



Universitat de Lleida

Estudi de les adaptacions metabòliques derivades del dèficit de frataxina en *Saccharomyces cerevisiae*

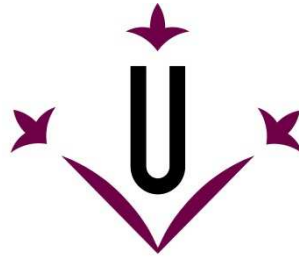
David Alsina Obiols

<http://hdl.handle.net/10803/390945>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

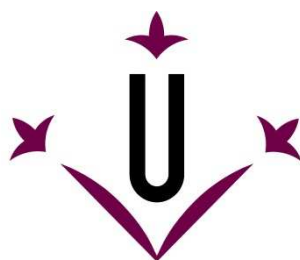


Universitat de Lleida

Estudi de les adaptacions metabòliques
derivades del dèficit de frataxina en
Saccharomyces cerevisiae

David Alsina Obiols

2016



Universitat de Lleida

Estudi de les adaptacions metabòliques
derivades del dèficit de frataxina en
Saccharomyces cerevisiae

David Alsina Obiols
2016

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Memòria per optar al grau de Doctor per la Universitat de
Lleida

Programa de Doctorat en Salut (0906)

Directors de la tesi

Jordi Tamarit i Sumalla

Joaquim Ros i Salvador

Resum – Resumen – Abstract

Resum

L'Atàxia de Friedreich és una malaltia neurodegenerativa que segueix un patró d'herència autosòmic recessiu. La causa de la malaltia és una mutació al gen denominat FRDA que provoca una baixa expressió d'aquest gen i com a conseqüència, els nivells del seu producte, la proteïna frataxina, es troben al voltant del 10-30% en comparació amb individus sans no portadors. Frataxina és una proteïna mitocondrial, altament conservada al llarg de l'evolució, de la qual encara no se'n coneix la funció amb precisió tot i que s'ha suggerit que té relació amb el metabolisme del ferro. L'hipòtesi més acceptada és que frataxina participa en la biosíntesi d'uns cofactors denominats centres Fe-S. Donat que aquesta és una proteïna molt conservada, s'han utilitzat un gran nombre d'organismes com a models d'estudi entre els quals hi ha el llevat *Saccharomyces cerevisiae* on el dèficit de Yfh1, l'homòleg de frataxina en llevat, provoca la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S, hipersensibilitat a estrès oxidatiu i alteracions en el metabolisme del ferro. En treballs previs del grup, es va generar un model condicional de llevat que va permetre establir l'ordre temporal d'aquests fenotips. Es va observar que l'activació del reguló del ferro i l'estrès oxidatiu eren fenotips primaris mentre que la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S es va descriure com un fenotip secundari previ a una aturada del creixement. En aquesta tesi s'ha continuat amb l'anàlisi dels mutants condicionals de llevat en els quals s'ha caracteritzat una adaptació metabòlica a la pèrdua de Yfh1 que està dirigida principalment per les proteïnes Adr1 i Cth2. En primer lloc, s'observa la inactivació d'Adr1 a través de la seva relocalització al citosol el que provoca una baixada en els nivells de moltes proteïnes implicades en el metabolisme de fonts de carboni alternatives. Aquesta inactivació també succeeix en mutants de Grx5 i en situacions d'estrès oxidatiu el que apunta a un mecanisme de regulació general en situacions d'estrès oxidatiu. Tanmateix, es va identificar la proteïna Cth2 com la responsable de la pèrdua de les proteïnes amb centres Fe-S. La deleció de Cth2 mantenia l'activitat de les proteïnes amb centres Fe-S tot i la manca de Yfh1, el que posa en dubte que frataxina tingui un paper essencial en la biosíntesi d'aquests cofactors. Tant la inactivació d'Adr1 com l'activació de Cth2 són els principals responsables de l'aturada en el creixement observada prèviament. Altres efectes que porten a aquesta aturada poden ser el dany oxidatiu produït per l'increment

en la producció de ROS juntament amb l'acumulació de ferro provocada per l'activitat d'Aft1 i les seves dianes.

Per altra banda, es va analitzar l'implicació de la proteïna Yhb1 (*Yeast flavoHemoglobin 1*), en els fenotips observats, i es va observar que la seva deleció impedeix l'activació del reguló del ferro en absència de Yfh1. Aquest fenotip és conseqüència de l'augment en els nivells intracel·lulars d'òxid nítric que fan que les soques deficientes en *YHB1* siguin més resistents a l'estrès oxidatiu, que es creu que és el responsable de l'activació d'Aft1.

Conjuntament, els resultats obtinguts en aquesta tesi posen de relleu la importància de l'estrès oxidatiu i de les espècies reactives de l'oxigen en els mutants deficientes en Yfh1 i suggereixen que una alteració en els mecanismes de control o detecció de ROS pot portar a les alteracions observades tant en el metabolisme energètic com en el metabolisme del ferro.

Resumen

La Ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa que sigue un patrón de herencia autosómico recesivo. La causa de la enfermedad es una mutación en el gen denominado FRDA que provoca una baja expresión de este gen y como consecuencia, los niveles de su producto, la proteína frataxina, se encuentran alrededor de un 10-30% en comparación con individuos sanos no portadores. Frataxina es una proteína mitocondrial altamente conservada a lo largo de la evolución, de la cual no se conoce su función con precisión aunque se ha sugerido que guarda relación con el metabolismo del hierro. La hipótesis más aceptada es que frataxina participa en la biosíntesis de unos cofactores denominados centros Fe-S. Ya que esta es una proteína muy conservada, se han utilizado un gran número de organismos como modelos de estudio entre los cuales se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae* donde el déficit de Yfh1, la proteína homóloga de frataxina en levadura, provoca la pérdida de proteínas con centros Fe-S, hipersensibilidad a estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo del hierro. En trabajos previos del grupo, se generó un modelo condicional de levadura que permitió establecer el orden temporal de estos fenotipos. Se observó que la activación del regulón del hierro y el estrés oxidativo eran fenotipos primarios, mientras que la pérdida de proteínas con centros hierro azufre se describió como un fenotipo secundario previo a una parada en el crecimiento. En esta tesis se ha seguido con el análisis de los mutantes condicionales de levadura en los cuales se ha caracterizado una adaptación metabólica a la pérdida de Yfh1 dirigida principalmente por las proteínas Adr1 y Cth2. En primer lugar, se observa la inactivación de Adr1 a través de su relocalización al citosol, lo que provoca un descenso en los niveles de muchas proteínas implicadas en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas. Esta inactivación también sucede en mutantes de Grx5 y en situaciones de estrés oxidativo, resultados que apuntan a un mecanismo de regulación general ante este tipo de estrés. Asimismo, se identificó la proteína Cth2 como la responsable de la pérdida de las proteínas que contienen centros Fe-S. La mutación de Cth2 mantenía la actividad de las proteínas con centros Fe-S a pesar de no tener Yfh1, lo que pone en duda el papel esencial de frataxina en la biosíntesis de estos cofactores. Tanto la inactivación de Adr1 como la activación de Cth2 son los principales responsables de la parada en el

crecimiento observada anteriormente. Otros efectos que pueden llevar a esta parada son el daño oxidativo producido por el incremento en la producción de ROS junto con la acumulación de hierro provocada por la actividad de la proteína Aft1 y de sus dianas.

Por otro lado, se analizó la implicación de la proteína Yhb1 (*Yeast flavoHemoglobin 1*) en los fenotipos observados, y se observó que la mutación de esta proteína impide la activación del regulón del hierro en ausencia de Yfh1. Este fenotipo es consecuencia del aumento en los niveles intracelulares de óxido nítrico que hacen que las cepas deficientes en *YHB1* sean más resistentes al estrés oxidativo, que se cree que es el responsable de la activación de Aft1.

Conjuntamente, los resultados obtenidos en esta tesis ponen de relieve la importancia del estrés oxidativo y de las especies reactivas del oxígeno en los mutantes deficientes en Yfh1 y sugieren que una alteración en los mecanismos de control o detección de ROS puede llevar a las alteraciones observadas tanto en el metabolismo energético como en el metabolismo del hierro.

Abstract

Friedreich ataxia is a neurodegenerative disease with an autosomal recessive inheritance. The cause of the disease is a mutation in the FRDA gene that leads to a decreased expression and consequently the levels of its product, the protein frataxin, are around 10-30% compared to non-affected individuals. Frataxin is a mitochondrial protein that is highly conserved among evolution and its function is not precisely known although it was suggested that is related to iron metabolism. The most accepted hypothesis is that frataxin is involved in the biosynthesis of the cofactors known as iron-sulfur clusters. As it is a highly conserved protein, many organisms have been used as models like the yeast *Saccharomyces cerevisiae* where the lack of Yfh1, the Yeast Frataxin Homolog, induce the loss of iron-sulfur proteins, hypersensitivity to oxidative stress and alterations in iron metabolism. In previous work of the group a new yeast conditional model was created, and that model allowed them to classify the different phenotypes in a time-dependent fashion. The activation of the iron regulon and oxidative stress were classified as primary phenotypes whereas the loss of iron-sulfur containing proteins was classified as a secondary phenotype previous to growth arrest. In this thesis we followed with the analysis of the yeast conditional Yfh1 mutants in which we have observed a metabolic remodeling triggered by the proteins Adr1 and Cth2. First we observed the inactivation of Adr1 through its relocalization to the cytosol which triggered a decrease in the protein levels of many genes involved in alternative carbon source metabolism. Such inactivation also occurs in Grx5 mutants and under oxidative stress conditions. These results points to a general regulatory mechanism under oxidative stress conditions. Moreover, Cth2 protein was identified as the responsible for iron sulfur protein loss. The deletion of *CTH2* maintained the activity of the Iron-sulfur proteins although Yfh1 was also reduced. These results questioned the essential role defined for frataxin in Fe-S cluster biosynthesis. The inactivation of Adr1 and the activation of Cth2 are the main causes that promote growth arrest. Other effects such as oxidative damage due to an increase in ROS production and iron accumulation due to the increased activity of Aft1 and its targets may also be involved in growth arrest.

On the other hand, we analyzed the role that plays Yhb1 (Yeast flavoHemoglobin 1) in the observed phenotypes, and we observed that the deletion of this gene impairs the activation of the iron regulon in the absence of frataxin. This phenotype is due to the increase in nitric oxide levels that promote a higher resistance of *YHB1* deficient strains to oxidative stress. Thus, is believed that Aft1 activation may be dependent on the increase of ROS.

Altogether, the results obtained in this thesis highlight the relevance of the oxidative stress and the reactive oxygen species in Yfh1 deficient mutants, and suggest that an alteration of control mechanisms or ROS sensing may lead to the observed alterations in the energetic metabolism and also in the iron metabolism.

Agraïments

I finalment... això ja està aquí!! Tenia moltes ganes de començar aquest apartadet perquè és molta gent la que m'ha ajudat durant aquests 4-5 anys des que vaig aterrar al laboratori de bioquímica per fer el màster i posteriorment el doctorat, així que espero no deixar-me a ningú.

En primer lloc, als meus directors, el Jordi i el Kim. Al Kim per oferir-nos la possibilitat de quedar-nos als que estudiàvem aquí, a la Universitat de Lleida, de formar part del seu grup. Per la confiança, per totes les tardes de "brain-storming" de les quals encara conservo aquells complicats esquemes (hem sembla que els emmarcaré i tot!), per tots els consells i frases lapidàries que et feien rumiar una mica més i trobar nous camins amb els que no havies pensat. Al Jordi, perquè si a dia d'avui sóc aquí en gran part és gràcies a ell. Per tots els consells, per aguantar totes les meves visites al despatx i sempre tenir temps per atendre els meus dubtes. Per tot el que m'ha ensenyat aquests anys a nivells científic, pels debats interessantíssims a l'hora del cafè, i un llarg etc. mil gràcies.

A la resta del laboratori de Bioquímica de l'estrès oxidatiu als que encara hi són i els que hi varen ser anys enrere. A l'Elisa, per tots els consells científics i per estar disposada sempre a donar un cop de mà. A l'Armando per ajudar-me en els inicis i per fotrem alguna que altra bronca que en el seu moment hem va venir força bé. A la Maria José, per tots els consells, suggeriments, debats i festes de disfresses a la seva terrassa. A la Stef que tot i que sembles una noia seria era un trosset de pa. A la Roser per tot el seu suport i per tots els cafès a mig matí que servien per desconectar una mica. Menció especial per les nenes (alies xoricets): Èlia, Núria, Rosa i Celia. A la Èlia, que tot i que al principi no parlàvem massa...has estat per mi, per davant de tot, una amiga. Per aquests cigarrets i passejos que donaven la volta a l'Arnau en moments crítics, per totes les cervesetes quan feia falta (i quan no també), per tots els moments que hem passat a diferents congressos, tal com vas dir tu mateixa per compartir les penúries del ferro!. A la Núria per tots aquests anys, per totes les estones que hem passat i que sempre s'han fet més amenes amb aquestes frases lapidàries tant típiques teves. A la Rosita i a la Cèlia, pel suport d'aquests últims anys, per totes les estones que hem passat: X-doors, sopars, dinars, els cafetonets que no s'acaben mai, cerveses, els cotilleos, pels carnivals, les excursions a port aventura... To Saravanan, because you have been a very good friend, for your details, your calls every birthday and our philosophic talks. To Ambika for your smile and your

Agraïments

nice words every day. A la resta del laboratori de BQ, Ana, Rosa, Elena, Fabien, Sandra i a tots els estudiants que han anat passant aquests anys dels que sempre n'aprens alguna coseta.

A les noies de proteòmica; a la Isu, per tota la ajuda tècnica quan l'he necessitat; i la Maria Alba per aquest riure i aquesta alegria que contagia per allà on passa. Al grup de BML, a l'Enric Herrero per tots els seus consells, preguntes als seminaris, per estar sempre disponible a donar un cop de mà i a resoldre dubtes; a la resta del grup per tota la seva ajuda a nivell tècnic durant aquests anys com les classes de micromanipulador (perdoneu per les agulles trencades!). A la resta de gent del IRB que sempre han estat disponibles per a qualsevol cosa en especial als de la tercera planta, CYCs i FPMs. Menció especial als futboleros Dani, Javi, Jose, Omar, Paolo, etc. Als amics d'aquí, amb els que tantes estones hem compartit, Nati, Isidre, Tania, Pau i Maria. Gràcies per totes les partides a la bolera, sopars, excursions per Aigües Tortes, per la visita a Siurana, per moltes altres coses però en especial pel vostre suport d'aquests últims mesos, per interessar-vos per mi i animar-me en moments de dificultat.

A la Marta, no se el que faria sense tu. Perquè ja són molts anys junts, passant per moments bons i altres que no tant, però tu sempre m'has animat a tirar endavant i m'has donat suport, inclòs estant lluny d'aquí. Per tots els detalls que tens dia rere dia, perquè només tu pots convertir un dia horrorós en un bon dia. Per això tinc molt clar que si avui sóc aquí és també gràcies a tu.

A tots els que han format part de l'equip Ibersending-Medicina. Perquè des que hi vaig entrar m'he sentit molt bé amb tots i vaig recuperar una mica del que havia perdut al deixar el futbol. Per totes les estones bones i els ànims en les dolentes (quin penal!). Gràcies a l'Asier que hem va introduir a l'equip i que sempre ha estat un gran amic tot i que ara sigui lluny. Gràcies, Jaume, als Guilles, Jose, Berni, Xisco, Fer, Dani, Sam, Àlex, Jorge, Isma, Miguel. Menció especial pel senyor Villu i als "mostros": Enrique, el tio més subjectiu que he conegut parlant de futbol (por cierto Torres selección!), al Ramón, a

superQuini i al David, per totes les xerrades que hem tingut aquest any anant cap al camp i pels sopars de futbol3.

Al consell de savis, Noel, Adrià, Javi, Nekane, Raul, Albert, Lucia per seguir units després de la carrera tot i que cadascú estigui a llocs diferents.

Finalment vull agrair a la meva família tot el suport d'aquests anys, no només aquests últims de tesi sinó des que vaig marxar de casa per començar a estudiar aquí a Lleida. En especial a les persones més lluitadores i treballadores que conec, els meus pares. Gràcies per tot, per confiar en mi i per ajudar-me sempre que ho he necessitat al llarg d'aquesta pila d'anys. Gràcies a la resta de la família Eva, Sandra, Dani, Miquel, Iaia, a la tia Esther (la tia preferida), Cristina, Mireia, Montserrat. No hem vull deixar als peques, Ariadna, Laia, Marc i Xavi que sempre hem treuen un somriure amb les seves ocurrències.

Mil gràcies a tots !

Índex

Abreviatures	1
Introducció	5
1. L'Atàxia de Friedreich	7
1.1. Frataxina, una proteïna ancestral	10
1.2. Funció de Frataxina	12
1.2.1. Emmagatzematge de Ferro	12
1.2.2. Control de l'estrès oxidatiu i la generació de ROS	14
1.2.3. Frataxina a la cadena de transport electrònic	15
1.2.4. Frataxina en la biosíntesi de grups hemo i centres Fe-S	15
1.3. Models per a l'estudi de frataxina i l'Atàxia de Friedreich	18
1.3.1. Models cel·lulars	19
1.3.2. Models pluricel·lulars	22
2. El metabolisme del Ferro en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.1. Biosíntesi de centres Fe-S	26
2.1.1. Síntesis <i>de novo</i> de centres 2Fe-2S sobre Isu1	26
2.1.2. Transferència dels clústers a les apo-proteïnes receptores	27
2.1.3. Maquinària de síntesi citosòlica (CIA)	29
2.2. Regulació transcripcional del metabolisme del ferro: els regulons YAP5 i AFT1	31
2.2.1. El reguló YAP5	32
2.2.2. El reguló del ferro o reguló AFT1	34
2.2.2.1. Sistemes de captació de ferro	35
2.2.2.2. Remodelació metabòlica en situacions de dèficit de ferro	36
2.2.2.3. Regulació de Aft1	38
2.1. Paral·lismes amb el metabolisme del ferro d'eucariotes superiors	40
3. El metabolisme energètic de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.1. Metabolisme respiratori	42
3.1.1. L'AMPK en llevat: Snf1	43
3.1.2. El factor transcripcional Adr1	45
3.1.3. El factor transcripcional Cat8	47
4. L'estrès oxidatiu	47
4.1. Generació de les espècies reactives de l'oxigen (ROS)	48
4.1. Propietats de les diferents ROS	49
4.2. Defenses antioxidants	51
4.2.1. Superòxid dismutases (SODs)	54
4.2.2. Catalases	54

Índex

4.2.3.	Peroxidases	55
4.2.4.	Sistema glutaredoxina	56
4.2.4.1.	Les GRX diotiòliques	57
4.2.4.2.	Les GRX monotiòliques	58
4.2.5.	Altres sistemes enzimàtics de reparació del dany oxidatiu	60
4.3.	<i>Redox signaling</i> , les espècies reactives de l'oxigen com a senyalitzadors	61
Objectius		65
Materials i Mètodes		69
1. Microorganismes i condicions de cultiu		71
1.1.	Soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilitzades i condicions de creixement	71
1.2.	Mesura del temps de generació	73
1.3.	Assajos de viabilitat	74
1.4.	Creixement de bacteris (<i>Escherichia coli</i>)	74
2. Mètodes d'anàlisi de proteïnes		75
2.1.	Obtenció d'extractes proteics	75
2.2.	Quantificació d'extractes proteics	75
2.3.	Mètodes electroforètics	75
2.3.1.	SDS-PAGE	75
2.3.2.	Electroforesi Bidimensional	78
2.3.2.1.	Primera Dimensió: Isoelectroenfoc	80
2.3.2.2.	Segona Dimensió: SDS-PAGE	81
2.4.	Immunodetecció de Proteïnes, <i>Western Blot</i>	82
2.5.	Mètodes de Tinció de Proteïnes	84
2.6.	Proteòmica Dirigida mitjançant MRM (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)	86
2.6.1.	Obtenció d'extractes	86
2.6.2.	Digestió en solució	86
2.6.3.	Purificació en columna C18	87
2.6.4.	Anàlisi per espectrometria de masses	88
3. Mètodes de Biologia Molecular		90
3.1.	Electroforesi d'àcids nucleics	90
3.2.	Transformació de bacteris	91
3.3.	Purificació de DNA plasmídic	91
3.4.	Amplificació de DNA plasmídic	91
3.5.	Transformació de Llevats	92
3.6.	Creuament de soques i esporulació	93

3.7.	Colony PCR	95
3.8.	Anàlisi de l'expressió gènica	97
3.8.1.	Extracció de RNA total	97
3.8.2.	Transcripció reversa i producció de DNA codificant (cDNA)	97
3.8.3.	PCR quantitativa o a temps real (RT-PCR)	99
4.	Mesura de Ferro intracel·lular	99
5.	Activitats enzimàtiques	100
5.1.	Aconitasa	100
5.2.	Activitat peroxidasa lligada a grups Hemo	101
5.2.1.	Citocrom C	101
5.2.2.	Yhb1	102
6.	Microscòpia de fluorescència	102
6.1.	Anàlisi de proteïnes marcades amb GFP	103
6.2.	Tinció nuclear amb DAPI	103
7.	Mètodes fluorimètrics	104
7.1.	Mesura de la producció de Superòxid (DHE)	104
7.2.	Mesura de la producció d'Òxid Nítric (DAF-FM DA)	105
8.	Mètodes estadístics	105
Resultats		107
CAPÍTOL 1: Estudi de la remodelació metabòlica en cèl·lules deficientes en YFH1 i de la implicació de Adr1 i Cth2		
1.	Anàlisi proteòmica de la deficiència de Yfh1	111
1.1.	Validació de dianes	118
2.	Estudi del factor transcripcional Adr1	120
2.1.	Canvis en els nivells de proteïna i la localització d'Adr1 després de la repressió de frataxina	120
2.2.	Estudi de Adr1 en mutants <i>GRX5</i>	125
2.3.	Anàlisi de l'efecte de diferents estressos sobre Adr1	126
3.	Estudi de la implicació de CTH2 en la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S	128
3.1.	Estudi de la influència de CTH2 en la reducció de la velocitat de creixement	134
3.2.	Impacte de la deleció de CTH2 en el metabolisme del ferro	136

