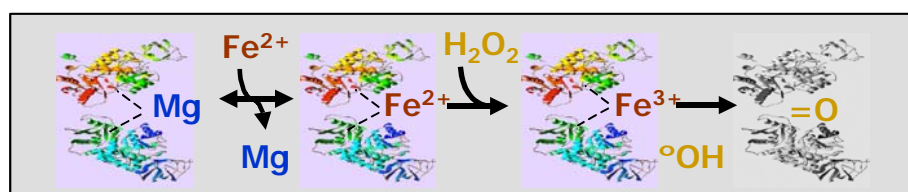
afectando a las células, aún cuando se produce la recuperación de las actividades SODs, es la principal responsable de la inducción de las enzimas de respuesta a estrés oxidativo.

A partir de la evidencia de la existencia de un estrés oxidativo endógeno, nos adentramos en el estudio de las proteínas oxidativamente afectadas. Los resultados de esta tesis claramente establecen que el exceso de hierro de la cepa deficiente en frataxina provoca daño oxidativo a las proteínas, medido como el incremento de grupos carbonilo. De manera más interesante aún, el daño oxidativo afecta a proteínas específicas que además en muchos de las situaciones muestran una pérdida de su actividad, como es el caso de piruvato quinasa, fosfoglicerato quinasa, adenilato quinasa y ATP sintasa.

El hecho de que 6 de las 14 proteínas identificadas como carboniladas sean de localización mitocondrial, indican que la mitocondria es el organelo más expuesto al estrés oxidativo en las células *Δyfh1*. Estos resultados cobran más sentido si tenemos en cuenta que la frataxina es una proteína de localización mitocondrial y que es en este organelo donde se localiza el mayor acúmulo de hierro cuando las células carecen de dicha proteína (Chen and Kaplan, 2000). Asimismo, ha sido descrito un gran número de defectos en la función mitocondrial en las células que carecen de Yfh1. Por otro lado, parece importante remarcar que alguna de las proteínas identificadas como carboniladas ya han sido identificadas previamente como blanco del estrés oxidativo. Este es el caso de actina y ATP sintasa (Cabiscol and Ros, 2006), Tef2 (Shenton and Grant, 2003), piruvato quinasa (Yoo and Regnier, 2004) y Ilv5 (Bulteau et al., 2007). Del mismo modo, diversas chaperonas han sido descritas previamente como blanco de estrés oxidativo (Cabiscol et al., 2000; Cabiscol et al., 2002; Echave et al., 2002; Reverter-Branchat et al., 2004; Sutak et al., 2008).

Sin embargo, la observación más destacada es que 11 de las proteínas identificadas son proteínas con sitios de unión a magnesio las cuales unen este metal directamente a su estructura o por medio de nucleótidos. Este número es claramente mayor al esperado por azar, ya que menos del 10% de las proteínas de levadura presentan dichas características, según lo anotado en la base de datos Swiss-Prot. Estos resultados representan la primera evidencia que relacionan al estrés oxidativo con las proteínas de unión a magnesio, lo cual puede implicar un mecanismo que puede darse de forma más general en las enfermedades que presentan acumulación de hierro. El mecanismo por el cual se produce la oxidación de las proteínas de unión a magnesio puede ser explicado mediante el proceso llamado oxidación catalizada por metales (MCO). Este mecanismo se produce cuando el peróxido de hidrógeno reacciona con los metales de transición que están formando parte de los centros activos de muchas proteínas dando lugar al radical hidroxilo. Ésta dañina especie del oxígeno modifica a los aminoácidos cercanos a dicho centro provocando la pérdida de estabilidad y

función de las proteínas (Figura I 5) (Stadtman, 1990). Por esta razón, la presencia de hierro o de otro metal con actividad redox en el sitio activo de las proteínas, las hace más sensible al estrés (Levine, 1983; Cabiscol et al., 1994). Mientras que por lo contrario, las metaloenzimas que contienen metales sin actividad redox como el zinc son altamente resistentes a MCO (Tamarit et al., 1998).



**Figura IV 1: Esquema del posible mecanismo de inactivación de las proteínas que unen magnesio bajo condiciones de acumulación de hierro.** Estructura tridimensional de la piruvato quinasa con la unión a metales esquematizada. La pérdida de color de la misma indicaría su inactivación. El mecanismo podría considerarse para todas las proteínas que unen magnesio.

De este modo, con el conocimiento de que el hierro es capaz de provocar la carbonilación de las proteínas una vez unida a ella, nos planteamos la siguiente hipótesis que relaciona el elevado número de proteínas oxidadas que contienen centros de unión a magnesio y la sobrecarga de hierro en las células deficientes en *YFH1*. Según esta hipótesis, el hierro en su estado quelable o libre se encontraría en altas concentraciones en la cepa  $\Delta yfh1$  y podría reemplazar al magnesio de las proteínas que presentan unión al mismo. Una vez unido a la proteína, dicho hierro promovería la generación de especies reactivas del oxígeno, las cuales provocarían la formación de grupos carbonilo en los aminoácidos vecinos al sitio de unión al metal de las proteínas (Figura IV 1).

Esta hipótesis fue corroborada a distintos niveles. En primer lugar mediante la sonda *PhenGreen SK* se comprobó la presencia de elevados niveles de hierro quelable en el mutante  $\Delta yfh1$ . Por otro lado, la enzima piruvato quinasa mostró una marcada inactivación en extractos crudos de células  $\Delta yfh1$ . Esta inactivación no fue observada cuando el hierro quelable fue disminuido, ya sea por medio de la mutación de *AFT1* (creando el doble mutante  $\Delta yfh1\Delta aft1$ ) o por tratamiento con desferrioxamina. Finalmente, los ensayos *in vitro* con la piruvato quinasa pura, sugieren claramente que el hierro podría reemplazar al magnesio en el sitio de unión a metales de estas proteínas y de este modo promover la inactivación de la enzima.

En el caso de la fosfoglicerato quinasa, la presencia de ATP promueve la formación de grupos carbonilo. Este efecto depende de la formación del complejo ATP-Fe, ya que el efecto



pro-oxidante del ATP es inhibido por magnesio. Un dato interesante no mostrado en los resultados es que la oxidación de la fosfoglicerato quinasa por ATP y hierro no resulta en la inactivación de la enzima. Además, las actividades enzimáticas de las proteínas que unen el magnesio directamente a sus aminoácidos ( $F_1F_0$  ATP sintasa y piruvato quinasa) se vieron marcadamente más afectadas en las células  $\Delta yfh1$  que las de aquellas que lo unen a través de nucleótidos, como es el caso de fosfoglicerato quinasa y adenilato quinasa (Figura III 13). Este hecho sugiere que las enzimas que contienen el magnesio directamente unido en sus sitios activos podrían ser más sensibles al estrés oxidativo mediado por hierro, que las enzimas que presenten el magnesio unido a nucleótidos. Así, cuanto más cerca del sitio activo se generen las ROS, más posibilidades existen de que se vean afectados los aminoácidos esenciales para el funcionamiento de las proteínas.

La observación de que las proteínas que unen magnesio, ya sean de forma directa o a través de nucleótidos, pueden ser blanco del estrés oxidativo o de un exceso de hierro en la célula, ha sido sugerido previamente por otros autores. Por ejemplo, la proteína ATP sintasa mitocondrial (Tamarit et al., 1998) o la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico se encuentran inactivadas en situación de estrés oxidativo (Moreau et al., 1998). Dicha sensibilidad al estrés oxidativo podría deberse a la capacidad que tiene el  $Fe^{2+}$  de reemplazar al magnesio unido a los grupos fosfato de los nucleótidos y una vez allí promover la formación de ROS tras reaccionar con  $H_2O_2$  o oxígeno (Hermes-Lima et al., 1995). Además, se ha demostrado que la oxidación de ATP sintasa *in vitro* necesita la unión del hierro en el sitio del magnesio y que la presencia de ATP en esta reacción promueve mayor oxidación y fragmentación de la proteína en la zona de unión del ATP (Belogradov, 1996). Nuestros resultados demuestran que este proceso también tiene lugar *in vivo* en condiciones de acumulación de hierro y que puede afectar de forma general a las proteínas que presentan lugares de unión a magnesio. Una pregunta interesante es como el hierro puede reemplazar al magnesio dado que las concentraciones celulares de magnesio son claramente mayores. La explicación podría estar basada en el hecho que el hierro (al igual que el cobre) muestran una afinidad de varios órdenes de magnitud mayor por los sitios de unión a metales catiónicos que el magnesio. Este hecho explicaría porque bajas concentraciones de hierro son capaces de competir y reemplazar al magnesio o al manganeso en los sitios de unión a metales (Stadtman and Levine, 2000; Harrigan et al., 2007).

Otro aspecto que conviene discutir son las posibles consecuencias que el daño a las proteínas identificadas como carboniladas en el  $\Delta yfh1$  pueda tener sobre la viabilidad celular. Dichas proteínas pueden dividirse en diferentes grupos. De este modo observamos la

presencia de tres chaperonas: Ssc1, Hsp78 y Sse1. Ssc1 está involucrada en el importe de Yfh1 y de otras proteínas a la mitocondria (Voisine et al., 2000). Además, ha sido descrito que su homóloga en humanos, llamada mortalina interacciona con frataxina (Shan et al., 2007). Asimismo, modificaciones post-traduccionales de mortalina han sido asociadas a la enfermedad de Alzheimer (Osorio et al., 2007). Hsp78 por su parte, previene la agregación y el plegamiento incorrecto de las proteínas mitocondriales (Rottgers et al., 2002), mientras que un mutante  $\Delta sse1$  es incapaz de crecer en fuentes de carbono no fermentables. Las consecuencias que la oxidación de estas proteínas puede tener en el correcto funcionamiento de la mitocondria son fundamentales si además tenemos en cuenta la falta de Yfh1, ya que el malfuncionamiento de cualquiera de ellas puede exacerbar alguno de los defectos causados por la disminución de la frataxina.

Otro grupo está formado por las proteínas involucradas en el metabolismo energético, las cuales son: Atp1, Atp2, Ilv5, Cdc19, Pgc1 y Adk1. Cobra especial atención la carbonilación y la inactivación de la ATP sintasa, ya que juega un rol fundamental en la producción de ATP. En este contexto, muchos trabajos han demostrado alteraciones en la producción de ATP en células deficientes en frataxina. Es de destacar que la producción de ATP mitocondrial en pacientes de FRDA está por debajo del rango normal (Lodi et al., 1999) y puede mejorar con tratamiento antioxidante (Long et al., 2002). Una reducción de los niveles de ATP también ha sido observado en ratones que presentan disrupción de la frataxina en hepatocitos (Thierbach et al., 2005). La relación entre el exceso de hierro y la disminución de los niveles de ATP viene dada por el hecho de que ratas con exceso crónico de hierro, presentan disminuidos sus niveles de ATP (Bacon et al., 1993; Ceccarelli et al., 1995). Por otro lado, la sobreexpresión de frataxina en adipocitos conduce a una mayor producción de ATP demostrando una correlación inversa entre el contenido de frataxina y el de ATP en las células (Ristow et al., 2000). De esta manera, la reducción del contenido de ATP en los diferentes modelos de FRDA, puede deberse no sólo al mal funcionamiento de enzimas como la aconitasa o la succinato deshidrogenasa, sino también a la deficiencia de la enzima ATP sintasa.

El último grupo de proteínas carboniladas está formado por las proteínas de respuesta a estrés: Cta1, Ahp1 y Sod1. Como se mencionó anteriormente, las células deficientes en *YFH1* presentan sobreexpresión de enzimas antioxidantes, entre las que se encuentra éstas tres proteínas por lo que su carbonilación podría tener un efecto marginal sobre la capacidad de defensa de la célula.

### 3. RELACIÓN ENTRE METABOLISMO DEL HIERRO Y ACTIVIDADES SOD: ¿UN ASPECTO CLAVE EN LA ATAXIA DE FRIEDREICH?

El caso de la actividad Sod merece especial atención debido a que es la única encargada de eliminar el superóxido del citoplasma (Sod1) y a que hemos observado disminuida sus actividades (Sod1 y Sod2) en las células  $\Delta yfh1$ . La inactivación de estas enzimas puede jugar un papel central en situaciones de acumulación de hierro. Diversos mecanismos o procesos pueden concurrir en la inactivación de ambas enzimas. En el caso de Sod1, como se puede observar en la Figura III 24, a pesar de recuperar la actividad CuZn-SOD con la suplementación de cobre en el medio de cultivo, al calcular su actividad específica (teniendo en cuenta la cantidad de proteína), observamos que entre un 30-40% de su actividad no puede ser restaurada. Esto puede deberse a que este porcentaje de proteína se encuentre oxidativamente modificado y por lo tanto irreversiblemente inactivado. De modo similar, observamos los resultados para la enzima Mn-SOD. Sin embargo en este caso el porcentaje de la enzima que continúa inactivada después de la suplementación con manganeso es de un 60-80%. A pesar de que el mecanismo por el cual se produce la inactivación de ambas proteínas podría depender en ambos casos de los altos niveles de hierro libre observado, en cada enzima actuaría de modo diferente. Así, la inactivación de Sod1 vendría dada por un mecanismo similar al observado en las enzimas de unión a magnesio, donde el hierro reemplazaría al metal en su centro activo y una vez allí provocaría el daño en los aminoácidos vecinos. En el caso de la Mn-SOD, el reemplazo del  $Fe^{2+}$  por el  $Mn^{2+}$ , dejaría a la enzima inactivada e incapacitada para ejercer su función (Luk et al., 2003). Si además tenemos en cuenta que el mutante  $\Delta yfh1$  presenta 7 veces más hierro libre y 3 veces menos manganeso que las células control, se explicaría el reemplazo del hierro por el manganeso en el sitio de unión al metal de la Sod2.

El mecanismo por el cual se produce la inactivación de la Sod1 también parece estar directamente relacionado con la disrupción de la homeostasis del hierro. Aunque las células deficientes en *YFH1* no mostraron una alteración de los niveles de cobre celular (datos no mostrados), la disponibilidad del cobre puede verse afectada dependiendo de las necesidades de la célula. Así, en las células  $\Delta yfh1$  bajo la activación de Aft1, el cobre se dirigiría principalmente a formar parte de Fet3 provocando la deficiencia del cofactor para Sod1 y por lo tanto la falta de actividad. Este hecho es relevante si tenemos en cuenta que al menos el 90% del cobre existente en el plasma de muchas especies, se encuentra

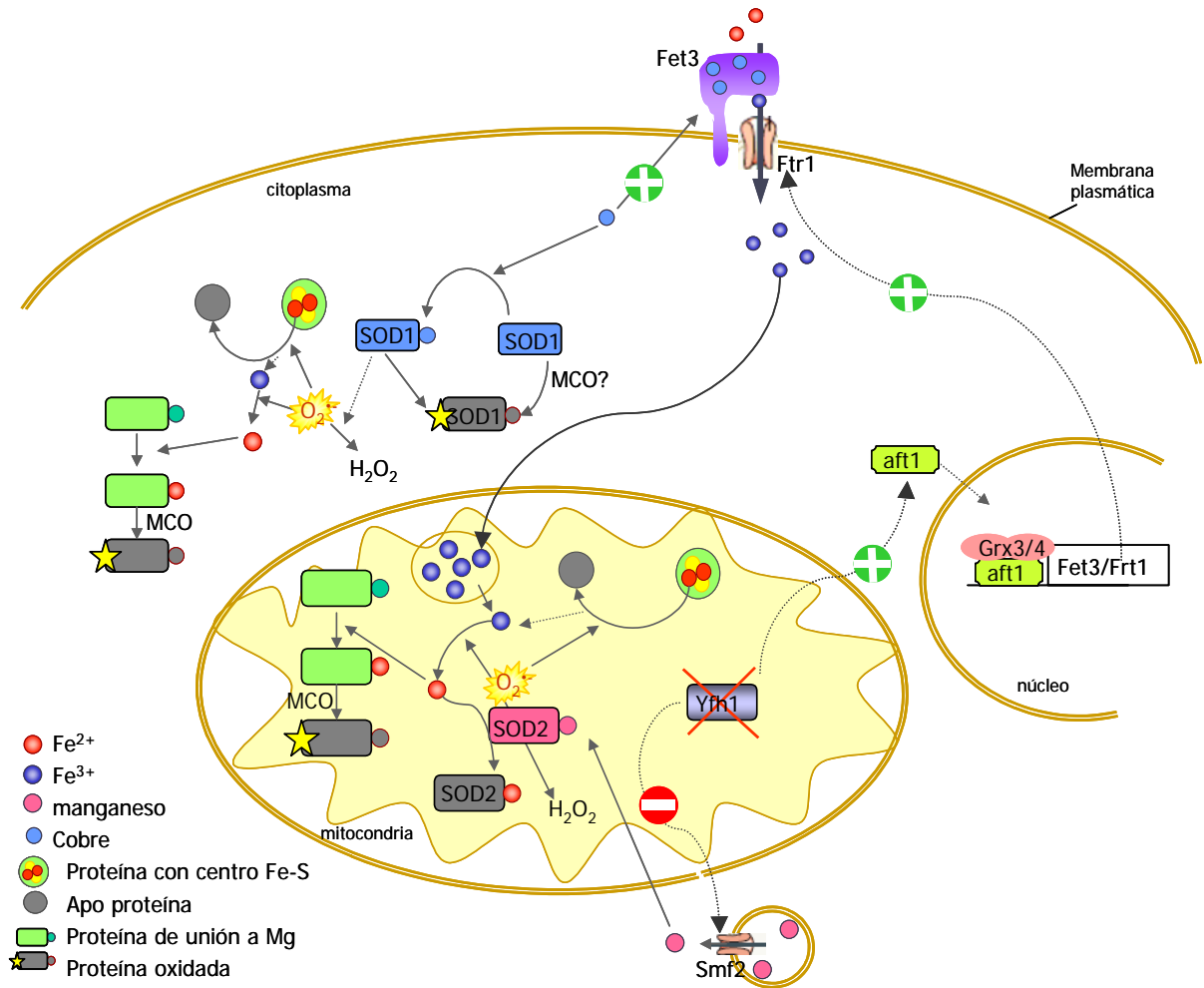
formando parte de la ceruloplasmina (homóloga de Fet3 en levadura) (Rogers and Lahiri, 2004).

¿Cuáles son las consecuencias de la falta de actividad SOD en el mutante *Δyfh1*? Nuestros resultados muestran que las células de levadura deficientes en *SOD1* presentan un aumento de hierro libre coincidiendo de este modo con otros grupos de trabajo (Srinivasan et al., 2000; Wei et al., 2001). Asimismo, se ha demostrado que las enzimas con centros Fe-S como la aconitasa, presentan una alta sensibilidad al superóxido, mostrándose inactivadas en células *Δsod1* (Wallace et al., 2004). Esta información pone de manifiesto que la falta de actividad CuZn-SOD provoca en la célula un aumento del superóxido capaz de reducir Fe<sup>3+</sup> y generar hierro quelable, situación que afecta a las proteínas de forma selectiva. La inactivación de la enzima piruvato quinasa en las células *Δsod1*, pone de manifiesto que la falta de dicha actividad en las células deficientes en *YFH1* es consecuencia del exceso de hierro libre generado por la falta de actividad CuZn-SOD.

Parece importante remarcar que tanto en la levadura deficiente en frataxina (Babcock et al., 1997) como en células cultivadas de pacientes con FRDA (Wong et al., 1999), se ha observado una alta sensibilidad a agentes oxidantes, en particular de peróxido de hidrógeno, probablemente porque éste puede reaccionar con Fe<sup>2+</sup> y dar lugar al OH•. En nuestro modelo de levadura observamos una importante reducción de la tasa de crecimiento del mutante *Δyfh1* al tratarlo con concentraciones de menadiona prácticamente inocuas para la cepa wt. Dicha sensibilidad podía ser parcialmente recuperada mediante la adición de cobre al medio de cultivo, lo que indica que la disminución de la actividad de CuZn-SOD ejerce un efecto directo en el aumento de la sensibilidad de las células *Δyfh1* al estrés oxidativo. Sin embargo observamos, un efecto negativo en la tasa de crecimiento de las células *Δyfh1* en presencia de menadiona cuando eran suplementadas con manganeso. Lo que demuestra que el manganeso por sí solo no es capaz de ejercer un efecto antioxidante en las concentraciones y condiciones utilizadas en este trabajo. Estos resultados contrastan con los que demuestran que altas concentraciones de manganeso (2mM) son capaces de suprimir los defectos de crecimiento del doble mutante *Δsod1Δsod2* (Lapinskas et al., 1995). También pone de manifiesto, que la sensibilidad al estrés de las células *Δyfh1* no puede ser restaurado por la actividad de la enzima Mn-SOD, demostrando que la actividad de la misma no está directamente relacionada con el lento crecimiento de las células. La explicación de la falta de respuesta positiva podría venir dada por la toxicidad de la menadiona, que a las concentraciones utilizadas afecta principalmente a proteínas citosólicas (Zadzinski et al.,

1998; Long et al., 2002), las cuales no se verían afectadas por la recuperación de la actividad Mn-SOD.

De modo general podemos interconectar nuestros resultados para comprender un poco más la respuesta de las células a la falta de frataxina (Figura IV 2). Así pues, tanto en este trabajo como en otros, queda demostrado que en las células carentes de Yfh1, *AFT1* se encuentra constitutivamente activado, aunque el mecanismo preciso que lleva a esta activación aún está por determinar (Babcock et al., 1997; Foury and Talibi, 2001). La activación de este factor transcripcional provoca la acumulación de hierro y la redistribución y/o falta del cobre citosólico, debido a los requerimientos de este metal por parte de la actividad de Fet3 (Philpott and Protchenko, 2007). Esta situación podría implicar la deficiencia de la actividad superóxido dismutasa 1, lo que promovería la inactivación de las enzimas con centros Fe-S generando un aumento del hierro libre en las células. Este hierro libre sería el encargado de reemplazar al magnesio en sus sitios de unión a las proteínas y una vez allí provocar el daño oxidativo. Por otro lado, Smf2 detectaría el exceso de hierro acumulado lo que promovería su degradación y por lo tanto la falta de manganeso celular. La falta de su cofactor, sumado a la gran disponibilidad de hierro quelable, dejaría inactivada a la Mn-SOD (Yang et al., 2006), provocando mayor daño esta vez en la mitocondria. La restauración parcial de las actividades SODs mediante la suplementación simultánea de cobre y manganeso en el medio de cultivo disminuiría los niveles de superóxido y prevendría la oxidación de muchas de las enzimas blanco del estrés oxidativo.



**Figura IV 2: Secuencia de eventos por falta de frataxina que explican el daño oxidativo celular.**

Sería importante determinar si la deficiencia de las actividades superóxido dismutasas están relacionadas con la ataxia de Friedreich. La observación de una disminución de estas actividades así como la sobreexpresión de las mismas en el modelo celular SH-SY5Y, nos permiten especular que lo observado en levadura puede estar sucediendo en los enfermos (Figura III 35). Alteraciones en la actividad y en la expresión de las SODs han sido observadas en otros modelos de la enfermedad. Como es el caso del modelo en células embrionarias de ratón diferenciadas a neuronas, a las cuales se les disminuía los niveles de frataxina. Estas células mostraron un incremento en la expresión de Mn-SOD comparada con las células controles (Santos et al., 2001). Se ha observado que tanto fibroblastos como limfoblastos procedentes de enfermos de FRDA presentan disminuida su capacidad antioxidante (Sturm et al., 2005). En los corazones del ratón condicional para FRDA la actividad SOD se ve disminuida (Chantrel-Groussard et al., 2001), mientras que un aumento

en la expresión de Mn-SOD es observada después del nacimiento seguida por la caída de la misma después de 10 semanas de vida del ratón (Seznec et al., 2005). Un dato muy interesante y que podría explicar la relación entre la FRDA y la falta de manganeso, es que las ratas deficientes en dicho metal desarrollan ataxia (Takeda et al., 2003). De manera análoga se ha observado una relación entre la deficiencia de cobre y desórdenes neurológicos en animales y el hombre, siendo los síntomas generales la falta de coordinación de los movimientos y la alta tasa de mortalidad en los recién nacidos (Zatta and Frank, 2007). Ambos metales, manganeso y cobre, son esenciales en el desarrollo y función del cerebro, no sólo por ser los cofactores de las superóxido dismutasas sino por formar parte de otras enzimas fundamentales para su correcto funcionamiento como la glutamina sintetasa. Por todo lo expuesto, sería muy importante conocer el contenido y disponibilidad de estos metales en los pacientes de FRDA ya que a partir de los resultados expuestos en esta tesis podríamos sugerir la suplementación de ambos metales a los enfermos. Por supuesto, hay que tener en cuenta que el manganeso en exceso puede tener efectos neurotóxicos, llevando al desarrollo de la enfermedad denominada manganismo que presenta síntomas similares al Parkinson (Santamaria, 2008). Sin embargo, los efectos tóxicos del manganeso están más relacionados con la exposición ambiental a éste. La intoxicación por ingesta de manganeso es rara ya que la absorción del manganeso está finamente regulada y cualquier exceso es eliminado por la vía biliar (Au et al., 2008). Por esta razón la ingesta de manganeso se considera segura a concentraciones hasta 5 veces mayores a la dosis diaria recomendada (Finley, 2004). Finalmente, merece la pena mencionar que los transportes de hierro y manganeso se encuentran interrelacionados, tanto en levadura, como en humanos. Por ejemplo, se cree que el principal transportador de manganeso en el cerebro sería DMT1, encargado también del transporte de hierro. Asimismo, la deficiencia en hierro favorece la acumulación de manganeso en el cerebro (Garcia et al., 2007). Todos estos datos, junto con los resultados presentados en esta tesis, nos llevan a considerar como muy probables la existencia de alteraciones del metabolismo de distintos metales en los pacientes que sufren FRDA.

## **V. CONCLUSIONES**





De los estudios realizados a lo largo de este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Las células de levadura deficientes en *YFH1* presentan niveles elevados de enzimas de respuesta a estrés oxidativo, lo que refleja una situación de estrés endógeno.
- Los mutantes  $\Delta yfh1$  muestran baja actividad Mn-SOD como consecuencia de un déficit de manganeso intracelular.
- La recuperación de tres enzimas Fe-S, mediante el tratamiento con manganeso o con quelantes de hierro, indica que *YFH1* no es esencial para la biosíntesis de los centros Fe-S.
- La correlación entre la acumulación de hierro intracelular y la deficiencia en manganeso en los mutantes  $\Delta yfh1$  y  $\Delta grx5$ , sugiere que éste mecanismo puede ser aplicable a situaciones o patologías que presentan sobrecarga de hierro.
- El estrés oxidativo debido a la falta de Yfh1 afecta a las proteínas de forma selectiva, principalmente a aquellas que presentan lugares de unión a magnesio o a nucleótidos. Esta selectividad se explica por la capacidad del hierro para reemplazar el magnesio y promover la oxidación de proteínas mediante el mecanismo de oxidación catalizada por metales.
- El déficit de la actividad SOD provoca un aumento de la fracción de hierro quelable, que es la responsable de la oxidación de las proteínas con centros de unión a magnesio.
- La inactivación parcial de CuZn-SOD, así como la inducción de Sod1 y Sod2 en las células SH-SY5Y interferidas para frataxina, indican que la falta de actividad SOD podría estar implicada en el desarrollo de la Ataxia de Friedreich.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



## A

- Adachi, T., Kodera, T., Ohta, H., Hayashi, K. & Hirano, K. (1992) *The heparin binding site of human extracellular-superoxide dismutase. Arch Biochem Biophys*, 297, 155-161.
- Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S. R., Bonomi, F. & Pastore, A. (2009) *Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. Nat Struct Mol Biol*, 16, 390-396.
- Aisen, P. (2004) Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2137-2143.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Ruddle, P., Carroll, C., Webster, Z. & Pook, M. (2004) *GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. Genomics*, 84, 301-310.
- Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A. & Craig, E. A. (2004) *Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. EMBO Rep*, 5, 1096-1101.
- Andrews, N. C. (2008) Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 112, 219-230.
- Arner, E. S. (1999) *Superoxide production by dinitrophenyl-derivatized thioredoxin reductase--a model for the mechanism and correlation to immunostimulation by dinitrohalobenzenes. Biofactors*, 10, 219-226.
- Arner, E. S. & Holmgren, A. (2000) *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem*, 267, 6102-6109.
- Arosio, P., Ingrassia, R. & Cavadini, P. (2008) Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*.
- Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P. S., Li, L., Davis-Kaplan, S., Sipe, D. M. & Kaplan, J. (1994) The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*, 76, 403-410.
- Askwith, C. & Kaplan, J. (1998) Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem Sci*, 23, 135-138.
- Au, C., Benedetto, A. & Aschner, M. (2008) *Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. Neurotoxicology*, 29, 569-576.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingstone, R., Moore, D., Smith, J., Seidman, J. & K, S. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Avery, A. M. & Avery, S. V. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem*, 276, 33730-33735.

## 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, 1709-1712.

- Bacon, B. R., O'Neill, R. & Britton, R. S. (1993) *Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. Gastroenterology*, 105, 1134-1140.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005) *Mitochondria, oxidants, and aging. Cell*, 120, 483-495.
- Bali, P. K., Zak, O. & Aisen, P. (1991) A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochemistry*, 30, 324-328.
- Belogradov, G. I. (1996) *Mitochondrial ATP synthase: Fe<sup>2+</sup>-catalyzed fragmentation of the soluble F1-ATPase. Arch Biochem Biophys*, 335, 131-138.
- Bencze, K. Z., Kondapalli, K. C., Cook, J. D., McMahon, S., Millan-Pacheco, C., Pastor, N. & Stemmler, T. L. (2006) *The structure and function of frataxin. Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41, 269-291.
- Bennaars-Eiden, A., Higgins, L., Hertzell, A. V., Kapphahn, R. J., Ferrington, D. A. & Bernlohr, D. A. (2002) *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*, 277, 50693-50702.
- Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. (1997) *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem*, 272, 20313-20316.
- 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. (2007) *Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. Blood*, 110, 401-408.
- Branda, S. S., Cavadini, P., Adamec, J., Kalousek, F., Taroni, F. & Isaya, G. (1999) Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem*, 274, 22763-22769.
- Bulteau, A. L., Lundberg, K. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. & Szweda, L. I. (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, 5987-5991.
- Bulteau, A. L., O'Neill, H. A., Kennedy, M. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. & Szweda, L. I. (2004) *Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. Science*, 305, 242-245.
- Bulteau, A. L., Dancis, A., Gareil, M., Montagne, J. J., Camadro, J. M. & Lesuisse, E. (2007) *Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. Free Radic Biol Med*, 42, 1561-1570.
- Bushweller, J. H., Aslund, F., Wuthrich, K. & Holmgren, A. (1992) *Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. Biochemistry*, 31, 9288-9293.
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. & Winterbourn, C. C. (1997) *Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. Free Radic Biol Med*, 23, 361-366.
- Butterfield, D. A. & Sultana, R. (2008) *Redox proteomics: understanding oxidative stress in the progression of age-related neurodegenerative disorders. Expert Rev Proteomics*, 5, 157-160.

- Cabiscol, E., Aguilar, J. & Ros, J. (1994) *Metal-catalyzed oxidation of Fe<sup>2+</sup> dehydrogenases. Consensus target sequence between propanediol oxidoreductase of Escherichia coli and alcohol dehydrogenase II of Zymomonas mobilis*. *J Biol Chem*, 269, 6592-6597.
- Cabiscol, E., Belli, G., Tamarit, J., Echave, P., Herrero, E. & Ros, J. (2002) *Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 277, 44531-44538.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. & Ros, J. (2000) *Oxidative stress promotes specific protein damage in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275, 27393-27398.
- Cabiscol, E. & Ros, J. (2006) Oxidative damage to proteins: structural modifications and consequences in cell function. *Redox Proteomics: From protein modifications to cellular dysfunction and diseases* (ed<sup>^</sup>(eds D.-D. I, S. A & B. D. A), pp. 399-472. Wiley, New York.
- Cadenas, E., Wefers, H., Muller, A., Brigelius, R. & Sies, H. (1982) *Active oxygen metabolites and their action in the hepatocyte. Studies on chemiluminescence responses and alkane production*. *Agents Actions Suppl*, 11, 203-216.
- 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, 1353-1358.
- Campanella, A., Rovelli, E., Santambrogio, P., Cozzi, A., Taroni, F., and Levi, S. (2009). Mitochondrial ferritin limits oxidative damage regulating mitochondrial iron availability: hypothesis for a protective role in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 18, 1-11.
- 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. (1996) *Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion*. *Science*, 271, 1423-1427.
- Castegna, A., Aksenov, M., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Pierce, W. M., Booze, R., Markesbery, W. R. & Butterfield, D. A. (2002) *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*, 82, 1524-1532.
- Cavadini, P., O'Neill, H. A., Benada, O. & Isaya, G. (2002) *Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia*. *Hum Mol Genet*, 11, 217-227.
- Ceccarelli, D., Gallesi, D., Giovannini, F., Ferrali, M. & Masini, A. (1995) *Relationship between free iron level and rat liver mitochondrial dysfunction in experimental dietary iron overload*. *Biochem Biophys Res Commun*, 209, 53-59.
- Cha, M. K., Choi, Y. S., Hong, S. K., Kim, W. C., No, K. T. & Kim, I. H. (2003) *Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 278, 24636-24643.
- Chae, H. Z., Chung, S. J. & Rhee, S. G. (1994) *Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast*. *J Biol Chem*, 269, 27670-27678.
- Chang, L. Y., Slot, J. W., Geuze, H. J. & Crapo, J. D. (1988) *Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes*. *J Cell Biol*, 107, 2169-2179.



- Chantrel-Groussard, K., Geromel, V., Puccio, H., Koenig, M., Munnich, A., Rotig, A. & Rustin, P. (2001) *Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. Hum Mol Genet*, 10, 2061-2067.
- Cheeseman, K. H. & Slater, T. F. (1993) *An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull*, 49, 481-493.
- Chen, O. S. & Kaplan, J. (2000) *CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. J Biol Chem*, 275, 7626-7632.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C. & Walz, T. (2004) Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*, 116, 565-576.
- Cogoni, C., Valenzuela, L., Gonzalez-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P. & Gonzalez, A. (1995) *Saccharomyces cerevisiae has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. J Bacteriol*, 177, 792-798.
- Condo, I., Ventura, N., Malisan, F., Rufini, A., Tomassini, B. & Testi, R. (2007) *In vivo maturation of human frataxin. Hum Mol Genet*, 16, 1534-1540.
- Cooper, J. M., Korlipara, L. V., Hart, P. E., Bradley, J. L. & Schapira, A. H. (2008) Coenzyme Q10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q10 therapy. *Eur J Neurol*, 15, 1371-1379.
- Corsi, B., Cozzi, A., Arosio, P., Drysdale, J., Santambrogio, P., Campanella, A., Biasiotto, G., Albertini, A. & Levi, S. (2002) *Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. J Biol Chem*, 277, 22430-22437.
- Cossee, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dolle, P. & Koenig, M. (2000) *Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. Hum Mol Genet*, 9, 1219-1226.
- Costa, V. M., Amorim, M. A., Quintanilha, A. & Moradas-Ferreira, P. (2002) *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*, 33, 1507-1515.
- Cox, J. & Mann, M. (2007) *Is proteomics the new genomics? Cell*, 130, 395-398.
- Cozar-Castellano, I., del Valle Machargo, M., Trujillo, E., Arteaga, M. F., Gonzalez, T., Martin-Vasallo, P. & Avila, J. (2004) *hIscA: a protein implicated in the biogenesis of iron-sulfur clusters. Biochim Biophys Acta*, 1700, 179-188.
- Craig, E. A. & Marszalek, J. (2002) *A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. Cell Mol Life Sci*, 59, 1658-1665.
- Crisp, R. J., Pollington, A., Galea, C., Jaron, S., Yamaguchi-Iwai, Y. & Kaplan, J. (2003) *Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. J Biol Chem*, 278, 45499-45506.
- Culotta, V. C., Yang, M. & O'Halloran, T. V. (2006) *Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. Biochim Biophys Acta*, 1763, 747-758.

## D

- D'Autreaux, B. & Toledano, M. B. (2007) *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 813-824.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A. (2006) *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. J Cell Mol Med*, 10, 389-406.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A. (2005) *Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. Mass Spectrom Rev*, 24, 55-99.
- Dancis, A., Klausner, R. D., Hinnebusch, A. G. & Barriocanal, J. G. (1990) *Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol*, 10, 2294-2301.
- Das, K. C., Guo, X. L. & White, C. W. (1999) *Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. Am J Physiol*, 276, L530-539.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H. F. (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 2258-2262.
- Davidson, J. F., Whyte, B., Bissinger, P. H. & Schiestl, R. H. (1996) *Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5116-5121.
- Davies, S. M., Poljak, A., Duncan, M. W., Smythe, G. A. & Murphy, M. P. (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, 181-190.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. (1997) *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J*, 324 ( Pt 1), 1-18.
- De Biase, I., Rasmussen, A., Monticelli, A., Al-Mahdawi, S., Pook, M., Coccozza, S. & Bidichandani, S. I. (2007) *Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. Genomics*, 90, 1-5.
- de Nobel, H., Lawrie, L., Brul, S., Klis, F., Davis, M., Alloush, H. & Coote, P. (2001) *Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed Saccharomyces cerevisiae. Yeast*, 18, 1413-1428.
- De Silva, D. M., Askwith, C. C., Eide, D. & Kaplan, J. (1995) The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J Biol Chem*, 270, 1098-1101.
- Desmyter, L., Dewaele, S., Reekmans, R., Nystrom, T., Contreras, R. & Chen, C. (2004) *Expression of the human ferritin light chain in a frataxin mutant yeast affects ageing and cell death. Exp Gerontol*, 39, 707-715.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J. & Toledano, M. B. (2002) A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111, 471-481.
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y. I., Ristow, M. & Shoelson, S. E. (2000) *Crystal structure of human frataxin. J Biol Chem*, 275, 30753-30756.

- Ding, H., Yang, J., Coleman, L. C. & 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, 7997-8004.
- Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A. & Eide, D. J. (1994) The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269, 26092-26099.
- Draculic, T., Dawes, I. W. & Grant, C. M. (2000) *A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol Microbiol*, 36, 1167-1174.
- 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, 2635-2643.
- Durr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J. L., Brice, A. & Koenig, M. (1996) *Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. N Engl J Med*, 335, 1169-1175.

## E

- Eaton, J. W. & Qian, M. (2002) *Molecular bases of cellular iron toxicity. Free Radic Biol Med*, 32, 833-840.
- Echave, P., Esparza-Ceron, M. A., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J., Membrillo-Hernandez, J. & Lin, E. C. (2002) *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.
- Eide, D., Davis-Kaplan, S., Jordan, I., Sipe, D. & Kaplan, J. (1992) Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. The ferrioreductase and Fe(II) transporter are regulated independently. *J Biol Chem*, 267, 20774-20781.
- Eklund, H., Gleason, F. K. & Holmgren, A. (1991) *Structural and functional relations among thioredoxins of different species. Proteins*, 11, 13-28.
- Emond, M., Lepage, G., Vanasse, M. & Pandolfo, M. (2000) *Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. Neurology*, 55, 1752-1753.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. & Comella, J. X. (2000) *Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. J Neurochem*, 75, 991-1003.
- Engidawork, E. & Lubec, G. (2001) *Protein expression in Down syndrome brain. Amino Acids*, 21, 331-361.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. (1991) *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med*, 11, 81-128.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Cooke, M. S. (2004) *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat Res*, 567, 1-61.

## F

- Fang, J. & Beattie, D. S. (2003) External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic Biol Med*, 34, 478-488.
- Fenton, A. W. & Blair, J. B. (2002) *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.
- Fernandes, A. P. & Holmgren, A. (2004) *Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system*. *Antioxid Redox Signal*, 6, 63-74.
- Field, L. S., Furukawa, Y., O'Halloran, T. V. & Culotta, V. C. (2003) *Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria*. *J Biol Chem*, 278, 28052-28059.
- Finley, J. W. (2004) *Does environmental exposure to manganese pose a health risk to healthy adults?* *Nutr Rev*, 62, 148-153.
- Fleming, M. D. & Andrews, N. C. (1998) Mammalian iron transport: an unexpected link between metal homeostasis and host defense. *J Lab Clin Med*, 132, 464-468.
- 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, 7762-7768.
- Foury, F. (1999) *Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain*. *FEBS Lett*, 456, 281-284.
- 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, 373-377.
- 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, 24475-24483.
- Frazzon, J., Fick, J. R. & Dean, D. R. (2002) *Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process*. *Biochem Soc Trans*, 30, 680-685.

## G

- Gakh, O., Park, S., Liu, G., Macomber, L., Imlay, J. A., Ferreira, G. C. & Isaya, G. (2006) *Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity*. *Hum Mol Genet*, 15, 467-479.
- Garcia, S. J., Gellein, K., Syversen, T. & Aschner, M. (2007) *Iron deficient and manganese supplemented diets alter metals and transporters in the developing rat brain*. *Toxicol Sci*, 95, 205-214.
- Georgatsou, E. & Alexandraki, D. (1994) *Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 14, 3065-3073.
- 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, 906-911.

- Gibson, T. J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A. & Bork, P. (1996) *Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. Trends Neurosci*, 19, 465-468.
- Ginsberg, M. D., Feliciello, A., Jones, J. K., Avvedimento, E. V. & Gottesman, M. E. (2003) *PKA-dependent binding of mRNA to the mitochondrial AKAP121 protein. J Mol Biol*, 327, 885-897.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E. & Pelicci, P. G. (2007) *Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 722-728.
- Glaser, T., Hedman, B., Hodgson, K. O. & Solomon, E. I. (2000) *Ligand K-edge X-ray absorption spectroscopy: a direct probe of ligand-metal covalency. Acc Chem Res*, 33, 859-868.
- Gonzalez-Cabo, P., Vazquez-Manrique, R. P., Garcia-Gimeno, M. A., Sanz, P. & Palau, F. (2005) *Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. Hum Mol Genet*, 14, 2091-2098.
- Grimsrud, P. A., Picklo, M. J., Sr., Griffin, T. J. & Bernlohr, D. A. (2007) *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*, 6, 624-637.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. & Hediger, M. A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388, 482-488.
- Gunshin, H., Starr, C. N., Drenzo, C., Fleming, M. D., Jin, J., Greer, E. L., Sellers, V. M., Galica, S. M. & Andrews, N. C. (2005) Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*, 106, 2879-2883.
- Gunther, M. R., Hanna, P. M., Mason, R. P. & Cohen, M. S. (1995) *Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin-trapping study. Arch Biochem Biophys*, 316, 515-522.

H
---

- Halliwell, B. (1996) *Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr*, 16, 33-50.
- Harman, D. (1956) *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol*, 11, 298-300.
- Harrigan, J. A., Piotrowski, J., Di Noto, L., Levine, R. L. & Bohr, V. A. (2007) *Metal-catalyzed oxidation of the Werner syndrome protein causes loss of catalytic activities and impaired protein-protein interactions. J Biol Chem*, 282, 36403-36411.
- Harris, Z. L., Klomp, L. W. & Gitlin, J. D. (1998) Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*, 67, 972S-977S.
- Hart, P. E., Lodi, R., Rajagopalan, B., Bradley, J. L., Crilley, J. G., Turner, C., Blamire, A. M., Manners, D., Styles, P., Schapira, A. H. & Cooper, J. M. (2005) Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Arch Neurol*, 62, 621-626.
- Haskins, K., Kench, J., Powers, K., Bradley, B., Pugazhenth, S., Reusch, J. & McDuffie, M. (2004) *Role for oxidative stress in the regeneration of islet beta cells? J Investig Med*, 52, 45-49.

- Hermes-Lima, M., Castilho, R. F., Meinicke, A. R. & Vercesi, A. E. (1995) *Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. Mol Cell Biochem*, 145, 53-60.
- Herman, D., Jenssen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S. L. & Gottesfeld, J. M. (2006) Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*, 2, 551-558.
- Herrero, E., Ros, J., Tamarit, J. & Belli, G. (2006) *Glutaredoxins in fungi. Photosynth Res*, 89, 127-140.
- Herrero, E., Ros, J., Belli, G. & Cabisco, E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780, 1217-1235.
- Holmgren, A. (1976) *Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 2275-2279.
- Holmgren, A. (1985) *Thioredoxin. Annu Rev Biochem*, 54, 237-271.
- Holmgren, A. (1989) *Thioredoxin and glutaredoxin systems. J Biol Chem*, 264, 13963-13966.
- Hori, K., Katayama, M., Sato, N., Ishii, K., Waga, S. & Yodoi, J. (1994) *Neuroprotection by glial cells through adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin (ADF/TRX). Brain Res*, 652, 304-310.
- Huynen, M. A., Snel, B., Bork, P. & Gibson, T. J. (2001) *The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. Hum Mol Genet*, 10, 2463-2468.
- Hwang, C., Sinskey, A. J. & Lodish, H. F. (1992) *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. Science*, 257, 1496-1502.

## I

- Imlay, J. A. (2003) *Pathways of oxidative damage. Annu Rev Microbiol*, 57, 395-418.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S. & Kimura, A. (1999) *Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem*, 274, 27002-27009.
- Isakov, N., Witte, S. & Altman, A. (2000) *PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. Trends Biochem Sci*, 25, 537-539.
- Izquierdo, A., Casas, C., Muhlenhoff, U., Lillig, C. H. & Herrero, E. (2008) *Saccharomyces cerevisiae Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. Eukaryot Cell*, 7, 1415-1426.

## J

- Jakubowski, W., Bilinski, T. & Bartosz, G. (2000) *Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Free Radic Biol Med*, 28, 659-664.
- Jamieson, D. J. (1998) *Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Yeast*, 14, 1511-1527.

- Jensen, L. T. & Culotta, V. C. (2000) *Role of Saccharomyces cerevisiae ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. Mol Cell Biol, 20, 3918-3927.*
- Jeong, J. S., Kwon, S. J., Kang, S. W., Rhee, S. G. & Kim, K. (1999) *Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from Saccharomyces cerevisiae. Biochemistry, 38, 776-783.*
- Jiralerspong, S., Liu, Y., Montermini, L., Stifani, S. & Pandolfo, M. (1997) *Frataxin shows developmentally regulated tissue-specific expression in the mouse embryo. Neurobiol Dis, 4, 103-113.*
- Johansson, C., Lillig, C. H. & Holmgren, A. (2004) *Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. J Biol Chem, 279, 7537-7543.*

## K

- Kakko, S., Paivansalo, M., Koistinen, P., Kesaniemi, Y. A., Kinnula, V. L. & Savolainen, M. J. (2003) *The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. Atherosclerosis, 168, 147-152.*
- Kakhlon, O. & Cabantchik, Z. I. (2002) *The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). Free Radic Biol Med, 33, 1037-1046.*
- Kang, S. W., Chae, H. Z., Seo, M. S., Kim, K., Baines, I. C. & Rhee, S. G. (1998) *Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. J Biol Chem, 273, 6297-6302.*
- Karthikeyan, G., Santos, J. H., Graziewicz, M. A., Copeland, W. C., Isaya, G., Van Houten, B. & Resnick, M. A. (2003) *Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. Hum Mol Genet, 12, 3331-3342.*
- Keller, R. J., Halmes, N. C., Hinson, J. A. & Pumford, N. R. (1993) *Immunochemical detection of oxidized proteins. Chem Res Toxicol, 6, 430-433.*
- Kirkman, H. N. & Gaetani, G. F. (2007) *Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends Biochem Sci, 32, 44-50.*
- 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, 3981-3989.*
- Kohlhaw, G. B. (1988) *Isopropylmalate dehydratase from yeast. Methods Enzymol, 166, 423-429.*
- Konrad, M. (1988) *Analysis and in vivo disruption of the gene coding for adenylate kinase (ADK1) in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem, 263, 19468-19474.*
- Korolainen, M. A., Goldsteins, G., Alafuzoff, I., Koistinaho, J. & Pirttila, T. (2002) *Proteomic analysis of protein oxidation in Alzheimer's disease brain. Electrophoresis, 23, 3428-3433.*
- Koutnikova, H., Campuzano, V. & Koenig, M. (1998) *Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. Hum Mol Genet, 7, 1485-1489.*
- Kumanovics, 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. & Kaplan, J. (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, 10276-10286.*

## L

- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G. & Lill, R. (2000) *A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 1050-1055.*
- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R. & Culotta, V. C. (1995) *Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. Mol Cell Biol, 15, 1382-1388.*
- Lee, T. H., Yu, S. L., Kim, S. U., Lee, K. K., Rhee, S. G. & Yu, D. Y. (1999) *Characterization of mouse peroxiredoxin I genomic DNA and its expression. Gene, 239, 243-250.*
- 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), 3455-3462.*
- 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, 24437-24440.*
- Levine, R. L. (1983) *Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system. J Biol Chem, 258, 11828-11833.*
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. & Stadtman, E. R. (1990) *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol, 186, 464-478.*
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R. & Shacter, E. (1994) *Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol, 233, 346-357.*
- Levine, R. L. A. E. R. S. (2006) *Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology. Redox Proteomics: From protein modifications to cellular dysfunction and diseases* (eds D.-D. I. & S. A. A. D. A. Butterfield), pp. 123-168. Wiley-Interscience, United States of America.
- Lewin, A., Moore, G. R. & Le Brun, N. E. (2005) *Formation of protein-coated iron minerals. Dalton Trans, 3597-3610.*
- Lill, R. & Muhlenhoff, U. (2008) *Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. Annu Rev Biochem, 77, 669-700.*
- Li, L., Bagley, D., Ward, D. M. & Kaplan, J. (2008) *Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. Mol Cell Biol, 28, 1326-1337.*
- Li, L., Chen, O. S., McVey Ward, D. & Kaplan, J. (2001) *CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. J Biol Chem, 276, 29515-29519.*
- Li, L. & Kaplan, J. (2004) *A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. J Biol Chem, 279, 33653-33661.*
- Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C. & Epstein, C. J. (1995) *Dilated cardiomyopathy and*



- neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nat Genet, 11, 376-381.*
- Lillig, C. H., Berndt, C. & Holmgren, A. (2008) *Glutaredoxin systems. Biochim Biophys Acta, 1780, 1304-1317.*
- Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M. E., Hudemann, C., Bill, E. & Holmgren, A. (2005) *Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 8168-8173.*
- Lim, C. K., Kalinowski, D. S. & Richardson, D. R. (2008) *Protection against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in Friedreich's ataxia fibroblasts using novel iron chelators of the 2-pyridylcarboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone class. Mol Pharmacol, 74, 225-235.*
- Llorens, J. V., Navarro, J. A., Martinez-Sebastian, M. J., Baylies, M. K., Schneuwly, S., Botella, J. A. & Molto, M. D. (2007) *Causative role of oxidative stress in a Drosophila model of Friedreich ataxia. FASEB J, 21, 333-344.*
- Lodi, R., Cooper, J. M., Bradley, J. L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D. J. & Schapira, A. H. (1999) *Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 11492-11495.*
- Long, D. J., 2nd, Iskander, K., Gaikwad, A., Arin, M., Roop, D. R., Knox, R., Barrios, R. & Jaiswal, A. K. (2002) *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.*
- Longo, V. D., Gralla, E. B. & Valentine, J. S. (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, 12275-12280.*
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W. & Grant, C. M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell, 9, 1081-1091.*
- Luk, E., Carroll, M., Baker, M. & Culotta, V. C. (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, 10353-10357.*
- Luk, E., Yang, M., Jensen, L. T., Bourbonnais, Y. & Culotta, V. C. (2005) *Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem, 280, 22715-22720.*
- Luk, E. E. & Culotta, V. C. (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, 47556-47562.*

## M

- Magi, B., Ettore, A., Liberatori, S., Bini, L., Andreassi, M., Frosali, S., Neri, P., Pallini, V. & Di Stefano, A. (2004) *Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. Cell Death Differ, 11, 842-852.*

- Maier, C. M. & Chan, P. H. (2002) *Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. Neuroscientist*, 8, 323-334.
- Maitra, P. K. & Lobo, Z. (1971) *A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. J Biol Chem*, 246, 475-488.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J. & Taketo, M. M. (1996) *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. Dev Biol*, 178, 179-185.
- Martin, M., Colman, M. J., Gomez-Casati, D. F., Lamattina, L. & Zabaleta, E. J. (2009) Nitric oxide accumulation is required to protect against iron-mediated oxidative stress in frataxin-deficient Arabidopsis plants. *FEBS Lett*, 583, 542-548.
- McAlister, L. & Holland, M. J. (1985) *Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. J Biol Chem*, 260, 15019-15027.
- McEligot, A. J., Yang, S. & Meyskens, F. L., Jr. (2005) *Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. Annu Rev Nutr*, 25, 261-295.
- Mesecke, N., Mittler, S., Eckers, E., Herrmann, J. M. & Deponce, 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, 1452-1463.
- Miranda, C. J., Santos, M. M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossee, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J. & Pandolfo, M. (2002) *Frataxin knockin mouse. FEBS Lett*, 512, 291-297.
- Mirzaei, H. & Regnier, F. (2006) *Enrichment of carbonylated peptides using Girard P reagent and strong cation exchange chromatography. Anal Chem*, 78, 770-778.
- Mizuno, K., Whittaker, M. M., Bachinger, H. P. & Whittaker, J. W. (2004) *Calorimetric studies on the tight binding metal interactions of Escherichia coli manganese superoxide dismutase. J Biol Chem*, 279, 27339-27344.
- Moldovan, L. & Moldovan, N. I. (2004) *Oxygen free radicals and redox biology of organelles. Histochem Cell Biol*, 122, 395-412.
- Monteiro, G., Pereira, G. A. & Netto, L. E. (2002) *Regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I expression by two different pathways: one dependent on cAMP and the other on heme. Free Radic Biol Med*, 32, 278-288.
- Moreau, V. H., Castilho, R. F., Ferreira, S. T. & Carvalho-Alves, P. C. (1998) *Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase AT submicromolar iron concentrations: evidence for metal-catalyzed oxidation. Free Radic Biol Med*, 25, 554-560.
- Moore, R. E., Kim, Y. & Philpott, C. C. (2003) The mechanism of ferrichrome transport through Arn1p and its metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5664-5669.
- Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M. & Stadtman, E. R. (1997) *The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9585-9589.

- Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M. & Stadtman, E. R. (1998) *Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in Saccharomyces cerevisiae and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14071-14075.
- Mouaheb, N., Thomas, D., Verdoucq, L., Monfort, P. & Meyer, Y. (1998) *In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3312-3317.
- Mueller, D. M. (1988) *Arginine 328 of the beta-subunit of the mitochondrial ATPase in yeast is essential for protein stability. J Biol Chem*, 263, 5634-5639.
- Muhlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J. T., Sipos, K., Kispal, G. & Lill, R. (2004) *Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem*, 279, 36906-36915.
- Muhlenhoff, U., Gerl, M. J., Flauger, B., Pirner, H. M., Balsler, S., Richhardt, N., Lill, R. & Stolz, J. (2007) *The ISC [corrected] proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell*, 6, 495-504.
- Munujos, P., Coll-Canti, J., Gonzalez-Sastre, F. & Gella, F. J. (1993) *Assay of succinate dehydrogenase activity by a colorimetric-continuous method using idonitrotetrazolium chloride as electron acceptor. Anal Biochem*, 212, 506-509.
- Muller, E. G. (1991) *Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. J Biol Chem*, 266, 9194-9202.
- Muller, E. G. (1994) *Deoxyribonucleotides are maintained at normal levels in a yeast thioredoxin mutant defective in DNA synthesis. J Biol Chem*, 269, 24466-24471.
- Muller, E. G. (1996) *A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. Mol Biol Cell*, 7, 1805-1813.

## N

- Napier, I., Ponka, P. & Richardson, D. R. (2005) *Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. Blood*, 105, 1867-1874.
- Nichol, H., Gakh, O., O'Neill, H. A., Pickering, I. J., Isaya, G. & George, G. N. (2003) *Structure of frataxin iron cores: an X-ray absorption spectroscopic study. Biochemistry*, 42, 5971-5976.