CAPÍTOL 2: Estudi de la Flavohemoglobina de llevat YHB1 en deficiència de Frataxina i la seva relació amb el Metabolisme del Ferro	139
1. Inducció de YHB1 en absència de Frataxina	141
2. Relació entre Yhb1 i l'activació del reguló del ferro	144
2.1. Mesura de la producció de espècies reactives de l'oxigen i d'òxid nítric	147
2.2. Regulació de la localització d'Aft1 en condicions d'estrès oxidatiu	151
CAPÍTOL 3: Anàlisi per proteòmica dirigida (MRM) de diferents dianes afectades en els mutants de frataxina	155
1. Selecció de dianes, rang dinàmic	157
2. Estudi de proteòmica dirigida en les soques BQS201 i BQS255	161
Discussió	169
1. Adaptació metabòlica en absència de Yfh1: el paper d'Adr1 i Cth2	171
1.1. La inactivació d'Adr1: un mecanisme de resposta front l'estrès oxidatiu?	172
1.2. Cth2, la baula perduda: Frataxina no és essencial en la biosíntesi de centres Fe-S	174
2. L'activació d'Aft1 en absència de frataxina, una via dependent de <i>redox signaling</i> ?	176
2.1. L'estrès oxidatiu en la fisiopatologia de l'Atàxia de Friedreich	179
3. Sobre la funció de Frataxina, podem parlar d'una proteïna <i>moon-lightning</i> ?	180
Conclusions	185
Bibliografia	191
Articles publicats	213

Abreviatures

2-DE	Electroforesi Bidimensional	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
3-NT	3- Nitrotirosina		
3'-UTR	<i>3'- Untranslated Region</i>	IAM	Iodoacetamida
5'-UTR	<i>5'- Untranslated Region</i>	IEF	Isoelectroenfoc
ACN	Acetonitril	iHDAC	Inhibidors de Histones
ADP	Adenosina 5'-difosfat		Desacetilases
ARE	<i>AU Rich Elements</i>	IPG	<i>Immobilized pH Gradient</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfat	iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
BPS	Bathophenanthroline disulfonic acid	IRE	<i>Iron Responsive Elements</i>
CBB	<i>Comassie Brilliant Blue</i>	IRP	<i>Iron Response Protein</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate	LB	Medi Luria-Bertani
CIA	<i>Cytosolic Iron-Sulfur cluster Assembly machinery</i>	MD	Menadiona
DAF-FM DA	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate	MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
DAPI	2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride,	mRNA	RNA missatger
DHE	<i>Dihydroethidium</i>	NADH	Nicotina Adenina dinucleòtid
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	NADPH	Nicotina Adenina dinucleòtid Fosfat
DNA	Àcid desoxiribonucleic	NO	Òxid nítric
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i>	OD600	Densitat òptica a 600nm
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	ONOO⁻	Peroxinitrit
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid,	pb	Parells de bases
FAD	Flavina adenina-dinucleòtid	PBS	Tampó fosfat salí
FRDA	Atàxia de Friedreich	PEG	Polietilenglicol
Fxn	Frataxina	PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	RET	<i>Reverse Electron Transfer</i>
GSH	Glutatió reduït	RHB	Tampó de rehidratació
GSSG	Glutatió oxidat	RNA	Àcid ribonucleic
		RNS	Espècies Reactives del Nitrogen
		ROS	Espècies Reactives del Oxigen
		SC	Medi Sintètic Complert
		SDS	<i>Sodium Dodecyl sulfate</i>

Abreviatures

TAE	Tampó Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tampó Tris Salí - Tween 20
TCA	Àcid Tricloroacètic
TE	Tris-EDTA
TFA	Àcid Trifluoroacètic
tRNA	RNA de transferència
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>
YPD	Medi Ric (<i>Yeast extract- Peptone-Dextrose</i>)
YPG	Medi Ric (<i>Yeast extract- Peptone-Glycerol</i>)

Introducció

1. L'Atàxia de Friedreich

L'Atàxia de Friedreich és una malaltia neurodegenerativa descrita a finals del segle XIX pel metge alemany Nikolaus Friedreich de qui va adquirir-ne el nom. Friedreich va observar en un grup de pacients que durant la pubertat es començaven a manifestar una sèrie de símptomes característics, concretament: atàxia, disàrtria, pèrdues de sensibilitat, debilitat muscular, escoliosis, peu buit (*pes cavus*) i símptomes cardíacs. Posteriorment també s'ha descrit una major incidència en diabetis que en la resta de població. Es considera una malaltia rara que segueix un patró d'herència autosòmic recessiu. La freqüència de portadors oscil·la, depenent de la zona, entre 1:50 i 1:100, mentre que els afectats per la malaltia són aproximadament 1:50.000, el que converteix aquesta malaltia en la forma d'atàxia hereditària més comú.

La mutació responsable de la malaltia és una expansió de triplets GAA en el primer intró del gen *FRDA* o *X25*, al cromosoma 9, que codifica per la proteïna mitocondrial frataxina (Campuzano et al., 1996). Aquesta expansió de triplets, que en pacients pot arribar a tenir fins a més de 1000 còpies, produeix una davallada en els nivells de proteïna frataxina fins a un 5-30% dels nivells normals (Campuzano et al., 1997). El nombre d'expansions GAA té una relació inversament proporcional amb l'edat on es comencen a manifestar els primers símptomes de la malaltia i també en determina la severitat dels mateixos (Filla et al., 1996; Isnard et al., 1997; McDaniel et al. 2001).

Tot i que no està del tot clar el mecanisme pel qual l'expansió de triplets afecta l'expressió de frataxina, existeixen diverses hipòtesis. En primer lloc, diferents estudis van suggerir que aquestes expansions formarien una triple hèlix de DNA que impediria la correcta transcripció de frataxina (Bidichandani et al. 1998; Ohshima et al. 1998). Posteriorment, es va descriure el mecanisme pel qual es formaria aquesta triple hèlix. En un estudi dut a terme per Grabcyk i Usdin, es va descriure com a mesura que la RNA polimerasa avança a través de l'expansió de triplets GAA es va generant un superenrotllament en el DNA que frena l'activitat de la RNA polimerasa. Aquest superenrotllament provoca que poc a poc la RNA polimerasa es vagi frenant, i al mateix

temps es formaria aquesta triple hèlix de DNA. El pre-mRNA transcrit fins al moment estabilitzaria la cadena de DNA restant (Grabczyk & Usdin, 2000) (Figura 1B).

Finalment, també s'ha suggerit que l'expansió de triplets, juntament amb els mecanismes suggerits anteriorment, provoca una compactació de la cromatina el que fa impossible la transcripció de frataxina. En aquest sentit, s'ha observat que amb tractaments amb inhibidors de les Histones Deacetilases (iHDAC) és possible incrementar els nivells de transcrit de frataxina, resultats que donen suport a aquesta hipòtesi i que més a més tenen un ampli potencial terapèutic (Herman et al., 2006).

Si bé l'expansió de triplets en homozigosi és responsable d'aproximadament un 96% dels casos, hi ha un petit percentatge, el 4% restant, on l'expansió de triplets GAA es troba en heterozigosi. En aquests casos l'al·lel que conserva un nombre normal de repeticions GAA presenta mutacions puntuals que sovint produeixen canvis d'aminoàcid a la proteïna frataxina. Els canvis descrits fins al moment, poden afectar a la interacció de frataxina amb altres proteïnes o bé afectar a l'estabilitat de la mateixa (Galea et al., 2016).

Frataxina és una proteïna mitocondrial i com a tal té un pèptid senyal en el seu extrem N-terminal. Ben aviat es va identificar, tant per Yfh1 com per la frataxina de ratolí, que la peptidasa MPP- β (de l'anglès, *Mitochondrial Processing Peptidase*) interaccionava amb frataxina i era la responsable del seu processament (Koutnikova et al., 1998; Branda et al., 1999). Aquest processament comporta dos talls seqüencials en l'estructura de frataxina per la mateixa peptidasa, el que genera en primer lloc una forma intermediària de frataxina i posteriorment la forma madura. Els llocs de tall canònics descrits són entre els aminoàcids 41-42 i entre els aminoàcids 80-81 per a la frataxina humana, tot i que s'han identificat altres formes menys abundants que correspondrien a llocs de tall alternatius (Figura 3). En aquests mateixos treballs, es va demostrar que la forma madura de frataxina (aa 81-210) és totalment activa i capaç de millorar la supervivència i els fenotips de cèl·lules deficientes en frataxina (Condò et al., 2007; Schmucker et al., 2008).

Tot i la demostració que la forma m81-210 és la forma activa i actua al mitocondri, existeix cert debat sobre el paper que podria desenvolupar la forma intermediària. En primer lloc es va demostrar que el processament de la forma intermediària és més lent que el de la forma precursora, el que suggeria que aquest podria ser un mecanisme de control dels nivells de frataxina madura (Cavadini et al., 2000). Més recentment, s'ha suggerit que les diferents formes de frataxina juguen diferents papers en la funció de frataxina com podria ser en la biosíntesi de centres Fe-S (Gakh et al., 2010).

A banda del processament post-transcripcional, també s'han observat mecanismes de *splicing* alternatiu que poden donar lloc a diferents isoformes de frataxina. Segons un estudi recent, aquestes formes alternatives tenen diferents funcions i localitzacions i a més semblen ser específiques de teixit (Xia et al., 2012). Tot i això, no existeixen a dia d'avui suficients evidències de la rellevància d'aquestes formes alternatives.

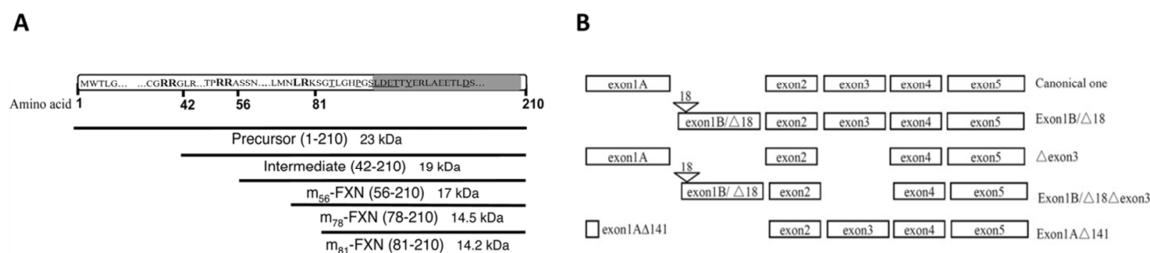


Figura 3. Isoformes de frataxina. A) Frataxina es processa en l'import al mitocondri en dos talls successius donant lloc a una forma intermediària (42-210) i posteriorment a la forma madura (81-210) tot i que s'han detectat formes madures alternatives (m56 i m72) (Schmucker et al., 2008). B) Isoformes de frataxina generades per *splicing* alternatiu (Xia et al., 2012). Algunes d'aquestes isoformes no presentarien l'exò 3 i/o modificacions en l'exò 1.

1.2. Funció de Frataxina

Vint anys d'estudi després del seu descobriment com la responsable de l'Atàxia de Friedreich (Campuzano et al., 1996), la funció concreta de frataxina a la cèl·lula segueix essent una incògnita tot i que ben aviat, utilitzant el llevat *Saccharomyces cerevisiae* com a model d'estudi, es va establir que frataxina tenia una relació amb el metabolisme del ferro al mitocondri (Babcock et al., 1997).

Al llarg d'aquests anys s'han proposat diferents funcions per a frataxina, les quals giren principalment al voltant del metabolisme del ferro i el control de l'estrès oxidatiu al mitocondri.

1.2.1. Emmagatzematge de Ferro

Una de les funcions que s'ha proposat per frataxina és que aquesta podria funcionar com una xaperona i emmagatzemadora de ferro. En treballs realitzats principalment pel grup de la Dra. Isaya, es va observar que frataxina tenia l'habilitat d'interaccionar amb àtoms de ferro en el seu estat d'oxidació Fe²⁺ *in vitro*. Aquesta interacció entre ferro i frataxina, li permetria actuar donant ferro a diferents processos mitocondrials (Figura 4). A més, a unes relacions frataxina-ferro molt concretes, el ferro provocava la seva oligomerització

fins a formar uns complexos d'alt pes molecular (850-1100 KDa) que emmagatzemaven ferro al seu interior (Adamec et al., 2000; Cavadini et al., 2002; Schagerlöf et al., 2008). Aquestes estructures recordaven a les mateixes que forma la proteïna ferritina, la principal proteïna encarregada de l'emmagatzematge de ferro en eucariotes superiors, així que es va proposar que frataxina podria actuar com una ferritina mitocondrial. Tot i que aquesta funció seria redundant en eucariotes superiors ja que ja existeix una ferritina mitocondrial, aquesta hipòtesi va adquirir certa força quan en estudis posteriors es va demostrar que l'expressió d'aquesta ferritina mitocondrial en llevats deficients en frataxina era capaç de recuperar parcialment alguns dels fenotips observats. Concretament, l'expressió de la ferritina mitocondrial reduïa l'acumulació de ferro parcialment ja que aquestes cèl·lules seguien contenint uns nivells de ferro dues vegades superiors a la soca salvatge; les cèl·lules eren més resistents a agents oxidants i es recuperaven parcialment les activitats d'enzims amb centres Fe-S (Campanella et al., 2004).

Malgrat aquestes evidències, estudis més recents han demostrat que frataxina no actuaria com una proteïna de emmagatzematge de ferro *in vivo*. Concretament, en un estudi realitzat a l'any 2010 on es va utilitzar *Saccharomyces cerevisiae* com a model es va demostrar que tot i alterar les relacions frataxina – ferro a través de modular l'expressió de frataxina, afegir ferro de forma exògena o bé en mutants que acumulen aquest metall; no semblava que frataxina actués com una ferritina (Seguin et al., 2010). Per altra banda els aminoàcids responsables d'aquesta unió es localitzen en una zona concreta de la proteïna formant una superfície àcida, força conservada, diferent dels motius d'unió a ferro canònics on s'hi solen trobar aminoàcids de cisteïna i/o histidina. Aquesta zona d'unió resulta en una unió electrostàtica dèbil i inespecífica del ferro ja que permet també la unió d'altres metalls divalents (revisat a Pastore & Puccio, 2013).

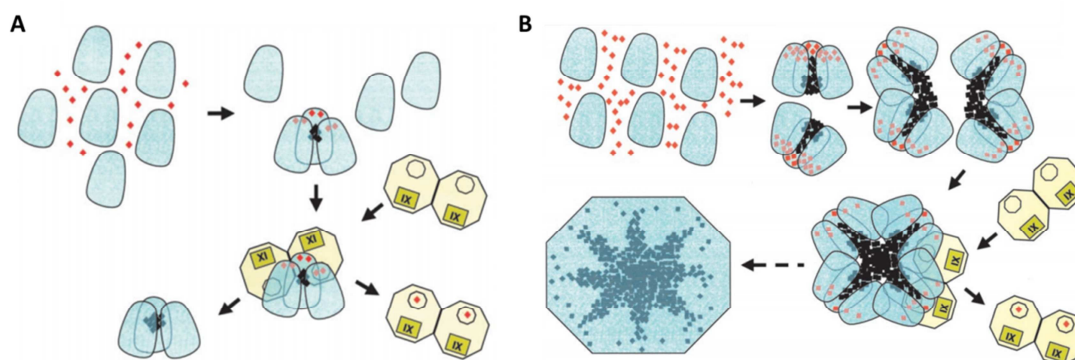


Figura 4. Frataxina com a xaperona i emmagatzemadora de ferro. Donat que frataxina pot interaccionar amb àtoms de ferro a través de la zona àcida de la seva seqüència, s'ha proposat que podria actuar com a xaperona de ferro. A) En condicions de baixa concentració de ferro frataxina funcionaria formant trímers i podria actuar donant ferro a diferents processos mitocondrials com la biosíntesis de grups hemo. B) Quan augmenten els nivells de ferro, els trímers de frataxina poden associar-se entre ells per formar grans oligòmers que oxidarien el ferro i l'emmagatzemarien a l'interior evitant-ne així la toxicitat de forma semblant al que faria una ferritina (Park et al., 2003).

1.2.2. Control de l'estrès oxidatiu i la generació de ROS

Un dels fenotips característics de la deficiència de frataxina en molts dels models d'estudi utilitzats és la sensibilitat a agents oxidants, el que revela una situació d'estrès oxidatiu en aquestes cèl·lules (Babcock et al., 1997; Gabrielli et al., 2012; Obis et al., 2014; Vázquez-Manrique et al., 2006; Wong et al., 1999). Donat que frataxina té l'habilitat d'interaccionar i d'alguna manera actuar com a quelant de Fe^{2+} , un metall altament actiu a nivell redox, es va proposar que frataxina podria regular l'estrès oxidatiu a través de limitar la biodisponibilitat de ferro. Per tant, a través de la unió i la posterior oxidació dels àtoms de Fe^{2+} a Fe^{3+} per part de frataxina s'evitaria la formació de noves espècies reactives de l'oxigen a través de la reacció de Fenton ja que frataxina evitaria que hi hagués Fe^{2+} lliure (O'Neill et al. 2005; Gakh et al. 2006). En suport d'aquesta hipòtesi, cal apuntar que s'ha demostrat que molts dels fenotips observats en deficiència de frataxina, incloent-hi la pèrdua d'enzims amb centres Fe-S, pot recuperar-se a través de reduir l'estrès oxidatiu ja sigui afegint quelants de ferro per reduir la disponibilitat d'aquest metall i així la reacció de Fenton, o bé afegint Mn^{2+} per a millorar l'activitat superòxid

dismutasa (Irazusta et al., 2006; Wong et al., 1999). En altres experiments realitzats en *Drosophila melanogaster*, també s'ha demostrat que les mosques deficientes en frataxina són hipersensibles a peròxid d'hidrogen, i que la sobreexpressió d'enzims antioxidants com catalasa i la peroxiredoxina mitocondrial en milloren la supervivència (Anderson et al., 2008).

1.2.3. Frataxina a la cadena de transport electrònic

A fi de definir la funció de frataxina a la cèl·lula s'han realitzat nombrosos estudis d'interacció. En un d'aquests estudis realitzat també en *S. cerevisiae*, es varen identificar diverses interaccions de frataxina amb proteïnes de la cadena de transport electrònic. Entre les proteïnes identificades, varen aparèixer les proteïnes Sdh1 i Sdh2 les quals són membres del complex II de la cadena de transport electrònic, així com Ypr004c (homòloga de la ETF- α) i Ygr207c (homòloga de la proteïna ETF- β) també implicades en la transferència d'electrons a la ubiquinona mitocondrial (González-Cabo et al., 2005). Aquestes interaccions per tant, suggerien que frataxina podria jugar algun paper a la cadena de transport electrònic. Tot i aquest estudi, el rol de frataxina en aquest procés no està clar i altres estudis on s'ha analitzat la composició dels supercomplexes mitocondrials no s'ha arribat a verificar la presència de frataxina en les condicions analitzades (Lapiente-Brun et al., 2013), el que indicaria que la interacció de frataxina amb la cadena de transport electrònic és una interacció dèbil un fet que suggeriria un paper secundari d'aquesta proteïna.

1.2.4. Frataxina en la biosíntesi de grups hemo i centres Fe-S

Finalment, també s'ha proposat que frataxina podria participar en la biosíntesi tant de grups hemo com de centres Fe-S com a donador de ferro. Aquesta hipòtesi té diversos fonaments: a) el dèficit de frataxina provoca una pèrdua d'activitat de proteïnes que contenen centres Fe-S i també grups hemo; b) frataxina té la capacitat d'interaccionar

amb àtoms de ferro; c) diversos estudis han mostrat l'habilitat de frataxina per interaccionar amb la ferroquelatasa, l'últim enzim en la biosíntesi de grups hemo i encarregat d'introduir el ferro a la protoporfirina IX. També s'han mostrat interaccions amb les proteïnes que formen el complex principal de la biosíntesi de centres Fe-S com són Isu1 i la desulfurasa Nfs1.

Biosíntesi de grups hemo

La incorporació de l'àtom de ferro a la protoporfirina IX és l'últim pas en la biosíntesi de grups hemo. Aquest pas està catalitzat per l'enzim ferroquelatasa, però no està massa clar com obté l'àtom de ferro o qui li proporciona ja que el Fe^{2+} no circula lliure per la cèl·lula. En estudis *in vitro*, es va demostrar que existia una interacció física entre frataxina i ferroquelatasa amb una estequiometria 1 a 2 el qual sembla lògic ja que ferroquelatasa funciona com un dímer. A més, aquesta interacció donava lloc a la formació de grups hemo amb el qual es donava suport a la hipòtesi de que frataxina actuava com a donador de ferro per a la síntesi de grups hemo (T. Yoon & Cowan, 2004). Al mateix temps, un estudi en el qual es varen combinar estudis estructurals i estudis bioinformàtics va suggerir les zones entre les que frataxina i ferroquelatasa podrien interaccionar, en les quals apareixia la superfície àcida de frataxina responsable de la unió amb àtoms de ferro (He et al. 2004). Aquests resultats, juntament amb la pèrdua d'activitat d'enzims que contenen grups hemo en absència de frataxina, donen suport a la hipòtesi de frataxina com a donador de ferro en la biosíntesi de grups hemo. En un estudi molt recent, s'ha aprofundit en aquesta funció i s'ha caracteritzat el complex que formarien la ferroquelatasa juntament amb frataxina (Soderberg et al., 2016).