## O

- O'Halloran, T. V. & Culotta, V. C. (2000) *Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. J Biol Chem*, 275, 25057-25060.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., Greer, E. L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J. J., Fujiwara, Y., Barker, J. E. & Fleming, M. D. (2005) *Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. Nat Genet*, 37, 1264-1269.
- Ohshima, K., Montermini, L., Wells, R. D. & Pandolfo, M. (1998) *Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron 1 of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. J Biol Chem*, 273, 14588-14595.

- Oktyabrsky, O. N. & Smirnova, G. V. (2007) *Redox regulation of cellular functions. Biochemistry (Mosc)*, 72, 132-145.
- O'Neill, H. A., Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S. M., Sampson, M., Ferreira, G. C. & Isaya, G. (2005) *Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. Biochemistry*, 44, 537-545.
- Ookawara, T., Kawamura, N., Kitagawa, Y. & Taniguchi, N. (1992) *Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. J Biol Chem*, 267, 18505-18510.
- Osorio, C., Sullivan, P. M., He, D. N., Mace, B. E., Ervin, J. F., Strittmatter, W. J. & Alzate, O. (2007) *Mortalin is regulated by APOE in hippocampus of AD patients and by human APOE in TR mice. Neurobiol Aging*, 28, 1853-1862.

## P

- Pandolfo, M. (1999) *Molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. Arch Neurol*, 56, 1201-1208.
- Pandolfo, M. (2008) Drug Insight: antioxidant therapy in inherited ataxias. *Nat Clin Pract Neurol*, 4, 86-96.
- Pandolfo, M. (2009) *Friedreich ataxia: the clinical picture. J Neurol*, 256 Suppl 1, 3-8.
- Pandolfo, M. & Pastore, A. (2009) *The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. J Neurol*, 256 Suppl 1, 9-17.
- Papanikolaou, G. & Pantopoulos, K. (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 202, 199-211.
- Park, S., Gakh, O., Mooney, S. M. & Isaya, G. (2002) *The ferroxidase activity of yeast frataxin. J Biol Chem*, 277, 38589-38595.
- Park, S., Gakh, O., O'Neill, H. A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G. C. & Isaya, G. (2003) *Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. J Biol Chem*, 278, 31340-31351.
- Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W. & Kim, I. H. (2000) *Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem*, 275, 5723-5732.
- Pastore, A., Tozzi, G., Gaeta, L. M., Bertini, E., Serafini, V., Di Cesare, S., Bonetto, V., Casoni, F., Carozzo, R., Federici, G. & Piemonte, F. (2003) *Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich's ataxia: a potential role in the pathogenesis of the disease. J Biol Chem*, 278, 42588-42595.
- Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. A., Wright, A. P. & Spyrou, G. (1999) *Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem*, 274, 6366-6373.
- Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A. & Spyrou, G. (2000) *Mitochondria of Saccharomyces cerevisiae contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. J Biol Chem*, 275, 16296-16301.

- Pedrajas, J. R., Porras, P., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Miranda-Vizueté, A. & Barcena, J. A. (2002) *Two isoforms of Saccharomyces cerevisiae glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. Biochem J*, 364, 617-623.
- Petersen, S. V., Oury, T. D., Valnickova, Z., Thogersen, I. B., Hojrup, P., Crapo, J. D. & Enghild, J. J. (2003) *The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures. Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13875-13880.
- Petrat, F., de Groot, H. & Rauen, U. (2001) *Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. Biochem J*, 356, 61-69.
- Petrova, V. Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V. & Schmitt, M. J. (2004) *Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. Biochem J*, 380, 393-400.
- Philpott, C. C. & Protchenko, O. (2008) *Response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell*, 7, 20-27.
- Pierre, J. L. & Fontecave, M. (1999) *Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. Biometals*, 12, 195-199.
- Portnoy, M. E., Liu, X. F. & Culotta, V. C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. Mol Cell Biol*, 20, 7893-7902.
- Prouzet-Mauleon, V., Monribot-Espagne, C., Boucherie, H., Lagniel, G., Lopez, S., Labarre, J., Garin, J. & Lauquin, G. J. (2002) *Identification in Saccharomyces cerevisiae of a new stable variant of alkyl hydroperoxide reductase 1 (Ahp1) induced by oxidative stress. J Biol Chem*, 277, 4823-4830.
- Puccio, H. (2009) *Multicellular models of Friedreich ataxia. J Neurol*, 256 Suppl 1, 18-24.
- Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. & Koenig, M. (2001) *Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. Nat Genet*, 27, 181-186.
- Puig, S., Askeland, E. & Thiele, D. J. (2005) *Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. Cell*, 120, 99-110.

## R

- Radi, R., Catro, L., Rodríguez, M., Cassina, A. & Thomson, L. (1997) Free Radical Damage to Mitochondria. *Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases* (eds N. H. M. Flint Beal, Ivan Bodis-Wollner), pp. 57-89. Wiley-Liss.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D. & Freeman, B. A. (1991) *Detection of catalase in rat heart mitochondria. J Biol Chem*, 266, 22028-22034.
- Ragan, H. A., Nacht, S., Lee, G. R., Bishop, C. R. & Cartwright, G. E. (1969) Effect of ceruloplasmin on plasma iron in copper-deficient swine. *Am J Physiol*, 217, 1320-1323.
- Raha, S. & Robinson, B. H. (2000) *Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends Biochem Sci*, 25, 502-508.

- Rai, M., Soragni, E., Jenssen, K., Burnett, R., Herman, D., Coppola, G., Geschwind, D. H., Gottesfeld, J. M. & Pandolfo, M. (2008) *HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. PLoS ONE*, 3, e1958.
- Requena, J. R., Chao, C. C., Levine, R. L. & Stadtman, E. R. (2001) *Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 69-74.
- Reverter-Branchat, G., Cabisco, 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, 31983-31989.
- Rhee, S. G., Chae, H. Z. & Kim, K. (2005) *Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. Free Radic Biol Med*, 38, 1543-1552.
- Ristow, M., Mulder, H., Pomplun, D., Schulz, T. J., Muller-Schmehl, K., Krause, A., Fex, M., Puccio, H., Muller, J., Isken, F., Spranger, J., Muller-Wieland, D., Magnuson, M. A., Mohlig, M., Koenig, M. & Pfeiffer, A. F. (2003) *Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. J Clin Invest*, 112, 527-534.
- Ristow, M., Pfister, M. F., Yee, A. J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C. Y., Ueki, K., Michael, M. D., 2nd, Lowell, B. B. & Kahn, C. R. (2000) *Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12239-12243.
- Robinson, J., Brent, L., Sumegi, B. & Srerre, P. (1987) *Mitochondria: a practical approach*. IRL, Press, Oxford.
- Robinson, C. E., Keshavarzian, A., Pasco, D. S., Frommel, T. O., Winship, D. H. & Holmes, E. W. (1999) *Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. Anal Biochem*, 266, 48-57.
- Rodriguez-Manzanegue, M. T., Ros, J., Cabisco, 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, 8180-8190.
- Rodriguez-Manzanegue, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J. & Herrero, E. (2002) *Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. Mol Biol Cell*, 13, 1109-1121.
- Roeser, H. P., Lee, G. R., Nacht, S. & Cartwright, G. E. (1970) The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *J Clin Invest*, 49, 2408-2417.
- Rogers, J. T. & Lahiri, D. K. (2004) *Metal and inflammatory targets for Alzheimer's disease. Curr Drug Targets*, 5, 535-551.
- Rosen, D. R. (1993) *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature*, 364, 362.
- Ross, S. J., Findlay, V. J., Malakasi, P. & Morgan, B. A. (2000) *Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. Mol Biol Cell*, 11, 2631-2642.
- 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, 215-217.

Rotig, A., Sidi, D., Munnich, A. & Rustin, P. (2002) *Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. Trends Mol Med*, 8, 221-224.

Rottgers, K., Zufall, N., Guiard, B. & Voos, W. (2002) *The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. J Biol Chem*, 277, 45829-45837.

## S

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. & Ichijo, H. (1998) *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. EMBO J*, 17, 2596-2606.

Santamaria, A. B. (2008) *Manganese exposure, essentiality & toxicity. Indian J Med Res*, 128, 484-500.

Santos, M. M., Ohshima, K. & Pandolfo, M. (2001) *Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. Hum Mol Genet*, 10, 1935-1944.

Santos, R., Buisson, N., Knight, S. A., Dancis, A., Camadro, J. M. & Lesuisse, E. (2004) *Candida albicans lacking the frataxin homologue: a relevant yeast model for studying the role of frataxin. Mol Microbiol*, 54, 507-519.

Sayre, L. M., Lin, D., Yuan, Q., Zhu, X. & Tang, X. (2006) *Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. Drug Metab Rev*, 38, 651-675.

Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W. & Schulze-Osthoff, K. (1994) *Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 1672-1676.

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, 3521-3531.

Seznec, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., Procaccio, V., Patel, M., Drapier, J. C., Koenig, M. & Puccio, H. (2005) *Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. Hum Mol Genet*, 14, 463-474.

Shacter, E., Williams, J. A., Lim, M. & Levine, R. L. (1994) *Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. Free Radic Biol Med*, 17, 429-437.

Shan, Y., Napoli, E. & Cortopassi, G. (2007) *Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. Hum Mol Genet*, 16, 929-941.

Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F. E., Hider, R. C., Frazer, D. M., Anderson, G. J., Vulpe, C. D., Simpson, R. J. & McKie, A. T. (2005) *Identification of an intestinal heme transporter. Cell*, 122, 789-801.

Sheftel, A. D. & Lill, R. (2009) *The power plant of the cell is also a smithy: The emerging role of mitochondria in cellular iron homeostasis. Ann Med*, 41, 82-99.

Shenton, D. & Grant, C. M. (2003) *Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochem J*, 374, 513-519.

Sies, H. (1999) *Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic Biol Med*, 27, 916-921.

- Silberstein, D. S., McDonough, S., Minkoff, M. S. & Balcewicz-Sablinska, M. K. (1993) *Human eosinophil cytotoxicity-enhancing factor. Eosinophil-stimulating and dithiol reductase activities of biosynthetic (recombinant) species with COOH-terminal deletions. J Biol Chem*, 268, 9138-9142.
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M. & Puccio, H. (2004) *Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. J Neurosci*, 24, 1987-1995.
- Sipe, D. M. & Murphy, R. F. (1991) Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH. *J Biol Chem*, 266, 8002-8007.
- 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, 26944-26949.
- Sohn, H. Y., Kwon, C. S., Kwon, G. S., Lee, J. B. & Kim, E. (2004) *Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. Toxicol Lett*, 151, 357-365.
- Sorolla, M. A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J. & Cabisco, E. (2008) *Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. Free Radic Biol Med*, 45, 667-678.
- Spizzo, T., Byersdorfer, C., Dueterhoeft, S. & Eide, D. (1997) The yeast FET5 gene encodes a FET3-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol Gen Genet*, 256, 547-556.
- Srinivasan, C., Liba, A., Imlay, J. A., Valentine, J. S. & Gralla, E. B. (2000) *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.
- Stadtman, E. R. (1990) *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. Free Radic Biol Med*, 9, 315-325.
- Stadtman, E. R. & Levine, R. L. (2000) *Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci*, 899, 191-208.
- Stadtman, E. R. & Berlett, B. S. (1998) *Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Drug Metab Rev*, 30, 225-243.
- Stadtman, E. R. & Levine, R. L. (2003) *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids*, 25, 207-218.
- Stehling, O., Elsasser, H. P., Bruckel, B., Muhlenhoff, U. & Lill, R. (2004) *Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. Hum Mol Genet*, 13, 3007-3015.
- Stenlund, P., Andersson, D. & Tibell, L. A. (1997) *Subunit interaction in extracellular superoxide dismutase: effects of mutations in the N-terminal domain. Protein Sci*, 6, 2350-2358.
- Sturm, B., Bistrich, U., Schranzhofer, M., Sarsero, J. P., Rauen, U., Scheiber-Mojdehkar, B., de Groot, H., Ioannou, P. & Petrat, F. (2005) *Friedreich's ataxia, no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts: a decrease in antioxidative capacity? J Biol Chem*, 280, 6701-6708.
- Strain, J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, D. T., Vickery, L. E. & Culotta, V. C. (1998) *Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in Saccharomyces cerevisiae. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. J Biol Chem*, 273, 31138-31144.



- Sun, Q. A., Su, D., Novoselov, S. V., Carlson, B. A., Hatfield, D. L. & Gladyshev, V. N. (2005) *Reaction mechanism and regulation of mammalian thioredoxin/glutathione reductase. Biochemistry*, 44, 14528-14537.
- 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, 5105-5110.
- Sutak, R., Xu, X., Whitnall, M., Kashem, M. A., Vyoral, D. & Richardson, D. R. (2008) *Proteomic analysis of hearts from frataxin knockout mice: marked rearrangement of energy metabolism, a response to cellular stress and altered expression of proteins involved in cell structure, motility and metabolism. Proteomics*, 8, 1731-1741.

## T

- Takeda, A., Sotogaku, N. & Oku, N. (2003) *Influence of manganese on the release of neurotransmitters in rat striatum. Brain Res*, 965, 279-282.
- Tamarit, J., Cabisco, E., Aguilar, J. & Ros, J. (1997) *Differential inactivation of alcohol dehydrogenase isoenzymes in Zymomonas mobilis by oxygen. J Bacteriol*, 179, 1102-1104.
- 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, 3027-3032.
- Tamarit, J., Belli, G., Cabisco, E., Herrero, E. & Ros, J. (2003) *Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. J Biol Chem*, 278, 25745-25751.
- Tamura, T. & Stadtman, T. C. (1996) *A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1006-1011.
- Tan, G., Chen, L. S., Lonnerdal, B., Gellera, C., Taroni, F. A. & Cortopassi, G. A. (2001) *Frataxin expression rescues mitochondrial dysfunctions in FRDA cells. Hum Mol Genet*, 10, 2099-2107.
- ter Linde, J. J., Liang, H., Davis, R. W., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. (1999) *Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol*, 181, 7409-7413.
- 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. (2005) *Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. Hum Mol Genet*, 14, 3857-3864.
- 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, 199-209.
- Tozzi, G., Nuccetelli, M., Lo Bello, M., Bernardini, S., Bellincampi, L., Ballerini, S., Gaeta, L. M., Casali, C., Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. & Piemonte, F. (2002) *Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich's ataxia. Arch Dis Child*, 86, 376-379.

- Traber, M. G., Sokol, R. J., Ringel, S. P., Neville, H. E., Thellman, C. A. & Kayden, H. J. (1987) *Lack of tocopherol in peripheral nerves of vitamin E-deficient patients with peripheral neuropathy. N Engl J Med*, 317, 262-265.
- Trotter, E. W. & Grant, C. M. (2005) *Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell*, 4, 392-400.
- Tsaytler, P. A., M, C. O. F., Sakharov, D. V., Krijgsveld, J. & Egmond, M. R. (2008) *Immediate protein targets of photodynamic treatment in carcinoma cells. J Proteome Res*, 7, 3868-3878.

## U

- Urbanowski, J. L. & Piper, R. C. (1999) The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J Biol Chem*, 274, 38061-38070.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D. & Flohe, L. (1995) *Diversity of glutathione peroxidases. Methods Enzymol*, 252, 38-53.

## V

- Van Ho, A., Ward, D. M. & Kaplan, J. (2002) *Transition metal transport in yeast. Annu Rev Microbiol*, 56, 237-261.
- van Renswoude, J., Bridges, K. R., Harford, J. B. & Klausner, R. D. (1982) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 6186-6190.
- Ventura, N., Rea, S., Henderson, S. T., Condo, I., Johnson, T. E. & Testi, R. (2005) *Reduced expression of frataxin extends the lifespan of Caenorhabditis elegans. Aging Cell*, 4, 109-112.
- Vickery, L. E. & Cupp-Vickery, J. R. (2007) *Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. Crit Rev Biochem Mol Biol*, 42, 95-111.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayte, J., Toledano, M. B. & Hidalgo, E. (2005) A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8875-8880.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Jones, N., Ayte, J. & Hidalgo, E. (2004) Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol*, 52, 1427-1435.
- Vivancos, A. P., Jara, M., Zuin, A., Sanso, M. & Hidalgo, E. (2006) Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Mol Genet Genomics*, 276, 495-502.
- Voisine, C., Schilke, B., Ohlson, M., Beinert, H., Marszalek, J. & Craig, E. A. (2000) *Role of the mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1. Mol Cell Biol*, 20, 3677-3684.

## W

- Wallace, M. A., Liou, L. L., Martins, J., Clement, M. H., Bailey, S., Longo, V. D., Valentine, J. S. & Gralla, E. B. (2004) *Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid*

*biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. J Biol Chem, 279, 32055-32062.*

Wei, J. P., Srinivasan, C., Han, H., Valentine, J. S. & Gralla, E. B. (2001) *Evidence for a novel role of copper-zinc superoxide dismutase in zinc metabolism. J Biol Chem, 276, 44798-44803.*

Wingert, R. A., Galloway, J. L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J. L., Weber, G. J., Dooley, K., Davidson, A. J., Schmid, B., Paw, B. H., Shaw, G. C., Kingsley, P., Palis, J., Schubert, H., Chen, O., Kaplan, J., Zon, L. I. & Tubingen Screen, C. (2005) *Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. Nature, 436, 1035-1039.*

Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. & Cortopassi, G. (1999) *The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. Hum Mol Genet, 8, 425-430.*

Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K. S., Kang, S. W., Kim, K. & Rhee, S. G. (2003) *Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. Science, 300, 653-656.*

## Y

Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A. & Klausner, R. D. (1995) *AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J, 14, 1231-1239.*

Yamazaki, I. & Piette, L. H. (1990) *ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe<sup>2+</sup> ions with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reactive species in oxygen toxicity in biology. J Biol Chem, 265, 13589-13594.*

Yang, J., Bitoun, J. P. & Ding, H. (2006a) *Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters. J Biol Chem, 281, 27956-27963.*

Yang, M., Cobine, P. A., Molik, S., Naranuntarat, A., Lill, R., Winge, D. R. & Culotta, V. C. (2006b) *The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. EMBO J, 25, 1775-1783.*

Yang, Y. F. & Wells, W. W. (1991) *Catalytic mechanism of thioltransferase. J Biol Chem, 266, 12766-12771.*

Yoo, B. S. & Regnier, F. E. (2004) *Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. Electrophoresis, 25, 1334-1341.*

Yoon, T. & Cowan, J. A. (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, 6078-6084.*

Yoon, T. & Cowan, J. A. (2004) *Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. J Biol Chem, 279, 25943-25946.*

## Z

Zadzinski, R., Fortuniak, A., Bilinski, T., Grey, M. & Bartosz, G. (1998) *Menadione toxicity in Saccharomyces cerevisiae cells: activation by conjugation with glutathione. Biochem Mol Biol Int, 44, 747-759.*

- Zarse, K., Schulz, T. J., Birringer, M. & Ristow, M. (2007) *Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in Caenorhabditis elegans models of Friedreich Ataxia. FASEB J*, 21, 1271-1275.
- Zatta, P. & Frank, A. (2007) *Copper deficiency and neurological disorders in man and animals. Brain Res Rev*, 54, 19-33.
- Zhang, A. S. & Enns, C. A. (2009) *Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. J Biol Chem*, 284, 711-715.
- Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. & Dean, D. R. (1998) *Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from Azotobacter vinelandii. J Biol Chem*, 273, 13264-13272.



## **VII. ARTÍCULOS PUBLICADOS**



# Manganese Is the Link between Frataxin and Iron-Sulfur Deficiency in the Yeast Model of Friedreich Ataxia\*

Received for publication, October 27, 2005, and in revised form, February 17, 2006 Published, JBC Papers in Press, March 1, 2006, DOI 10.1074/jbc.M511649200

Verónica Irazusta<sup>1</sup>, Elisa Cabiscol, Gemma Reverter-Branchat, Joaquim Ros<sup>2</sup>, and Jordi Tamarit

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

Friedreich ataxia is a human neurodegenerative and myocardial disease caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin. Proteomic analysis of the mutant yeast model of Friedreich ataxia presented in this paper reveals that these cells display increased amounts of proteins involved in antioxidant defenses, including manganese-superoxide dismutase. This enzyme shows, however, lower activity than that found in wild type cells. Our results indicate that this lack of activity is a consequence of cellular manganese deficiency, because in manganese-supplemented cultures, cell manganese content, and manganese-superoxide dismutase activity were restored. One of the hallmarks of Friedreich ataxia is the decreased activity of iron/sulfur-containing enzymes. The activities of four enzymes of this group (aconitase, glutamate synthase, succinate dehydrogenase, and isopropylmalate dehydratase) have been analyzed for the effects of manganese supplementation. Enzyme activities were recovered by manganese treatment, except for aconitase, for which, a specific interaction with frataxin has been demonstrated previously. Similar results were obtained when cells were grown in iron-limited media suggesting that manganese-superoxide dismutase deficiency is a consequence of iron overload. In conclusion, these data indicate that generalized deficiency of iron-sulfur protein activity could be a consequence of manganese-superoxide dismutase deficiency, and consequently, it opens new strategies for Friedreich ataxia treatment.

Friedreich ataxia (FRDA)<sup>3</sup> is a human disease caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin due to the presence of large expansions of a GAA triplet repeats in the first intron of the nuclear gene coding for the protein (1). FRDA patients suffer from multiple symptoms, including progressive gait and limb ataxia, hypertrophic cardiomyopathy, and diabetes mellitus (2). These alterations are thought to be the consequence of a mitochondrial defect related to iron metabolism. However, 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 (3, 4), heme biosynthesis (5, 6), iron storage (7, 8), electron transfer to ubiquinone (9), or holo-aconitase reconstitution (10, 11). In hearts from FRDA patients, decreased activities of iron-sulfur-contain-

ing proteins and increased mitochondrial iron accumulation have been reported (12). Furthermore, conditional knock-out mice in neuronal and cardiac tissues have been developed as an animal model for FRDA. Accordingly, this model displays iron accumulation and decreased activity of iron-sulfur proteins (13). Consequently, some therapeutic approaches under study suggest reducing the degree of iron accumulation by chelators or prevent its prooxidant effects by the use of antioxidants such as idebenone, a coenzyme Q analogue (2). Many studies on frataxin function arise from experiments performed with the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* (3, 6, 8, 9) as frataxin and the yeast homologue Yfh1 are orthologues. Frataxin and Yfh1 are mitochondrial proteins; the *S. cerevisiae* mutant in the *YFH1* gene ( $\Delta yfh1$ ) accumulates iron and shows decreased activities of iron-sulfur-containing enzymes (14); and finally, human frataxin complements  $\Delta yfh1$  mutant strains (15).

Despite the great amount of data obtained with these different model systems, the analysis of the proteome of frataxin-deficient cells has not been addressed. Thus, we have focused on the effects of the absence of frataxin on the cellular proteome of yeast. One of the major findings is that, although the amount of the antioxidant enzyme manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) is increased, its activity is decreased in  $\Delta yfh1$  cells. This deficiency contributes to lowered activities of several iron-sulfur-containing enzymes, one of the hallmarks of Friedreich ataxia.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Organisms and Culture Conditions**—*S. cerevisiae* W303 and its isogenic null  $\Delta yfh1$  derivative (MML298) were kindly provided by Dr. Enrique Herrero from the Universitat de Lleida (16). Strains BY4741 and Y02769 ( $\Delta grx5$  in BY4741 background) were provided by EUROSCARF (Frankfurt, Germany). The *YFH1* gene used in complementation studies was also obtained from the EUROSCARF collection. It carries upstream and downstream regulatory sequences and is cloned in pRS416, an *ARS-CEN-URA* vector. 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. Raffinose synthetic medium contained 2% raffinose, 0.67% yeast nitrogen base (Difco), 0.25% ammonium sulfate, a mixture of amino acids, and the required auxotrophic supplements (17). The  $\Delta yfh1$  mutant transformed with pRS416-*YFH1* plasmid was maintained in synthetic medium without uracil. Before each experiment the strain was transferred to rich medium for 4–5 generations.

**Two-dimensional Gel Electrophoresis**—Cells were resuspended 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 was added to the lysed cells, and after centrifugation (12,000 rpm for 5 min) 10  $\mu$ l of the supernatant were diluted in 350  $\mu$ l of rehydration buffer (18). Isoelectric focusing was performed in immobilized pH gradient strips (3–10 NL; Bio-Rad). Second dimension SDS-PAGE was per-

\* This work was supported in part by Friedreich Ataxia Research Alliance (Arlington, VA) and Grants BFU2004-00593/BMC and GEN2001-4707C08-06 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

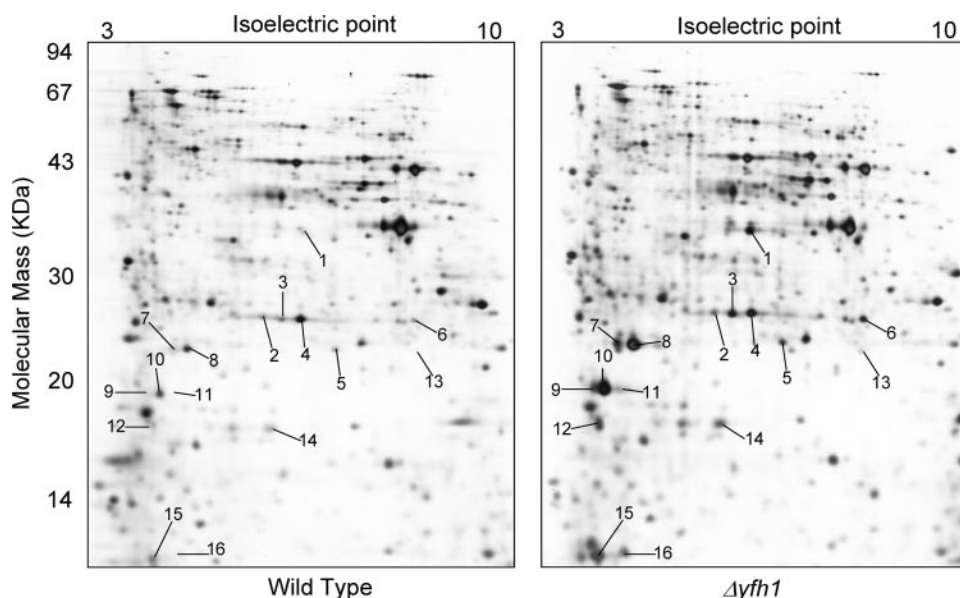
<sup>1</sup> Recipient of a Ph.D. fellowship from the Generalitat de Catalunya.

<sup>2</sup> 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.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: FRDA, Friedreich ataxia; SOD, superoxide dismutase; DHE, dihydroethidium; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; BPS, bathophenanthroline sulfonate.



**FIGURE 1. Analysis of the proteome of wild type and  $\Delta yfh1$  cells by two-dimensional gel electrophoresis.** W303 (wild type) and the isogenic derivative  $\Delta yfh1$  (MML298) cells were grown in YPG medium, and 40  $\mu\text{g}$  of total cell lysates were separated by two-dimensional gel electrophoresis. Gels were silver-stained and analyzed with PDQuest software (Bio-Rad).



formed on 12.5% polyacrylamide gels. Gels were scanned in a GS800 densitometer (Bio-Rad) and analyzed with PDQuest software (Bio-Rad).

**Analyses**—Total cellular iron was determined under reducing conditions with bathophenanthroline sulfonate as chelator (19). Manganese content was assayed in a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer. Superoxide ion levels were measured in a spectrofluorophotometer (RF-5000, Shimadzu). Exponentially growing cells were washed in water and resuspended in phosphate-buffered saline plus 0.1% glycerol and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  the superoxide specific probe dihydroethidium (DHE) (Fluka) (20). The rate of oxidation of DHE was calculated from the rate of increase in fluorescence for 30 min (excitation 520 nm, emission 590 nm).

**Enzyme Activities**—Cell extracts were prepared using glass beads and assayed as described in the following references: aconitase and succinate dehydrogenase (16), glutamate synthase (21), isopropylmalate dehydratase (22), superoxide dismutase (23).