Biosíntesi de centres Fe-S

A més d'interaccionar amb ferroquelatasa, frataxina també interacciona amb les proteïnes que formen la maquinària central de biosíntesi de centres Fe-S, concretament amb les proteïnes Isu1, Nfs1, i Isd11. Aquesta interacció, facilita la incorporació de ferro sobre Isu1, la proteïna bastida on es sintetitzen els clústers Fe-S, el que va suggerir en un principi que frataxina podria actuar com a donador de ferro també en la biosíntesi d'aquests centres (Gerber et al., 2003). No obstant, si frataxina fos una proteïna essencial en aquest procés la pèrdua de les proteïnes que contenen centres ferro-sofre hauria de ser el fenotip principal en models de deficiència de frataxina però diferents estudis, tan en llevat com en eucariotes superiors, han mostrat que aquest seria un fenotip secundari (Irazusta et al., 2006; Moreno-Cermeño et al., 2010; Navarro et al., 2015; Obis et al., 2014)

Recentment, s'ha suggerit que frataxina participaria en la biosíntesi de centres Fe-S com a regulador al·lostèric i no com a donador de ferro de forma que el seu paper en el procés no seria essencial. En treballs realitzats *in vitro* amb la proteïna CyaY (homòloga bacteriana de frataxina), es va demostrar que aquesta tenia un efecte inhibidor sobre la producció de centres Fe-S. Aquest efecte s'incrementa a més concentració de ferro en el que els autors van descriure com una regulació per a adaptar la producció d'aquests cofactors al nombre d'acceptors finals (Adinolfi et al., 2009). Per contra, estudis realitzats amb les proteïnes humanes varen demostrar que frataxina tindria un efecte estimulador en la producció de centres Fe-S a través d'afavorir l'activitat de la desulfurasa (Bridwell-Rabb et al., 2014; Tsai & Barondeau, 2010).

Avui en dia, tot i l'intens debat generat al voltant de la funció o funcions de frataxina, aquesta activitat no essencial en el metabolisme del ferro com a regulador al·lostèric de la biosíntesi de centres Fe-S és la més acceptada i a través de la qual es podrien explicar la gran majoria de fenotips observats en pacients i en els diferents models d'estudi, tot i que no es descarta que frataxina pugui desenvolupar més d'una funció.

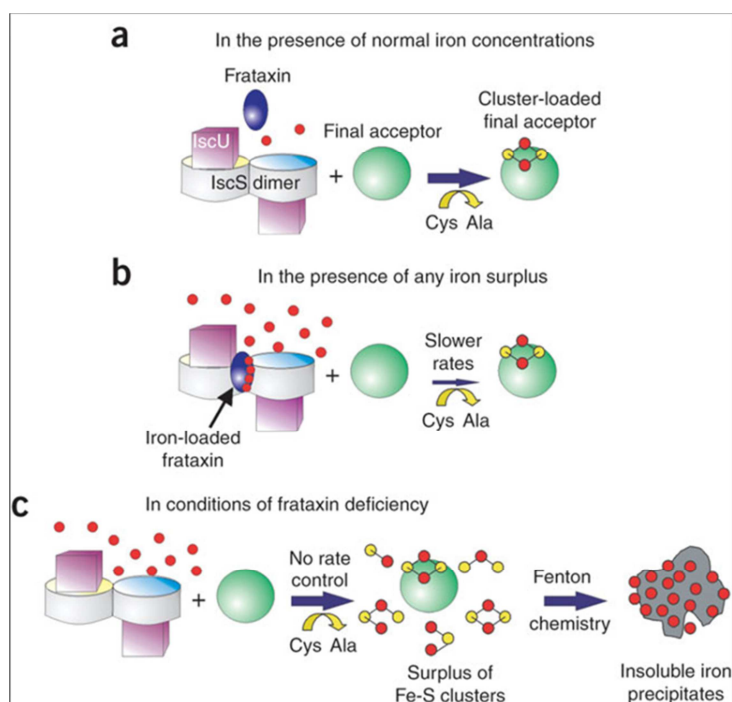


Figura 5. Mecanisme de regulació al·lostèrica de frataxina en la biosíntesi de centres Fe-S. a) En condicions normals frataxina té una unió dèbil amb la maquinària de biosíntesi de centres Fe-S permetent que aquests es produeixin d'acord amb el nombre d'acceptors finals. B) Quan els nivells de ferro són elevats, frataxina s'uneix de forma depenent de ferro a aquesta maquinària de biosíntesi i modula l'activitat de la desulfurasa. C) En absència de frataxina l'activitat no es controla i dona lloc a una generació excessiva i deficient de clústers que donarà lloc a estrès oxidatiu i a l'acumulació de ferro (Adinolfi et al., 2009).

1.3. Models per a l'estudi de frataxina i l'Atàxia de Friedreich

Al llarg dels anys s'han generat diferents models per a l'estudi de la funció de frataxina i els fenotips derivats del seu dèficit. Entre aquests, podem trobar models cel·lulars que van des dels llevats *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, fins a models obtinguts a partir de cèl·lules de pacients; i també models pluricel·lulars tant d'organismes invertebrats com diferents models de ratolí.

1.3.1. Models cel·lulars

El llevat com model

Els primers estudis adreçats a identificar la possible funció de frataxina es varen realitzar utilitzant el llevat *S. cerevisiae* com model d'estudi donat l'alt grau de conservació en la proteïna frataxina. En aquest primer estudi, es va identificar la proteïna Yfh1 com l'homòloga de frataxina en llevat i se'n varen estudiar els fenotips a nivell cel·lular derivats del seu dèficit. Es va identificar Yfh1 com una proteïna mitocondrial, i es va observar que el seu dèficit provocava un augment dels sistemes de captació de ferro amb la conseqüent acumulació d'aquest metall principalment al mitocondri. Alhora, les cèl·lules deficientes en Yfh1 presentaven una hipersensibilitat a agents oxidants com el peròxid d'hidrogen (Babcock et al., 1997). En estudis posteriors es va observar que les cèl·lules deficientes en Yfh1 perdien activitat de proteïnes amb centres Fe-S i la respiració cel·lular es veia compromesa ja que existia un fort dany sobre el DNA mitocondrial (Rötig et al., 1997; Wilson & Roof, 1997). Estudis de complementació posteriors realitzats en *Saccharomyces cerevisiae*, varen demostrar que l'expressió de la frataxina humana en llevats deficientes en Yfh1, l'homòleg de frataxina en llevat, aconseguia restaurar els fenotips observats en aquests mutants (Cavadini et al., 2000) el que demostraria que la funció de frataxina també està conservada.

Utilitzant aquests mutants, s'ha pogut descriure la importància que té l'estrès oxidatiu en absència de frataxina sobre la resta de fenotips. En aquest sentit, estudis previs del nostre grup van demostrar que en deficiència de Yfh1 hi havia una pèrdua d'activitat de les superòxid dismutases deguda a una deficient assimilació de manganés. La simple addició de Mn^{2+} al medi provocava una disminució en la carbonilació de proteïnes i una recuperació d'activitat de molts enzims afectats entre els quals enzims amb centres Fe-S (Irazusta et al., 2010, 2006).

Per altra banda, també s'ha realitzat un estudi utilitzant el llevat de fissió *Schizosaccharomyces pombe*. En aquest estudi liderat per la Dra. Hidalgo, es va identificar l'homòleg de frataxina en *S. pombe* i posteriorment se'n varen analitzar els fenotips

derivats del seu dèficit. Entre ells, es van identificar fenotips comuns amb els mutants de *S. cerevisiae*: sensibilitat a agents oxidants, acumulació de ferro, un menor consum d'oxigen i un descens en l'activitat de l'enzim aconitasa (Gabrielli et al., 2012).

Tot i els nombrosos i valuosos resultats obtinguts, la utilització dels mutants nuls $\Delta yfh1$ i també del mutant $\Delta pfh1$ de *S. pombe*, genera un problema capital i es la pèrdua de la cronologia dels fenotips, és a dir, no només és important saber quins fenotips tenen lloc en deficiència de frataxina sinó que és important identificar quin és o quins són els fenotips primaris entre tots ells (Pastore & Adinolfi, 2014). En el cas dels mutants $\Delta yfh1$ la identificació d'aquest fenotip es fa difícil donada l'alta relació que guarden entre si els tres fenotips principals identificats en absència de frataxina: acumulació de ferro, estrès oxidatiu i pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S.

Amb l'objectiu d'adreçar aquest problema, el nostre grup va desenvolupar un nou model condicional de llevat on el gen YFH1 es trobava sota el control del promotor tetO₇ el qual es pot reprimir afegint doxiciclina al medi, una tetraciclina que no té cap efecte sobre el creixement del llevat. Gràcies a aquest model es va poder establir un ordre en els fenotips observats prèviament, i es van identificar com a fenotips primaris la inducció dels sistemes de captació de ferro i d'enzims antioxidants; mentre que com a fenotips secundaris apareixia el descens, tant en activitat com en els nivells de proteïna, de proteïnes que contenen centres Fe-S (Moreno-Cermeño et al., 2010).

Models cel·lulars d'eucariotes superiors

Tot i la gran utilitat dels llevats, per a entendre millor els processos fisiològics que tenen lloc en absència de frataxina en els pacients s'han generat diferents models cel·lulars de mamífers. En aquest sentit, podem diferenciar entre aquells models en que s'indueix la deficiència de frataxina per RNA d'interferència en cultius primaris de cèl·lules diferenciades com les neurones dels ganglis de l'arrel dorsal (DRGs) o miòcits cardíacs i els models basats en l'ús de cèl·lules de pacients.

Respecte els primers, recentment, el nostre grup ha generat dos models basats en cultius primaris de DRGs i miòcits cardíacs de rata i interferència de frataxina amb vectors lentivirals. En el cas dels miòcits cardíacs es van identificar com a fenotips primaris de la deficiència de frataxina una alteració de la xarxa mitocondrial, una acumulació de gotes lipídiques a les cèl·lules i major sensibilitat a agents oxidants. No obstant, no es varen observar alteracions en el metabolisme del ferro ni en els enzims que contenen centres Fe-S com Aconitasa, el que apuntaria a que aquests fenotips serien un fenotip secundari igual que s'havia observat en els llevats (Obis et al., 2014). Pel que fa a les DRGs, aquest model va permetre caracteritzar el procés de neurodegeneració i mort apoptòtica d'aquestes cèl·lules que té el seu origen en una alteració de la homeòstasi del calci, un fet que va permetre obrir noves perspectives terapèutiques (Mincheva-Tasheva et al., 2014).

Un altre dels teixits més afectats en la malaltia és el pàncreas, el que deriva en una major incidència en diabetis en els pacients amb Atàxia de Friedreich que en la resta de la població. Per estudiar els efectes derivats del dèficit de frataxina en les cèl·lules β pancreàtiques, també es va establir un model cel·lular amb RNA d'interferència (Cnop et al., 2012). En aquest treball, on es van utilitzar cèl·lules β pancreàtiques de rata i es va baixar l'expressió de frataxina amb RNA d'interferència, es va identificar una menor secreció d'insulina en les cèl·lules interferides així com una major sensibilitat a diferents agents estressants que provocaven la mort per apoptosi, resultats que explicarien perquè els pacients d'atàxia de Friedreich tenen una major incidència en diabetis.

Per altra banda, s'han utilitzat múltiples models cel·lulars a través de la utilització de cèl·lules provinents de pacients d'Atàxia de Friedreich. A partir de limfòcits i fibroblasts s'han pogut obtenir diferents línies cel·lulars immortalitzades comercials les quals s'han utilitzat sovint per a comprovar resultats obtinguts amb altres models com per exemple en llevat (Bulteau et al., 2012).

A banda d'aquestes línies cel·lulars i a través de protocols de reprogramació genètica s'han aconseguit obtenir cèl·lules mare pluripotents induïdes de pacients (iPSC, de l'anglès *induced pluripotent stem cell*) (Ku et al., 2010). Posteriorment, aquestes cèl·lules es poden diferenciar en el tipus cel·lular d'interès, i de fet s'han realitzat amb relatiu èxit

diferenciacions a miòcits cardíacs i neurones (Hick et al., 2013). Aquests models són altament interessants donat que conserven les expansions GAA originàries dels pacients, si bé amb alguna diferència com a conseqüència de la inestabilitat de les repeticions, i permeten testar no tant sols compostos potencialment terapèutics per a revertir els fenotips observats sinó que també permeten testar compostos destinats a incrementar els nivells de frataxina a través de l'increment dels nivells d'expressió, estabilització del mRNA o altres mecanismes.

1.3.2. Models pluricel·lulars

Models invertebrats

A fi d'analitzar la deficiència de frataxina en sistemes més complexes, s'han generat models d'estudi en *Drosophila melanogaster* i també en *Caenorhabditis elegans*.

En el cas dels models de mosca, a grans trets consisteixen en l'expressió d'un RNA de interferència contra el gen *dfh* (de l'anglès, *Drosophila Frataxin Homolog*) (Cañizares et al., 2000). És important en aquest model modular els nivells de repressió del gen, donat que una alta repressió dona lloc a letalitat en estadis larvaris, però, si s'obté una repressió que doni lloc a uns nivells d'expressió del 30% respecte als controls, aquestes mosques són viables i representen millor la malaltia. Amb la utilització d'aquest model, es va identificar l'estrès oxidatiu com un component principal dels fenotips observats en les mosques deficientes en *dfh* (Llorens et al., 2007). També s'han identificat problemes metabòlics, concretament en el metabolisme lipídic (Navarro et al., 2010). Aquest models de mosca són molt útils per a testar compostos potencialment terapèutics i així s'ha fet en nombrosos estudis on s'han testat, entre altres compostos, la deferiprona, la idebenona, el blau de metilè i més recentment la rapamicina (Calap-Quintana et al., 2015; Soriano et al., 2013; Tricoire et al., 2014).

Pel que fa als models de *C. elegans*, aquests també es basen en RNA de interferència per a reduir l'expressió de frataxina. Diferents estudis han mostrat diversos fenotips en aquest model entre els quals, tal com s'ha mostrat per altres models de deficiència de frataxina, major sensibilitat a agents oxidants (Vázquez-Manrique et al., 2006; Ventura et al., 2005). Tot i això, els resultats publicats, de forma contrària als obtinguts en altres models, indiquen un menor contingut de lípids, un descens en alguns enzims antioxidants com SOD2 i també una menor producció de ROS (Schiavi et al., 2015). Aquests resultats posen de relleu la dificultat d'obtenir resultats homogenis en els diferents models d'estudi de frataxina per a obtenir una idea més clara de la funció d'aquesta proteïna, donat que la seva deficiència en diferents organismes i en diferents tipus cel·lulars sembla tenir diferents efectes.

Models de ratolí

Amb l'objectiu de generar un model de mamífer per a l'estudi de la deficiència de frataxina a nivell sistèmic, s'han intentat generar diferents models de ratolí. Un problema en la generació d'aquests models és que la deleció total de frataxina provoca letalitat embrionària. Per aquest motiu s'han generat diferents ratolins en els quals s'ha introduït les repeticions GAA al gen de frataxina. Principalment es poden destacar dos models els quals han introduït les repeticions GAA sobre el gen del ratolí, que són el model KIKO (*knock-in – knock-out*) i el KIKI (*knock-in – knock-in*). La diferència entre ambdós models es que el model KIKO té modificat un al·lel amb l'expansió de triplets GAA mentre que l'altre al·lel té una deleció, donant lloc a un fenotip $Fxn^{GAA/-}$. Per altra banda el model KIKI conté als dos al·lells la inserció de de triplets GAA per tant el seu fenotip és $Fxn^{GAA/GAA}$. Entre els models de ratolí que han intentat reproduir la patologia a través de l'expansió de triplets, també trobem els denominats YG8R i YG22R. En aquest cas es van obtenir ratolins KO per *Fxn* que expressen la forma humana de frataxina afectada pels triplets a través de la inserció del gen en un cromosoma artificial de llevat (YAC). Tot i els esforços per obtenir aquests models de Atàxia de Friedreich els tres ratolins citats presenten fenotips molt poc severos que sovint triguen a aparèixer en el temps tot i tenir reduïts els

nivells de frataxina. Donades aquestes circumstàncies, aquests ratolins s'estan utilitzat principalment per a l'anàlisi de compostos que reverteixin el silenciament gènic de frataxina com els iHDAC i altres drogues amb potencial terapèutic.

Finalment, també s'han desenvolupat models condicionals de teixit. Per a construir aquests models es va flanquejar l'exó 4 de frataxina amb les seqüències loxP que són reconegudes per la recombinasa Cre. Acte seguit, aquests ratolins es creuaven amb ratolins que tenien el gen de la recombinasa Cre sota el control de diferents promotors específics per a diferents teixits. D'aquesta manera, es van desenvolupar 4 ratolins: 1 que presentava deficiència de frataxina al teixit cardíac, 2 models neuronals i un últim model on frataxina era deficient al fetge. Aquests ratolins presenten l'avantatge de poder estudiar efectes específics de teixit, però l'inconvenient de no reproduir fidelment l'alteració trobada en els pacients, ja que contràriament al que passa en l'atàxia de Friedreich, els nivells de frataxina d'aquests ratolins són pràcticament nuls en els teixits indicats.

Taula 1. Fenotips dels diferents models de ratolí. Resum d'alguns dels testos realitzats als diferents models de ratolí per a determinar-ne tant fenotips neuronals com cardíacs característics de l'atàxia de Friedreich. MCK = Model condicional cardíac, NSE i PRP models condicionals neuronals. N = test realitzat i no es varen detectar alteracions, S = test realitzat amb alteracions detectades (adaptat de Perdomini et al., 2013).

Test realitzat\Model de ratolí	KIKO/KIKI	YG8R/YG22R	MCK	NSE	PRP
Atàxia cerebel·losa i sensorial					
- Rotarod	N	S	-	-	S
- Petjades	-	-	-	-	S
Defectes sensorials					
- Electromiograma	-	-	-	S	S
Funció cardíaca					
- Ecocardiografia	-	-	S	S	-
Defectes motors					
- Activitat locomotora	-	S	-	-	-
- Test força "grip"	-	S	-	-	N

2. El metabolisme del Ferro en *Saccharomyces cerevisiae*

El ferro és el quart element més abundant a l'escorça terrestre, el que ha provocat que al llarg de l'evolució aquest metall de transició hagi estat utilitzat per un gran nombre d'organismes i avui en dia el ferro és un oligoelement essencial per pràcticament totes les formes de vida. En condicions fisiològiques, podem trobar el ferro en dos estats d'oxidació o estats redox: una forma reduïda i soluble, Fe^{2+} ; o bé en forma oxidada i poc soluble, Fe^{3+} . Aquesta propietat permet que el ferro pugui ser utilitzat en un ampli nombre de reaccions en diferents grups prostètics, com els centres Fe-S o els grups hemo, ja que el potencial redox del parell $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ va des de -300 fins a 700 mV, depenent del lligant al que es trobi unit, un rang que coincideix amb el dels agents oxidants i reductors biològics (revisat a Crichton, 2001). Aquestes reaccions inclouen la cadena de transport d'electrons, el transport d'oxigen o bé la reducció de nucleòtids, pas clau en la síntesi del DNA. Aquestes mateixes característiques que fan del ferro un element molt útil per la cèl·lula també el converteixen en una arma de doble tall. El ferro lliure dins la cèl·lula pot reaccionar amb oxigen donant lloc a espècies reactives de l'oxigen que són altament perjudicials per la cèl·lula donat que poden reaccionar amb diferents macromolècules provocant la seva inactivació. Per aquest motiu, tant la captació, com l'emmagatzematge i la distribució del ferro dins la cèl·lula són processos que han de ser minuciosament controlats.

Un dels elements centrals en la regulació del metabolisme del ferro en un gran nombre d'organismes són els centres Fe-S. La utilització d'aquests centres com a sensors, permet relacionar els nivells de ferro extracel·lulars amb la seva utilització dins la cèl·lula el que permet donar una resposta transcripcional adequada en funció dels nivells de ferro presents al medi (revisat a Outten & Albetel, 2013).

2.1. Biosíntesi de centres Fe-S

Tant en llevats com en bacteris o eucariotes superiors la biosíntesi de centres Fe-S juga un paper central en la regulació del metabolisme del ferro. Aquest és un procés altament conservat al llarg de la evolució i els productes generats en aquesta reacció, els clústers Fe-S, són cofactors essencials per a moltes proteïnes i permeten que moltes reaccions cel·lulars puguin tenir lloc. La biosíntesi de centres Fe-S s'ha estudiat amb un alt nivell de detall utilitzant *S. cerevisiae* com a model el que ha permès entendre millor aquest procés i identificar-ne un gran nombre de proteïnes que en formen part.

La biosíntesi de centres Fe-S té lloc principalment al mitocondri i en podem diferenciar 3 processos principals: a) la biosíntesis dels clústers sobre la proteïna-bastida Isu1, b) la transferència dels clústers a les apo-proteïnes receptores, i c) l'exportació d'un component suposadament format de glutatió i sofre que servirà per generar els clústers per a les proteïnes citosòliques a través de la maquinària citosòlica CIA (de l'anglès, *Cytosolic Iron-sulfur Assembly machinery*) (Lill et al., 2012).