**Western Blot Analysis**—Cell extracts were separated in SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Antibodies against superoxide dismutases were from StressGene (SOD-111, Mn-SOD) and from Chemicon (AB1237, CuZn-SOD). Anti-Aco1 aconitase (from R. Lill, Marburg, Germany) and anti-succinate dehydrogenase (from B. Lemire, University of Alberta) antibodies were also used. A peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was used for detection. Image acquisition was performed in a ChemiDoc CCD camera (Bio-Rad).

## RESULTS

**Analysis of the Proteome of  $\Delta yfh1$  Cells by Two-dimensional Electrophoresis**—Tissues affected in FRDA are those with elevated oxidative metabolism, like heart and nervous system (2). Thus, unless otherwise stated, our experiments were carried out on yeast cells grown in rich medium containing glycerol (YPG), because in this medium cells exhibit high respiration rates. It is worth mentioning that the ability of this strain to grow in a non-fermentable carbon source such as glycerol has been described previously (24–26). Wild type and  $\Delta yfh1$  cells were harvested during exponential phase and the crude extracts analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (Fig. 1). Spots that repetitively showed at least 2-fold difference in protein amount between both strains were identified and are shown in Table 1. Similar results were

**TABLE 1**  
**Proteins identified differentially expressed in wild type and  $\Delta yfh1$  cells**

Spots showing a minimum of 2-fold difference in protein abundance between wild type and  $\Delta yfh1$  proteomes (see Figs. 1 and 2) were digested with trypsin and analyzed in an Applied Biosystems Voyager DE PRO MALDI-TOF. Proteins were identified by peptide mass fingerprinting with MASCOT. Percent protein coverage for each spot in the MASCOT analysis is shown. Fold induction ( $\Delta yfh1$  over wild type, mean of three independent experiments  $\pm$  S.E.) was estimated considering all the spots identified as the same protein. The values with the > symbol indicate that a corresponding spot in the wild-type sample is too low to be used as a reference value.

Protein	Gene	Spots	Coverage	Fold induction	
				YPD	YPG
Thiol peroxidase 1	<i>TSA1</i>	7	30.6	10.6 $\pm$ 3.1	7.1 $\pm$ 3.0
		8	50.2		
		13	13.4	>21.0	>14.0
		9	70.4	5.6 $\pm$ 2.7	8.5 $\pm$ 0.6
		10	62.0		
		11	22.2		
Thiol peroxidase 2	<i>AHP1</i>	12	39.1		
		16	35.6		
		1	37.7	>25.0	>20.0
		15	37.8	3.9 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 4.5
Thioredoxin 1	<i>TRX2</i>	15	37.8	3.9 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 4.5
Mitochondrial thiol peroxidase	<i>PRX1</i>	6	30.3	5.3 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.6
CuZn-superoxide dismutase	<i>SOD1</i>	14	70.0	5.5 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.3
Manganese-superoxide dismutase	<i>SOD2</i>	5	42.0	4.0 $\pm$ 0.9	3.0 $\pm$ 0.3
Triosephosphate isomerase	<i>TPI1</i>	2	22.7	1.9 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.9
		4	66.2		
Adenylate kinase	<i>ADK1</i>	3	35.6	2.1 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 1.3

found in cells grown on rich medium containing glucose (YPD) (Fig. 2). Cells deficient in *YFH1* clearly exhibit increased amounts of enzymes involved in the oxidative stress response. Among these proteins, four thiol peroxidase isoenzymes have been identified. These enzymes eliminate  $\text{H}_2\text{O}_2$  and alkyl hydroperoxides with the use of thioredoxin and thioredoxin reductase as thiol-reducing donor (27), two proteins that are also induced in  $\Delta yfh1$  cells. Two additional enzymes involved in the oxidative stress response that have been identified are both mitochondrial and cytosolic SODs. These enzymes catalyze the dismutation of superoxide into  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (28). The increased expression of these eight proteins indicates an endogenous situation of oxidative stress in  $\Delta yfh1$  cells. It is interesting to mention that no changes in the expression

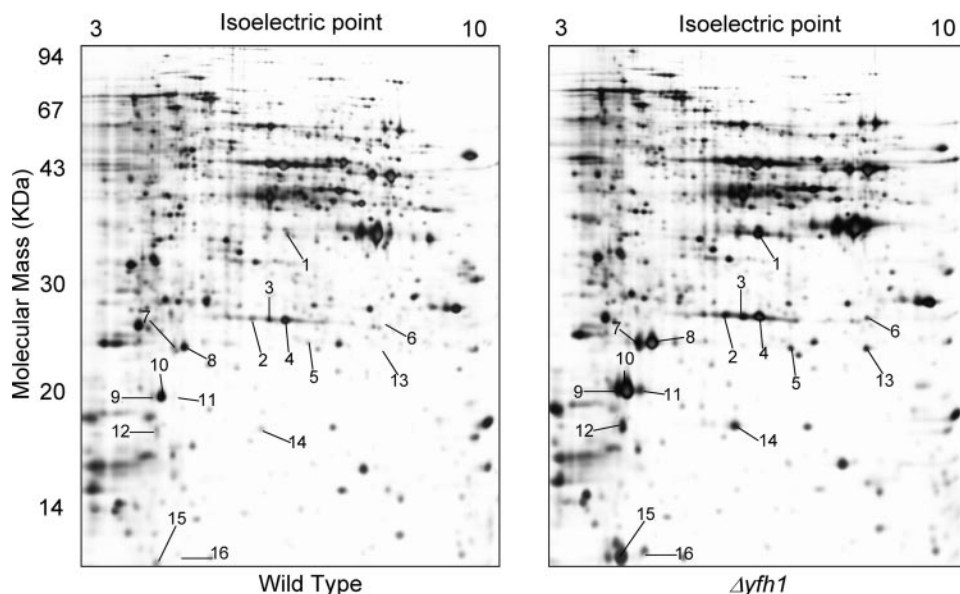


FIGURE 2. Analysis of the proteome of wild type and  $\Delta yfh1$  cells grown in YPD by two-dimensional gel electrophoresis. W303 (wild type) and the isogenic derivative  $\Delta yfh1$  (MML298) cells were grown in YPD medium, and 40  $\mu\text{g}$  of total cell lysates were separated by two-dimensional gel electrophoresis. Gels were silver-stained and analyzed with PDQuest software (Bio-Rad).

of antioxidant enzymes were observed by gene expression analysis of  $\Delta yfh1$  mutant cells using DNA microarrays (25), even though the strain used had the same genetic background in both studies. A partial explanation to this fact is that, in the reference cited, many of the induced genes code for membrane proteins that are poorly resolved in two-dimensional gels. Furthermore, lack of concordance between proteomic and transcriptomic analysis is not unusual (29), thus highlighting the importance of both approaches.

**Manganese and Mn-SOD Deficiency in  $\Delta yfh1$  Cells**—Among the proteins induced in  $\Delta yfh1$  cells, both SODs were found. This result was further confirmed by Western blotting using specific antibodies (Fig. 3A). Interestingly, when the enzymatic activity of Mn-SOD (coded by *SOD2*) was analyzed, we found that in  $\Delta yfh1$  cells it was lower than in wild type cells (Fig. 3, A and B). The decreased Mn-SOD activity resulted in increased steady state levels of superoxide anion inside yeast cells. As shown in Fig. 3C, the rate of oxidation of DHE, a superoxide-specific probe, is increased by 2-fold in *YFH1*-deficient cells.

Trying to unravel the cause of Mn-SOD deficiency in  $\Delta yfh1$  cells, we first analyzed the manganese content of wild type and  $\Delta yfh1$  cells. As shown in Fig. 4A, manganese concentration in the latter was 20% of that found in wild type cells, suggesting that manganese transport could be altered in that strain. To further confirm that this altered phenotype is a consequence of *YFH1* deficiency, we transformed the  $\Delta yfh1$  strain with a plasmid containing the *YFH1* gene with its own promoter (see "Experimental Procedures"), and transformants ( $\Delta yfh1$ -*YFH1*) were analyzed for the altered parameters. As shown in Fig. 3A, Mn-SOD activity, as well as Sod1 and Sod2 protein levels, were restored. Also,  $\Delta yfh1$ -*YFH1* cells displayed manganese and iron concentrations close to those found in wild type cells (Fig. 4A).

**Recovery of Mn-SOD Activity by Manganese Treatment**—The results described above suggested that intracellular manganese and Mn-SOD activity in  $\Delta yfh1$  could be reestablished by supplementing growth media with this metal. To this purpose,  $\Delta yfh1$  cell cultures were treated with increasing concentrations of  $\text{MnCl}_2$ . As shown in Fig. 4B, manganese levels were restored. Consistently, recovery of Mn-SOD activity in a dose-dependent manner was also observed (Fig. 3A). Thus, lack of Mn-SOD activity in  $\Delta yfh1$  cells is a consequence of cellular manganese deficiency. In accordance with these results, a clear decay in superoxide anion levels was observed in  $\Delta yfh1$  cells grown in manganese-supplemented media, and the values were indistinguishable from those of the

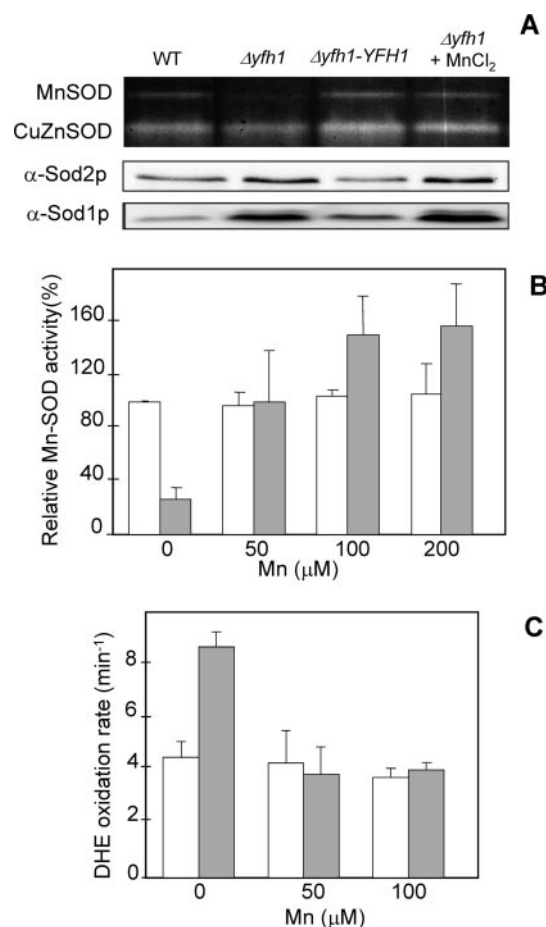
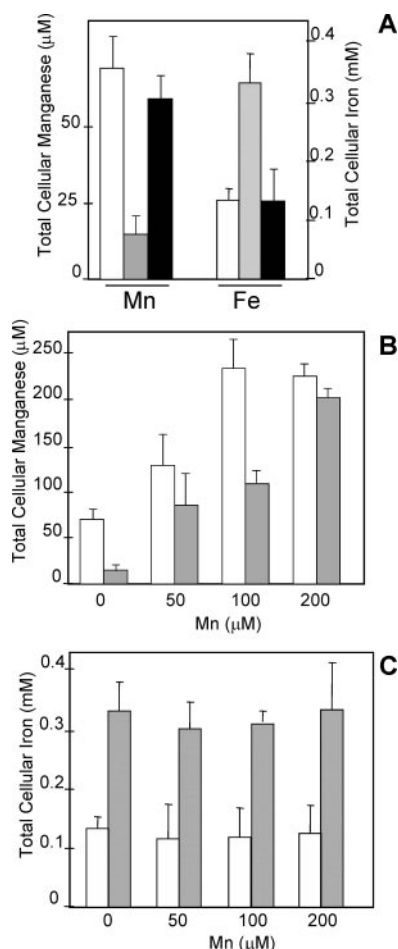


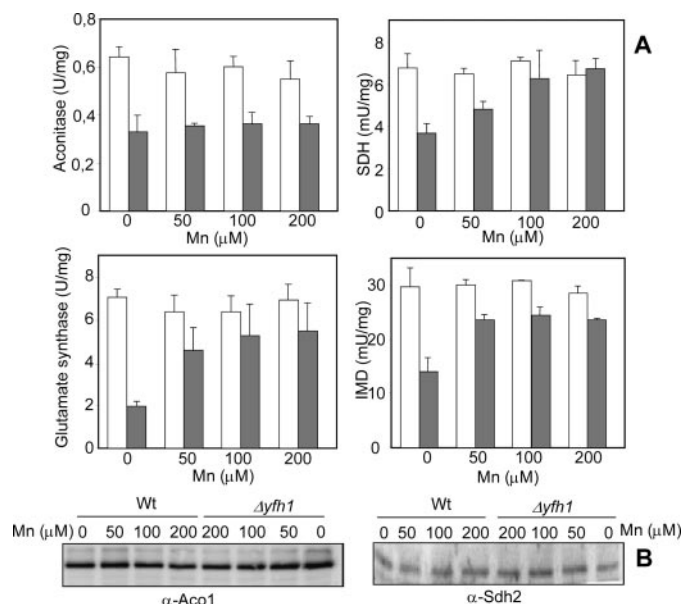
FIGURE 3. Decreased superoxide dismutase activity in  $\Delta yfh1$  and effect of manganese supplementation. A, cultures of wild type,  $\Delta yfh1$ ,  $\Delta yfh1$ -*YFH1*, and  $\Delta yfh1$  plus 100  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  were grown in YPG medium, and cell lysates (20  $\mu\text{g}$  of protein) were analyzed by native gel electrophoresis and SOD activity staining. Western blot analysis of total cell extracts against Sod1 and Sod2 was performed under denaturing conditions; B, wild type (white bars) and  $\Delta yfh1$  cells (gray bars) were grown in YPG medium supplemented with the indicated amounts of  $\text{MnCl}_2$ . Cell lysates were analyzed for SOD activity in native gels. Bands corresponding to Mn-SOD were measured with a densitometer and the relative density calculated (Quantity One software, Bio-Rad); C, wild type (white bars) and  $\Delta yfh1$  cells (gray bars) were grown in YPG medium supplemented with the indicated amounts of  $\text{MnCl}_2$  and analyzed for the rate of oxidation of DHE by endogenous superoxide. Data are represented as means  $\pm$  S.E. from three independent experiments.



**FIGURE 4. Total cellular manganese and iron concentrations of wild type,  $\Delta yfh1$ , and  $\Delta yfh1$ -YFH1 cells.** A, wild type (white bars)  $\Delta yfh1$  cells (gray bars) and  $\Delta yfh1$ -YFH1 (black bars) cells were grown in YPG medium. Manganese and iron content were quantified as described under "Experimental Procedures." B, wild type (white bars) and  $\Delta yfh1$  cells (gray bars) were grown in YPG medium supplemented with the indicated amounts of  $\text{MnCl}_2$  and analyzed for total cellular manganese. The same experiment was performed to analyze total cellular iron (C). Data are represented as means  $\pm$  S.E. from three independent experiments.

wild type cells (Fig. 3C). Nevertheless, as shown in Fig. 4C, manganese treatment had no significant effect on total cellular iron concentration, both in wild type or  $\Delta yfh1$  cells.

**Recovery of Iron-Sulfur Enzymes by Manganese Treatment**—Frataxin has been suggested to play an important role in iron-sulfur cluster biosynthesis. This hypothesis is based on the decreased activities of iron-sulfur enzymes found in frataxin-deficient cells (12) and a physical and genetic interaction with Isu1, a scaffold protein required for iron-sulfur clusters biogenesis (3, 4). However, decreased activities of iron-sulfur enzymes have been observed in yeast lacking *SOD2* (30) and in Mn-SOD knock-out mice (31). In this context, our results suggest that a decline in iron-sulfur enzyme activities in  $\Delta yfh1$  cells could be a consequence of oxidative stress in mitochondria due to decreased Mn-SOD activity. To test this hypothesis, we analyzed activities of three iron-sulfur mitochondrial enzymes (aconitase, glutamate synthase, and succinate dehydrogenase) and a cytosolic one (isopropylmalate dehydratase) in wild type and  $\Delta yfh1$  cells grown in manganese-supplemented YPG (Fig. 5). Values of iron-sulfur enzyme activities in  $\Delta yfh1$  cells are in agreement to those described by other authors (9, 17, 26, 32) With the exception of aconitase, all other enzyme activities analyzed showed a clear recovery by manganese treatment, indicating that lack of Mn-SOD activity contributes to inactivating these enzymes. Also, these



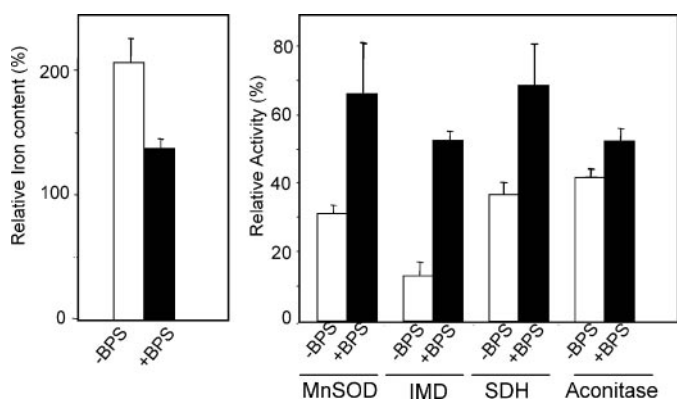
**FIGURE 5. Activities of iron-sulfur-containing proteins in wild type and  $\Delta yfh1$  yeast cells.** Wild type (white bars) and  $\Delta yfh1$  cells (gray bars) were grown in YPG medium supplemented with increasing amounts of  $\text{MnCl}_2$ . A, enzymatic activities of glutamate synthase, aconitase, succinate dehydrogenase (SDH), and isopropylmalate dehydratase (IMD) in whole cell extracts; B, no changes in the amounts of aconitase and succinate dehydrogenase were found in Western blot analysis of total cell extracts against Aco1 and Sdh2. Data are represented as means  $\pm$  S.E. from three independent experiments.

results suggest that *YFH1* is not essential for iron-sulfur biosynthesis, except for aconitase. Such an exception can be explained by recent observations reporting that frataxin interacts with aconitase and that such interaction is crucial for reconstitution of the aconitase [4Fe4S] cluster (10, 11).

**Recovery of Iron-Sulfur Enzymes and Mn-SOD in Iron-limiting Media**—In a previous work published by Foury's group (17), it was found that succinate dehydrogenase, but not aconitase activity, could be rescued when  $\Delta yfh1$  yeast cells were grown in iron-limited medium using bathophenanthroline sulfonate (BPS) as iron chelator. In such conditions, cellular iron accumulation is prevented. To test whether such treatment is also capable of restoring iron-sulfur enzymes other than succinate dehydrogenase, wild type and  $\Delta yfh1$  cells were grown in raffinose synthetic medium supplemented with BPS (Fig. 6). The results obtained not only confirmed the findings reported by Foury but also showed that isopropylmalate dehydratase and Mn-SOD activities were recovered in such conditions. These are additional indications that decreased Mn-SOD activity leads to inactivation of iron-sulfur containing enzymes in  $\Delta yfh1$  cells.

**Manganese and Mn-SOD Deficiency Are the Consequence of Iron Overload**—As shown above,  $\Delta yfh1$  cells displayed low levels of manganese that caused decreased activities of several iron-sulfur containing enzymes. This phenotype was corrected by manganese supplementation. Nevertheless, iron accumulation, induction of Sod1 and Sod2 (Fig. 3A), and slow growth in YPG (data not shown) persisted in manganese-treated  $\Delta yfh1$  cells, suggesting that they are not strictly a consequence of manganese deficiency. Then, could manganese deficiency be a consequence of iron accumulation caused by the absence of Yfh1? The experiments in iron-limited media support this hypothesis, because Mn-SOD activity is restored when iron accumulation is prevented in  $\Delta yfh1$  cells (Fig. 6). To study whether this phenotype is a more general phenomenon and not restricted to the mutant strain used, we further checked this hypothesis by analyzing manganese content and SOD activity in a strain with altered iron homeostasis such as a yeast mutant lacking



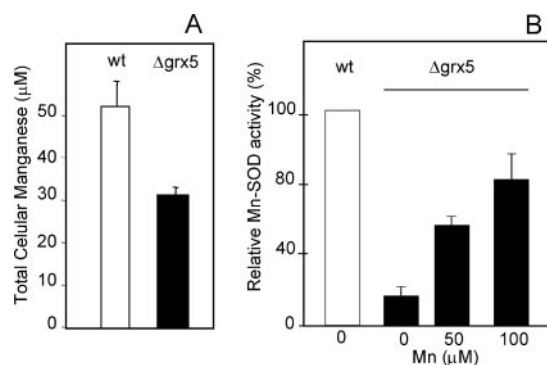


**FIGURE 6. Activities of Mn-SOD and iron-sulfur containing proteins in  $\Delta yfh1$  yeast cells grown in iron-limited medium.** Wild type and  $\Delta yfh1$  cells were grown in raffinose synthetic medium supplemented (black bars) or not (white bars) with 10  $\mu\text{M}$  BPS. Iron content and enzymatic activities in  $\Delta yfh1$  cells (relative to wild type grown in the same conditions) are shown. In iron-limited medium (plus BPS), Mn-SOD, succinate dehydrogenase (SDH), and isopropylmalate dehydratase (IMD) activities were recovered; iron accumulation was prevented; and aconitase activity was not restored. Data are represented as means  $\pm$  S.E. from three independent experiments.

*GRX5*. Mutants deficient in this glutaredoxin exhibit a strong iron accumulation, as well as decreased activities in aconitase and succinate dehydrogenase (16). As shown in Fig. 7A, manganese levels in this strain were 60% of those found in wild type cells, in agreement with the data obtained in  $\Delta yfh1$  mutant strain. Also,  $\Delta grx5$  cells exhibit an 80% decrease in Mn-SOD activity. In this case, this activity can also be restored by manganese supplementation (Fig. 7B). Taken together, the data obtained from both mutant strains clearly suggest that manganese deficiency would be a side effect of iron accumulation.

## DISCUSSION

The precise role of frataxin in iron metabolism is a hot field of discussion. The most accepted hypothesis is that it cooperates in iron delivery to Isu1, a scaffold protein required for iron-sulfur biogenesis. However, it has been suggested that the role of frataxin would be non-essential in such process (26). Moreover, recent data support this hypothesis: (i) frataxin interacts much more strongly with ferrochelatase than with Isu1 (5); (ii) in *Escherichia coli*, IscA (homologous to Isa1 and Isa2 in yeast) is the iron donor to IscU (homologous to Isu1 in yeast), and frataxin homologues are not required for the biogenesis of iron-sulfur clusters (33); and (iii) a direct interaction between frataxin and aconitase has been reported (10, 11). The results shown in this paper clearly indicate that frataxin is not essential for iron-sulfur cluster biogenesis (although required for full recovery of aconitase activity) and give a reasonable explanation of how the absence of frataxin leads to iron-sulfur deficiency in the yeast model of FRDA. Iron overload would lead to reduced manganese levels that would result in impaired manganese incorporation into Sod2. Lack of Mn-SOD activity would result in increased levels of superoxide (Fig. 3C) that would inactivate iron-sulfur-containing enzymes. The link between iron accumulation and Mn-SOD deficiency is clearly established with the experiments performed with BPS and  $\Delta grx5$  cells. Also, a direct link between Mn-SOD activity and inactivation of iron-sulfur enzymes arises from experiments reported in Figs. 5 and 6. Results shown in Fig. 5 demonstrate the recovery of Mn-SOD and iron-sulfur containing enzymes by manganese treatment. In this context, it is worth mentioning that manganese itself has antioxidant properties that suppress growth defects in a  $\Delta sod1\Delta sod2$  mutant (34). However, this suppression required concentrations above 2 mM and was not observed at concentrations used in our work (50–100  $\mu\text{M}$ ). Consistently, when we treated a  $\Delta sod2$  mutant with



**FIGURE 7. Manganese deficiency and decreased superoxide dismutase activity in  $\Delta grx5$ .** BY4741 (wild type, white bars) and its isogenic derivative  $\Delta grx5$  (black bars) were grown in YPD medium supplemented with increasing amounts of  $\text{MnCl}_2$ . A, whole cell manganese concentration was quantified as described under "Experimental Procedures"; B, 40  $\mu\text{g}$  of cell lysates were loaded on native gels. Bands corresponding to Mn-SOD were measured with a densitometer and the relative density calculated (Quantity One software). Data are represented as means  $\pm$  S.E. from three independent experiments.

100  $\mu\text{M}$  manganese, recovery of iron-sulfur enzymes was not observed (data not shown). Furthermore, as shown in Fig. 6, enzyme activities were recovered by reducing iron concentration (without manganese supplementation). Consequently, it is not likely that recovery of iron-sulfur enzymes could be a consequence of the antioxidant properties of manganese independently of Mn-SOD recovery.

An important problem to solve in the future is how iron overload results in manganese deficiency. As a hypothesis, it should be mentioned that Smf2p, a high affinity manganese transporter, could be the link. Cells lacking *SMF2*, as those lacking *YFH1*, show decreased manganese content and limited Mn-SOD activity. These defects are corrected after manganese supplementation of growth media (23). Interestingly, Smf2 activity is decreased at the post-translational level by elevated iron levels and its expression is not regulated by the iron sensor Aft1 (35). Thus, 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. It is worth mentioning that manganese deficiency linked to increased iron levels could be a general situation not only applying to FRDA. The results obtained with  $\Delta grx5$  mutant cells indicate that these could be a more general phenomena occurring in iron overloading diseases. An important consequence is that oxidative stress triggered by an excess of iron would be potentiated by diminished SOD activities.

As mentioned earlier, our work supports that Yfh1 should be dispensable for iron-sulfur cluster biogenesis. However, how lack of Yfh1 induces iron accumulation in yeast is still an intriguing question. Iron accumulation in *yfh1* mutants depends on constitutive activation of the iron sensor Aft1 (25), and it has been reported that this sensor responds to a signal connected to mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis (36). As shown in Fig. 5, manganese treatment restores the activity of some iron-sulfur enzymes, but iron overload persists. This indicates that the signal acting on Aft1 is not restored in these particular circumstances. Could this signal be related to aconitase? It should be kept in mind that in manganese-treated  $\Delta yfh1$  cells, its activity is not restored, and according to two recent reports (10, 11), reconstitution of the aconitase [4Fe4S] cluster depends on its interaction with frataxin. Also, in mammals, cytosolic aconitase (Irp-1) has a well known role as an iron sensor (37). In yeast, apo-aconitase binds to mitochondrial DNA where it could play a regulatory function in response to changing metabolic needs (38).

Another important conclusion from this work arises from the analy-

sis of the proteome of  $\Delta yfh1$  cells. Induction of antioxidant defenses reveals that *YFH*-deficient cells are exposed to an endogenous oxidative stress. This would be the consequence of Mn-SOD deficiency but more importantly of iron overload, since the increased amounts of Sod1p and Sod2p persisted in manganese-treated  $\Delta yfh1$  cells. The relevance of oxidative stress in FRDA is also a matter of discussion. Markers of oxidative stress in samples of FRDA patients have been extensively reported; for instance, in lymphoblasts, mitochondrial peroxides were increased and the GSH/GSSG ratio was reduced (39); in fibroblasts, the GSH/GSSG ratio decreased by 3-fold and protein-bound glutathione and actin glutathionylation were increased (40). On the other hand, the existence of oxidative stress in FRDA has been questioned by some reports that were unable to identify markers of oxidative stress, like protein-bound carbonyl groups (41) or malondialdehyde (42), in different FRDA models. But it should be kept in mind that specific targets depend on how oxidative stress is generated (43, 44). This means that the absence of a specific marker of oxidative stress in one system does not preclude the presence of oxidative stress in such system.