2.1.1. Síntesis *de novo* de centres 2Fe-2S sobre Isu1

El primer pas de la biosíntesi dels centres Fe-S, és la generació d'un clúster 2Fe-2S sobre Isu1 que actua com a proteïna bastida, procés pel que es requereix sofre, ferro i electrons (Figura 6). En primer lloc, Isu1 forma un complex amb les proteïnes Nfs1 i Isd11 les quals s'encarreguen conjuntament de proporcionar el sofre necessari per a la biosíntesi del clúster. Nfs1 és un enzim amb activitat desulfurasa, mentre que Isd11 actua com a proteïna accessòria a la reacció i és indispensable per a l'activitat de Nfs1. Juntes, catalitzen l'obtenció de sofre a partir de l'aminoàcid cisteïna generant com a subproducte alanina i per a la qual es requereix com a cofactor piridoxal fosfat (Mühlenhoff et al., 2004; Wiedemann et al., 2006). El sulfur obtingut forma un persulfid sobre la cisteïna activa de Nfs1 la qual està molt conservada. Acte seguit aquest persulfid es transfereix

sobre una cisteïna de Isu1 formant un nou persulfid. Per a la formació del clúster, el persulfid format sobre les cisteïnes de Isu1 s'ha de reduir a S^{2-} pel que es necessiten electrons. Aquests electrons s'obtenen del NAD(P)H en una reacció catalitzada per un complex format per dues proteïnes: la ferredoxina Yah1 i la ferredoxina reductasa Arh1 (Webert et al., 2014). Finalment, s'incorpora el ferro sobre Isu1 per a la formació final del centre 2Fe-2S que posteriorment serà transferit a les proteïnes receptores. En aquest procés d'incorporació del ferro, s'han identificat els transportadors Mrs3 i Mrs4 com els responsables de l'import de ferro del citosol al mitocondri (Mühlenhoff et al. 2003; Froschauer et al. 2009) però no es sap exactament com aquest metall arriba fins a Isu1. Tot i que s'ha suggerit que frataxina podria ser el donador de ferro en aquest procés donada la seva habilitat d'interaccionar amb àtoms de ferro, aquest paper no està del tot clar. Recentment, s'ha suggerit que frataxina podria actuar com un regulador al·lostèric de la formació de clústers el que suposa que no tindria un paper essencial en aquest procés i per tant l'exclouria com a candidata a ser el donador de ferro (Adinolfi et al., 2009). D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha mostrat com un mutant puntual de Isu1 (M107I) reverteix els fenotips derivats de la manca de frataxina demostrant així que Yfh1 és dispensable per a la biosíntesi dels clústers (Yoon et al., 2012). El mecanisme proposat pel qual aquesta mutació permet prescindir de Yfh1 és precisament una regulació al·lostèrica sobre la desulfurasa Nfs1 produïda per aquesta mutació que seria similar a l'efecte que podria tenir Yfh1 (Pandey et al., 2013).

2.1.2. Transferència dels clústers a les apo-proteïnes receptores

Un cop format el centre 2Fe-2S sobre Isu1, aquest s'ha de transferir sobre les proteïnes receptores. Per a dur a terme aquesta tasca existeixen una sèrie de proteïnes que en primer lloc alliberen el clúster de Isu1 en un procés que requereix ATP. Posteriorment existeixen diferents vies de maduració d'aquests clústers, les quals no es tractaran en aquest apartat, que serveixen tant per a la modificació dels clústers com per a la posterior transferència a proteïnes específiques (Figura 6).

El primer pas en la transferència dels clústers, és la unió de holo-Isu1 a la proteïna Jac1. Aquesta proteïna funciona conjuntament amb Ssq1 una xaperona de la família HSP70 la qual té un domini d'unió a ATP. Per tant, després de la unió de Jac1 amb Isu1, també s'uneix la proteïna Ssq1 unida a ATP. Seguidament, Ssq1 hidrolitza aquest ATP el que provoca una sèrie de canvis de conformació que afecten en primer lloc a la unió de Jac1 a aquest complex, i també a l'estructura de Isu1 (Andrew et al., 2006). Aquest canvi produït sobre Isu1 debilita la seva unió amb el centre 2Fe-2S fent que aquest sigui més accessible. Finalment, la glutarredoxina monotiòlica Grx5 pot accedir al clúster i transferir-lo directament a proteïnes receptores o bé a altres proteïnes que actuen en la transferència i maduració d'aquests centres (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002; Uzarska et al., 2013). Per a que el cicle pugui tornar a començar, un cop s'ha hidrolitzat l'ATP i s'ha trencat la unió amb Jac1, s'uneix al complex format Ssq1-ADP i Isu1 la proteïna Mge1 que canvia l'ADP de Ssq1 per un ATP. Aquest canvi promou un nou canvi de conformació gràcies al qual es trenca el complex i Ssq1-ATP queda lliure per iniciar un nou cicle així com Isu1 queda de nou disponible per a la síntesi de nous clústers.

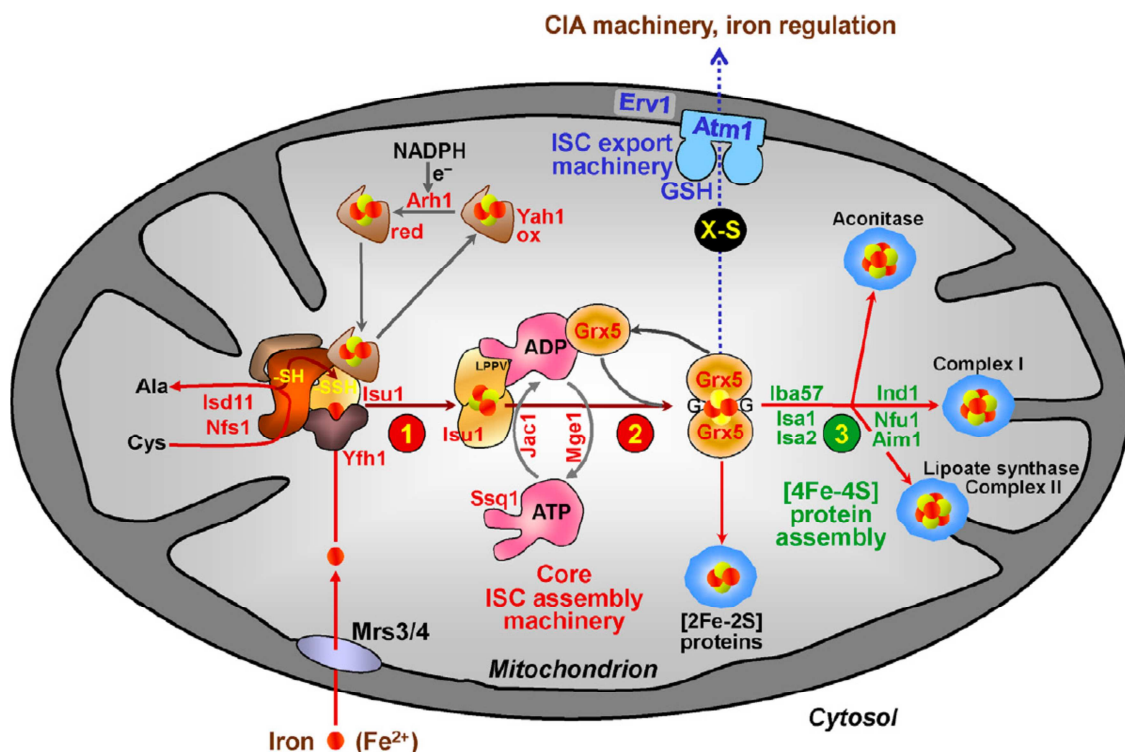


Figura 6. Biosíntesi de centres Fe-S al mitocondri. La biosíntesi de centres Fe-S té lloc al mitocondri i se'n diferencien 3 parts principals. 1) La biosíntesi *de novo* de centres 2Fe-2S sobre Isu1, en aquest procés participen la desulfurasa Nfs1 i la seva proteïna accessòria Lsd11 que aporten el sulfur obtingut a partir de l'aminoàcid cisteïna; els transportadors Mrs3/4 i frataxina que aportarien el ferro; i finalment la ferredoxina i la ferredoxina reductasa (Arh1 i Yah1) aporten els electrons necessaris per al procés. 2) Per a la transferència dels centres des de Isu1 fins a les apo-proteïnes receptores participen les xaperones Jac1 i Ssq1, que catalitzen el pas del centre 2Fe-2S des de Isu1 fins a la proteïna Grx5 en un procés que depèn d'ATP. La proteïna Mge1 intercanvia el ADP resultant de la reacció per ATP podent així començar un nou cicle. 3) Des de Grx5 existeixen tota una sèrie de branques per a la maduració dels diferents clústers (extret de Lill et al., 2015)

2.1.3. Maquinària de síntesi citosòlica (CIA)

La part central de biosíntesi de centres Fe-S i sobre la que giren tots els processos derivats es localitza al mitocondri i per això es requereix una segona maquinària, citosòlica, per a proporcionar els clústers als enzims tant citosòlics com nuclears que els requereixin que depèn de la fracció mitocondrial. Si bé aquest procés no està tant ben caracteritzat com el que té lloc al mitocondri, si que s'han identificat tota una sèrie de proteïnes que hi participen.

Aquesta maquinària citosòlica depèn del transportador Atm1 el qual es creu transporta un compost format per glutatió i algun element més derivat de la biosíntesi dels centres Fe-S al mitocondri. Aquest compost aporta sofre i és el que serveix com a precursor per la síntesi dels clústers al citosol. Aquest compost, denominat sovint X-S, s'uneix a la Grx3 un cop al citosol la qual s'uneix a les proteïnes Nbp35 i Cfd1 que serveixen com a proteïnes bastida. Acte seguit s'incorpora el ferro necessari tot i que se'n desconeixen les proteïnes que hi participen i, igual que passa al mitocondri, també es requereixen electrons que s'obtenen a través de l'oxidació de NAD(P)H per part del complex format per les proteïnes Tah18 i Dre1. Per a la transferència final del clúster a les apo proteïnes receptores s'han identificat fins a 4 proteïnes que participen en aquest procés: Nar1, Cia1, Cia2 i Mms19 (revisat a Lill, Srinivasan, & Mühlhoff, 2014). A banda de la dependència que mostra aquest procés de l'activitat del transportador Atm1, cal destacar que la majoria de les proteïnes implicades en la CIA són proteïnes que contenen centres Fe-S els quals són essencials per a les seves respectives activitats. Aquest fet reforça encara més la unió entre el procés que té lloc al mitocondri i la maquinària citosòlica.

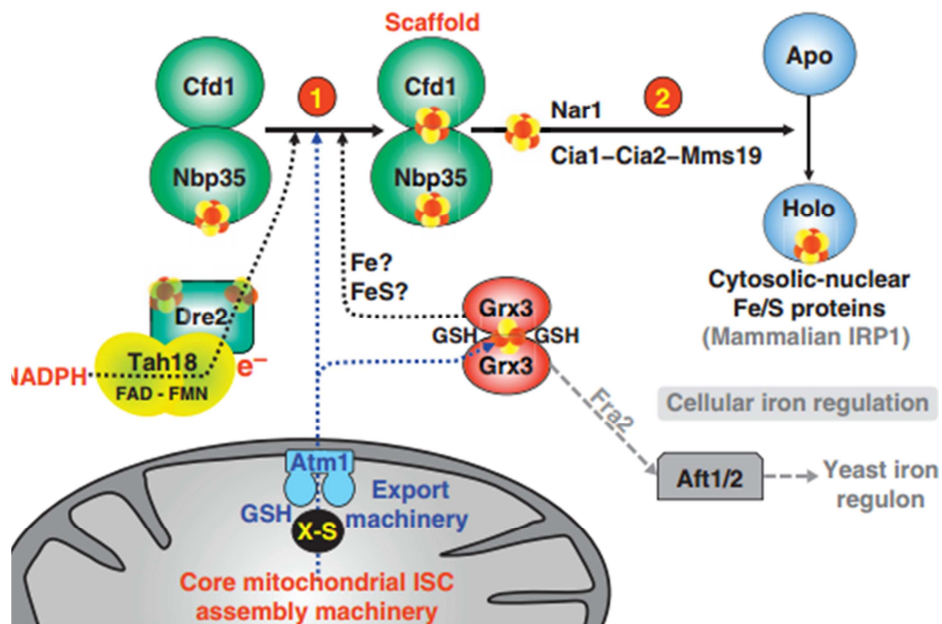


Figura 7. Maquinària citosòlica de biosíntesi de clústers Fe-S (CIA). En un procés que depèn de la síntesi dels centres al mitocondri, tot comença amb l'exportació d'un compost X-S que conté glutatí i sofre per part del transportador Atm1. 1) Un cop al citosol aquest compost serveix a les proteïnes Cfd1 i Nbp35 per a començar la síntesi dels centres. En aquest procés el complex format per les proteïnes Dre2 i Tah18 aporta el poder reductor. Es desconeix d'on surt el ferro necessari tot i que es creu que la proteïna Grx3 participa en aquest procés. 2) Finalment, el centre sintetitzat sobre les proteïnes-bastida Cfd1 i Nbp35 es transfereix a les proteïnes receptores a través d'una sèrie de proteïnes que participen en la transferència d'aquests clústers (Nar1, Cia1, Cia2 i Mms19) (extret de Lill, Srinivasan, & Mühlhoff, 2014)

2.2. Regulació transcripcional del metabolisme del ferro: els regulons YAP5 i AFT1

A fi de controlar al màxim la circulació de ferro dins la cèl·lula, les proteïnes implicades en aquests processos estan controlades principalment a nivell transcripcional. Depenent de si els gens participen en la resposta a alts nivells de ferro o a baixos nivells de ferro podem classificar-los en dos grups. El primer, la resposta a alts nivells de ferro, és el que es denomina reguló YAP5 i tot i que no és molt conegut i se'n coneixen pocs gens que en formin part regula l'emmagatzematge de ferro i està regulat pel factor transcripcional Yap5 del qual en pren el nom. Per altra banda, la resposta a baixos nivells de ferro està regulada pel factor transcripcional Aft1, i en menor mesura el seu paràleg Aft2, i el grup

de gens el qual regula se'l denomina reguló del ferro o reguló Aft1 (Yamaguchi-Iwai et al., 1996).

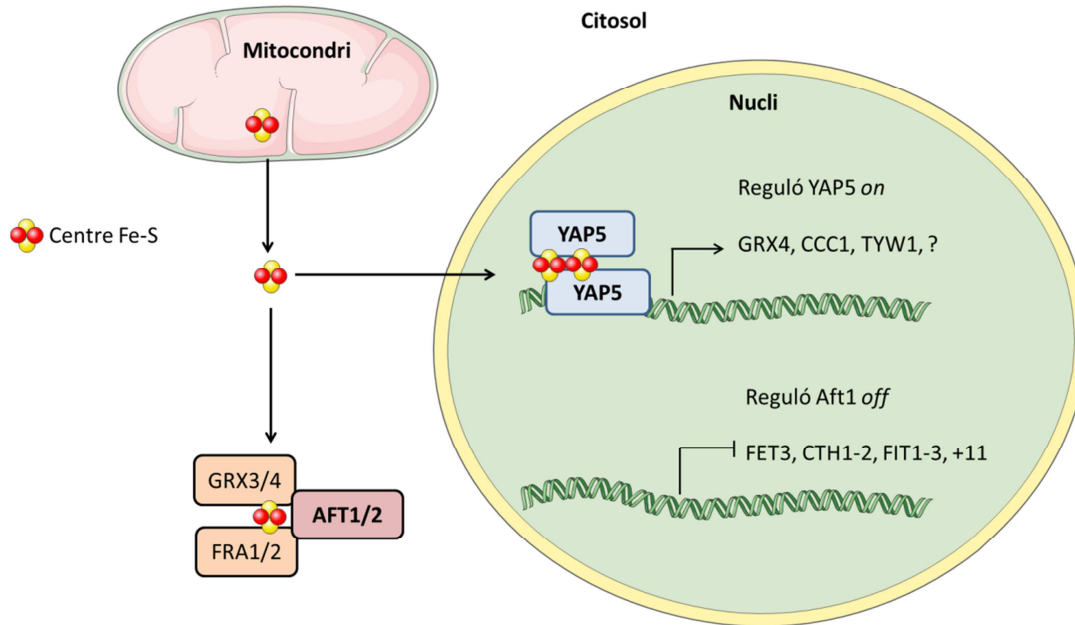


Figura 8. Regulació transcripcional del metabolisme del ferro en *S. cerevisiae*. En condicions de suficiència de ferro, es produeixen centres Fe-S al mitocondri que serveixen com a senyalitzadors de la regulació transcripcional del metabolisme del ferro. En aquesta situació, per una banda s'activa el reguló Yap5 que promou l'emmagatzematge de ferro a través de l'expressió del gen CCC1. Per altra banda, s'inhibeix l'activitat del reguló Aft1 que es manté al citosol fent impossible l'expressió dels gens que formen el reguló del ferro. Els detalls de cada regulació es troben al text.

2.2.1. El reguló YAP5

Donat que el ferro és un element tòxic a altes concentracions és essencial regular-ne la seva distribució a la cèl·lula. El llevat *Saccharomyces cerevisiae* pot emmagatzemar ferro dins la vacuola com a reserva en una forma innòcua. S'ha identificat un únic transportador de ferro citosol – vacuola, denominat CCC1 (Li et al., 2001). Aquest transportador, es regula a la baixa en condicions de deficiència de ferro però quan les concentracions d'aquest metall al medi són elevades, la seva expressió augmenta. El factor transcripcional que en regula l'expressió és Yap5, un factor transcripcional de la

família Yap els quals modulen l'expressió de diferents gens en diferents situacions d'estrès (Li et al., 2008). Posteriorment a la identificació d'aquest factor transcripcional, es van dur a terme estudis transcriptòmics per a identificar més gens regulats per Yap5 i que formessin part de la resposta a alts nivells de ferro. Tot i que no s'han identificat un gran nombre de gens regulats directament per Yap5, a banda de CCC1 es va identificar els gens de la glutarredoxina 4 (GRX4) i el gen TYW1 relacionat amb la síntesi de tRNAs (Li et al., 2011; Pimentel et al., 2012). La troballa de que l'expressió de GRX4 està regulada per Yap5 és altament interessant ja que permet establir una relació directe entre la resposta a alts nivells de ferro, regulada per Yap5, i la resposta a baixos nivells de ferro, regulada per Aft1; ja que la localització de Aft1, i per tant la seva activitat, està regulada entre altres proteïnes per Grx4 (Pujol-Carrion et al., 2006). Per tant, en condicions on els nivells de ferro són elevats, s'indueix Grx4 i aquesta inhibiria l'activitat de Aft1 promovent d'aquesta manera que no s'indueixin els gens regulats per aquest factor de transcripció.

L'activació de Yap5 està regulada pel contingut de ferro, però, quins són els mecanismes pels quals es regula aquest factor de transcripció? La comparació amb proteïnes de la seva mateixa família com el factor de resposta a estrès Yap1, va permetre la observació que al contrari que Yap1, Yap5 no conté cap seqüència d'exportació nuclear (NES) el que fa que sempre es localitzi al nucli, però té conservats dos dominis rics en cisteïnes que són importants per la seva regulació donat que la mutació d'aquestes cisteïnes a alanines bloquejava l'activitat de Yap5 (Li et al., 2008). Tot i que en un principi es creia que el ferro podria actuar directament sobre aquests dominis rics en cisteïnes induint la formació de ponts disulfur, un estudi més recent ha demostrat que la regulació de Yap5 depèn directament dels centres Fe-S (Rietzschel et al., 2015). Concretament, s'ha descrit que Yap5 funciona com un homodímer, i que quan aquest homodímer uneix dos centres Fe-S es produiria un canvi de conformació que dóna lloc a la forma activa de Yap5. Aquest mecanisme de regulació permetria unir la utilització del ferro, en forma de biosíntesi de clústers Fe-S, amb la regulació dels seus nivells al citosol i com a conseqüència a altres compartiments a través tant de la regulació de CCC1 com de GRX4 que inhibiria l'activitat de Aft1 i per tant evitaria una sobrecàrrega de ferro.

2.2.2. El reguló del ferro o reguló AFT1

A banda del reguló Yap5, la resposta més estudiada en llevat és la que es dona en condicions de baixa biodisponibilitat de ferro. En aquestes condicions, *S. cerevisiae* activa una sèrie de gens denominats en conjunt com el reguló del ferro activats pel factor transcripcional Aft1 i en menor mesura Aft2 (Yamaguchi-Iwai et al., 1996). Aquesta resposta té com objectiu incrementar la biodisponibilitat de ferro a la cèl·lula a través d'induir la captació de ferro amb transportadors d'alta afinitat, la mobilització de reserves de la vacuola i una remodelació metabòlica que té com a objectiu optimitzar l'ús del ferro a la cèl·lula. Aquests objectius es descriuen a continuació.

Taula 2. Gens regulats pels factors transcripcionals Aft1 i Aft2. Resum dels gens regulats per Aft1 i Aft2 que formen el reguló del ferro i pels quals s'ha demostrat directament aquesta relació. Els gens s'han agrupat per funcions independentment de l'òrganul on duen a terme la seva funció (adaptat de Rutherford & Bird, 2004).

Funció	Gens
Transportadors	<i>FET4, FET5, FTR1, FTH1, SMF3, MRS4, CCC2, COT1</i>
Ferrooxidases	<i>FET3, FET5</i>
Metaloreductases	<i>FRE1, FRE2, FRE3, FRE4, FRE5, FRE6</i>
Proteïnes de la paret cel·lular	<i>FIT1, FIT2, FIT3</i>
Transport de sideròfors	<i>ARN1, ARN2, ARN3, ARN4</i>
Biosíntesi de centres Fe-S	<i>ISU1, ISU2</i>
Altres	<i>CTH1, CTH2, ATX1, HMX1</i>

2.2.2.1. Sistemes de captació de ferro

El primer punt que han de resoldre els llevats referent al ferro és la seva captació donat que la gran majoria del ferro disponible al medi es troba en la seva forma més insoluble Fe^{3+} . Per a aquest propòsit el llevat disposa de diferents mecanismes de captació de ferro, els quals els podem dividir principalment en dos grans blocs: a) la via no reductiva i b) la via reductiva (Lesuisse & Labbe, 1989).

La via no reductiva, com el seu propi nom indica, implica l'assimilació de ferro en estat oxidat sense necessitat de reduir-lo a Fe^{2+} . Aquesta via depèn de la captació de petites molècules orgàniques, conegudes com sideròfors, que poden solubilitzar el ferro i afavorir-ne la captació per part de la cèl·lula. Aquests sideròfors, que no són sintetitzats pel llevat sinó per altres microorganismes que puguin compartir-ne l'hàbitat, són reconeguts per una sèrie d'enzims i cadascun d'ells és específic d'un sideròfor o d'una família concreta.

Per altra banda, trobem la via reductiva la qual implica un primer pas de reducció de Fe^{3+} a Fe^{2+} i la posterior captació d'aquests àtoms de ferro. Aquesta reacció està mitjançada per una sèrie de ferrereductases, principalment Fre1-2, tot i que n'existeixen més homòlegs, que es localitzen a la membrana plasmàtica. Aquestes proteïnes tenen uns nivells d'expressió basals però la seva expressió augmenta en deficiència de ferro a través de l'activació d'Aft1. D'aquesta forma, el ferro reduït es pot captar per diferents canals com Fet4 i Smf1 que no són específics de ferro ja que també poden transportar altres metalls divalents (Chen et al., 1999; Dix et al., 1997). Aquests transportadors també es coneixen com el sistema de baixa afinitat. Dins la via reductiva, trobem el sistema de captació de ferro d'alta afinitat format per la ferrooxidasa Fet3 i la proteïna transportadora Ftr1. Juntes, aquestes dues proteïnes agafen ferro reduït, Fet3 l'oxida de nou a Fe^{3+} i acte seguit la proteïna Ftr1 el transporta cap al citosol en una reacció acoblada definida com *iron channeling* (Kwok et al., 2006).

Mentre que els nivells de les proteïnes Fet4 i Smf1 no semblen augmentar en deficiència de ferro -per tant no semblarien estar regulades pel factor transcripcional Aft1- el sistema

d'alta afinitat, així com les reductases de la membrana plasmàtica i les proteïnes que formen la via no reductiva si que estan altament regulats per Aft1 (Taula 2).

Una altra forma d'obtenir ferro i que aquest pugui utilitzar-se a la cèl·lula ràpidament, és la mobilització de les reserves de la vacuola. De la mateixa manera que passa a la membrana plasmàtica, existeix un procés idèntic a la part interna de la membrana de la vacuola a fi de mobilitzar aquestes reserves. En aquest cas, Aft1 activa l'expressió de la reductasa FRE6 i també dels gens FET5 i FTH1 els quals realitzen la mateixa funció que Fet3 i Ftr1 a la membrana plasmàtica permetent així que es mobilitzi el ferro cap al citosol (Urbanowski & Piper, 1999).

2.2.2.2. Remodelació metabòlica en situacions de dèficit de ferro

Amb la finalitat d'optimitzar els recursos de ferro en una situació de baixa disponibilitat d'aquest metall, *S. cerevisiae* promou una dràstica regulació metabòlica. Aquesta remodelació la duen a terme mitjançant l'expressió de proteïnes regulades per Aft1, Cth1 i Cth2, essent aquesta última la més rellevant. Aquestes proteïnes s'uneixen a uns motius denominats AREs (de l'anglès, *AU Rich Elements*) als extrems 3'-UTR dels mRNAs de les seves dianes. La unió d'aquestes proteïnes llurs mRNAs diana en promou la seva degradació a través del reclutament de l'helicasa tal i com s'ha demostrat pel mRNA de SDH4, una de les dianes de Cth2 (Pedro-Segura et al., 2008).

Entre les dianes de Cth1 i Cth2 trobem principalment proteïnes que utilitzen ferro, ja sigui en forma de centres Fe-S, grups hemo o en altres formes com per exemple el centre dos ferro que es troba en l'enzim ribonucleòtid reductasa. L'activitat de Cth1-2 també afecta proteïnes que participen d'altres formes en el metabolisme del ferro com el transportador Ccc1 (Puig et al., 2005). Tot i que comparteixen algunes dianes els rols que juguen Cth1 i Cth2 en aquesta remodelació difereixen lleugerament. Quan es dona una situació de deficiència de ferro, en primer lloc augmenten els nivells de Cth1 que regularia a la baixa una sèrie de dianes no essencials. Si aquesta situació persisteix, els nivells de Cth2 augmenten progressivament fins a dur a terme una remodelació més profunda que afecta a proteïnes essencials com la ribonucleòtid reductasa i proteïnes de la cadena de

transport electrònic, el que suposa una parada immediata del creixement. Aquest mecanisme de regulació s'aconsegueix gràcies a una regulació creuada que existeix entre Cth1 i Cth2 donat que els mRNAs d'ambdues proteïnes contenen també motius ARE (Puig et al., 2008). Aquesta regulació creuada, que també pot ser auto-regulació, alhora permet que quan es restableixen els nivells de ferro la adaptació de la cèl·lula sigui més ràpida (Martínez-Pastor et al., 2013).

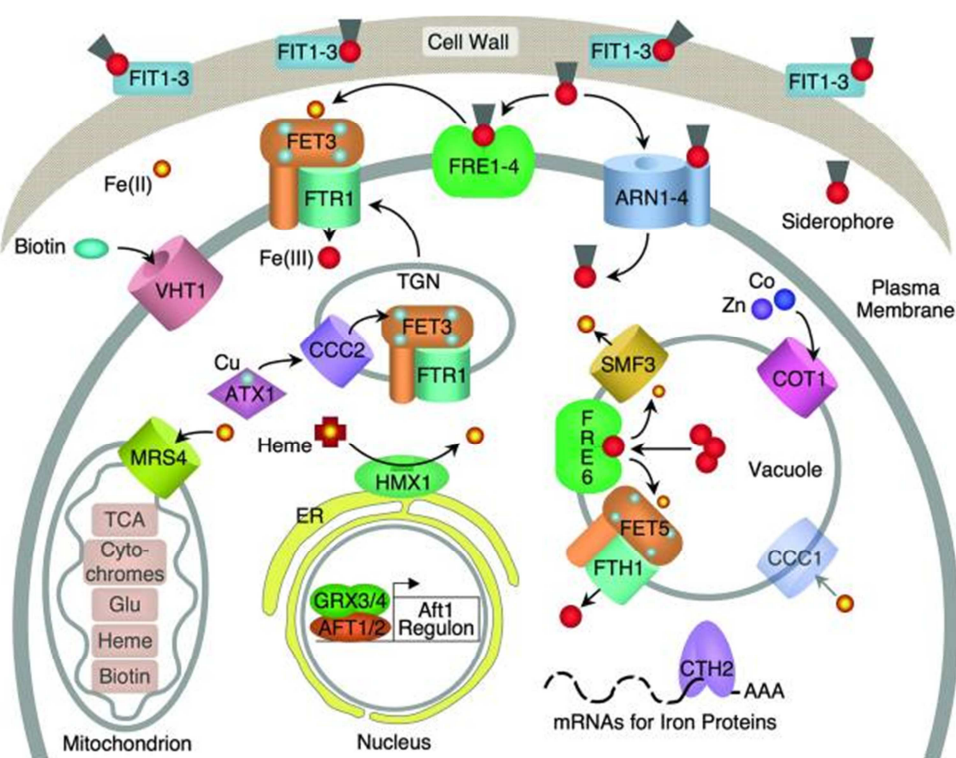


Figura 9. Vies regulades en resposta a baixos nivells de ferro en *S. cerevisiae*. En resposta a una situació de baixos nivells de ferro, el llevat activa diferents mecanismes regulats per Aft1 (gens marcats en negre) i regula a la baixa altres vies per a optimitzar l'ús del ferro en aquesta situació (marcats en gris) (Philpott & Protchenko, 2008).

2.2.2.3. Regulació de Aft1

Al contrari que Yap5, el qual sempre es localitza al nucli, Aft1 segueix principalment una regulació a nivell de localització (Yamaguchi-Iwai et al., 2002). En aquesta regulació són importants les proteïnes Grx3, Grx4, Fra1 i Fra2. Aquestes proteïnes formen un complex que és l'encarregat de mantenir Aft1 al citosol inactiu (Kumánovics et al., 2008; Pujol-Carrion et al., 2006). Però la formació d'aquest complex depèn d'un altre procés que és la biosíntesi de centres Fe-S. Anys enrere ja s'havia suggerit que l'activitat de Aft1 depenia de la biosíntesi de centres Fe-S i no de la quantitat de ferro disponible al medi (Chen et al., 2004). Estudis posteriors han demostrat que entre les proteïnes Grx3/4 i Fra2 es coordina un centre Fe-S, i aquest complex interacciona amb Aft1 establint així una vinculació directe entre la biosíntesi de centres Fe-S i la regulació del metabolisme del ferro (Li et al., 2009).

Així doncs en una situació de dèficit de ferro, no es produïrien suficients centres Fe-S, el complex es trenca i Aft1 pot entrar al nucli on reconeix la seqüència "PyPuCACCCPu" localitzada als promotors dels gens que formen el reguló del ferro (Yamaguchi-Iwai et al., 1996). Un cop finalitzada la situació de deficiència de ferro i els nivells d'aquest metall es restableixen, Aft1 s'exporta del nucli a través d'un mecanisme ferro dependent que consta de dos passos:

- a) En primer lloc, Aft1 es separa dels promotors on actua gràcies a la unió entre aquest factor transcripcional i un dímer de les glutaredoxines monotioliques Grx3/4 pel qual es requereix un centre Fe-S. Per a la formació d'aquest complex entre Aft1 i les Grx3/4 s'ha observat que es requereixen les cisteïnes 291 i 293, i les leucines 99 i 102 d'Aft1, ja que s'ha observat que en mutants puntuals en aquests residus s'impedeix la formació d'aquest complex i per tant la desunió dels promotors del reguló del ferro (Ueta et al., 2012).
- b) Posteriorment, Aft1 és reconegut per la exportina Msn5 la qual promou la seva sortida cap al citosol. En aquest procés, que també depèn dels nivells de ferro, hi

ha múltiples factors a tenir en compte. El més important, és la interacció d'Aft1 amb ell mateix a través de diferents residus entre els quals hi ha la C291 i 4 treonines (T421, T423, T431 i T435). Aquesta interacció, permet que la exportina Msn5 pugui reconèixer un domini format per diferents unitats de Aft1. A més, la fosforilació de les Serines S210 i S224 també és important en el procés d'exportació nuclear, tot i que no és suficient (Ueta et al., 2007).

En aquesta regulació d'Aft1 sembla tenir una important rellevància la cisteïna C291, tant en la desunió dels promotors com en el reconeixement per la exportina Msn5. De fet, existeix una variant natural de Aft1 on aquesta proteïna té una mutació puntual que converteix la cisteïna 291 en una fenilalanina (C291F). Aquest mutant, denominat Aft1-1up, no té capacitat de regular els gens del reguló del ferro depenent dels nivells de ferro al medi ja que sempre es troba actiu i unit als promotors dels seus gens diana (Ueta et al., 2012; Yamaguchi-Iwai et al., 1995; Yamaguchi-Iwai et al., 2002).

Per altra banda, les fosforilacions observades en els residus S210 i S224 també són importants en el mecanisme d'exportació de Aft1. Tot i que no s'han identificat les quinases que promouen aquestes fosforilacions, aquest podria ser un mecanisme per unir el metabolisme energètic i el metabolisme del ferro. En un estudi realitzat per Casas et al., es va demostrar que Aft1 es fosforila al llarg del canvi diàuxic. En aquest mateix treball, es va identificar aquest mecanisme com una forma d'inhibició de l'activitat d'Aft1 que servia per a sincronitzar el creixement de les cèl·lules amb l'activació del reguló del ferro, de forma que quan les cèl·lules paren de créixer momentàniament, s'atura l'expressió dels gens del reguló del ferro (Casas et al., 1997). En estudis posteriors, s'ha identificat que la subunitat catalítica Tpk2 de la quinasa PKA té un efecte inhibitori sobre l'expressió dels gens del reguló del ferro, en el que seria una nova evidència de l'alta relació i control que es manté entre el metabolisme del ferro i el metabolisme energètic (Robertson et al., 2000). En aquest sentit també s'ha suggerit que la quinasa Snf1, homòloga de la quinasa AMPK d'eucariotes superiors, també podria jugar algun paper en la regulació, en aquest cas positiva, sobre Aft1 tot i que no en forma de fosforilació directa (Haurie et al., 2003).

2.1. Paral·lelismes amb el metabolisme del ferro d'eucariotes superiors

Tot i el salt evolutiu que existeix entre els llevats i els mamífers, la regulació del metabolisme del ferro guarda una gran similitud, potser no en els mecanismes de regulació però sí en els objectius que es volen aconseguir amb aquesta regulació a nivell cel·lular. El metabolisme del ferro en mamífers està controlat principalment per dues proteïnes anomenades IRP1 i IRP2 (de l'anglès, *Iron Responsive Protein*). L'activitat d'aquestes dues proteïnes és a través de la unió als seus mRNAs diana, en unes seqüències denominades IREs que es poden localitzar o bé a les zones 3'-UTR o bé a l'extrem 5'-UTR. Depenent de si aquests IREs es localitzen a un extrem o un altre dels mRNAs, la unió de les IRPs tindrà efectes contraris sobre els missatgers. Si els IREs es localitzen a l'extrem 3'-UTR la unió de les IRPs promou l'estabilització del mRNA mentre que si aquests IREs es troben a l'extrem 5'-UTR del mRNA, la unió de les IRPs no permet l'accés dels ribosomes a aquests mRNAs i per tant es bloqueja la traducció. A grans trets, l'activació de les IRPs promou: a) la captació de ferro, a través d'estabilitzar el RNA missatger del receptor de la transferrina i del transportador DMT1; i b) es bloqueja la traducció de mRNAs de proteïnes que participen en l'emmagatzematge, l'exportació de ferro i altres vies que consumeixen aquest metall (revisat a Anderson et al. 2012; Wilkinson & Pantopoulos, 2014).

IRP1 i IRP2 regulen la seva activitat per mecanismes diferents. Pel que fa a la regulació de IRP2, aquesta està lligada a la regulació dels nivells de proteïna per part de la proteïna FBXL5, un sensor de ferro que està relacionat amb el complex ubiquitina proteïna lligasa. Quan els nivells de ferro són òptims FBXL5 uneix ferro el que li provoca un canvi conformacional que estabilitza la proteïna i en permet la unió amb IRP2. Aquesta unió promou la ubiquitinització de IRP2 per part del complex SKP1-CUL1, i per tant la seva degradació al proteasoma (Guo et al., 1995; Moroishiet al., 2011; Yamanaka et al., 2003). Per altra banda, i de forma semblant al que passa en llevat, l'activitat de IRP1 depèn de la biosíntesi de centres Fe-S. Quan els nivells de ferro són els adequats, IRP1 conté un centre 4Fe-4S i actua com a aconitasa citosòlica (revisat a Anderson et al., 2012). Quan IRP1 perd

aquest centre 4Fe-4S com a conseqüència d'uns baixos nivells de ferro o altres motius com pot ser una situació d'estrès (Bouton, 1999), IRP1 pot unir-se als mRNAs a través del motius IRE que s'han citat anteriorment. Tot i que els mecanismes d'actuació són diferents, no es pot negar que existeixen clares semblances amb la regulació d'Aft1, i que la resposta generada tant per l'activació de les IRPs com la d'Aft1 persegueix els mateixos objectius. Aquest grau de similitud mostra el procés evolutiu del metabolisme del ferro on s'ha mantingut un paper central pels clústers Fe-S com a sensors dels nivells d'aquest metall a la cèl·lula.

Recentment, també s'ha descrit un homòleg de la proteïna de llevat Cth2 en eucariotes superiors i que du a terme una funció semblant. En aquest estudi realitzat per Hossein Ardehali i els seus col·laboradors, es va identificar la proteïna TTP (tristetraprolin), com a homòleg funcional de Cth2. Es va observar que l'expressió de TTP augmentava en resposta a tractament amb quelants de ferro, i que l'activitat de TTP promovia la desestabilització del mRNA del receptor de transferrina (TfR). Tot i que aquesta resposta semblaria estar en contra amb la que duen a terme les IRPs ja que el missatger de TfR és un dels mRNAs estabilitzats, els autors argumenten que aquest seria un mecanisme per modular la resposta a baixos nivells de ferro. Per altra banda es va establir una relació clara amb un regulador central del metabolisme com és TOR. En el mateix article es va descriure que TOR regula l'activitat de TTP de forma que serviria per unir el metabolisme energètic de la cèl·lula amb el metabolisme del ferro (Bayeva et al., 2012).

3. El metabolisme energètic de *Saccharomyces cerevisiae*

El llevat *S. cerevisiae* és un organisme que utilitza glucosa com a font principal de carboni adoptant un metabolisme fermentatiu. Per tant, quan hi ha altes concentracions de glucosa al medi es reprimeixen les vies metabòliques més oxidatives, per exemple la cadena de transport electrònic, en favor de la fermentació alcohòlica, un efecte que es coneix com efecte Crabtree (De Deken, 1966). No obstant, quan la concentració de glucosa al medi baixa degut al creixement del cultiu, té lloc una adaptació metabòlica que

es coneix com canvi diàuxic. Al llarg d'aquest procés el llevat activa una sèrie de vies de senyalització, les quals es detallaran posteriorment, que permetran l'expressió de gens implicats en el metabolisme respiratori, i per tant més oxidatiu, afavorint el consum de fonts de carboni alternatives a la glucosa com per exemple l'etanol produït durant la fermentació.

El canvi cap a un metabolisme respiratori implica la coordinació de diferents vies de senyalització, com per exemple la captació de ferro i la biosíntesi dels cofactors necessaris per a les proteïnes que formen part, per exemple, de la cadena de transport electrònic. De la mateixa manera, també cal coordinar aquest canvi en el metabolisme amb una major expressió de gens antioxidants donada la major producció d'espècies reactives del oxigen que se'n deriva d'un metabolisme més oxidatiu.

3.1. Metabolisme respiratori

Quan la glucosa comença a exhaurir-se i el llevat entra en canvi diàuxic *S. cerevisiae* canvia el seu metabolisme cap a un metabolisme oxidatiu on utilitza fonts de carboni alternatives a la glucosa. Si bé en condicions normals la font més utilitzada és l'etanol, que s'acumula durant el procés de fermentació, hi ha multitud de fonts de carboni que el llevat pot utilitzar per continuar creixent, com són els àcids grassos, el lactat, el acetat o el glicerol entre altres. En aquest procés d'adaptació hi participen nombrosos factors de transcripció (Taula 3) i hi juga un paper central la quinasa Snf1, homòloga de l'AMPK present en mamífers i eucariotes superiors.

Taula 3. Reguladors transcripcionals principals del metabolisme de fonts de carboni no fermentables. Factors transcripcionals que actuen al llarg del canvi diàuxic i els gens i processos sobre els que actuen (adaptat de Turcotte et al. 2010).

Regulador transcripcional	Gens diana
Adr1	Metabolisme de fonts de carboni no fermentables (p.e. <i>ADH2</i> , <i>GUT1</i> , <i>ACS1</i>) Biogènesi de peroxisomes i utilització d'àcids grassos (p.e. <i>POX1</i> , <i>PXA1</i>)
Cat8	Gens de la gluconeogènesi (p.e. <i>PCK1</i> , <i>FBP1</i>) Gens del cicle del glioxilat Factor transcripcional <i>SIP4</i>
Ert1	<i>PCK1</i> Altres dianes desconegudes
Gsm1	Gluconeogènesi (<i>PCK1</i> , <i>FBP1</i>) Factor transcripcional <i>HAP4</i>
Hap1	Gens de la respiració cel·lular (p.e. <i>CYC1</i> , <i>CYC7</i>)
Hap2/3/4/5	Gens de la respiració cel·lular (<i>CYC1</i>) Gens del cicle de Krebs
Oaf1	Utilització d'àcids grassos (p.e. <i>POX1</i> , <i>FOX3</i>) Biogènesi de peroxisomes
Oaf3	Repressor dels gens de resposta a oleat
Pip2	Utilització d'àcids grassos (p.e. <i>POX1</i> , <i>FOX3</i>) Biogènesi de peroxisomes
Rds2	Gluconeogènesi (<i>PCK1</i> , <i>FBP1</i>) Gens del cicle del glioxilat Factors de transcripció (<i>HAP4</i> , <i>SIP4</i>)
Sip4	Gens de la Gluconeogènesi (p.e. <i>PCK1</i>)

3.1.1. L'AMPK en llevat: Snf1

En la transició fermentació – respiració, hi juga un paper essencial la quinasa Snf1 homòloga de la quinasa AMPK d'eucariotes superiors. Snf1 forma un complex amb les proteïnes Snf4, equivalent a la subunitat γ de AMPK, i amb un de les tres proteïnes Gal83/Sip1/Sip2, que equivaldria a la subunitat β de la quinasa AMPK. La quinasa Snf1

s'activa a través de la fosforilació del residu T210, el qual està molt conservat, per part de les quinases Sak1, Elm1 i Tos3 les quals tenen funcions redundants (Hong et al., 2003; Nath et al., 2003). Per altra banda, quan les concentracions de glucosa són altes, Snf1 es manté en un estat desfosforilat i inactiu. El manteniment d'aquest estat inactiu és gràcies principalment a l'activitat del complex format per la fosfatasa Glc7 i la seva subunitat reguladora Reg1 (Sanz et al., 2000).