Finally, the results shown here open the question on whether manganese and deficient SOD activity are both related to FRDA. Alterations in SOD activity and expression have been reported in other FRDA models. Embryonic mouse cells treated with retinoic acid and frataxin antisense RNA show increased expression of Mn-SOD compared with control cells. Retinoic acid induces differentiation of embryonic cells into neurons, astroglia, and microglia (45). According to a recent report (46), fibroblasts and lymphoblasts from FRDA patients could have decreased antioxidant capacity. Decreased total SOD activity is observed in hearts from the mouse model of FRDA ataxia (47). In this model, Mn-SOD expression increases after birth and suddenly drops after 10 weeks (41). Could this drop in Mn-SOD expression be the consequence of manganese deficiency? Interestingly, *Smf2p* is homologous to DMT1, which transports iron as well as manganese in mammals (48). The existence of a manganese deficiency in FRDA patients could lead to a sudden change in FRDA therapies. Manganese is known to be essential for the development and function of the brain. Manganese-deprived rats are often ataxic (49). The reason is not known, but it is remarkable that several brain manganese-containing enzymes, such as glutamine synthetase, pyruvate carboxylase, or Mn-SOD, play a significant role in brain function and could be affected by manganese deficiency. Should manganese supplementation be considered in FRDA patients? Even if such deficiency is confirmed in mammals, this is a delicate point, since high environmental exposure to manganese has toxic effects. However, oral manganese intake is considered to be safe even at concentrations 5-fold above the recommended daily doses (50). Consequently, the results presented here open new strategies in FRDA therapies.

*Acknowledgments*—We thank Vanessa Guijarro for technical assistance. We also are indebted to Jerry Kaplan (University of Utah) and Enrique Herrero (Universitat de Lleida) for critical review of the manuscript.

## REFERENCES

- 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., and Pandolfo, M. (1996) *Science* **271**, 1423–1427
- Rötig, A., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (2002) *Trends Mol. Med.* **8**, 221–224
- Gerber, J., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 906–911
- Yoon, T., and Cowan, J. A. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6078–6084
- Yoon, T., and Cowan, J. A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 25943–25946
- Zhang, Y., Lyver, E. R., Knight, S. A., Lesuisse, E., and Dancis, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 19794–19807

- O'Neill, H. A., Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S. M., Sampson, M., Ferreira, G. C., and Isaya, G. (2005) *Biochemistry* **44**, 537–545
- Campanella, A., Isaya, G., O'Neill, H. A., Santambrogio, P., Cozzi, A., Arosio, P., and Levi, S. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2279–2288
- Gonzalez-Cabo, P., Vazquez-Manrique, R. P., Garcia-Gimeno, M. A., Sanz, P., and Palau, F. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2091–2098
- Bulteau, A. L., O'Neill, H. A., Kennedy, M. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., and Szweda, L. I. (2004) *Science* **305**, 242–245
- Bulteau, A. L., Lundberg, K. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., and Szweda, L. I. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5987–5991
- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997) *Nat. Genet.* **17**, 215–217
- Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001) *Nat. Genet.* **27**, 181–186
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997) *Science* **276**, 1709–1712
- Cavadini, P., Gellera, C., Patel, P. I., and Isaya, G. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2523–2530
- Rodriguez-Manzanque, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109–1121
- Foury, F. (1999) *FEBS Lett.* **456**, 281–284
- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J., and Ros, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 31983–31989
- Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., and Ros, J. (2006) *Anal. Biochem.* **351**, 149–151
- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nystrom, T. (2003) *Science* **299**, 1751–1753
- Cogoni, C., Valenzuela, L., Gonzalez-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P., and Gonzalez, A. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 792–798
- Kohlhaw, G. B. (1988) *Methods Enzymol.* **166**, 423–429
- Luk, E. E., and Culotta, V. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 47556–47562
- Foury, F., and Cazzalini, O. (1997) *FEBS Lett.* **411**, 373–377
- Foury, F., and Talibi, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 7762–7768
- Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J., and Lutz, T. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2635–2643
- Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W., and Kim, I. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5723–5732
- Fridovich, I. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97–112
- de Nobel, H., Lawrie, L., Brul, S., Klis, F., Davis, M., Alloush, H., and Coote, P. (2001) *Yeast* **15**, 1413–1428
- Strain, J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, D. T., Vickery, L. E., and Culotta, V. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 31138–31144
- Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melow, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C., and Epstein, C. J. (1995) *Nat. Genet.* **11**, 376–381
- Foury, F., and Roganti, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24475–24483
- Ding, H., Harrison, K., and Lu, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 30432–30437
- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R., and Culotta, V. C. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1382–1388
- Portnoy, M. E., Liu, X. F., and Culotta, V. C. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7893–7902
- Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff, U., Lill, R., and Winge, D. R. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 10135–10140
- Rouault, T. A., and Klausner, R. D. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 174–177
- Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A., and Butow, R. A. (2005) *Science* **307**, 714–717
- Tan, G., Napoli, E., Taroni, F., and Cortopassi, G. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1699–1711
- Pastore, A., Tozzi, G., Gaeta, L. M., Bertini, E., Serafini, V., Di Cesare, S., Bonetto, V., Casoni, F., Carrozzo, R., Federici, G., and Piemonte, F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 42588–42595
- Seznez, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., Procaccio, V., Patel, M., Drapier, J. C., Koenig, M., and Puccio, H. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14**, 463–474
- MacEvilly, C. J., and Muller, D. P. (1997) *Res. Neurol. Neurosci.* **11**, 131–137
- Tamarit, J., Cabiscol, E., and Ros, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3027–3032
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27393–27398
- Santos, M. M., Ohshima, K., and Pandolfo, M. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1935–1944
- Sturm, B., Bistrich, U., Schranzhofer, M., Sarsero, J. P., Rauen, U., Scheiber-Mojdehkar, B., de Groot, H., Ioannou, P., and Petrat, F. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 6701–6708
- Chantrel-Groussard, K., Geromel, V., Puccio, H., Koenig, M., Munnich, A., Rotig, A., and Rustin, P. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2061–2067
- Van Ho, A., Ward, D. M., and Kaplan, J. (2002) *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 237–261
- Takeda, A. (2003) *Brain Res. Rev.* **41**, 79–87
- Finley, J. W. (2004) *Nutr. Rev.* **62**, 148–153

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](mailto: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- $\Delta$ 5::URA3*) [28]; and MML350 (*MAT $\alpha$  aft1- $\Delta$ 5::URA3*) [28]. The  $\Delta yfh1\Delta aft1$  strain, BQS100 (*MATa aft1- $\Delta$ 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  $\mu$ l of the supernatant was diluted in 140  $\mu$ 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  $\mu$ l of 0.1% TFA, 50% acetonitrile, and spotted onto a MALDI plate in the presence of  $\alpha$ -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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M Phen Green SK diacetate in 300  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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



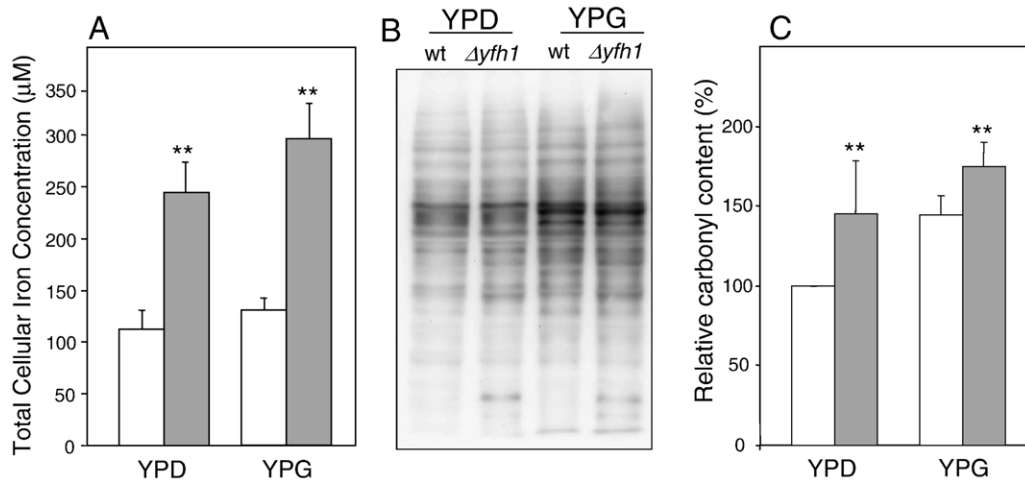


Fig. 1. Increased protein oxidative damage in  $\Delta yfh1$  cells. Wild-type (white bars) and  $\Delta yfh1$  cells (gray bars) grown in YPD or YPG medium were taken at mid-exponential phase and prepared as described under Experimental procedures. (A) Total cellular iron was quantified as described 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

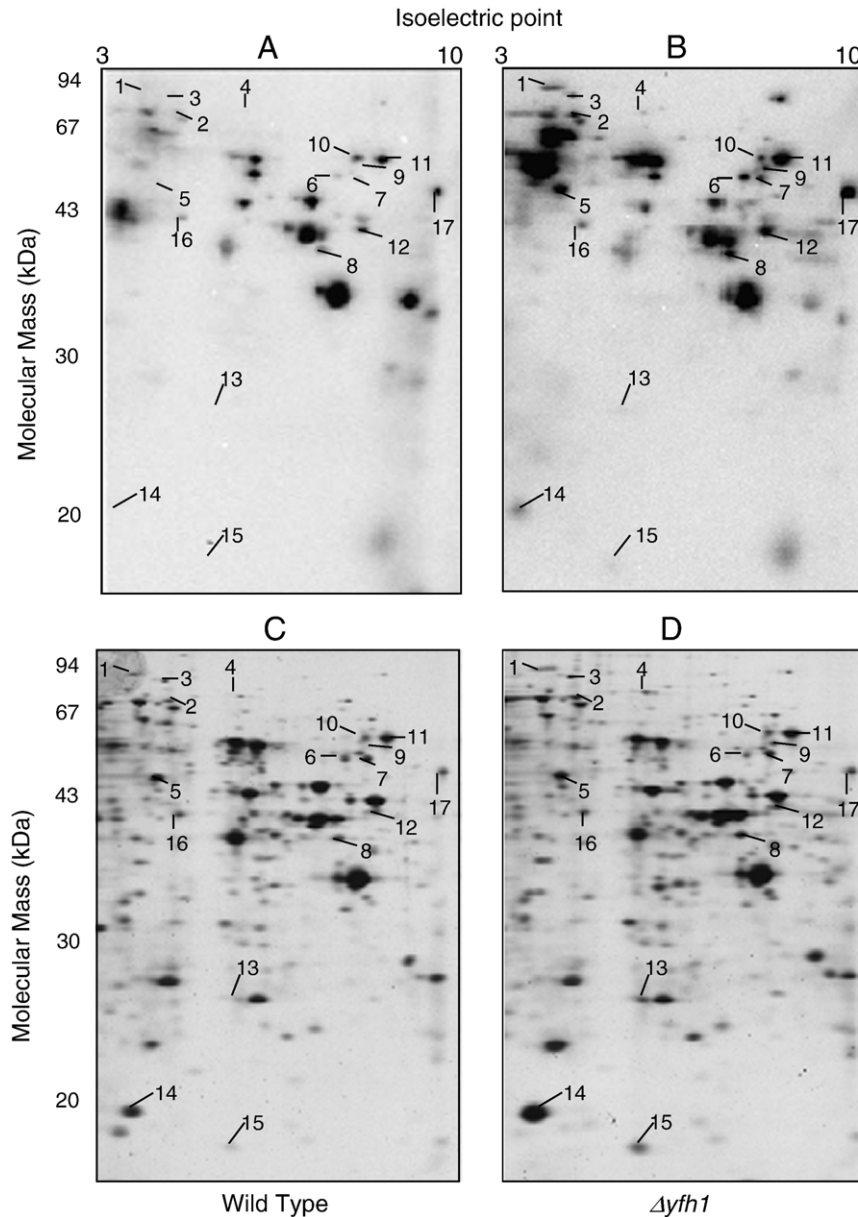


Fig. 2. Analysis of the proteome and oxyproteome of wild-type and  $\Delta yfh1$  cells grown in YPG by two-dimensional gel electrophoresis. Cells were grown in YPG medium and 40  $\mu\text{g}$  of total cell lysates were separated by two-dimensional gel electrophoresis as described under Experimental 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  $\text{Mg}^{2+}$  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 <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP synthase, $\alpha$ 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 <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP synthase, $\beta$ 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, $\alpha$ chain	<i>ACT1</i>	16	128	2.6±0.3	0.7±0.1	3.43
Translational elongation factor EF-1 $\alpha$	<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

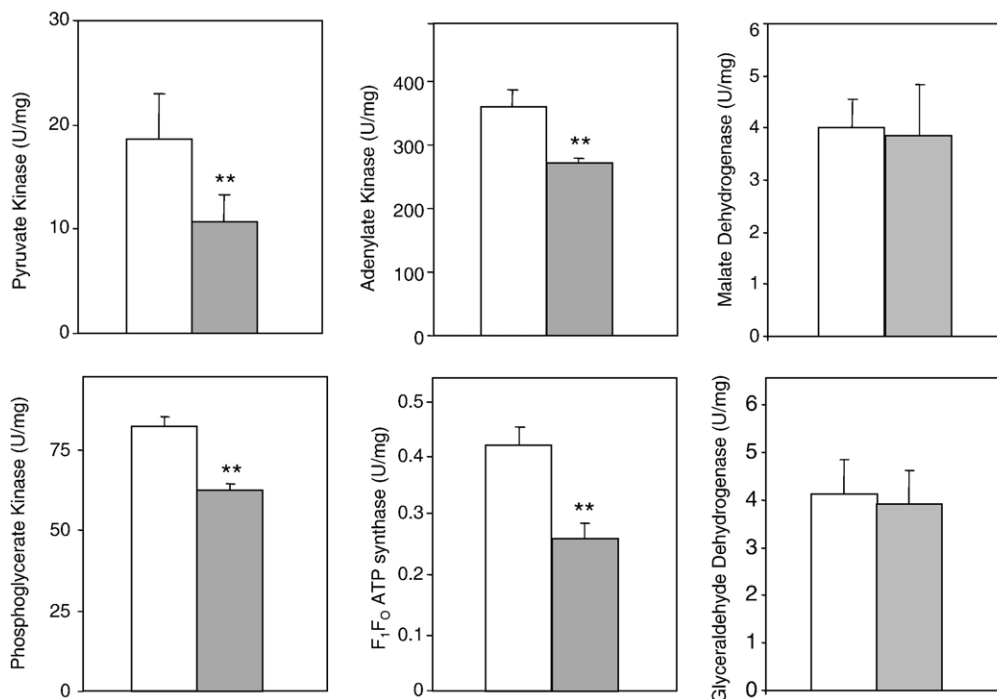


Fig. 3. Specific activities of carbonylated enzymes in wild-type and  $\Delta yfh1$  yeast cells. Wild-type (white bars) and  $\Delta yfh1$  cells (gray bars) were grown in YPG. Enzymatic activities of pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase, and adenylate kinase were measured in whole-cell extracts and the specific activities (U/mg enzyme) calculated considering the relative amount of each enzyme detected in 2D gels. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> 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.

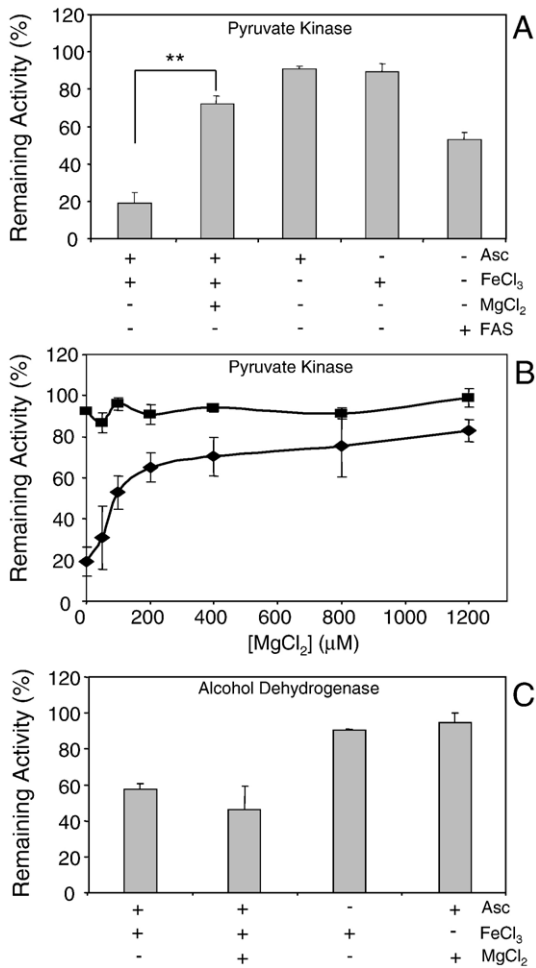


Fig. 4. Inactivation of pyruvate kinase by ascorbate and iron. (A) Pure preparations of rabbit pyruvate kinase (9  $\mu$ M final concentration) were incubated with the indicated compounds at the following final concentrations: 50  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>, 10 mM ascorbate, 50  $\mu$ M ferrous ammonium sulfate (FAS), and 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>. 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  $\mu$ M final concentration) were incubated with 50  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> and the indicated amounts of MgCl<sub>2</sub> 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  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>. When added, MgCl<sub>2</sub> 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/Fe<sup>3+</sup>. 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  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> 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 FeCl<sub>3</sub> 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  $\mu$ 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

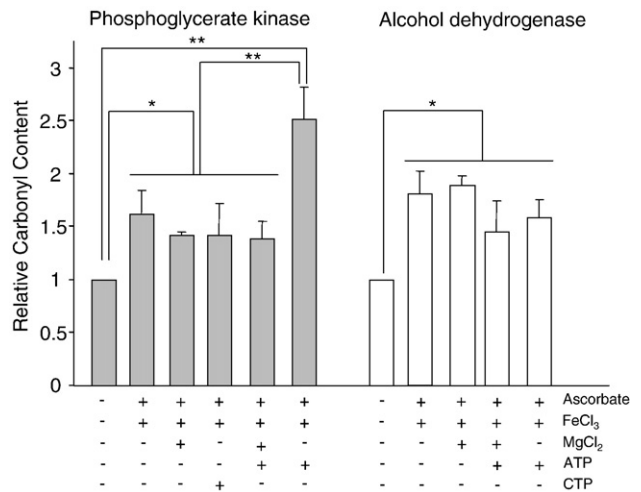


Fig. 5. Metal-catalyzed oxidation of phosphoglycerate kinase by ascorbate and iron is enhanced by ATP. Pure preparations of yeast phosphoglycerate kinase (9  $\mu$ M final concentration) were incubated with the indicated compounds at the following final concentrations: 50  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>, 10 mM ascorbate, 25  $\mu$ M ATP, 25  $\mu$ M CTP, and 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>. 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 MgCl<sub>2</sub>. 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  $\mu$ M iron, whereas 50  $\mu$ 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  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> 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  $\mu$ 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,”

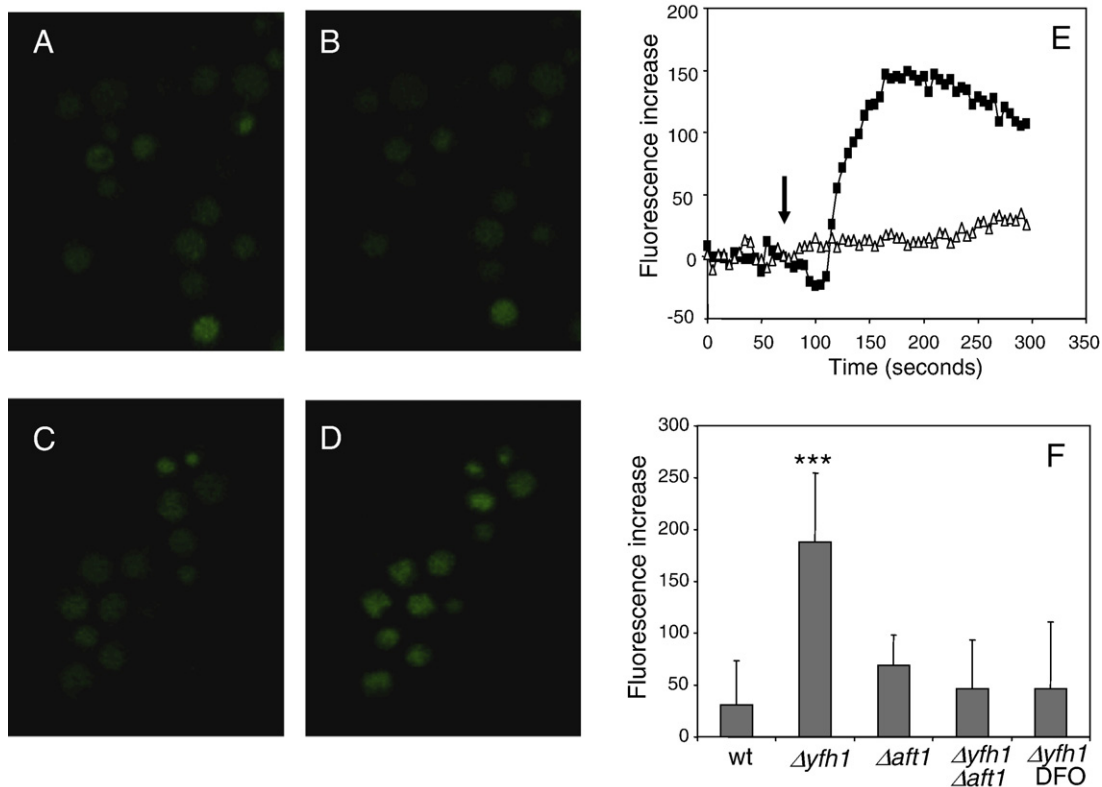


Fig. 6. Increased levels of chelatable iron in  $\Delta yfh1$  cells. Wild-type,  $\Delta yfh1$ ,  $\Delta aft1$ , and  $\Delta yfh1 \Delta aft1$  cells were grown in YPD medium, washed with SC medium, and then loaded for 20 min with 20  $\mu$ M Phen Green SK diacetate. Images were obtained by confocal microscopy using a 505-nm long-pass filter ( $\lambda_{excitation}$  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 ( $\Delta$ ) 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

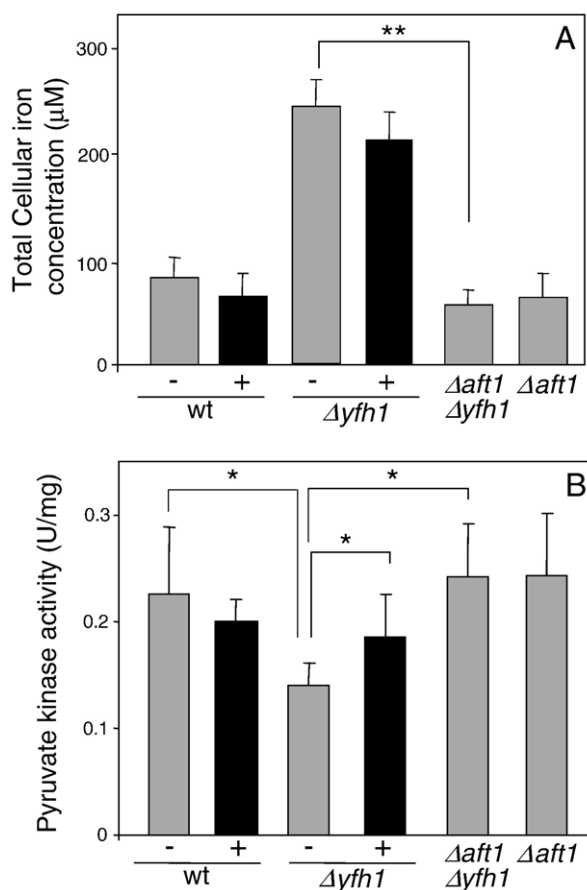


Fig. 7. Pyruvate kinase activity and iron content in iron-deprived  $\Delta yfh1$  cells. Wild-type  $\Delta yfh1$ ,  $\Delta aft1$ , and  $\Delta yfh1 \Delta aft1$  cells were grown in YPD medium supplemented with 0.5 mM desferrioxamine (black bars) or without supplementation (gray bars). (A) Total 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  $\mu$ 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.; Cabiscol, 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.; Cabiscol, 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] Cabiscol, 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.; Cabiscol, 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.; Cabiscol, E.; Ros, J. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**:30193–30198; 2003.
- [26] Tamarit, J.; Cabiscol, 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.; 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.* **279**:31983–31989; 2004.
- [30] Sorensen, B. K.; Hojrup, P.; Ostergaard, 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 Fe<sup>2+</sup> 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.; 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.
- [50] Yamazaki, I.; Piette, L. H. ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe<sup>2+</sup> ions with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 Ca<sup>2+</sup>-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: Fe<sup>2+</sup>-catalyzed fragmentation of the soluble F<sub>1</sub>-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.

## Referencias

- del Castillo Busto ME, Montes-Bayón M, Blanco-González E, Meija J, Sanz-Medel A. 2005. *Analytical Chemistry* 77, 5615-5621.
- Lobinski R, Schaumlöffel D, Szpunar J. 2006. *Mass Spectrometry In Bioinorganic Analytical Chemistry. Mass Spectrometry Reviews* 25, 255-289.
- Michalke B, Fernández-Sánchez ML, Sanz-Medel A. 2007. Elemental speciation in human milk and substitute food for newborns. *The Determination of Chemical Elements in Food (Applications for Atomic Mass Spectrometry)*. Wiley & sons 3, 535-567.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A. 2007a. *Angewandte Chemie International Edition* 46, 569-571.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Carrascal M, Abian J, Sanz-Medel A. 2008. *Analytical Chemistry* 80, 1777-1787.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A. 2007b. *Chemical Biology (Instant Insight)* 2, B79.
- Sanz-Medel A. 2008. Heteroatom(isotope)-tagged proteomics via ICP-MS: screening and quantification of proteins and their post-translational modifications. *Analytical & Bioanalytical Chemistry (Trends)* 391, 885-894.

## Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas

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

Grup de Bioquímica de l'Estrés Oxidatiu, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida

### Resumen

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la formación y la destrucción de las especies reactivas del oxígeno. Una forma indirecta de determinar la existencia de estrés oxidativo es la medida de los productos derivados de la reacción de las especies reactivas del oxígeno con biomoléculas. En este sentido, la formación de grupos carbonilo en las proteínas ha sido uno de los marcadores de estrés oxidativo más estudiados debido a su estabilidad y fácil detección. Diversas herramientas proteómicas ofrecen un gran potencial para descubrir nuevas proteínas susceptibles al estrés oxidativo, cambios cuantitativos en el perfil de estas modificaciones bajo distintas condiciones biológicas, y para caracterizar el sitio exacto y tipo de modificación sufrida por una determinada proteína. En el presente trabajo se revisan las diferentes aproximaciones utilizadas para la detección de proteínas carboniladas y las herramientas proteómicas que permiten su identificación.

### Palabras clave:

Estrés oxidativo, oxidación de proteínas, grupos carbonilo, DNPH, proteómica redox.

### Introducción

El estrés oxidativo se describe como una situación en la cual las defensas antioxidantes son insuficientes para inactivar completamente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) [1]. Este desequilibrio entre la producción y la destrucción de ROS puede afectar a gran parte de los componentes celulares,

incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos [2-4]. Muchos de los cambios que ocurren durante el envejecimiento y durante la progresión de ciertas enfermedades son una consecuencia del estrés oxidativo [5-7]. Las proteínas se modifican oxidativamente al ser uno de los blancos principales de las ROS. Ello conlleva modificaciones estructurales

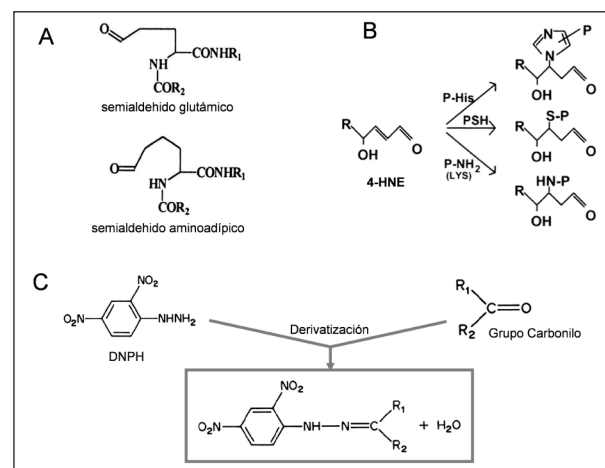
que, en general, suponen la pérdida total o parcial de su función [4, 8, 9]. En este sentido, la oxidación de proteínas juega un papel muy importante en el desarrollo del proceso de envejecimiento y de una lista muy extensa de enfermedades entre las que podríamos destacar la aterosclerosis, el cáncer, y diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson [10]. Muchos residuos de aminoácidos de las proteínas son susceptibles a la oxidación por varias especies reactivas del oxígeno. El producto de la oxidación de proteínas más ampliamente estudiado en los últimos años ha sido la formación de grupos carbonilo debido a su estabilidad y fácil detección. Por tanto, su cuantificación se ha convertido en el método más aceptado para medir el daño oxidativo en proteínas en situaciones donde el estrés oxidativo juega un papel relevante.