L'activació de la quinasa AMPK en organismes superiors, depèn directament de la relació AMP/ATP. Tot i que aquest mecanisme no està del tot descartat en llevat, es creu que Snf1 respon directament als nivells de glucosa però no està del tot clar com aquests senyals s'integren sobre l'activació o la inhibició de l'activitat de Snf1.

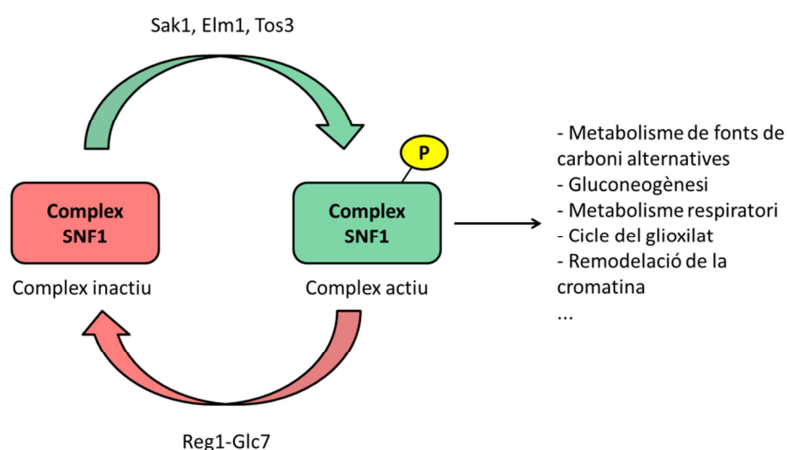


Figura 10. Mecanisme de regulació de la quinasa Snf1. El complex format per Snf1, Snf4 i Gal83/Sip1/Sip2, s'activa per fosforilació sobre Snf1 per part d'alguna de les cinases indicades (Sak1, Elm1 o Tos3). L'activació de Snf1 permet la posterior activació de vies que es troben corrent avall i que permeten l'adaptació a un metabolisme oxidatiu on s'utilitzen de fonts de carboni no fermentables. La fosfatasa Glc7 i la seva proteïna accessòria Reg1 promouen la defosforilació i la conseqüent inactivació de Snf1 en presència de glucosa (adaptat de Ghillebert et al., 2011).

Per a Snf1 s'han descrit diferents mecanismes d'activació dels gens reprimits per glucosa, tant de forma directa com de forma indirecta. Per un costat s'ha descrit que l'activació de Snf1 promou canvis epigenètics afavorint així la transcripció de certs gens. Snf1 du a terme aquesta activitat a través de l'activació de la histona acetiltransferasa Gcn5 que amb la seva activitat promou l'obertura de la cromatina i permet així una major

accessibilitat als diferents factors de transcripció (Abate et al., 2012; Salminen et al., 2016). Per altra banda s'ha descrit que Snf1 pot regular directa o indirectament altres reguladors del metabolisme de fonts alternatives de carboni com els factors transcripcionals Adr1 i Cat8 (veure apartats posteriors). Una de les dianes més estudiades de Snf1 és el repressor Mig1. Aquest repressor, és un dels encarregats de reprimir l'expressió dels gens reprimits per glucosa a través de la unió directa als seus promotors. Un cop la concentració de glucosa al medi baixa i Snf1 s'activa, aquesta quinasa és capaç de fosforilar directament Mig1, el que provoca que es desuneixi dels promotors i s'exporti del nucli cap al citosol (Hahn & Young, 2011).

A més, Snf1 pot coordinar altres vies de senyalització que permeten l'adaptació de les cèl·lules a un metabolisme més oxidatiu. En primer lloc, tal com s'ha citat anteriorment, Snf1 promou l'activació del reguló del ferro regulat per Aft1 (Haurie et al., 2003), el que permet a la cèl·lula captar una major quantitat de ferro del medi i adaptar-se així als nous requeriments, donat que molts enzims que componen la cadena de transport electrònic, per exemple, necessiten cofactors que contenen ferro com són els grups hemo i els centres Fe-S. A més, recentment s'ha demostrat que Snf1 pot regular positivament l'activitat del factor transcripcional Hcm1 (de tipus FoxO) a través de fosforilació directa. Aquesta regulació permet l'expressió de gens implicats en la biogènesi mitocondrial, la respiració cel·lular i el metabolisme de fonts de carboni alternatives, però també de gens de resposta a estrès oxidatiu els quals són necessaris en una situació de metabolisme oxidatiu (Rodríguez-Colman et al., 2013).

3.1.2. El factor transcripcional Adr1

Adr1 és un dels factors transcripcionals amb més pes en aquest canvi metabòlic, ja que activa la transcripció d'un gran nombre de gens relacionats amb el metabolisme de fonts de carboni alternatives (Young et al., 2003). L'expressió d'aquest factor transcripcional està regulada pels nivells de glucosa, de forma que quan els nivells de glucosa baixen l'expressió d'Adr1 augmenta (Blumberg et al., 1988). Tot i això la regulació de la seva

activitat encara no està clarament definida i s'han descrit diferents mecanismes de regulació que no són excloents entre ells:

- a) En primer lloc existeix una regulació per fosforilació en el domini d'unió al DNA de la proteïna, concretament a la serina 98. Per tant, la fosforilació en aquest residu impedeix la unió d'Adr1 al promotor. Es va observar que la quinasa dependent de ciclina Pho85 hi guarda relació ja que en soques nul·les per aquesta proteïna els nivells de fosforilació de la Ser98 eren menors però en assajos quinasa amb el complex Pho85/Pho80 purificat no es va veure fosforilació en la Ser98. Aquest fet indicaria una regulació indirecta per part d'aquest complex (Kacherovsky et al., 2008).

- b) Per altra banda existeix una regió reguladora entre els aminoàcids 227 i 239 on s'han identificat certes mutacions que poden escapar a la regulació per glucosa (Denis, 1992). Entre aquests residus apareix la serina 230 de la qual es creu que és el centre de regulació de la proteïna per part de Snf1. Quan aquesta serina està fosforilada, Adr1 és inactiu fet que té lloc en condicions amb elevada concentració de glucosa. En manca de glucosa o quan aquesta comença a exhaurir-se, Snf1 promouria la defosforilació de la Ser230 inactivant la quinasa responsable d'aquesta fosforilació, la qual no ha estat determinada, arribant a la conclusió que diverses quinases poden ser les responsables (Ratnakumar et al., 2009).

- c) Finalment, en relació amb el punt anterior, s'ha descrit que les proteïnes 14-3-3 de llevat anomenades Bmh1 i Bmh2 poden interaccionar amb la Ser230 fosforilada inhibint-ne l'activitat. Aquesta activitat té lloc al nucli on Adr1 hi resideix lligat als promotors tot i que en un estat inactiu per l'activitat de les proteïnes Bmh1 i Bmh2 (Braun et al., 2013; Parua et al., 2010).

3.1.3. El factor transcripcional Cat8

Un altre dels factors transcripcionals activats durant el canvi diàuxic, és el denominat Cat8. Cat8 és responsable de l'expressió d'un gran nombre de gens que permeten la utilització de fonts de carboni alternatives, alguns de forma individual i altres de forma coordinada amb Adr1 o Snf1 per exemple (Young et al., 2003). Principalment s'ha descrit que Cat8 regularia gens que participen en la gluconeogènesi, el cicle del glicoxilat i en el metabolisme de l'etanol (Haurie et al., 2001).

En presència de glucosa, l'expressió d'aquest factor transcripcional es troba reprimida per l'activitat del repressor Mig1. Tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, quan s'activa Snf1 aquesta fosforila Mig1 que seguidament s'exporta al citosol i permet l'expressió dels gens els quals estava reprimint anteriorment com Cat8. Però, per ser completament actiu, Cat8 necessita fosforilar-se, una acció que es creu que també du a terme la quinasa Snf1, ja que mutants fosfomimètics de Cat8 (S562E) rescaten parcialment els fenotips derivats del dèficit de Snf1 en *S. cerevisiae* (Randez-Gil et al. 1997; Charbon et al. 2004).

4. L'estrès oxidatiu

Des de l'aparició de l'oxigen a l'atmosfera com a conseqüència directa del metabolisme dels primers organismes fotosintètics, aquesta molècula ha estat indispensable per a processos metabòlics com la respiració cel·lular. L'oxigen en el seu estat O₂ no és un radical però pot reaccionar parcialment en reaccions de transferència d'electrons alterant el seu estat d'oxidació i donant lloc a espècies reactives de l'oxigen conegudes com ROS (de l'anglès, *Reactive Oxygen Species*). Aquestes són altament oxidants i produeixen dany a macromolècules com proteïnes, lípids i DNA. Per altra banda, la cèl·lula disposa de mecanismes per fer front a aquestes molècules en el que coneixem com a defenses antioxidants. Per tant, una situació d'estrès oxidatiu apareix quan la producció d'espècies

reactives de l'oxigen supera la capacitat antioxidant de la cèl·lula i es produeix dany oxidatiu sobre els diferents components cel·lulars.

4.1. Generació de les espècies reactives de l'oxigen (ROS)

En la cèl·lula, la producció d'espècies reactives del oxigen és majoritàriament la conseqüència del metabolisme respiratori dels organismes aeròbics. Així doncs, la font més important de ROS a la cèl·lula es troba al mitocondri, concretament a la cadena de transport electrònic, i aquests oxidants apareixen com un subproducte de la respiració cel·lular. La cadena de transport electrònic, implica la coordinació de diversos enzims i altres components per a generar un flux d'electrons que sustenta la producció d'energia en forma d'ATP. En aquesta cadena de transport electrònic existeixen diferents punts on els electrons poden escapar i reaccionar amb l'oxigen donant lloc a aquests ROS (revisat a Herrero et al. 2008). A diferència dels eucariotes superiors el llevat té un complex I diferent, un dels punts on es generen ROS, que consta de NADH deshidrogenases, una a la part interna de la membrana interna del mitocondri (Ndi1) i dues a la part externa (Nde1 i Nde2). Estudis amb la proteïna Ndi1 han revelat que aquesta és altament eficient en la transferència d'electrons des del NADH fins a la quinona i el seu mecanisme de reacció permet que no es generin ROS en aquest punt ja que l'oxigen no pot accedir al centre catalític (Yang et al., 2011). Per contra, les dues deshidrogenases externes que catalitzen l'oxidació del NADH que prové de reaccions citosòliques, sí que són un punt de producció de ROS i generen aproximadament la meitat del superòxid total generat al mitocondri (Fang & Beattie, 2003). Un altre punt de generació de ROS al mitocondri és a nivell del complex III. En aquest complex, es catalitza la transferència d'electrons des de l'ubiquinona reduïda o ubiquinol fins al citocrom C. Estudis en els quals s'han utilitzat diferents compostos inhibidors del complex III com són la Antimicina A i el mixotiazol entre altres, han mostrat que la font principal de superòxid en aquest punt es localitza al denominat centre Q_0 on s'oxida l'ubiquinol. L'oxidació parcial de l'ubiquinol a diferents espècies denominades semiquinones és el que dóna lloc a la generació de superòxid donat que aquestes poden reaccionar amb l'oxigen (revisat a Bleier & Dröse, 2013).

Un altre tipus de molècules oxidants són les denominades espècies reactives del nitrogen (RNS) on trobem una altra molècula altament oxidant com és el peroxinitrit (ONOO^-). El peroxinitrit apareix de la reacció entre l'òxid nítric (NO) i el superòxid i pot provocar danys irreversibles a proteïnes, lípids i DNA. La producció d'òxid nítric en eucariotes superiors té una gran importància en diferents mecanismes de senyalització, per exemple a nivell vascular. En *S. cerevisiae*, s'ha identificat la proteïna Tah18 com la responsable de la producció de NO utilitzant arginina com a substrat en un mecanisme semblant a les òxid nítric sintases (NOS) (Nishimura et al., 2013). Per altra banda, l'òxid nítric també es pot produir al mitocondri, concretament al complex IV, en situacions d'hipòxia on s'utilitzaria el nitrit com a substrat (Castello et al., 2006). Tot i que no està clar el paper del NO en cèl·lules de llevat, es creu que aquest juga un paper important en la senyalització en situacions d'hipòxia i també s'ha demostrat que la seva producció activa, a través de l'enzim Tah18, protegeix front estressos tèrmics (Nishimura et al., 2013).

4.1. Propietats de les diferents ROS

Existeixen principalment 3 espècies reactives del oxigen, les quals presenten diferents propietats pel que fa a estabilitat, reactivitat, difusió, etc. (Taula 4). Aquestes espècies reactives de l'oxigen són: l'anió superòxid (O_2^-), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$).

Taula 4. Propietats dels diferents ROS. A la taula s'indiquen les propietats dels diferents ROS, potencial de reducció mesurat en Volts, la vida mitja en segons i la concentració en molar calculada *in vivo* (adaptat de Giorgio et al. 2007).

	O_2^-	H_2O_2	$\text{OH}\cdot$
Potencial de reducció (V)	0,94	0,32	2,31
Vida mitja ($T_{1/2}$)(sec)	10^{-6}	10^{-5}	10^{-9}
Concentració <i>in vivo</i> (M)	10^{-10}	10^{-7}	10^{-15}

En primer lloc, l'aparició de l'anió superòxid té lloc quan es redueix amb un electró l'oxigen molecular. El superòxid és relativament estable però la seva capacitat de difondre per la cèl·lula és molt reduïda donat que té càrrega negativa. La dismutació del superòxid per part dels enzims Superòxid Dismutasa (SOD) dona lloc a l'aparició del peròxid d'hidrogen, una molècula més estable que el superòxid i que té la capacitat de difondre per la cèl·lula. Donada aquesta capacitat de difusió, s'han fet nombrosos estudis sobre el paper senyalitzador que podria jugar el peròxid d'hidrogen a la cèl·lula (veure apartats posteriors) (revisat a Giorgio et al. 2007). A més, el peròxid d'hidrogen té la capacitat de reaccionar amb àtoms de ferro en el seu estat de reducció $2+$. Aquesta reacció, coneguda com la reacció de Fenton, provoca la formació del radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) una molècula amb una vida mitja molt curta conseqüència de la seva alta reactivitat. El radical hidroxil pot reaccionar amb les macromolècules que formen els diferents compartiments cel·lulars donant lloc a peroxidació lipídica, oxidació de proteïnes i oxidació del DNA.

Tal com s'ha mostrat, les diferents ROS tenen propietats diferents el que fa que tinguin unes dianes específiques dins la cèl·lula a excepció del radical hidroxil que pràcticament pot reaccionar amb qualsevol macromolècula. Per un costat, l'anió superòxid té preferència pels centres Fe-S els quals pot destruir provocant així l'alliberació del ferro a la cèl·lula i la conseqüent inactivació o activació de la proteïna. El superòxid també pot reaccionar amb gran afinitat i velocitat amb l'òxid nítric (NO) donant lloc a peroxinitrit (ONOO^-). Per altra banda, trobem que el peròxid d'hidrogen, tot i que també pot atacar centres Fe-S, té més especificitat per aminoàcids que contenen sofre com són les cisteïnes i les metionines de les quals en provoca l'oxidació. També pot atacar altres centres catalítics formats per metalls com el ferro o el coure (Figura 11)(D'Autréaux & Toledano, 2007).

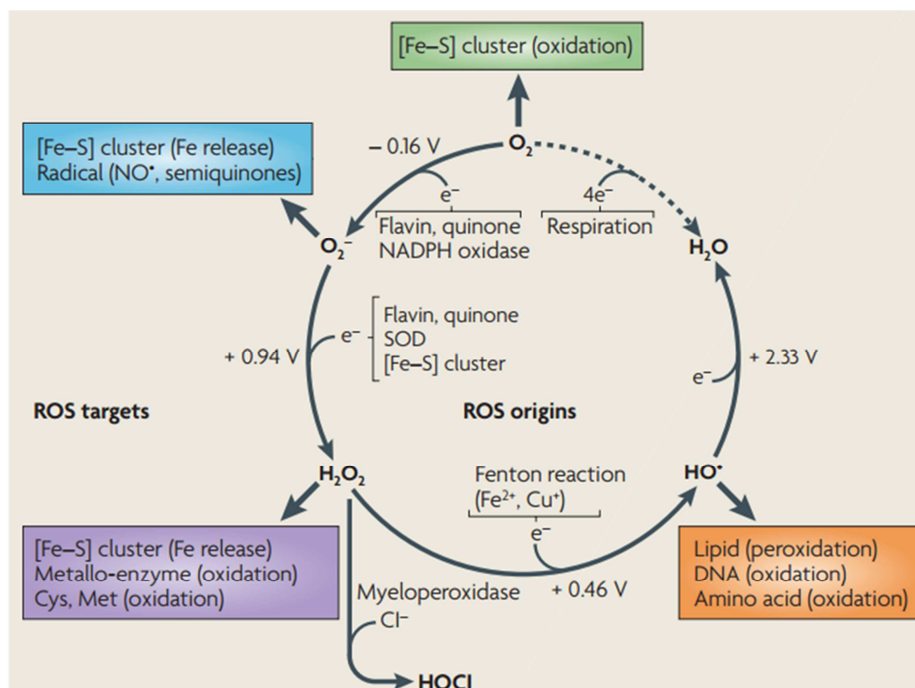


Figura 11. Origen i reactivitat dels diferents ROS. Cicle dels diferents ROS on s'indica el seu origen i l'especificitat de reacció de cada ROS amb certes dianes. En cada reacció s'indica el potencial de reducció (extret de D'Autréaux & Toledano, 2007).

4.2. Defenses antioxidants

Per a fer front a la producció d'espècies reactives de l'oxigen, les cèl·lules disposen d'un conjunt de sistemes antioxidants destinats a detoxificar directament els diversos ROS o restaurar el dany reversible que hagin pogut provocar a diferents macromolècules com per exemple l'oxidació de proteïnes. Entre les defenses antioxidants podem diferenciar entre sistemes enzimàtics (Taula 5) i els sistemes no enzimàtics. Aquests sistemes no enzimàtics són molècules amb capacitat antioxidant de les quals podem destacar-ne principalment tres, el glutatió, l'àcid ascòrbic i l' α -tocoferol.

- El glutatió (GSH) és un tripèptid (glutamat-cisteïna-glicina) molt abundant a la cèl·lula. Actua com a tampó redox de la cèl·lula i participa com a donador d'electrons en diversos sistemes enzimàtics (veure apartats posteriors). La relació entre glutatió reduït (GSH) i glutatió oxidat (GSSG) s'utilitza sovint per a definir la

situació redox de la cèl·lula o del orgànul en qüestió ja que aquesta relació varia entre els diferents compartiments cel·lulars. La síntesi del glutatió en llevat consta de dos passos catalitzats pels enzims GSH1 i GSH2 al citosol en un procés que requereix d'ATP.

- b) Tot i que els llevats no poden sintetitzar àcid ascòrbic si que poden sintetitzar eritroascorbat, un anàleg d'aquest primer amb propietats similars, a partir de diferents precursors. Tot i aquesta capacitat, els nivells d'aquest compost en condicions normals són pràcticament indetectables. Aquests resultats sumats a que els nivells no augmenten en situacions d'estrès fan dubtar sobre el paper que tindria la biosíntesi d'eritroascorbat en la resposta front situacions d'estrès oxidatiu en *S. cerevisiae* (Spickett et al., 2000). Tot i aquests resultats, és inqüestionable el rol antioxidant de l'ascorbat ja que la seva suplementació al medi de cultiu millora la supervivència de soques deficientes en els enzims superòxid dismutasa (Krzepiřko et al., 2004).
- c) Finalment, el tocoferol o vitamina E, és una molècula liposoluble el que li atorga la capacitat d'actuar com antioxidant a les membranes cel·lulars evitant per exemple la peroxidació lipídica. Tot i no produir-se en *S. cerevisiae*, i de forma semblant al que s'ha comentat prèviament per l'ascorbat, la suplementació a cultius de llevat de l'anàleg de la vitamina E, Trolox, augmentava la capacitat antioxidant de les cèl·lules a través de la disminució dels nivells de ROS com el superòxid o el peròxid d'hidrogen i d'aquesta manera es reduïa el dany a macromolècules com el DNA (Raspor et al., 2005).

Per altra banda, trobem els sistemes antioxidants enzimàtics. Entre aquest grup de proteïnes, podem diferenciar aquelles que utilitzen centres metàl·lics per a dur a terme la seva funció, com les SOD o les catalases, o bé aquelles que utilitzen cisteïnes de la seva estructura per dur a terme la seva funció.

Taula 5. Defenses antioxidants en *S. cerevisiae*. (adaptat de Morano et al. 2012).

Antioxidant	Gen	Localització	Activitat
Sistema tioredoxina			
Tioredoxina	TRX1, TRX2	Cit	Activitat disulfur oxidoreductasa
	TRX3	Mit	Activitat disulfur oxidoreductasa
Tioredoxina reductasa	TRR1	Cit	Reductor de tioredoxines oxidades (Trx1, Trx2)
	TRR2	Mit	Reductor de tioredoxines oxidades (Trx3)
Peroxiredoxina	TSA1, TSA2	Cit	2-Cis Prx, tioredoxina peroxidasa i activitat xaperona
	AHP1	Cit	2-Cis Prx, tioredoxina peroxidasa particularment amb alquil hidroperòxids
	DOT5	Nuc	2-Cis Prx, funció en silenciament telomèric
	PRX1	Mit	1-Cis Prx, activitat tioredoxina peroxidasa
Sistema glutaredoxina			
Síntesi de GSH	GSH1, GSH2	Cit	Catalitza dos passos dependents d'ATP a la biosíntesi de GSH
Glutatió reductasa	GLR1	Cit/Mit	Recicla el GSSG oxidat a la forma reduïda GSH
Glutatió transferasa	GTT1	RE	Catalitza la conjugació de GSH a diversos electròfils
	GTT2	Mit	Catalitza la conjugació de GSH a diversos electròfils
	GTO1	Per	Glutatió transferases del tipus Omega
	GTO2, GTO3	Cit	Glutatió transferases del tipus Omega
Glutatió peroxidasa	GPX1, GPX2	Cit	Fosfolípid hidroperòxid glutatió peroxidasa
	GPX3	Cit	Fosfolípid hidroperòxid glutatió peroxidasa, transductor de la senyal Yap1
Glutaredoxina	GRX1	Cit	Activitat glutatió disulfur oxidoreductasa
	GRX2	Cit/Mit	Activitat glutatió disulfur oxidoreductasa
	GRX3, GRX4	Nuc	Glutaredoxina monotiòlica
	GRX5	Mit	Glutaredoxina monotiòlica, participa en la síntesi de centres ferro-sofre.
	GRX6, GRX7	Gol	Glutaredoxina monotiòlica Cis-Golgi
	GRX8	Cit	Activitat glutatió disulfur oxidoreductasa
Altres sistemes antioxidants			
Superòxid dismutasa	SOD1	Cit/Nuc	Catalitza la dismutació de l'anió superòxid a peròxid d'hidrogen
	SOD2	Mit	Catalitza la dismutació de l'anió superòxid a peròxid d'hidrogen
Catalasa	CTT1	Cit	Catalitza la reducció de peròxid d'hidrogen a aigua i oxigen
	CTA1	Per	Catalitza la reducció de peròxid d'hidrogen a aigua i oxigen
Metionina sulfòxid reductasa	MXR1 (MSRA)	Cit	Catalitza la reducció de metionina (S)-sulfòxid tiol dependent
	MXR2 (MSRB)	Mit	Catalitza la reducció de metionina (R)-sulfòxid tiol dependent
	fRMsr (YKL069W)	Cit	Catalitza la reducció de metionina (R)-sulfòxid tiol dependent

4.2.1. Superòxid dismutases (SODs)

Les superòxid dismutases són enzims encarregats de detoxificar superòxid generant com a subproducte peròxid d'hidrogen. *S. cerevisiae* conté dos gens que codifiquen per dues SODs diferents denominats *SOD1* i *SOD2*. *SOD1* codifica per la superòxid dismutasa citosòlica també denominada Cu,Zn-SOD ja que utilitza aquests metalls com cofactors. Tot i que es va definir com a citosòlica també s'ha descrit que es pot localitzar al nucli i a l'espai intermembrana del mitocondri. De fet, la seva localització a l'espai intermembrana protegeix front l'estrès generat al mitocondri i millora la supervivència de les cèl·lules un cop passada la fase diàuxica (Sturtz et al., 2001). Els mutants $\Delta sod1$, són sensibles a agents que generen superòxid com el paraquat o la menadiona i a més són auxòtrofs per alguns aminoàcids com a conseqüència del dany generat pel superòxid sobre enzims essencials en la biosíntesi d'aquests (Wallace et al., 2004). Per altra banda, el gen *SOD2* codifica per la superòxid dismutasa mitocondrial que depèn de manganès com a cofactor (Mn-SOD). Si bé l'activitat d'aquesta proteïna no és tant important durant el creixement en medis que contenen glucosa, aquest gen es pràcticament indispensable per al creixement respiratori i la supervivència en fase estacionària (Flattery-O'Brien et al., 1997; Longo et al., 1996). En models de llevat d'atàxia de Friedreich on s'acumula ferro al mitocondri, s'ha observat un descens en l'activitat SOD, un problema que pot ser conseqüència del canvi de metall en el centre catalític. L'addició de manganès al medi permetia la recuperació de l'activitat SOD i una millora dels fenotips observats (Irazusta et al., 2010, 2006).

4.2.2. Catalases

Les catalases són enzims que promouen la reducció del peròxid d'hidrogen a aigua i oxigen i utilitzen grups hemo com a cofactors. En llevat trobem dos gens que codifiquen per diferents catalases, els denominats *CTT1* i *CTA1*. La catalasa Ctt1 es localitza principalment al citosol i detoxifica gran part del peròxid d'hidrogen generat a la cèl·lula. Per altra banda, la catalasa Cta1 es localitza principalment als peroxisomes i es creu que

juga un paper important en la detoxificació del peròxid d'hidrogen generat en la β -oxidació dels àcids grassos en aquest orgànu (revisat a Hiltunen et al., 2003). Si bé sembla que la deleció d'ambdues catalases no té un efecte sobre el creixement, les soques deficientes en ambdues catalases són hipersensibles al peròxid d'hidrogen en fase estacionària el que apunta a que ambdues jugarien un paper col·laboratiu ja que els mutants simples no presenten aquesta hipersensibilitat (Izawa et al., 1996). Per altra banda, també s'ha suggerit que les catalases podrien participar en la detoxificació d'altres compostos oxidants com el peroxinitrit (Sahoo et al., 2009).

4.2.3. Peroxidases

A banda de les catalases la cèl·lula disposa d'un altre grup d'enzims denominats peroxidases capaços de reduir el peròxid d'hidrogen i altres peròxids. Dins aquest grup d'enzims podem trobar-ne dos subgrups: les tioredoxina peroxidases, que ahora es divideixen en diferents subgrups; i les glutatió peroxidases.

Per un costat les tioredoxina peroxidases, també denominades peroxiredoxines, les podem classificar en 3 subfamílies depenent de les cisteïnes que participen en el mecanisme de reacció. Així doncs, podem diferenciar entre les 2-Cys típiques, les 2-Cys atípiques i les 1-Cys. Totes les peroxiredoxines contenen una cisteïna reactiva la qual és la responsable de la reducció dels peròxids i com a conseqüència de la reacció, aquesta cisteïna s'oxida. Seguidament, aquesta cisteïna reacciona amb una altra de la pròpia peroxiredoxina, o amb altres tiols com el glutatió en el cas de les 1-Cys, donant lloc a un pont disulfur. Posteriorment aquest pont disulfur es redueix amb l'ajuda d'altres antioxidants com el sistema tioredoxina (veure apartats posteriors) (revisat a Karplus, 2015; Toledano & Huang, 2016). En condicions més oxidants, la cisteïna oxidada de la peroxiredoxina en qüestió es pot sobreoxidar donant lloc a un grup sulfínic. Aquesta oxidació es pot revertir de nou a sulfènic a través de l'acció de les sulfiredoxines en un procés que requereix del consum d'ATP (Jeong et al., 2012).

Les denominades glutatió peroxidases, tenen un mecanisme d'acció similar a les peroxiredoxines, amb la diferència que en el sistema de reducció del peròxid s'utilitza el

glutatió com a donador d'electrons i participen principalment en la reducció de fosfolípids oxidats. El glutatió oxidat resultant de la reacció de la glutatió peroxidasa, pot ser reduït de nou per part dels enzims glutatió reductasa (Glr).

4.2.4. Sistema glutaredoxina

Un dels sistemes per reparar l'oxidació de cisteïnes, és el denominat sistema glutaredoxina on aquestes proteïnes participen a través de reduir ponts disulfur. Aquests enzims es varen descriure per primer cop com a reductors de la ribonucleòtid reductasa en *E. coli* en una reacció que utilitzava com a donador d'electrons el glutatió (Holmgren, 1976). Dins de la família de les glutaredoxines en podem trobar dues subfamílies, les denominades glutaredoxines ditiòliques (*GRX1*, *GRX2* i *GRX8*) i les glutaredoxines monitiòliques (*GRX3*, *GRX4*, *GRX5*, *GRX6* i *GRX7*) (Herrero & de la Torre-Ruiz, 2007). La diferència entre ambdues subfamílies es troba en el centre catalític d'aquests enzims: mentre que en les ditiòliques el centre actiu té dos residus de cisteïna (CPYC) en les monitiòliques aquest centre actiu només consta d'una cisteïna (CG/PF/YS) el que fa que el seu mecanisme de reacció sigui lleugerament diferent (Figura 12). Per un costat, les GRX ditiòliques poden reaccionar amb proteïnes que contenen ponts disulfur com a conseqüència de l'oxidació de les seves cisteïnes. En aquesta reacció, les cisteïnes del centre actiu de la GRX aporten electrons per a resoldre el pont disulfur de forma que en primer lloc es forma un pont disulfur mixte entre les dues proteïnes, per a que posteriorment aquest pont disulfur es formi entre les cisteïnes de la GRX tal que la proteïna inicialment oxidada queda reduïda. Per a restablir les condicions inicials, les GRX obtenen electrons del glutatió (GSH) aconseguint així reduir el pont disulfur i generant com a producte glutatió oxidat (GSSG). Finalment l'enzim glutatió reductasa catalitza la conversió del GSSG a 2GSH a través de l'oxidació del NADPH. Pel que fa a les GRX monitiòliques se les ha relacionat més a la reducció de proteïnes glutatiolades. En aquesta reacció, les GRX redueixen la cisteïna oxidada (ProtS-SG) i incorporant el glutatió a la cisteïna del centre actiu. Seguidament utilitzen el glutatió com a donador d'electrons

per a reduir-se i es genera com a producte glutatió oxidat (GSSG) que pot ser reduït de nou per la glutatió reductasa.

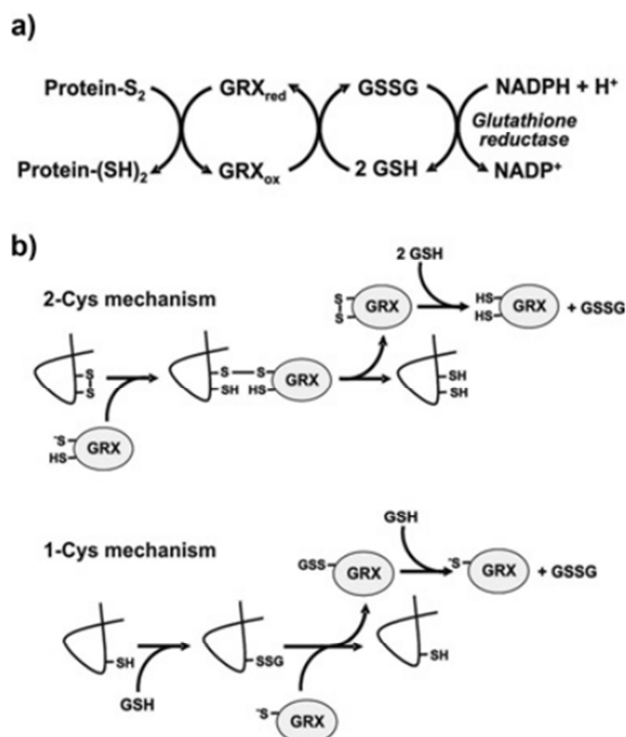


Figura 12. Mecanismes de reacció de les glutaredoxines. A) Mecanisme general de reacció de les glutaredoxines. B) Mecanismes de reacció de les diferents subfamílies de glutaredoxines, ditiòliques (2-Cys) i monotiòliques (1-Cys), els detalls de cada reacció s'expliquen al text (Herrero & de la Torre-Ruiz, 2007)

4.2.4.1. Les GRX ditiòliques

En *S. cerevisiae*, la família de les GRX ditiòliques està formada pels gens *GRX1*, *GRX2* i la més desconeguda *GRX8*. Les glutaredoxines 1 i 2, tenen una similitud entre elles del 85% i són parcialment redundants. Si bé els mutants d'aquestes proteïnes no mostraven una alta sensibilitat a agents oxidants durant la fase exponencial de creixement, si que es van apreciar diferències en fase estacionària, on es va observar una major sensibilitat dels mutants *grx1* a estrès per superòxid i una major sensibilitat dels mutants *grx2* a l'estrès per peròxids (Luikenhuis et al., 1998). En aquest mateix treball i en un altre realitzat pel mateix grup, es varen apreciar diferències d'expressió entre els dos gens sota diferents condicions d'estrès. Mentre l'expressió de *GRX1* era superior en situacions d'estrès tèrmic

i osmòtic l'expressió de GRX2 era superior en fase estacionària i en el creixement en medi on la font principal de carboni no fos glucosa, per exemple en medi amb glicerol (Grant et al., 2000; Luikenhuis et al., 1998). Aquest fenomen pot tenir la seva explicació en el fet que la GRX2 també té localització mitocondrial i tant l'activitat mitocondrial com la biosíntesi de les mateixes augmenten durant la fase diàuxica i en les etapes de creixement posteriors així com en el creixement en fonts de carboni no fermentables. Aquesta localització mitocondrial és conseqüència d'un codó d'iniciació (AUG) diferent al clàssic i que es localitza 99 pb abans del codó d'iniciació canònic. Aquest nou fragment aporta a la proteïna un pèptid de localització mitocondrial, on es localitza tot i que els seus nivells són inferiors als de la forma citosòlica (Pedrajas et al., 2002).

4.2.4.2. Les GRX monotiòliques

La família de les GRX monotiòliques està formada pels gens *GRX3*, *GRX4*, *GRX5*, *GRX6* i *GRX7*. Aquestes es localitzen en orgànuls diferents i participen no tan sols en la resposta a estrès oxidatiu sinó que també duen a terme altres funcions rellevants.

Les primeres identificades varen ser les glutaredoxines 3,4 i 5. Mentre que els mutants de les glutaredoxines 3 i 4 no mostraven una alteració en el seu ritme de creixement, el mutant Δ grx5 sí que ho feia. A més aquest mutant també mostrava una major sensibilitat a agents oxidants com el peròxid d'hidrogen o la menadiona i un major grau de carbonilació de proteïnes (Rodríguez-Manzanaque et al., 1999). Posteriorment, es va observar que aquesta proteïna tenia localització mitocondrial i la seva deleció provocava un increment en els nivells de ferro intracel·lulars i la pèrdua de l'activitat dels enzims que contenen centres Fe-S com aconitasa. Tot i que els centres Fe-S són sensibles a l'estrès oxidatiu, la pèrdua d'aquests no era conseqüència de l'acumulació de ferro el que apuntava a un paper directe de Grx5 en la biosíntesi d'aquests cofactors (Rodríguez-Manzanaque et al., 2002). Per altra banda, es va descriure que Grx5 també podria funcionar com una GRX ditiòlica a través dels aminoàcids C60, que pertany al centre actiu, i la C117 (Tamarit et al., 2003), tot i que aquesta seria una funció secundària de la proteïna ja que mutacions a l'aminoàcid C117 no donen lloc als fenotips d'acumulació de

ferro, sensibilitat a menadiona i dificultats de creixement en medis sintètics com les que ho provoquen la deleció de la proteïna o la mutació de la cisteïna del centre catalític C60 (Bellí et al., 2002).

Pel que fa referència a les Grx3 i Grx4, aquestes tenen localització citosòlica-nuclear. S'ha descrit que aquestes proteïnes funcionen en la regulació del metabolisme del ferro a través de regular la localització del factor transcripcional Aft1 (Pujol-Carrion et al., 2006). Aquesta regulació té lloc juntament amb la proteïna Fra2 amb la qual la proteïna Grx3 o la Grx4 coordinen un centre 2Fe-2S que és essencial per a regular l'activitat d'Aft1 (Figura 13) (Kumánovics et al., 2008; Li et al., 2009). A banda d'aquesta regulació del metabolisme del ferro, les glutaredoxines 3 i 4 també regulen els nivells d'oxidació de proteïnes nuclears. Recentment, s'ha descrit com aquestes dues proteïnes poden revertir la glutatiolació que pateix la sirtuïna Sir2 restaurant-ne així l'activitat (Vall-Llaura et al., 2016).

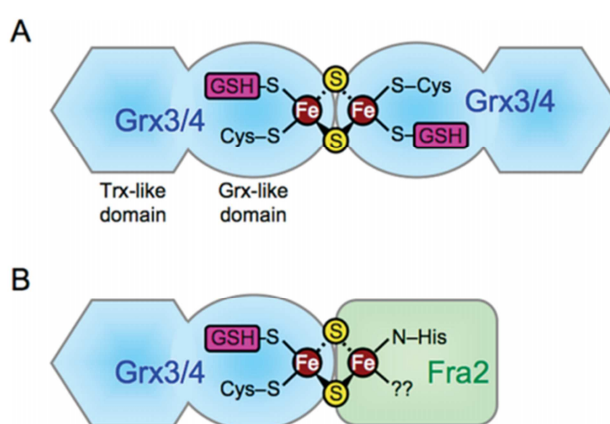


Figura 13. Formació de homo i heterodimers de Grx3/4. A) Grx3 i Grx4 poden formar homodimers a través de la coordinació d'un centre 2Fe-2S amb les cisteïnes dels seus centres actius i les cisteïnes del glutatió que poden unir. B) Per a la regulació del metabolisme del ferro, Grx3 i Grx4 poden formar un heterodímer amb la proteïna Fra2 coordinant el centre Fe-S amb una histidina de la seva estructura. El quart lligand implicat en la coordinació d'aquest centre encara no s'ha identificat. (Li et al., 2009)

Finalment les glutaredoxines 6 i 7 s'han associat al reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008). Tot i tenir un alt grau d'homologia,

tenen diferències que suggereixen que duen a terme diferents funcions entre elles. Una de les diferències es troba en l'estructura, on s'ha descrit que Grx6 forma un tetràmer coordinat per centres Fe-S, una estructura que no es troba en Grx7 (Mesecke et al., 2008). Si bé la seva funció concreta no està clara, s'ha descrit que la deficiència en Grx6 altera la homeòstasi del calci, a través de l'activació de la via de la calcineurina, mentre que la deleció de Grx7 no produeix aquest efecte (Puigpinós et al., 2015). Segons aquest estudi, els efectes observats poden ser conseqüència de l'alteració en la situació redox del reticle derivats del dèficit de Grx6 ja que l'adició de reductors com el DTT restableixen els nivells de calci. Així doncs, Grx6 actuaria com a reductor al reticle endoplasmàtic.

4.2.5. Altres sistemes enzimàtics de reparació del dany oxidatiu

A banda del sistema glutaredoxina, existeix un altre conjunt d'enzims, conegut com el sistema tioredoxina, que serveix per reduir ponts disulfur formats per l'oxidació de cisteïnes. La principal diferència amb el sistema glutaredoxina és que aquest no utilitza glutatí, i obté els electrons directament del NADPH.

Les tioredoxines contenen dues cisteïnes molt conservades al seu centre actiu que són les responsables de la seva activitat tiol oxidoreductasa. *Saccharomyces cerevisiae* conté tres gens que codifiquen per tioredoxines, *TRX1*, *TRX2* i *TRX3*, essent les dues primeres citosòliques i la tercera mitocondrial (revisat a Herrero et al., 2008). Aquestes proteïnes juntament amb les tioredoxines reductases (Trr1 i Trr2) formen dos sistemes tioredoxina, un citosòlic i un altre mitocondrial. Tot i que el sistema tioredoxina i el glutaredoxina són sistemes diferents, ambdós tenen funcions redundants tant en termes de regulació com en llurs dianes. Aquest fet queda demostrat en la combinació de diferents mutants dels dos sistemes. La pèrdua de funcionalitat dels dos sistemes alhora, com passa en el mutant $\Delta\text{glr1 } \Delta\text{trr1}$, resulta en letalitat (Trotter & Grant, 2003). Aquesta letalitat, es creu que es dona com a conseqüència de la impossibilitat de reduir algun enzim essencial, com per exemple la ribonucleòtid reductasa posant de manifest la redundància en les seves dianes. Per altra banda, la mutació de Glr1 juntament amb la Trr2, la reductasa mitocondrial, ($\Delta\text{glr1 } \Delta\text{trr2}$) no genera aquesta letalitat tot i que s'observa un creixement

lent en medi respiratori i una hipersensibilitat a peròxid d'hidrogen. Aquests fenotips són conseqüència de la incapacitat per a reduir la Trx3 que provoca una situació d'estrès al mitocondri (Trotter & Grant, 2005). Aquests resultats proven la existència de dos sistemes tioredoxina independents descrit prèviament (Pedrajas et al., 1999), així com la connexió entre els sistemes glutaredoxina i tioredoxina citosòlic i mitocondrials.

A banda de l'oxidació de cisteïnes, la cèl·lula disposa de mecanismes per a revertir l'oxidació d'altres aminoàcids com la metionina. Aquest aminoàcid, que també conté sofre, pot oxidar-se donant lloc al que es coneix com a metionina sulfòxid. Els dos enzims dels que disposa *S. cerevisiae* per a restaurar les metionines oxidades són els gens *MXR1* i *MXR2*. Cadascun d'aquests enzims és específic pels diferents enantiòmers de metionina sulfòxid (formes L i R). La manca d'aquests enzims genera sensibilitat a peròxid d'hidrogen i el creixement en medis on la metionina es troba oxidada també és menor en comparació amb soques salvatges (Le et al., 2009). En mutants de les dues MXR s'ha observat l'activació del reguló del ferro Aft1, un fenotip que s'ha relacionat amb un defecte en la biosíntesi de centres Fe-S o un augment del dany oxidatiu sobre aquests. Per tant, la protecció de les Mxr front estrès oxidatiu també inclou la protecció dels centres Fe-S de l'oxidació (Sideri et al., 2009). El mecanisme de reducció que utilitzen les Mxr per a reduir les metionines oxidades implica l'oxidació de les cisteïnes que tenen al centre actiu que després de reduir la metionina s'oxiden formant un pont disulfur. Posteriorment el sistema tioredoxina redueix aquestes cisteïnes (Le et al., 2009).