### Formación de grupos carbonilo

El estrés oxidativo puede causar modificaciones reversibles o irreversibles en las proteínas. Las modificaciones reversibles, generalmente en los residuos de cisteína, pueden ser reparadas mediante enzimas específicos como las glutaredoxinas o tioredoxinas [11, 12]. De la misma manera, la metionina se oxida fácilmente a metionina sulfóxido pudiendo ser reducida por la enzima metionina sulfóxido reductasa [13]. Habitualmente este tipo de modificaciones tienen la función de proteger ante el daño irreversible o de modular la función de las proteínas (regulación redox). Las modificaciones irreversibles no pueden ser reparadas, de forma que las proteínas inactivas se acumulan o son degradadas. Un ejemplo de modificaciones irreversibles es el caso de la carbonilación de las proteínas [14, 15].

Los grupos carbonilo pueden ser introducidos en las proteínas en diferentes sitios y por medio de diferentes mecanismos. Por un lado, los carbonilos son producidos en las cadenas laterales de los aminoácidos, especialmente en los residuos de prolina, arginina, lisina y treonina los cuales son oxidados a derivados aldehídos o cetonas [2, 16]. Este tipo de modificaciones se producen habitualmente por el ataque del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), que puede ser originado por radiación ionizante o por la reacción de cationes metálicos con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , reacción de Fenton). En este sentido merece la pena comentar que la mayoría de los carbonilos formados en las proteínas mediante la oxidación catalizada por cationes metálicos son el semialdehído glutámico derivado de la arginina y el semialdehído aminoadípico derivado de la lisina (Fig. 1A) [17].

Por otro lado, los grupos carbonilo pueden también ser generados por proteólisis de las proteínas tras el ataque de radicales  $\cdot\text{OH}$ , vía alfa-amidación o tras la oxidación de las cadenas laterales de residuos glutámico, dando lugar a la formación de un péptido en el cual el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado alfa-cetoacilo [16]. Existen también otros mecanismos que pueden dar lugar a la carbonilación proteica como la reacción con productos generados durante la peroxidación lipídica como 4-hidroxinonenal (4-HNE<sup>1</sup>) (Fig. 1B), 2-propenal (acroleína) y malondialdehído [18]. Este tipo de reacción denominada “Adición de Michael”, conlleva la adición de grupos aldehídos reactivos a las cadenas laterales de los residuos de cisteína, histidina o lisina. Finalmente, grupos carbonilo reactivos pueden ser también generados por reacciones del grupo amino de los residuos de lisina con azúcares reducidos o por la oxidación de sus productos de reacción (glicación/glicoxidación), dando lugar a, por ejemplo, carboximetil lisina [2, 3].



**Figura 1. Formación de grupos carbonilo y derivatización mediante DNP.** A: productos generados por el ataque del radical  $\cdot\text{OH}$  a las cadenas laterales de arginina (semialdehído glutámico) y lisina (semialdehído aminoadípico) [17]; B: la reacción de 4-HNE con las cadenas laterales de los residuos de cisteína, histidina y lisina conlleva la adición de grupos aldehídos reactivos a las proteínas [16]; C: formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona tras la reacción del DNP con grupos carbonilo.

### Medidas de daño oxidativo a proteínas: carbonilos

Debido a que las ROS son generalmente muy reactivas y tienen una vida media muy corta, una

<sup>1</sup> 4-HNE: 4-hidroxinonenal

forma indirecta de determinar la existencia de estrés oxidativo es la medida de los productos formados por la reacción de las ROS con biomoléculas. Dado que en el caso de las proteínas uno de los productos generados son los grupos carbonilo su cuantificación se ha convertido en un parámetro ampliamente aceptado de daño oxidativo en condiciones de estrés. Los grupos carbonilo han sido cuantificados de diversas formas. El método más comúnmente utilizado es el basado en su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH<sup>2</sup>) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona. Este método se basa en que el DNPH es capaz de unirse covalentemente a los grupos carbonilo -formando una base de Schiff- para dar lugar a hidrazonas estables (Fig. 1C). El grupo dinitrofenilo (DNP<sup>3</sup>) puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima a 365-375 nm [8, 19]. Asimismo, debido a que existen excelentes anticuerpos comerciales contra el grupo dinitrofenilo [20, 21], la detección de grupos carbonilo puede realizarse mediante western blot, dot blot, inmunohistoquímica o ELISA. Se han desarrollado diversos métodos para la derivatización y la preparación de las muestras. La detección mediante western blot ha sido comúnmente denominada Oxi-blot. [10, 22-24].

Sin embargo otros métodos están emergiendo como alternativas al DNPH debido a que algunos autores cuestionan la estabilidad de la 2,4-dinitrofenilhidrazona en condiciones alcalinas o durante el almacenamiento prolongado. Entre los métodos alternativos más utilizados se encuentran los que utilizan la química de la hidrazida. Las hidrazidas reaccionan específicamente con los carbonilos de proteínas (principalmente en su forma aldehído) mediante la formación de una base de Schiff, la cual puede ser estabilizada por reducción con cianoborohidruro [25-27]. Las ventajas de esta aproximación no son sólo una mayor estabilidad del producto final de reacción sino también la presencia de un amplio catálogo de grupos funcionales acoplados a la hidrazida que permiten el diseño de diversas estrategias para la captura o detección de las proteínas carboniladas [28]. Entre estos grupos funcionales encontramos biotina, digoxigenina y diversos compuestos fluorescentes. De esta forma los grupos carbonilo pueden ser derivatizados con digoxigeni-

na-hidrazida, e identificados utilizando anticuerpos contra digoxigenina [29]. Una técnica similar puede ser utilizada derivatizando los grupos carbonilo con biotina-hidrazida, identificando las proteínas derivatizadas utilizando avidina marcada con fluoresceína [30]. Otro compuesto utilizado para la detección fluorescente de grupos carbonilo es la fluoresceína-5-tiosemicarbazida. El grupo tiosemicarbazida presenta una reactividad frente a los grupos carbonilo similar a la hidrazida [31].

Finalmente, otra aproximación para medir el contenido de carbonilos totales en una muestra biológica es la determinación de productos específicos como el semialdehído glutámico y el semialdehído aminoadípico mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas con dilución isotópica. Esta aproximación fue desarrollada por Requena y colaboradores y posteriormente utilizada para caracterizar la naturaleza de los distintos productos carbonilo presentes en muestras de enfermos de Alzheimer [17, 32].

### Identificación de proteínas oxidadas mediante herramientas proteómicas

Podemos definir la “proteómica redox” como el conjunto de aproximaciones proteómicas que permiten la identificación de proteínas modificadas oxidativamente. La proteómica redox ofrece un gran potencial para descubrir nuevas proteínas susceptibles al estrés oxidativo, correlacionar cambios cuantitativos en el perfil de estas modificaciones con el estado de una enfermedad o con el envejecimiento, y para caracterizar el sitio exacto y tipo de modificación vía análisis MS/MS [3, 33]. Este tipo de aproximaciones pueden dar lugar a la identificación de grupos de proteínas selectivamente oxidadas en determinadas patologías y por tanto contribuir a aclarar los mecanismos moleculares involucrados en ellas. En esta revisión nos centraremos en la identificación de grupos carbonilo, uno de los productos de la oxidación de proteínas. Hasta la fecha diversos estudios proteómicos han demostrado que la carbonilación es altamente selectiva, debido a que en diferentes modelos de estudio se han identificado grupos de proteínas particularmente sensibles al estrés oxidativo. A continuación se revisan algunas de las estrategias utilizadas para la identificación de proteínas carboniladas. Un resumen de los estudios referidos puede encontrarse en la Tabla 1, mientras que en la Figura 2 se presenta una visión esquemática de las principales estrategias utilizadas.

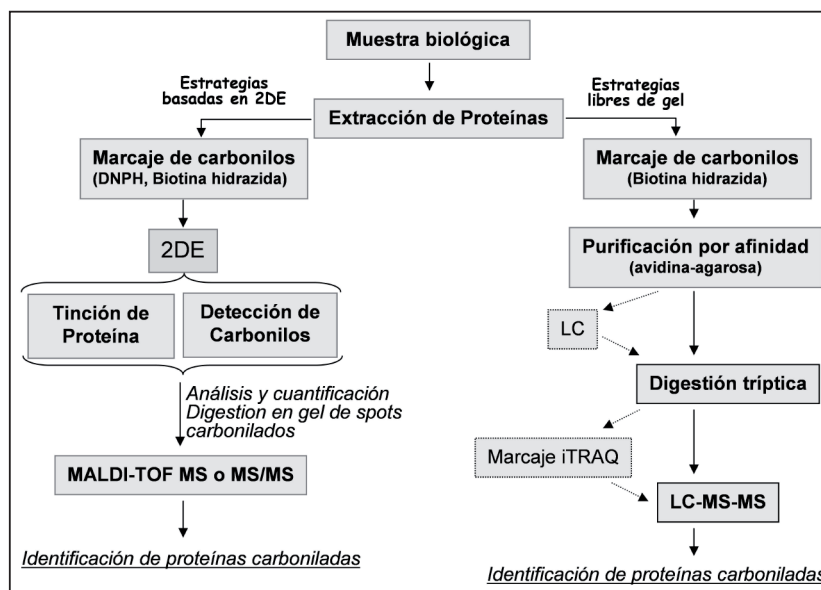
<sup>2</sup> DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

<sup>3</sup> DNP: 2,4-dinitrofenilo



**Tabla 1.** Estudios en que se identifican proteínas carboniladas

Referencia	Organismo	Modelo	Compuesto	Estrategia	Proteínas identificadas
<i>Sistemas basados en electroforesis bidimensional</i>					
[40]	Levadura	Deficiencia en frataxina	DNP	2DE Oxi-blot	14
[39]	Cerebro humano	Enfermedad de Huntington	DNP	2DE Oxi-blot	4
[38]	Levadura	Envejecimiento	DNP	2DE Oxi-blot	16
[37]	Cerebro humano	Alzheimer	DNP	2DE Oxi-blot	4
[31]	Ratón	Envejecimiento	Fluorescein-5-Tiosemicarbazida	2DE/detección fluorescente	12
[30]	Levadura	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Biotina hidrazida	2DE/avidina-fluoresceína	20
[25]	Rata	Diabetes	Biotina hidrazida	2DE avidin blot	7
[48]	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ciclo de vida	DNP	2DE Oxi-blot	5
<i>Sistemas libres de gel</i>					
[28]	Levadura	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Biotina hidrazida	Afinidad/LC/proteólisis/MS-MS	99
[26]	Mitocondria de rata	Basal	Biotina hidrazida + iTRAQ	Afinidad/proteólisis/iTRAQ/LC-MS-MS	200
[27]	Cerebro de ratón	Envejecimiento	Biotina hidrazida	Afinidad/LC/proteólisis/LC-MS-MS	100
[43]	Células tumorales	Tratamiento fotodinámico	Biotina hidrazida	Afinidad/IDE/proteólisis/ LC-MS-MS	81
[47]	Levadura	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reactivo de Girard	LC-MS/MALDI-MS-MS	36
[44]	Tejido adiposo	Obesidad	Biotina hidrazida	Afinidad/proteólisis/ LC-MS-MS	37

**Figura 2.** Visión esquemática de diversas estrategias analíticas utilizadas para la identificación y cuantificación de proteínas carboniladas.

### Sistemas basados en electroforesis bidimensional

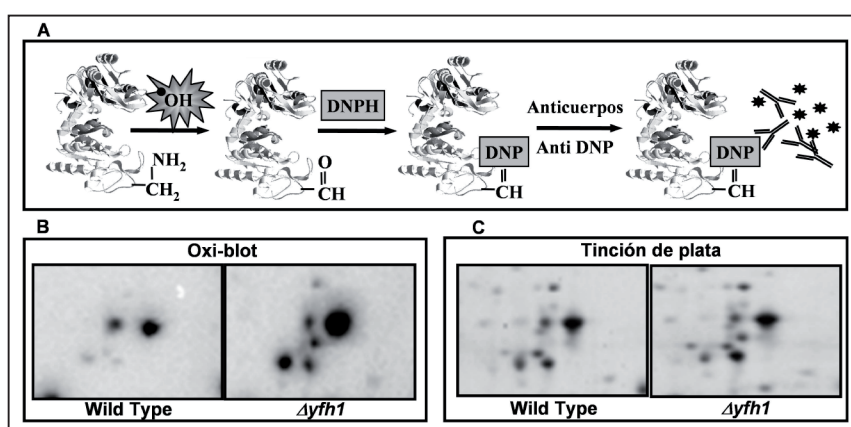
La electroforesis bidimensional (2DE) ha sido ampliamente utilizada para la identificación de proteínas carboniladas a partir de muestras complejas. La detección de esta modificación oxidativa se puede realizar mediante western blot con anticuerpos que reconocen directamente la modificación carbonilo en la proteína (por ejemplo: anti -4-HNE)[34], o bien con anticuerpos anti-DNP si la muestra ha sido pre-

viamente derivatizada con este compuesto [35-37]. Un ejemplo de este tipo de aproximación se muestra en la Figura 3. En otros casos, los carbonilos reactivos son marcados covalentemente con biotina-hidrazida y detectados en el gel mediante avidina-fluoresceína [30] o avidina-peroxidasa [25]. El uso de geles bidimensionales ha demostrado ser muy útil para la identificación de proteínas oxidadas, especialmente cuando se comparan dos condiciones fisiológicas [38-40]. Presenta la ventaja de poder contar por un lado con las imágenes obtenidas tras la detección del

grupo funcional unido a los carbonilos y por otro con aquellas obtenidas tras la tinción de los geles mediante colorantes de proteínas (tinción con plata, Sypro Ruby, Coomassie Brilliant blue, etc.). Esto permite la normalización de la señal de carbonilo respecto a la cantidad de proteína. Hay que tener en cuenta que como en cualquier análisis proteómico, el estudio de las proteínas carboniladas está sesgado a favor de aquellas proteínas más abundantes. Por tanto la determinación del nivel de carbonilación relativo de una determinada proteína es más informativo que el contenido total de proteína modificada. De lo contrario, aquellas proteínas abundantes pero con bajo contenido de carbonilos específicos pueden aparecer como predominantes en oxi-blot, mientras que

proteínas poco abundantes pero con niveles altos de carbonilación específica podrían pasar desapercibidas [10]. Asimismo un cambio en el nivel de expresión de una determinada proteína entre dos condiciones de estudio podría identificarse erróneamente como un cambio en el grado de daño de dicha proteína. En este sentido conviene destacar que diversos estudios basados en geles bidimensionales han permitido identificar proteínas poco abundantes como altamente sensibles al estrés oxidativo. Un ejemplo serían las chaperonas mitocondriales [40-42].

el daño a una proteína determinada. Sin embargo, esta estrategia no se acostumbra a utilizar ya que para resultar concluyente requeriría del desarrollo de aproximaciones específicamente encaminadas a ese fin. Una forma indirecta de validación de los resultados es la medida de las actividades enzimáticas de aquellas proteínas identificadas como oxidadas. Esta aproximación ha sido utilizada con éxito en diversos estudios [9, 38, 40], aunque su principal limitación se encuentra en el hecho de que solo puede aplicarse a enzimas para los cuales exista un método eficaz para medir su actividad enzimática.



**Figura 3. Formación de grupos carbonilo y detección mediante anticuerpos anti-DNP (Oxi-Blot).** **A:** El ataque de un radical  $\bullet\text{OH}$  a la cadena lateral de un aminoácido genera un grupo carbonilo. El DNP reacciona específicamente con el grupo carbonilo formándose una hidrazona estable que puede ser detectada inmunológicamente por medio de anticuerpos específicos anti-DNP. **B:** Detección de proteínas carboniladas en extractos celulares de dos cepas de levadura mediante 2DE y Oxi-Blot. **C:** La tinción de proteínas mediante plata de la misma región del gel bidimensional permite la normalización de los niveles de carbonilación. Puede observarse que diversas proteínas presentan un mayor grado de carbonilación en la cepa  $\Delta yfh1$  (para detalle ver ref. 40).

A pesar de la gran información obtenida mediante el análisis proteómico basado en geles, existen limitaciones de este tipo de aproximación para el caso de análisis a gran escala así como para la identificación de proteínas de membrana o proteínas poco abundantes. Por otro lado, el uso de geles bidimensionales presenta como principal problema la validación de los resultados obtenidos. La comparación de las imágenes obtenidas mediante tinción específica (anti-DNP, por ejemplo) y proteína total no siempre es fácil, y el criterio a seguir en cada trabajo queda en manos del investigador. La doble tinción fluorescente permite, en teoría, un mejor emparejamiento entre las distintas imágenes obtenidas. La confirmación mediante MS de la presencia de péptidos modificados podría ser una forma de confirmar

### Sistemas “libres de gel”

Diversos autores han explorado métodos libres de gel, basados en el enriquecimiento mediante afinidad de proteínas que presentan una modificación tipo carbonilo y su posterior detección mediante espectrometría de masas. Estas aproximaciones permitirían en

teoría obviar algunas de las limitaciones de los sistemas basados en 2DE descritas en el apartado anterior. Sin embargo la desventaja de estas aproximaciones es que no permiten un análisis cuantitativo del grado de carbonilación de las distintas proteínas identificadas en diferentes muestras, lo que limita su utilidad como herramienta para el estudio de cambios en el patrón de oxidación de proteínas en distintas condiciones biológicas. El sistema más utilizado para el enriquecimiento de las proteínas carboniladas es la cromatografía de afinidad de avidina, para carbonilos previamente derivatizados con biotina-hidrazida. Posteriormente las proteínas enriquecidas son digeridas y los péptidos obtenidos son identificados mediante LC-MS/MS [26-28, 43, 44]. Utilizando esta tecnología Soreghan y colaboradores identificaron 100 proteínas carboniladas en un único experimento a partir de homogenados de cerebro de ratones de diferentes edades. Entre ellas destacan receptores poco abundantes y proteínas mitocondriales implicadas en el metabolismo energético y en la respuesta a estrés, así como receptores con residuos de tirosina fosforilables. Además, fueron capaces de observar carbonilos en proteínas citoplasmáticas abundantes previamente identificadas mediante electroforesis bidimensional [27]. Una extensión de esta tecnología utilizando iTRAQ ha permitido distinguir las proteínas carboniladas de aquellas con afinidad a la avidina. De esta

forma se han logrado identificar 200 proteínas carboniladas en extractos mitocondriales de músculo de rata, lo cual muestra la gran susceptibilidad de este tipo de proteínas ante el estrés oxidativo [26]. Otra alternativa consiste en el fraccionamiento mediante LC de las proteínas derivatizadas con biotina-hidrazida tras su purificación mediante cromatografía de afinidad de avidina y previamente a su digestión. Utilizando esta aproximación "top-down" Mirzaei y Regnier identificaron 99 proteínas carboniladas en levaduras tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [28].

### Identificación del sitio de carbonilación

En los últimos años se han intentado desarrollar metodologías para identificar el aminoácido modificado oxidativamente. Esta información es importante para entender en profundidad los mecanismos oxidativos por los cuales se están produciendo los grupos carbonilo, así como para conocer los efectos funcionales que una modificación a un determinado aminoácido puede causar en la proteína. Existen diferentes estrategias analíticas para la detección del aminoácido modificado. La mayoría de estas metodologías están basadas en la observación de la variación de la masa molecular específica de un aminoácido modificado covalentemente, que es fácilmente detectable mediante mediciones de espectrometría de masas. En algunos de los estudios en que se ha usado la biotina-hidrazida para el marcaje y purificación de proteínas carboniladas, la identificación de péptidos biotinilados ha permitido confirmar la modificación oxidativa y asimismo conocer su localización [28, 43]. Por otro lado, la reacción de 4-HNE con los residuos de lisina, histidina y cisteína puede ser monitorizada en proteínas intactas, detectando los productos correspondientes con un incremento de 156 Da. Asimismo, puede ser identificado el péptido específico que lleva esta diferencia de masa [3, 34, 45]. Existe otra aproximación que permite la identificación mediante MALDI-TOF de péptidos modificados oxidativamente mediante la adición de DNP por reacción con 4-HNE. Los péptidos carbonilados pueden ser identificados por la diferencia de masa de 180 Da (correspondiente al DNP) existente entre muestras derivatizadas y sin derivatizar. Dada la baja estabilidad de la hidrazona en las condiciones habitualmente utilizadas en MALDI-TOF, esta estrategia requiere del uso de DNPH como matriz de ionización [46]. Finalmente, Mirzaei y Regnier utilizaron dos formas isotópicas del reactivo de Girard (que contiene un grupo hi-

drazida) para caracterizar el lugar de carbonilación de proteínas provenientes de extractos de levaduras tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [47].

Queda claro que las técnicas proteómicas están ayudando a profundizar en la detección, identificación y los mecanismos subyacentes en las modificaciones oxidativas de las proteínas. Con ello se contribuye a una mejor comprensión de la trascendencia de estas modificaciones a nivel celular. El impacto de ellas sobre la fisiología celular será, sin duda, el próximo reto, es decir, cómo se afecta el metaboloma de la célula como consecuencia de la alteración en la función de determinadas proteínas.

### Referencias

- [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 Suppl* 11:203-216; 1982.
- [2] Stadtman, E. R.; Berlett, B. S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30:225-243; 1998.
- [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* 24:55-99; 2005.
- [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* 10:389-406; 2006.
- [5] Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300; 1956.
- [6] Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495; 2005.
- [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* 8:722-728; 2007.
- [8] Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-357; 1994.
- [9] Tamarit, J.; Cabiscol, E.; Ros, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in Es-

- cherichia coli cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* 273:3027-3032; 1998.
- [10] Levine, R. L., Stadtman, E. R. *Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology*. In: Dalle-Donne I., Scaloni, A., Butterfield, 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* 1780:1304-1317; 2008.
- [12] Oktyabrsky, O. N.; Smirnova, G. V. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)* 72:132-145; 2007.
- [13] Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* 18:93-105; 1995.
- [14] Stadtman, E. R.; Levine, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207-218; 2003.
- [15] Dean, R. T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 ( Pt 1):1-18; 1997.
- [16] Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313-20316; 1997.
- [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 U S A* 98:69-74; 2001.
- [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* 38:651-675; 2006.
- [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* 186:464-478; 1990.
- [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* 17:429-437; 1994.
- [21] Keller, R. J.; Halmes, N. C.; Hinson, J. A.; Pumford, N. R. Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem Res Toxicol* 6:430-433; 1993.
- [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* 266:48-57; 1999.
- [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* 31:181-190; 2001.
- [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* 23:361-366; 1997.
- [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* 34:11-22; 2003.
- [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* 7:1150-1163; 2007.
- [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* 20:1713-1720; 2003.
- [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* 1141:22-31; 2007.
- [29] Bautista, J.; Mateos-Nevado, M. D. Immunological detection and quantification of oxidized proteins by labelling with digoxigenin. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:419-423; 1998.
- [30] 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.
- [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* 127:849-861; 2006.



- [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, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem* 280:21522-21530; 2005.
- [33] Butterfield, D. A.; Sultana, R. Redox proteomics: understanding oxidative stress in the progression of age-related neurodegenerative disorders. *Expert Rev Proteomics* 5:157-160; 2008.
- [34] Bennaars-Eiden, A.; Higgins, L.; Hertz, A. V.; Kappahn, 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* 277:50693-50702; 2002.
- [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* 33:1507-1515; 2002.
- [36] Korolainen, M. A.; Goldsteins, G.; Alafuzoff, I.; Koistinaho, J.; Pirttila, T. Proteomic analysis of protein oxidation in Alzheimer's disease brain. *Electrophoresis* 23:3428-3433; 2002.
- [37] Castegna, A.; Aksenov, M.; Thongboonkerd, V.; Klein, J. B.; Pierce, W. M.; Booze, 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* 82:1524-1532; 2002.
- [38] 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.
- [39] Sorolla, M. A.; Reverter-Branchat, G.; Tamarit, J.; Ferrer, I.; Ros, J.; Cabisco, E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* 45:667-678; 2008.
- [40] 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.
- [41] Magi, B.; Ettore, A.; Liberatori, S.; Bini, L.; Andreassi, M.; Frosali, S.; Neri, P.; Pallini, V.; Di Stefano, A. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ* 11:842-852; 2004.
- [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* 277:44531-44538; 2002.
- [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* 7:3868-3878; 2008.
- [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* 6:624-637; 2007.
- [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* 283:21837-21841; 2008.
- [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* 76:867-873; 2004.
- [47] Mirzaei, H.; Regnier, F. Enrichment of carbonylated peptides using Girard P reagent and strong cation exchange chromatography. *Anal Chem* 78:770-778; 2006.
- [48] Johansson, E.; Olsson, O.; Nystrom, T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279:22204-22208; 2004.

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 ICP<sup>1</sup>–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 KMnO<sub>4</sub>. 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 CuSO<sub>4</sub> 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(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 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](mailto:joaquim.ros@cmb.udl.es) (J. Ros).

<sup>1</sup> 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  $\text{FeCl}_3$  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  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ , and  $\text{CuSO}_4$  [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  $98^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  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

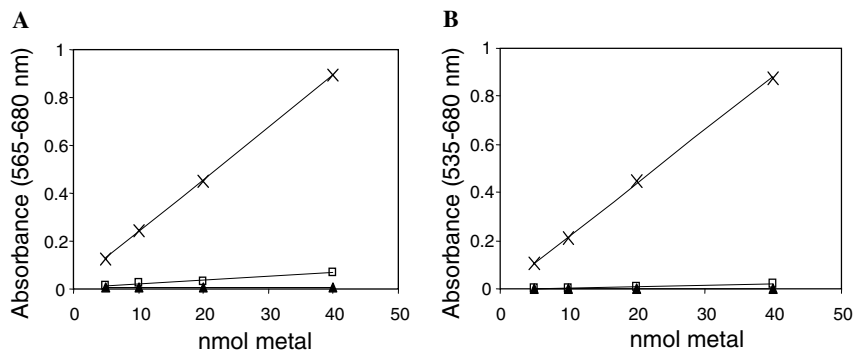


Fig. 1. Detection of metals dissolved in nitric acid. The indicated amounts of  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  (X),  $\text{CuSO}_4$  (□), and  $\text{MnCl}_2$  (▲) were dissolved in 3% nitric acid and treated as described in the text (using either ferrozine or BPS as iron chelator). Nonspecific 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  $\text{FeCl}_3$  were used as the iron source. No reaction between  $\text{ZnCl}_2$  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).

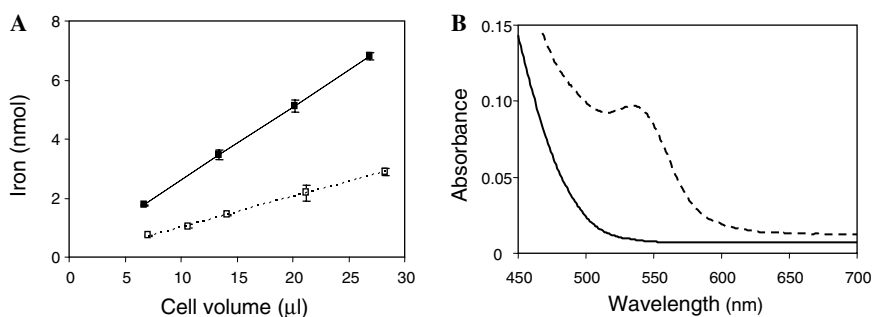


Fig. 2. Determination of iron content in nitric-acid-digested samples from yeast. (A) Different amounts of wild-type and  $\Delta yfh1$  cells were digested overnight in 3% nitric acid and iron content was quantified as described in the text. Iron content shows a strong correlation with digested cell 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.



**YEAST FRATAXIN MUTANTS DISPLAY DECREASED  
SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITIES WHICH ARE  
CRUCIAL TO PROMOTE PROTEIN OXIDATIVE DAMAGE.**

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

**Grup de Bioquímica de l'Estrés Oxidatiu, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida, Spain.**

Acknowledgments

This work is supported by grants BFU2004-00593/BMC and CSD2007-00020 from the Ministerio de Educación y Ciencia and SGR 0677 from Generalitat de Catalunya (Spain). V. I. is a recipient of a Ph.D. fellowship from the Generalitat de Catalunya.

Address correspondence to: Joaquim Ros, Dept. Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Montserrat Roig, 2, 25008-Lleida, Tel. +34 973 702 275; Fax. +34 973 702 426; E-mail address: [joaquim.ros@cmb.udl.es](mailto:joaquim.ros@cmb.udl.es)

Running Title: Role of superoxide dismutases in iron-toxicity

# YEAST FRATAXIN MUTANTS DISPLAY DECREASED SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITIES WHICH ARE CRUCIAL TO PROMOTE PROTEIN OXIDATIVE DAMAGE

Iron overload is involved in several pathological conditions such as Friedreich Ataxia, a disease caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin. Iron exerts its toxicity through the generation of reactive oxygen species, which have the potential to damage cellular components. In a previous work we identified 14 proteins selectively oxidized in yeast cells lacking Yfh1, the yeast frataxin homolog. Most of these damaged proteins were magnesium binding proteins. Also, decreased activity of Mn-SOD, oxidative damage to CuZn-SOD and increased levels of chelatable iron were observed in this model. In this work, the relationship between low SOD activity, the presence of chelatable iron and protein damage was investigated in more detail. We observed that recovery of both SOD activities by addition of copper and manganese to the culture medium prevented oxidative damage and inactivation of magnesium binding proteins. This protection was compartment specific: recovery of mitochondrial enzymes required the addition of manganese while cytosolic enzymes were recovered by only adding copper. Copper treatment also decreased *Δyfh1* sensitivity towards menadione. Finally, a *Δsod1* mutant showed high levels of chelatable iron and inactivation of magnesium-binding enzymes which could not be prevented by copper treatment. These facts indicate that decreased SOD activities in *Δyfh1* cells play a central role in the formation of chelatable iron, oxidative damage to metal binding proteins and sensitivity to menadione. Our results also suggest that alterations in the activity of superoxide dismutases should be considered to explain the iron-overloading toxicity observed in pathologies in which this metal accumulates.

**Keywords:** Iron-overload, protein carbonylation, metal-catalyzed oxidation, frataxin, yeast, superoxide dismutase, iron toxicity, friedreich ataxia.

## INTRODUCTION

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

FRDA is caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin [6]. A large number of studies link frataxin to iron metabolism and iron overload. Consequently, some therapeutic approaches under study suggest reducing the degree of iron accumulation by chelators [7] or siderophores, or prevent its prooxidant effects by the use of antioxidants such as idebenone, a coenzyme Q analogue [8]. Frataxin has been suggested to play a role in iron-sulfur cluster biosynthesis because in most cellular and animal models of FRDA, decreased activities of iron-sulfur containing proteins have been reported [9]. However, the precise function of this protein remains a matter of debate. Many studies in frataxin function arise from experiments performed with *Saccharomyces cerevisiae*, as frataxin and the yeast homologue Yfh1 are orthologues. Frataxin and Yfh1 are mitochondrial proteins;  $\Delta yfh1$  strains accumulate iron and show decreased activities of iron-sulfur containing proteins [10] and finally, 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 the iron fraction that is in transit between uptake and release from iron-binding proteins and directly involved in iron toxicity. It has also been termed “chelatable iron”, “redox-active iron” or “labile iron pool” [13]. The exact nature of this iron fraction is poorly defined, but it is generally considered to be associated to small molecular weight ligands such as ATP, ADP, phosphate or citrate [1, 14]. All living



organisms have developed iron transport and storage systems in order to keep concentrations of “free iron” as low as possible [13].

In a previous work we have addressed the consequences of iron overload on the cellular proteome of a yeast model of Friedreich ataxia [15]. By analyzing protein carbonylation, which is one of the end-products of free radical attack on proteins, we were able to identify 14 proteins specifically carbonylated in *Δyfh1* mutants. Most of them were Mg-binding proteins, indicating that iron can replace Mg binding sites and promote the specific 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.

Besides Mg-binding proteins, our proteomic search for iron targets in *Δyfh1* mutants identified the cytosolic CuZn dependent SOD1 as one of the damaged enzymes [15]. Also, independent results from our lab [16] and others [17], have shown that iron overload in yeast promotes inactivation of SOD2. A similar effect has been recently reported in a mouse model of hereditary hemochromatosis . [18]. These data suggests 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 cytosolic superoxide dismutases. In the present work we show 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 their isogenic null mutants MML298 ( $\Delta$ *yfh1*; MATa *yfh1::kanMX4*) and BQS102 ( $\Delta$ *sod1*; MATa *sod1::URA3*). 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 8M Urea and disrupted using glass beads. An equal volume of 8M Urea, 8% CHAPS and 50 mM DTT was added to the lysed cells and after centrifugation (12,000 rpm for 10 minutes) protein amounts in the supernatant were quantitated with a Nanodrop ND-100 spectrophotometer and 40  $\mu$ g of protein were diluted in 150  $\mu$ l of Rehydration Buffer (8M 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 first dimension, strips were incubated for 20 minutes with 5 ml of a solution containing 10 mM 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) in 10% trifluoroacetic acid. This compound reacts with carbonyl groups in proteins. Antibodies against DNPH allow the 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, 6M Urea, 2% SDS and 20% glycerol. Second dimension SDS-PAGE was performed on 18x18 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 (PlusOne silver staining kit, General Electric Healthcare) and scanned in a GS800 densitometer (Bio-Rad). Antibodies against DNPH (Dako) were used at 1:5,000 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 Activities*—Cell extracts were prepared using glass beads and enzymatic activities assayed as described in the following references: aconitase and succinate dehydrogenase [19], pyruvate kinase [20], and phosphoglycerate kinase [21]. Mitochondrial F1Fo ATP synthase was assayed in mitochondrial preparations as described [22]. Oligomycin at 6 µg/ml, an inhibitor of this enzyme [23], was used for background subtraction. Mitochondria were prepared as previously described [19]. Superoxide dismutase activities were analyzed in zymograms. Briefly, cells were disrupted using glass beads in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0. Crude extracts were loaded on native 12% Tris-glycine polyacrilamide gels, pH 8.8. After electrophoresis, gels were stained for SOD activity as described [24]. Native gels were densitometered and the density of the bands corresponding to Mn-SOD or CuZn-SOD activity 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 media, washed twice with SC media and then loaded for 20 minutes with 20 µM Phen green SK diacetate in 300 µl of SC media. 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 minutes of incubation with Phen Green SK diacetate, cells already fixed on the chamber's coverslip were washed twice with SC media, diluted again in 300 µl of SC media and imaged in the microscope using an argon laser ( $\lambda_{\text{excitation}}$  488 nm) and a 505 nm long-pass filter. An Olympus PlanApo oil objective (60x / 1.40 NA) was used. For dynamic measurements of Phen Green dequenching, images were collected at five-second intervals. After 1 minute, 3 µl 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 seconds 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). Optical density (600 nm) was recorded every 30 minutes. Generation times were calculated using Gen5 Data Analysis software and Microsoft Excel.

## RESULTS

*CuZn-SOD activity is decreased in  $\Delta yfh1$ .* In two previous proteomic analyses of  $\Delta yfh1$  yeast cells, we identified CuZn-superoxide dismutase as both a highly induced protein (Irazusta 2006) and as a target of iron-induced oxidative stress (Irazusta 2008). The degree of carbonylation largely exceeds the increase in SOD1 protein amounts. This suggests that a fraction of this protein may be present in a damaged form in  $\Delta yfh1$  cells. However, we have not previously investigated the consequences of such carbonylation on SOD1 activity. To reveal whether or not total SOD1 activity was altered in  $\Delta yfh1$  cells, we analyzed the activity of both SOD isoenzymes using native gels stained for SOD activity. As shown in Fig. 1 A and B, CuZn-SOD activity was slightly decreased in  $\Delta yfh1$ . This decrease in SOD1 activity appears stronger when specific activity (Fig 1 C) is calculated by dividing the enzymatic activity with the protein amounts measured by western blot (Fig. 1 A). The origin of such low specific activity may be protein carbonylation due to ROS damage, but it 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 Fet3 activity, 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 transport into membrane compartments, leading to copper-deprived cytosol [27]. To investigate whether or not copper availability may be limited in  $\Delta yfh1$  cells, we supplemented the culture media with copper sulfate at different concentrations. As shown in Fig 1B, copper treatment increased CuZn-SOD activity both in wild-type and  $\Delta yfh1$  cells. In the case of wild-type cells, this increase in activity was due to the presence of higher protein expression, as observed by western-blot (Fig 1A). Specific activity was not altered (Fig 1 C). Recovery of wild type levels of CuZn-SOD activity in  $\Delta yfh1$  cells was achieved with 5  $\mu$ M concentration of  $\text{CuSO}_4$ . Supplementing culture media with higher concentrations of copper did not increase SOD activity further.

However, specific activity was not fully restored. This fact may indicate that besides of limited copper availability, a fraction of CuZn-SOD may be inactive in *Δyfh1* cells due to oxidative damage.

We also investigated the effects of copper and manganese treatment on the activity of Mn-SOD. In a previous work [16], we observed that the mitochondrial manganese-dependent isoenzyme (Mn-SOD), also showed a marked increase in protein amounts, but paradoxically decreased activity in *Δyfh1* cells. This decreased activity was considered one of the consequences of the manganese deficiency found in *Δyfh1* cells and could be reverted by manganese supplementation of the culture media. The zymograms shown in Fig 1 A confirmed this marked decrease in Mn-SOD activity in *Δyfh1* cells and its recovery by manganese (Fig 1 D). However, when specific activity was calculated, the presence of large amounts of inactive Sod2 could be noticed, even in manganese supplemented cultures (Fig 1 E). This fact indicates that, in addition to manganese deficiency, Mn-SOD may be inactivated by iron accumulation in mitochondria. This metal may substitute the active site of the enzyme [17] yielding to inactive and easily oxidizable [15] forms of this enzyme.

*Carbonyl content in supplemented cultures.*-In a previous work, we used a proteomic approach to identify oxidatively damaged proteins in a *Δyfh1* strain. This approach consisted on detection by western blot of carbonyl groups on proteins previously separated by two-dimensional gel electrophoresis (2D-oxy blot). We identified 17 spots with increased carbonyl content in *Δyfh1* cells that corresponded to 14 different proteins. We wanted now to explore the contribution of decreased SOD activity on the degree of carbonylation of this group of proteins. To tackle this point, we analyzed protein carbonylation in yeast cells grown in YPG media supplemented with manganese and/or copper. As it has been shown in the previous section (Fig. 1), recovery of wild type levels of CuZn-SOD in *Δyfh1* cells was achieved with 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , while recovery of Mn-SOD in copper-supplemented media required a 50  $\mu\text{M}$  concentration of  $\text{MnCl}_2$ . Consequently, wild type and *Δyfh1* cells were grown in YPG media supplemented with  $\text{CuSO}_4$  and  $\text{MnCl}_2$  at 5  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$  concentrations respectively. Crude extracts were prepared and analyzed by 2D-oxy blots as described under experimental procedures.

Replicate gels were silver stained to calculate the differences in protein amounts of every analyzed spot. Images are shown in figure 2. Both 2D-oxy blots and silver stained gels were analyzed using PDQuest software. Values obtained for each spot in this work are shown in table 1 and are compared with those values obtained previously in untreated cultures. These results are summarized in Fig. 3, where the increase in carbonylation for each protein analyzed in supplemented cultures is presented compared to the increase observed in untreated cultures. A clear decrease in the carbonylation degree of all the analyzed proteins was observed after manganese and copper treatment. These results suggest that these proteins are damaged as a consequence of increased superoxide levels produced in *Δyfh1* cells.

*Recovery of enzymatic activities by copper and manganese treatments*- In order to validate the results obtained in the previous section, we analyzed the enzymatic activities 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 *Δyfh1* cells. The data shown in Table 1 and Fig. 3 indicated that they are protected by manganese and copper treatment and that the enzymatic activities of these three enzymes were recovered by such treatment (Fig. 4). These results confirm the proteomic data presented in the previous section. Also, we wanted to analyze if copper alone was able to recover both cytosolic and mitochondrial enzymes because it has been previously reported a cross-compartment protection by CuZn-SOD of mitochondrial enzymes such as homoaconitase or aconitase [28]. Only the cytosolic proteins pyruvate kinase and phosphoglycerate kinase were recovered by copper treatment, while recovery of the mitochondrial ATP synthase required both copper and manganese. This result suggests that these enzymes are inactivated as a consequence of increased superoxide levels found in *Δyfh1* cells in their respective cellular compartments. To further investigate the contribution of CuZn-SOD activity to the inactivation of mitochondrial enzymes in *Δyfh1* cells, we analyzed the effect of copper alone or copper in conjunction with manganese on the activities of two representative iron-sulfur enzymes, aconitase and succinate dehydrogenase. In a previous work we showed that inactivation of several iron-sulfur enzymes, one of the hallmarks of FRDA, could be prevented in *Δyfh1* 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. 3, copper alone had no effect on aconitase and succinate dehydrogenase activity. The combined treatment (copper plus manganese) restored succinate dehydrogenase activity, while 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 *Δyfh1* cells has little effect on mitochondrial enzymes.

*Effect of copper and manganese treatments on cell growth rate and sensitivity to menadione.*- When grown in YPG, *Δyfh1* cells present a decrease in cell growth rate. As copper and manganese prevented protein damage in *Δyfh1* cells, we investigated the effects of such supplementation on cell growth rate. In order 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. Cultures of 1 ml containing different concentrations of copper and manganese in YPG were incubated for 18 hours in 24-well plates in a Biotek PowerWave XS. An equal amount of cells was inoculated in each well at the beginning of the experiment, and optical density was measured every 30 minutes. Maximum generation times were calculated for each culture considering at least a 4 hours period. Cells lacking Yfh1 presented longer generation times (208 minutes) than wild-type cells (156 minutes). Copper or manganese treatment, either alone (Fig 6), or combined (not shown) did not significantly affect these parameters. This fact indicates that reduced growth rate in *Δyfh1* cells is not due to increased protein damage to those Mg-binding proteins or FeS-enzymes which are recovered by copper and manganese treatment.

We also wanted to test the sensitivity of both strains to the superoxide generating agent menadione, and which was the effect of metal supplementation on such sensitivity. To this purpose, cell cultures were challenged with 2.5 μM menadione 4 hours after metal treatment and growth rate monitored for 14 additional hours. Maximum generation times were calculated as described before. Menadione had a strong effect on *Δyfh1* generation time (461 minutes, more than two fold increase), while it did not have a significant effect on wild type generation time. Copper and manganese treatments had divergent effects on the increased sensitivity of the *Δyfh1* strain to menadione. Copper

decreased sensitivity; but manganese increased it in a dose dependent manner (Fig 6). These results confirm that *Δyfh1* cells are more sensitive to oxidative stress than wild type cells and that decreased CuZn-SOD activity is involved in such sensitivity.

*Pyruvate Kinase activity in Δsod1 cells: effect of copper supplementation.*-To further investigate the contribution of decreased SOD activity on protein oxidation, we analyzed pyruvate kinase activity in a *Δsod1* strain. To perform the following experiments, cells were grown in YPD because this mutant did not grow in YPG. As shown in Fig 7, pyruvate kinase activity presented a significant decrease in *Δsod1*. This decrease was similar to that observed in the *Δyfh1* mutant grown under the same conditions. Interestingly, enzymatic activity was not recovered in *Δsod1* cells grown in copper supplemented media, in contrast to what was observed in *Δyfh1* cells. This fact confirms that the recovery of pyruvate kinase by copper treatment in *Δyfh1* cells is due to the recovery of CuZn-SOD activity and not to any other indirect effect exerted by copper treatment.

*Both Δyfh1 and Δsod1 strains show increased levels of chelatable iron.*-Previously, we had shown that chelatable iron was the fraction responsible for protein oxidative damage in *Δyfh1* 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, *Δyfh1* and *Δsod1* cells grown in YPD. Also, we measured 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-permeant fluorescent sensor carrying a phenantroline group. Inside cells, the fluorescence of this sensor is quenched by iron binding, and can be recovered after addition of the cell permeant iron chelator 1,10-phenantroline to the cell suspension [30]. To this purpose, cells were washed with synthetic media, loaded with 20 μM Phen Green SK diacetate for 20 minutes, washed again with synthetic media and its fluorescence recorded in a confocal microscope. After recording basal fluorescence for 1 minute, 2 mM 1,10-phenanthroline was added to the preparation and fluorescence recorded for 4 additional minutes. Fig. 8A-F show the images of wild type *Δsod1* and *Δyfh1* cells before and 90 seconds after the addition of 1,10-phenanthroline. The mean recorded fluorescence for both strains at different



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. By subtracting the basal fluorescence of each cell to the fluorescence of the same cell after 90 seconds of exposure to 1,10-phenanthroline, the relative amount of chelatable iron was obtained (shown in Fig. 8H). A minimum of 30 different cells from three independent experiments were considered for the estimation of this value. As shown in Fig 8H, both mutants exhibited increased amounts of chelatable iron. When total cell iron content was measured, *Δsod1* cells did not show a significant increase in total iron in contrast to what was observed in *Δyfh1* cells. These results confirm that formation of chelatable iron in *Δyfh1* cells is promoted by decreased SOD activity.

## DISCUSSION

In a previous work, we described the presence of high levels of chelatable iron, oxidative damage to Mg-binding proteins and decreased SOD activity in *Δyfh1* mutants. In this work we have investigated the role of SOD deficiency in promoting oxidative damage in such iron-overload conditions. Our results suggest a central role for both SODs in promoting protein oxidative damage. An hypothesis for the role of SOD in iron-overload conditions is summarized in Fig. 9. This hypothesis is sustained on the results presented in this work and also on previously published observations by different authors. It has been widely described that loss of Yfh1 activates the iron regulon AFT1, which in turn promotes Frt1 and Fet3 expression and iron acquisition [10, 15, 26]. Also, 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 similar effects in mitochondria than those exerted by decreased CuZn-SOD activity in the cytosol. Moreover, Mn-SOD may be inactivated by iron [17], leading to a vicious cycle which promotes further increase in superoxide levels and decreased activities of target enzymes. This vicious cycle can be prevented by enhancing the cofactor availability (copper and manganese), allowing a partial recovering of both SOD activities and, as a consequence, preventing the oxidation of most of the enzymes targeted by superoxide. In *Δsod1* cells, increased superoxide levels due to the absence of cytosolic SOD activity, also results 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.

Which 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 *Δyfh1* 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 media. Under such

conditions, copper treatment significantly ameliorates the slow growth rate of *Δyfh1* cells. This fact indicates that decreased CuZn-SOD activity is directly involved on the increased sensitivity of Yfh1-deficient cells to oxidative stress. In contrast, manganese has a negative effect on the growth rate of *Δyfh1* 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 have both beneficial and toxic effects [31], being the latter, under the conditions tested, more detrimental for cell viability than the beneficial effects of restoring Mn-SOD activity.

Some interesting questions remain unanswered regarding Yfh1 function and the consequences of its absence on metal ions 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 [34]. However, several studies have questioned that Yfh1 plays an essential role in iron-sulfur biogenesis [35, 36] [37] [16], and other roles such as iron storage/detoxification [38], electron transfer to ubiquinone [39] or heme biosynthesis [40] have been proposed for frataxin or Yfh1. Any of these roles, in conjunction or not with a non-essential involvement in iron-sulfur biogenesis, could originate an imbalance in mitochondrial iron homeostasis that would trigger AFT1 activation. Once AFT1 activated, increased iron deposits and decreased copper availability could promote SOD deficiency and originate a vicious cycle of increased superoxide levels, iron-sulfur enzymes inactivation, stronger AFT1 activation and enhanced SOD deficiency. Finally, another intriguing question is the origin of manganese deficiency. This topic will deserve further investigation to address whether this deficiency is a direct consequence of Yfh1 deficiency or is secondary to AFT1 activation, iron accumulation or any other consequence of Yfh1 depletion.

**Table 1. Analysis of specific protein carbonylation in *Δyfh1* cells grown in YPG media supplemented with copper and manganese.** The spots indicated in Fig. 2 were previously identified as the indicated proteins [15]. Oxidation increase (*Δyfh1* over wild type) was quantified from the oxy-blot shown in Fig. 2. Protein increase (*Δyfh1* over wild type) was quantified from the 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 *Δyfh1*. Values shown in brackets in the last column are those observed previously in untreated cultures [15]. Data are mean ± standard deviation from three independent experiments.

<i>Protein</i>	<i>Gene</i>	<i>Spots</i>	<i>Oxidation Increase</i>	<i>Protein Increase</i>	<i>Oxidation/protein</i>
Mitochondrial heat shock protein	<i>SSC1</i>	1	1.15±0.33	0.78±0.54	1.47 (3.9)
		3	1.68±0.42	0.74±0.20	2.25 (2.4)
Mitochondrial matrix chaperone	<i>HSP78</i>	4	2.19	1.35±0.65	1.62 (15.3)
Cytoplasmic heat shock protein homolog	<i>SSE1</i>	2	2.27±0.01	0.74±0.36	3.05 (7.1)
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP synthase α subunit	<i>ATP1</i>	6	1.56±0.79	1.98±0.92	0.78 (4.5)
		7	1.72±0.82	1.64±0.42	1.05 (12.1)
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP synthase β subunit	<i>ATP2</i>	5	1.43±0.67	0.74±0.25	1.93 (4.7)
Acetohydroxyacid reductoisomerase	<i>ILV5</i>	8	1.02±0.54	2.28±0.87	0.45 (9.7)
Pyruvate Kinase 1	<i>CDC19</i>	10	1.02±1.42	1.85±1.2	0.55 (3.9)
		11	1.32±0.06	2.03±1.51	0.65 (3.4)
3-phosphoglycerate kinase	<i>PGK1</i>	12	1.71±0.51	0.98±0.51	1.73 (3.7)
Adenylate kinase	<i>ADK1</i>	13	1.71±0.51	3.54±0.92	0.48 (3.3)
Catalase A	<i>CTA1</i>	9	2.17±0.86	8.85±5.30	0.24 (8.1)
Thiol-specific peroxiredoxin	<i>AHP1</i>	14	6.76±2.31	6.53±0.92	1.03 (3.7)
CuZn-Superoxide dismutase	<i>SOD1</i>	15	5.20±1.44	2.11±0.38	2.46 (2.8)
Actin, α chain	<i>ACT1</i>	16	1.24±0.50	0.55±0.17	2.24 (3.4)
Translational elongation factor EF-1α	<i>TEF2</i>	17	1.87±0.73	0.95±0.07	1.97 (7.1)

## Figure legends

**Fig 1. SOD activity in *Δyfh1* cells.** Crude extracts from wild-type and *Δyfh1* cells grown under different conditions were loaded on native gels and SOD activity detected as explained under experimental procedures. Crude extracts were also separated by SDS-PAGE and the amount of Sod1 and Sod2 calculated by western-blot; A, zymograms and western blots showing the activity and amounts of both isoenzymes in crude extracts from cells grown in YPG supplemented or not with 5 μM CuSO<sub>4</sub>, 50 μM MnCl<sub>2</sub> or both metals; B, total CuZn-SOD activity in cells grown in supplemented YPG media was calculated by analyzing the intensity of the corresponding band in the zymogram. Activity in non-supplemented wild type cells was considered the 100% reference value; C, specific CuZnSOD activity was calculated by dividing the relative enzymatic activity (obtained by zymograms), with the relative intensity of the western blot bands against Sod1. Activity in non-supplemented wild type cells was considered the 100% reference value; D and E, in manganese supplemented cultures, total and specific MnSOD activity was calculated as explained before for CuZnSOD. All data are represented as mean ± standard deviation of three independent experiments.

**Fig. 2. Analysis of the oxyproteome of wild type and *Δyfh1* cells grown in metal supplemented YPG by two- dimensional gel electrophoresis.** Cells were grown in YPG media supplemented with 5 μM CuSO<sub>4</sub> and 50 μM MnCl<sub>2</sub>, 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-dinitrophenol. Images corresponding to wild type (2A) and *Δyfh1* (2B) were recorded in a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad). Silver stained gels corresponding to wild-type (2C) and *Δyfh1* (2D), were digitalized using a GS-800 densitometer (Bio-Rad). Images were analyzed with PDQuest software (Bio-Rad). The indicated spots are those previously identified as targets of oxidative stress in *Δyfh1* cells [15] (see Table 1).

**Fig 3. Comparative analysis of specific protein damaged in untreated (whole bars) and treated (black bars) cultures.** Values are the ratio between the changes observed in protein carbonylation (by oxy-blots) and protein amounts (silver stained gels) for each specific protein and represent the relative increase in oxidative damage in *Δyfh1* for each protein analyzed under the different growth conditions.

**Fig 4. Specific activities of carbonylated enzymes in *Δyfh1* yeast cells are recovered by metal treatment.** Wild type (white bars) and *Δyfh1* cells (grey bars) were grown in YPG supplemented or not with 50 μM MnCl<sub>2</sub> and/or 5 μM CuSO<sub>4</sub>. Enzymatic activities of pyruvate kinase and phosphoglycerate kinase were measured in whole cell extracts. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase was measured in mitochondrial preparations from wild type and *Δyfh1* cells, and the activity found in *Δyfh1* mitochondria was corrected considering the relative amount of mitochondrial porin present in each preparation (detected by western blot). Data are represented as mean ± standard deviation from three independent experiments. Combined copper and manganese treatment provided a significant protection of the three enzymatic activities. Copper alone provided a significant protection to cytosolic enzymatic activities but failed to protect F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase (\* p<0.05, \*\* p<0.01).

**Fig. 5 Specific activities of mitochondrial FeS-enzymes in *Δyfh1* yeast cells are not recovered by copper treatment.** Wild type (white bars) and *Δyfh1* cells (grey bars) were grown in YPG media supplemented or not with 50 μM MnCl<sub>2</sub> and/or 5 μM CuSO<sub>4</sub>. Enzymatic activities were measured in whole cell extracts. Data are represented as mean ± standard deviation from three independent experiments. Combined copper and manganese treatment provided a significant protection of succinate dehydrogenase but not of aconitase. Copper alone did not protect any of these enzymes (\* p<0.05, \*\* p<0.01).

**Fig. 6 Effect of menadione, copper and manganese on the generation time of wild type and *Δyfh1* cells.** Wild type (black markers) and *Δyfh1* cells (white markers) were grown in 24-well plates in YPG media containing the indicated amount of CuSO<sub>4</sub> (A) or MnCl<sub>2</sub> (B) and stressed by 2.5 μM menadione (square markers) or non stressed (triangles). Generation time was calculated for each condition as explained under experimental procedures. Data are represented as mean ± confidence intervals from six independent cultures.

**Fig. 7. Effect of copper supplementation on pyruvate kinase activity in *Δyfh1* and *Δsod1* cells .** Wild type *Δyfh1*, and *Δsod1* cells were grown in YPD media supplemented with 5 μM CuSO<sub>4</sub> (black bars) or without supplementation (grey bars) and pyruvate kinase activity was measured in whole cell extracts. Values are U/mg of total protein. Data are represented as mean ± standard deviation from three independent experiments. A significant protection in pyruvate kinase activity (\*\*p<0.01) was provided by copper treatment in *Δyfh1* cells but not in *Δsod1* cells.

**Fig. 8. Increased levels of chelatable iron in  $\Delta yfh1$  cells.** Wild type  $\Delta yfh1$ , and  $\Delta sod1$  cells were grown in YPD media, washed with SC media and then loaded for 20 minutes with 20  $\mu$ M Phengreen SK diacetate. Images were obtained by confocal microscopy using a 505 nm long pass filter ( $\lambda_{\text{excitation}}$  488 nm). *A-F*, images collected before (*A* to *C*) and 90 seconds after (*D* to *F*) 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 ( $\blacktriangle$ ),  $\Delta yfh1$  ( $\square$ ) or  $\Delta sod1$  ( $\diamond$ ) strains. Basal fluorescence was recorded for 1 minute. An increase in fluorescence was observed after addition of 2 mM 1,10-phenanthroline to the preparation (arrow); *H*, relative levels of chelatable iron (white bars) and total iron content (grey bars) in the three strains analyzed. To obtain the chelatable iron value, the fluorescence recorded before 1,10-phenanthroline addition, was subtracted to that recorded for the same cell 90 seconds after addition of the chelator. A minimum of 30 cells were recorded in each single experiment. Total cell iron was calculated after acid digestion of the cells as described under experimental procedures. Data are represented as mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments.

**Fig 9. Proposed mechanism to explain the role of SOD deficiency in promoting oxidative damage in iron-overload conditions.** For details see text.

## REFERENCES

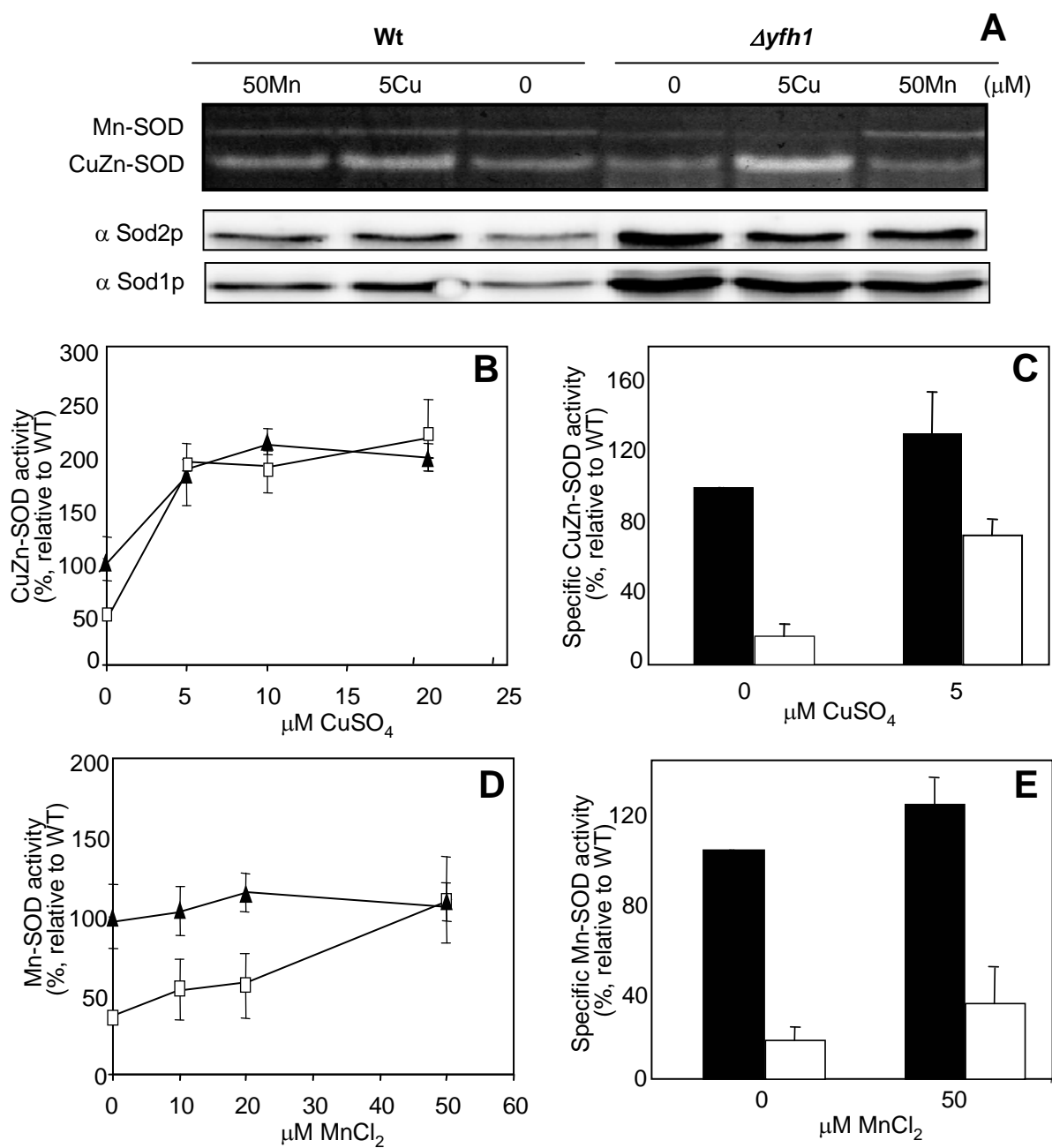
- [1] Fontecave, M.; Pierre, J. L. Iron: metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie* **75**:767-773; 1993.
- [2] De Domenico, I.; McVey Ward, D.; Kaplan, J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:72-81; 2008.
- [3] Eaton, J. 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 ferrototoxic 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*:-; 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. *Biometals* **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*; 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-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.
- [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*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC; 1994.
- [25] Tamarit, J.; Irazusta, V.; Moreno-Cermeno, A.; Ros, J.; Pr. Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Analytical Biochemistry* **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. The Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*; 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] Zadzinski, 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, D. J., 2nd; 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] 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.
- [35] 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.
- [36] 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*; 2008.
- [37] Adinolfi, S.; Iannuzzi, C.; Prischi, 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*; 2009.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Bencze, K. Z.; Yoon, T.; Millan-Pacheco, C.; Bradley, P. B.; Pastor, N.; Cowan, J. A.; Stemmler, T. L. Human frataxin: iron and ferrochelatase binding surface. *Chem Commun (Camb)*:1798-1800; 2007.

Fig. 1



**Fig. 2**

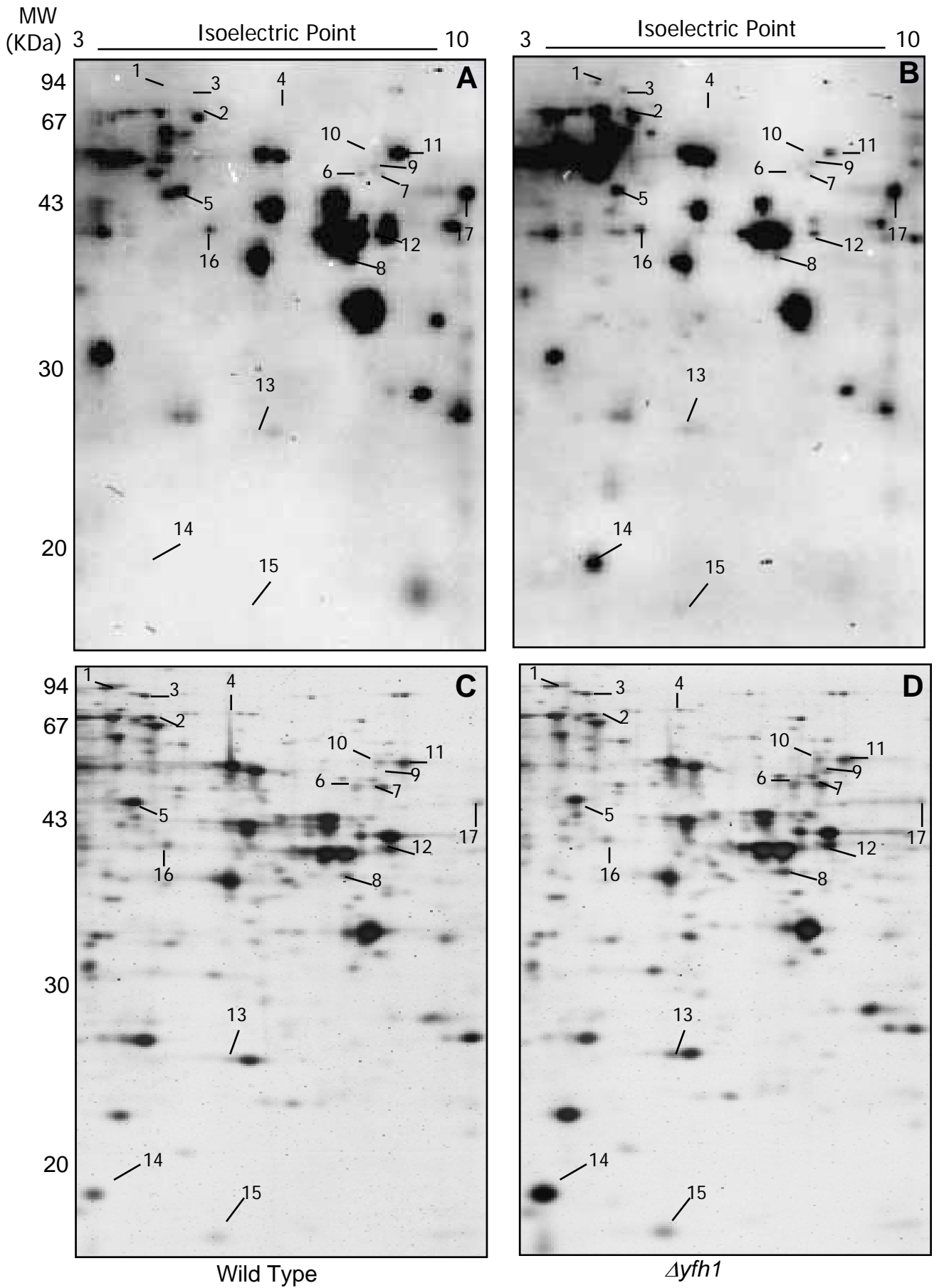


Fig. 3

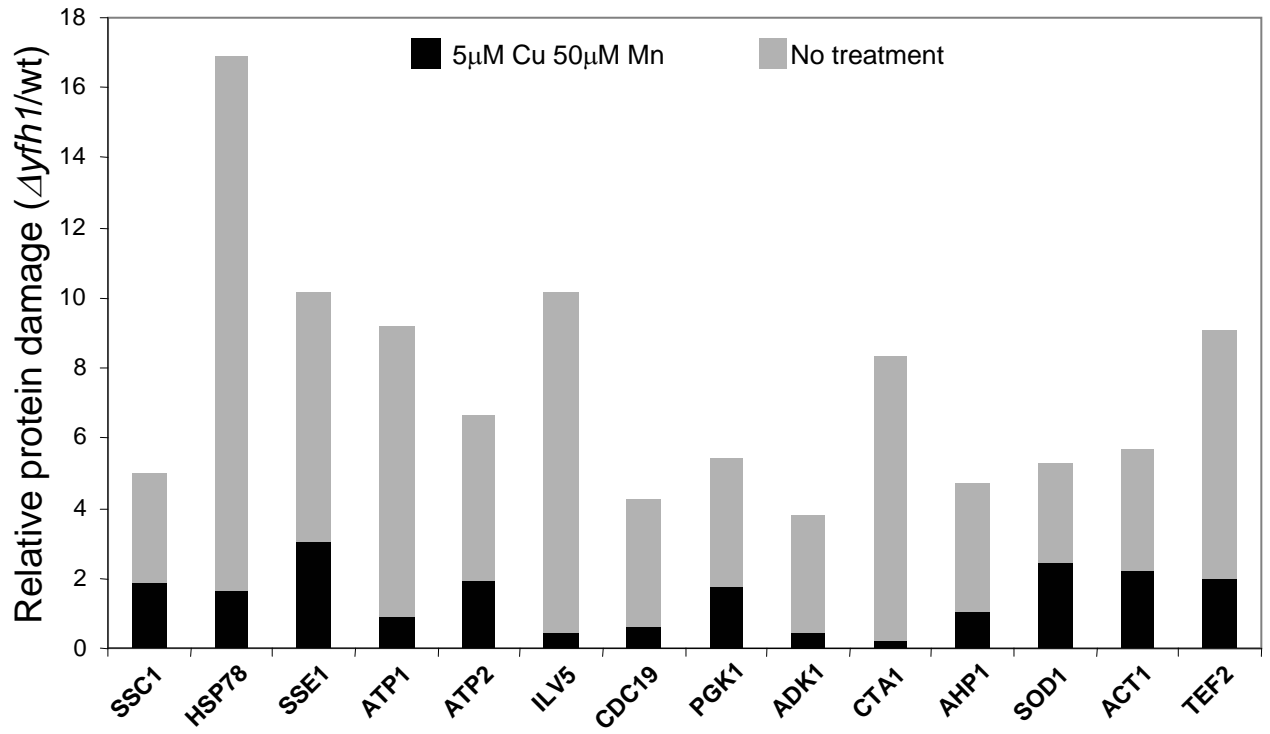


Fig. 4

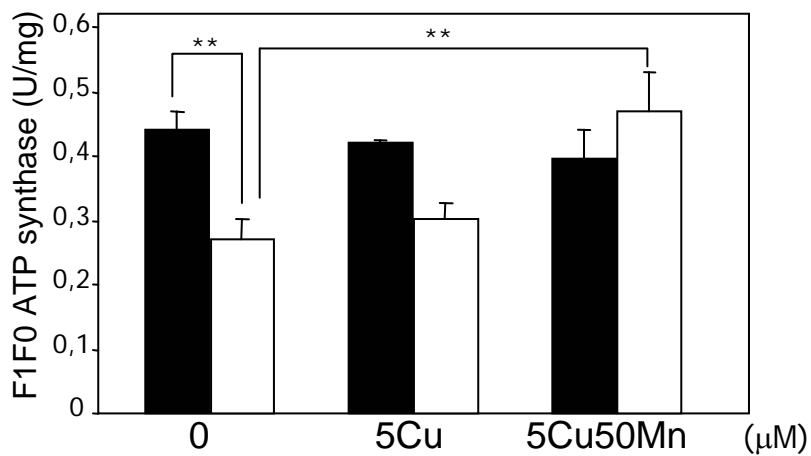
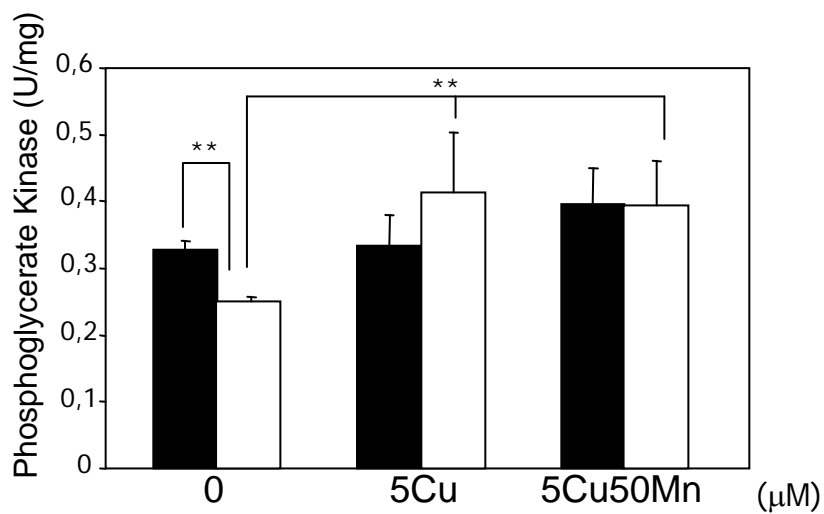
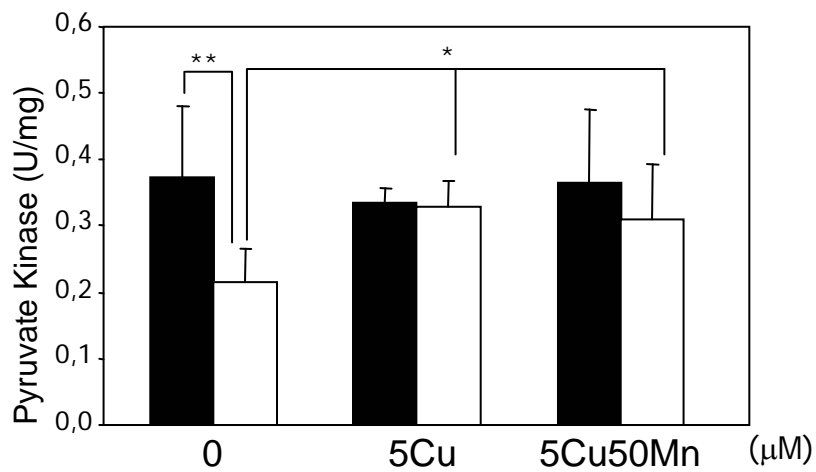


Fig. 5

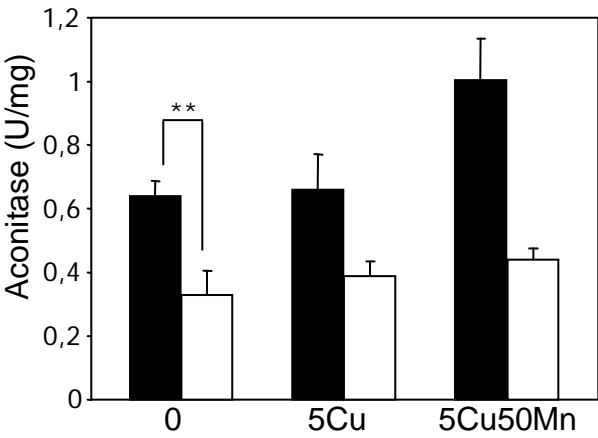
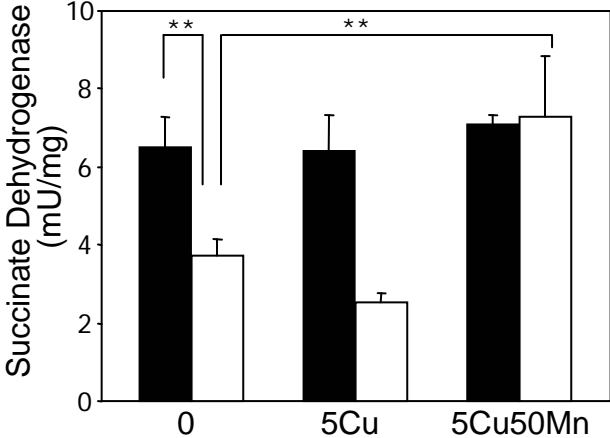


Fig. 6

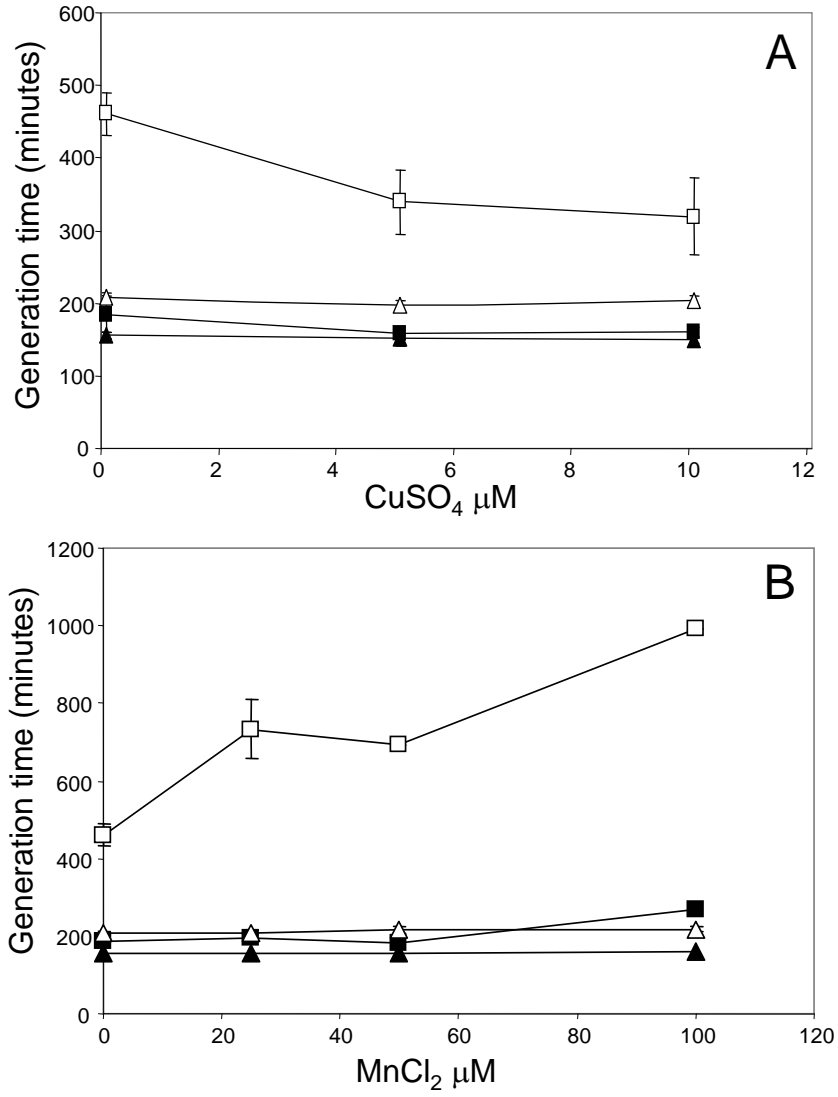




Fig. 7

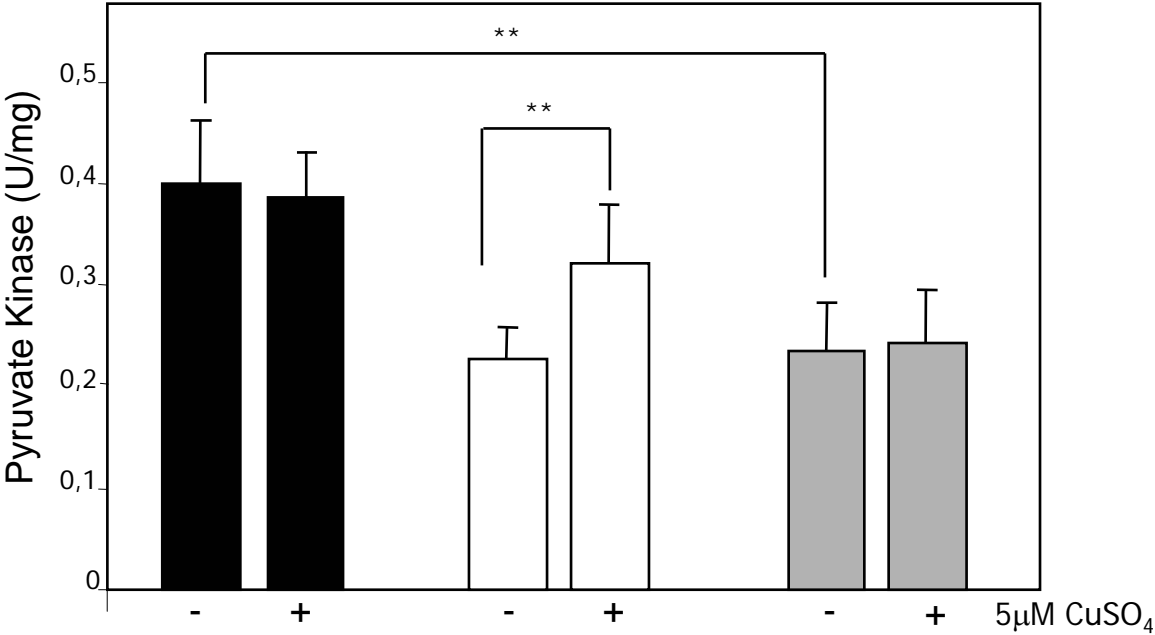


Fig. 8

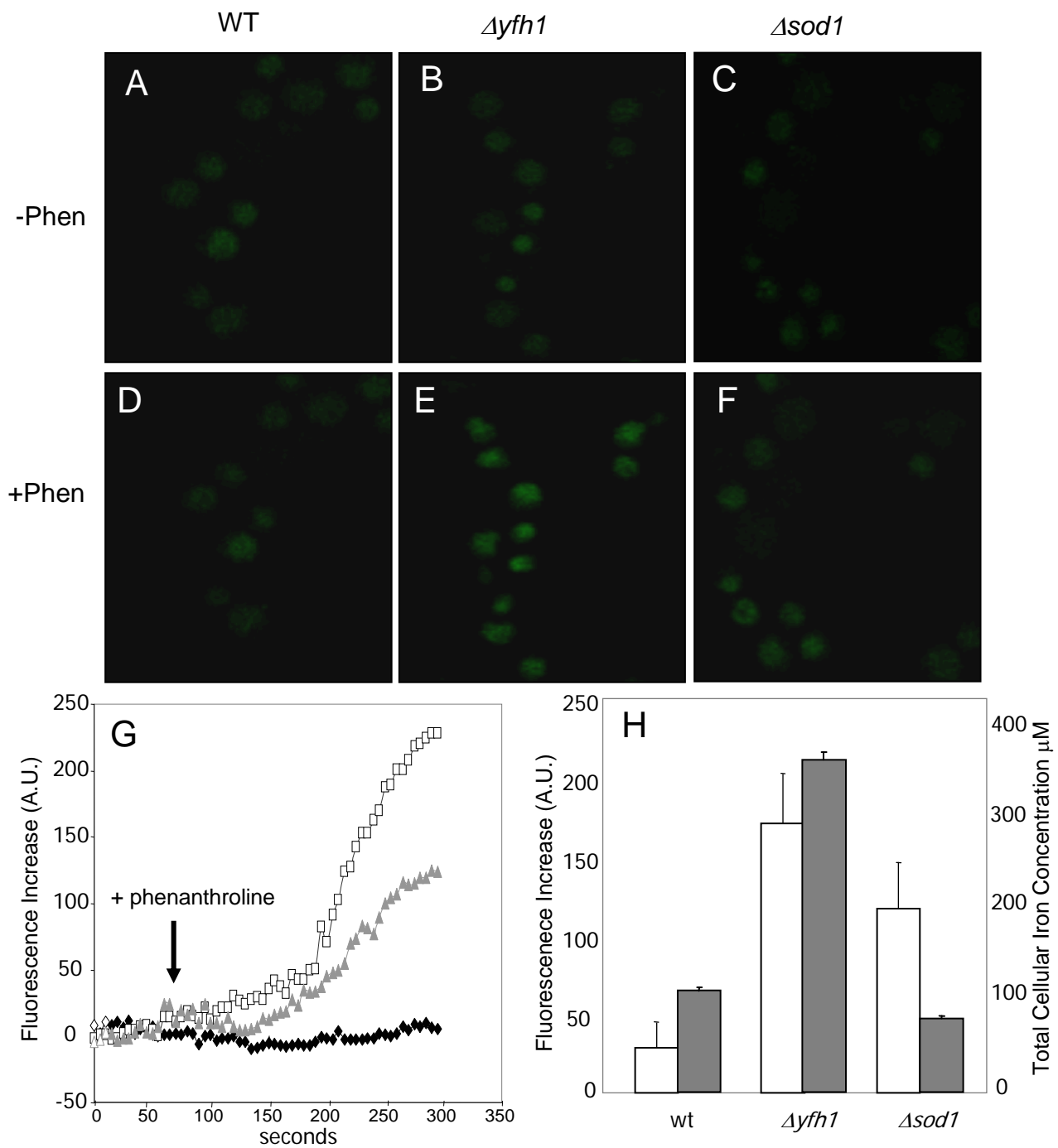


Fig. 9