4.3. Redox signaling, les espècies reactives de l'oxigen com a senyalitzadors

Tal com s'ha explicat anteriorment, les espècies reactives de l'oxigen tenen diferents propietats, tant de difusió com de reactivitat, el que permet que aquestes siguin utilitzades per la cèl·lula com a senyalitzadors. Aquesta senyalització és important en molts processos, com la resposta transcripcional a situacions d'estrès oxidatiu.

En termes de reactivitat, podem trobar clars exemples de com diferents ROS poden activar diferents respostes transcripcionals de la cèl·lula. Per a mostrar-ho amb un exemple, podem fixar-nos en els sistemes OxyR i SoxR d'*Escherichia coli*. Per un costat el sistema OxyR serveix per respondre en presència de peròxid d'hidrogen. Aquest radical provoca l'oxidació de certes cisteïnes en la seva estructura donant lloc a la forma activa de la proteïna que activa la transcripció dels gens de resposta a estrès. Per altra banda, el sistema SoxR posseeix com a sensor un centre Fe-S el qual és més sensible a la presència de superòxid que no pas al peròxid d'hidrogen. En presència de superòxid aquest centre Fe-S es desestabilitza, el factor transcripcional SoxR s'activa i promou l'expressió, entre altres, de la superòxid dismutasa (Pomposiello et al., 2001).

En el cas de *S. cerevisiae*, trobem un clar exemple de senyalització redox en l'activació del factor transcripcional Yap1, un dels activadors de la resposta front estrès oxidatiu. Aquest factor transcripcional, s'oxida en presència de peròxid d'hidrogen formant un pont disulfur intern entre les cisteïnes C303 i C598 que li provoca un canvi de conformació i com a conseqüència perd la capacitat d'interaccionar amb l'exportina nuclear Crm1, augmentant així la seva presència al nucli (Delaunay et al., 2000). Així doncs, aquesta localització nuclear en presència d'estrès és conseqüència d'un descens en l'exportació nuclear i no conseqüència d'un augment en l'import (Isoyama et al., 2001). Aquest mecanisme de regulació és específic per al peròxid d'hidrogen, ja que, estressos amb diamida, tot i que provoquen la localització nuclear de Yap1, impliquen l'oxidació de diferents cisteïnes, el que suggereix especificitat en la resposta front diferents agents oxidants (Coleman et al., 1999). Posteriorment, es va observar que l'activació depenent de peròxid d'hidrogen té un intermediari, la glutatió peroxidasa 3 (GPx3). En presència d'hidroperòxids, aquesta peroxidasa els redueix oxidant una de les seves cisteïnes reactives, concretament la C36. Aquesta cisteïna oxidada reacciona amb la C598 de Yap1 donant lloc a un pont disulfur mixte entre les dues proteïnes. Finalment la C303 de Yap1 forma el pont disulfur intern que dóna lloc a la forma activa de Yap1 (Delaunay et al., 2002). La reducció de Yap1 depèn del sistema tioredoxina i per tant dels gens que el propi factor transcripcional expressa (Kuge & Jones, 1994), establint-se així una clara relació

entre nivells d'estrès i l'expressió de defenses antioxidants, de forma que quan la bàscula s'inclina a favor de les defenses antioxidants aquestes deixen d'expressar-se.

Així doncs, les espècies reactives de l'oxigen no són només un subproducte del metabolisme oxidatiu, sinó que des dels procariotes fins als eucariotes superiors aquestes molècules s'han utilitzat com a senyalitzadors a través de diferents intermediaris que generen especificitat per així integrar aquestes senyals i generar una resposta adequada.

Objectius

Resultats previs del grup, així com resultats obtinguts per altres grups, apunten a que la pèrdua de proteïnes que contenen centres Fe-S és un efecte secundari del dèficit de frataxina. Tot i això, no s'ha descrit un mecanisme concret més enllà del dany oxidatiu que poden patir aquestes proteïnes. Si bé la pèrdua d'aquestes proteïnes pot portar a l'aturada del creixement observada en *Saccharomyces cerevisiae* (Moreno-Cermeño et al., 2010), altres mecanismes podrien participar en aquesta pèrdua de velocitat del creixement. Amb aquests antecedents, ens plantegem els següents objectius:

1. Identificar, utilitzant mètodes proteòmics, noves alteracions en cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en frataxina que puguin portar a la pèrdua de viabilitat cel·lular i analitzar la possible implicació d'un factor comú en els possibles efectes observats a l'anàlisi proteòmica.
2. Analitzar la implicació de la proteïna Cth2 en el descens d'activitat i nivells de proteïna de les proteïnes que contenen centres Fe-S, com Aconitasa, en mutants deficientes en Yfh1.
3. Analitzar el mecanisme d'activació del reguló del ferro en mutants de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en Yfh1.
4. Posta a punt d'un mètode de proteòmica dirigida per a la ràpida detecció i quantificació de proteïnes relacionades amb els diferents fenotips observats en els mutants de Yfh1.

Materials i Mètodes

1. Microorganismes i condicions de cultiu

1.1. Soques de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades i condicions de creixement

Per a l'estudi dels fenotips derivats del dèficit de frataxina, s'han utilitzat les soques que es mostren resumides a la Taula 6.

Taula 6. Soques de *S. cerevisiae* utilitzades en aquest treball. Es detalla el codi de la soca, el genotip i el seu origen.

Codi	Genotip rellevant	Font i Comentaris
W303-1A	<i>MATa ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1</i>	Soca salvatge
W303-1B	<i>MATα ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1</i>	Soca salvatge
BQS200	W303-1A <i>tetO2-YFH1::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Moreno-Cermeño (2010)
BQS201	W303-1A <i>tetO7-YFH1::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Moreno-Cermeño (2010)
BQS213	W303-1A <i>ADR1-GFP::hphNT1</i>	<i>ADR1</i> marcada amb GFP. Dr. Armando Moreno-Cermeño.
BQS215	BQS201, <i>ADR1-GFP::hphNT1</i>	<i>ADR1</i> marcada amb GFP. Dr. Armando Moreno-Cermeño.
BQS216	BQS201, <i>ADR1-3HA::natMX4</i>	<i>ADR1</i> marcada amb l'epítot 3x HA. Dr. Armando Moreno-Cermeño.
BQS250	W303-1B, <i>cth2::natMX4</i>	Aquest estudi. Interrupció del gen <i>CTH2</i>
BQS251	BQS201, <i>cth2::natMX4</i>	Aquest estudi. Espora provinent del creuament BQS201xBQS250

BQS252	W303-1A <i>cth2::natMX4</i>	Aquest estudi. Espora provinent del creuament BQS201xBQS250
MML313	W303-1A <i>tetO7-GRX5::kanMX4 tetR'-Ssn6::LEU2</i>	Dr. Enric Herrero
BQS257	MML313, <i>cth2::natMX4</i>	Aquest estudi. Espora provinent del creuament MML313xBQS250
BQS253	W303-1B, <i>yhb1::natMX4</i>	Aquest estudi. Interrupció del gen YHB1
BQS254	W303-1A, <i>yhb1::natMX4</i>	Aquest estudi. Interrupció del gen YHB1
BQS255	BQS201, <i>yhb1::natMX4</i>	Aquest estudi. Espora provinent del creuament BQS201xBQS253
BQS259	BQS200, <i>YHB1-GFP::hphNT1</i>	Aquest estudi. Marcatge de YHB1 amb l'epítop GFP
BQS265	W303, <i>FET3-9myc::hphNT1</i>	Aquest estudi. Marcatge de FET3 amb el epítop 9x Myc
BQS266	BQS252, <i>FET3-9myc::hphNT1</i>	Aquest estudi. Marcatge de FET3 amb el epítop 9x Myc
BQS267	BQS201, <i>FET3-9myc::hphNT1</i>	Aquest estudi. Marcatge de FET3 amb el epítop 9x Myc
BQS268	BQS255, <i>FET3-9myc::hphNT1</i>	Aquest estudi. Marcatge de FET3 amb el epítop 9x Myc

Els cultius es van créixer principalment en medi respiratori YPG. Per a determinats experiments, tal com s'indica quan correspongui, també es van utilitzar altres medis com YPD o medi sintètic (SC). En els casos on es va utilitzar medi SC, es van afegir al medi

les auxotròfies requerides per la soca en qüestió. La composició dels medis de cultiu es detalla a la Taula 7:

Taula 7. Composició dels medis utilitzats per al creixement de *S. cerevisiae*.

YPG 3%		YPD 2%		SC	
Glicerol	3%	Glucosa	2%	Glucosa	2%
Extracte de llevat	1%	Extracte de llevat	1%	Yeast Nitrogen Base (YNB)	6,7g/L
Peptona	2%	Peptona	2%	Drop-out	1,32g/L

En el cas dels cultius en medi líquid, aquests es van créixer en erlenmeyers respectant una relació 1:5 entre el volum de cultiu i el volum del erlenmeyer per a assegurar una bona oxigenació. Els cultius es van créixer a una temperatura de 30°C utilitzant un agitador orbital de calor sec. En el cas del creixement en medi sòlid, es van utilitzar els mateixos medis descrits anteriorment als quals se'ls hi va afegir agar 2% (p/v). Les plaques s'incubaven el temps desitjat en una estufa a 30 °C.

1.2. Mesura del temps de generació

Per a la determinació dels temps de generació dels cultius de llevat, es va partir d'un preinòcul de la soca desitjada crescuda en el medi en el qual es volgués determinar la taxa de creixement. Aquests cultius es van diluir fins una densitat òptica inicial de 0,05 (OD₆₀₀) en plaques de 24 pous (Falcon), en les quals s'utilitzava un volum de 0,5 mL per pou. Les plaques es van segellar amb una membrana transpirable (*Breathe Easy Sealing Membrane, Sigma*) i es varen incubar en un lector de plaques (*Powerwave XS, Biotek*) a 30 °C amb agitació constant on se'n va mesurar l'absorbància a 600 nm cada mitja hora al llarg de 48 hores.

Les dades es varen obtenir amb el programa Gen5.1 (*Biotek*) i es varen calcular els temps de generació de la fase exponencial dels cultius utilitzant el programa Excel de Microsoft.

1.3. Assajos de viabilitat

Per a la realització dels diferents assajos de viabilitat, es varen seguir dues estratègies:

- a) Es varen créixer els cultius en medi YPG fins a una $OD_{600} = 0,4 - 0,7$. Aquests cultius es varen tractar amb el compost que es volgués analitzar durant un cert temps. Seguidament, es varen prendre 0,5 ODs d'aquest cultiu, es va centrifugar durant 2 minuts a 6000 rpms i el pèl·let es va rentar un cop amb PBS. Es va centrifugar de nou i el pèl·let es va resuspendre en 1 mL de PBS. Finalment, es varen fer dilucions seriades (1:5) en PBS i 2,5 μ L de cadascuna d'aquestes dilucions es varen plaquejar en medi YPD durant 36-48h en una estufa a 30°C.
- b) Les soques a analitzar es varen créixer en medi YPG fins a una $OD_{600} = 0,4 - 0,7$. Seguidament es van prendre 0,5 ODs, aquestes cèl·lules es varen centrifugar 2 minuts a 6000 rpms i el pèl·let es va rentar amb 1 mL de PBS. Es va centrifugar de nou, i el pèl·let es va resuspendre en un volum final de 1 mL de PBS. A continuació es van realitzar 5 dilucions seriades (1:5) en PBS i se'n varen plaquejar 2,5 μ L de cadascuna en plaques que contenien el compost del qual se'n volia determinar la sensibilitat. Les plaques es varen incubar durant 36-48h en una estufa a 30°C.

1.4. Creixement de bacteris (*Escherichia coli*)

Amb la finalitat d'amplificar plasmidis per a obtenir-ne més quantitat, es van utilitzar cèl·lules DH5 α d'*Escherichia coli*. Per al creixement d'aquests bacteris, es va utilitzar medi LB (1% Triptona, 1% NaCl, 0,5% Extracte de llevat), amb presència o no d'ampicil·lina a una concentració final de 100 μ g/mL. Els cultius es varen créixer en un agitador orbital de calor sec a 37° C.

Per al creixement en placa, es va utilitzar el mateix medi LB amb o sense ampicil·lina i amb un 2% (p/v) agar. Aquestes es van incubar en una estufa a 37°C.

2. Mètodes d'anàlisi de proteïnes

2.1. Obtenció d'extractes proteics

Per a la disrupció mecànica de les cèl·lules i l'obtenció dels extractes es va utilitzar un *Mini-BeadBeater 16 Cell Disrupter (MBB-16)* i perles de vidre (*glass beads, Sigma*) en presència de tampó. Segons la posterior utilització dels extractes proteics es varen utilitzar tampons de lisi diferents. En cada mètode d'anàlisi de proteïnes es detallarà el tampó utilitzat i les condicions d'extracció.

2.2. Quantificació d'extractes proteics

Per a la quantificació dels extractes de proteïna, es varen utilitzar dos mètodes diferents basats en el mètode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*) i el mètode de Lowry (*BCATM Protein Assay Kit, #23227 Thermo Scientific*). La utilització d'un o altre mètode depèn de la presència o no de SDS en els extractes ja que el Bradford és incompatible a aquest detergent. En ambdós casos es va utilitzar una corba patró elaborada amb concentracions conegudes de BSA per a calcular la concentració de proteïna de cada mostra.

2.3. Mètodes electroforètics

2.3.1. SDS-PAGE

L'electroforesi desnaturalitzant o SDS-PAGE, permet la separació de les proteïnes d'una mostra en gels d'acrilamida en funció de la seva mida. Aquesta electroforesi es basa en la desnaturalització de les proteïnes amb el detergent aniònic SDS el qual també afegeix càrrega negativa a la mostra.

Protocol, preparació de les mostres:

- Es parteix d'un pèl·let de 7 ODs de cèl·lules, les quals es resupenen en 100 µL de tampó 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 1 mM EDTA i inhibidors de proteases.
- S'afegeixen perles de vidre i es lisen les cèl·lules en un *Mini-BeadBeater 16 Cell Disrupter*. Es fan 3 cicles de 45 segons.
- Es perfora el tub i es col·loca un tub nou de 1,5 mL a sota. Es centrifuga a 3000 rpm durant 1 minut i es recupera l'extracte.
- L'extracte es centrifuga de nou a 12.000 rpm durant 10 minuts.
- Es recupera el sobrenedant i se'n quantifica la proteïna utilitzant el mètode de Bradford tal com s'ha descrit a l'apartat anterior.
- S'igualava tant la concentració de proteïna com el volum entre les diferents mostres i s'hi afegeix SRx3 en una proporció 1:3 respecte la mostra. Aquesta solució conté SDS, EDTA i β-mercaptoetanol que queden a una concentració final del 5%, 10 mM i 5% respectivament.
- Seguidament les mostres es bullen a 100 °C durant 3 minuts en un bloc tèrmic.
- Finalment s'afegeix la solució SSx4 en una proporció 1:4 respecte la mostra. Aquesta solució és el que també denominem tampó de càrrega ja que conté sacarosa, a una concentració final del 5%, que dóna densitat a la mostra i blau de bromofenol 0,0125% que dóna color a la mostra.

Protocol, preparació de mostres amb àcid tricloroacètic (TCA):

- Es parteix d'un cultiu a una densitat òptica $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ i s'hi afegeix TCA a una concentració final del 20%.
- Es prenen 5 ODs i es centrifuguen 2 minuts a 5000 rpm.
- El pèl·let es resuspèn amb 0,5 mL 20% TCA, es transfereix a un tub de 1,5 mL i es centrifuga durant 1 minut a 10.000 rpm.
- Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pèl·let amb 100 µL de TCA 12,5%. S'afegeixen perles de vidre i es lisen les cèl·lules en un *Mini-BeadBeater 16 Cell Disrupter*. Es fan 3 cicles de 45 segons.

- Es perfora el tub i es col·loca un tub nou de 1,5 mL a sota. Es centrifuga a 3000 rpm durant 1 minut i es recupera l'extracte.
- Es centrifuga l'extracte durant 1 minut a 10.000 rpm i es descarta el sobrenedant.
- El pèl·let es resuspèn amb 100 µL de acetona freda, es centrifuga de nou 1 minut a 10.000 rpm. Aquest procés es repeteix dues vegades més. Després de l'últim rentat el pèl·let es deixa assecar a temperatura ambient durant 5 minuts.
- Es resuspèn el pèl·let en tampó 0,67M Tris-HCl pH=8, 1% SDS i 1 mM EDTA.
- S'afegeix la solució SRx3 + 15% β-mercaptoetanol en una proporció 1:3 respecte la mostra.
- Es bullen les mostres a 100 °C durant 3 minuts en un bloc tèrmic.
- Finalment s'afegeix la solució SSx4 en una proporció 1:4 respecte la mostra.
- Abans de carregar el gel, les mostres es centrifuguen durant 3 minuts a 10.000 rpm per eliminar possibles agregats.

Protocol, electroforesi:

- Per a la preparació dels gels, s'utilitza el sistema Mini Protean 3 (*Bio-Rad*). La composició dels gels es detalla a la Taula 8.
- Un cop polimeritzats, es carreguen les mostres als pous. La quantitat de proteïna que es carrega oscil·la entre 15-40 µg depenent de la finalitat de l'experiment. En un dels pous es carrega un marcador de pes molecular com a referència (*Precision Plus ProteinTM All Blue Prestained Protein Standards, #1610373, Bio-Rad*).
- Un cop carregades les mostres, s'afegeix tampó de migració a la cubeta d'electroforesi. La cursa es realitza mantenint una intensitat de corrent de 15 mA fins que el front arribi al gel separador i aquesta s'augmenta a 20-25 mA constants la resta de la cursa.

Taula 8. Composició dels gels de poliacrilamida. La concentració del gel separador variava segons l'objectiu de l'experiment entre el rang de percentatge indicat.

	Gel Concentrador	Gel Separador
Acilamida/Bisacilamida (30:0,8)	5% (v/v)	7,5-15% (v/v)
Tris-HCl pH 8,9	-	375 mM
Tris-HCl pH 6,5	125 mM	-
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
Persulfat amònic	0,005% (p/v)	0,005% (p/v)
TEMED	0,025% (v/v)	0,025% (v/v)

Taula 9. Composició del tampó de migració (*Running buffer*)

Tampó de migració	
Tris-HCl pH 8,8	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1% (p/v)

2.3.2. Electroforesi Bidimensional

L'electroforesi bidimensional (2-DE) permet la separació de proteïnes en funció de dues propietats diferents. En aquest treball s'ha utilitzat la separació per punt isoelèctric o isoelectroenfoc (IEF) com a primera dimensió, i la separació per pes molecular (SDS-PAGE) per a la segona dimensió. L'IEF es va dur a terme en tires IPG (*Immobilized pH Gradient*) amb un rang de pH 3-10 no lineal i de 17 cm de longitud (*Bio-Rad*). La segona dimensió o SDS-PAGE es va fer tal com s'ha descrit a l'apartat 2.3.1 en gels de 18 cm pel que es va utilitzar el sistema Protean II (*Bio-Rad*).

Protocol, preparació de mostres per als gels analítics:

- Es parteix d'un pèl·let de 7 ODs de cèl·lules el qual es resuspèn en 75 µL de tampó 25 mM Tris-HCl pH=8, Urea 8M i inhibidors de proteases.

- S'afegeixen perles de vidre i es lisen les cèl·lules en un *Mini-BeadBeater 16 Cell Disrupter*. Es fan 3 cicles de 45 segons.
- S'afegeixen 75 µL de 8M Urea 8% CHAPS a la mostra i es barreja amb l'ajuda d'un vòrtex.
- Es perfora el tub, es col·loca sobre un tub de 1,5 mL nou i es centrifuga a 3000 rpm durant 1 minut per recuperar l'extracte.
- Seguidament, es centrifuga a 12.000 rpm durant 10 minuts i es recupera el sobrenedant.
- Es quantifica la proteïna utilitzant el mètode de Bradford.
- S'utilitzen 50 µg de proteïna per cada mostra, els quals es dilueixen amb tampó de rehidratació (RHB VI, *General Electric*), DTT a una concentració final de 50 mM i Amfòlits (BioLytes 3-10, #163-1112, *Bio-Rad*) en un volum final de 340 µL.

Protocol, preparació de mostres per als gels preparatius:

- Es parteix d'un pèl·let de 7 ODs de cèl·lules el qual es resuspèn en 100 µL de tampó 50 mM Tris-HCl pH=7,5, inhibidors de proteases i 6% SDS.
- Seguidament, s'afegeixen perles de vidre i es lisen les cèl·lules per disrupció mecànica en un *Mini-BeadBeater 16 Cell Disrupter*. Es fan 3 cicles de 45 segons cadascun.
- Es perfora el tub, es col·loca sobre un tub nou de 1,5 mL i es centrifuga a 3000 rpm durant 1 minut a fi de recuperar l'extracte.
- La proteïna es precipita afegint 9 volums de acetona (900 µL), s'agita suaument al vòrtex i s'incuba durant 45 minuts a temperatura ambient.
- Passat el temps d'incubació, es centrifuga durant 5 minuts a 5000 rpm i es descarta el sobrenedant. Seguidament, el pèl·let de proteïna es renta 2 vegades amb 1 mL de acetona. Després de l'últim rentat es deixa evaporar completament la acetona.
- El pèl·let de proteïna es resuspèn en 100 µL de tampó de rehidratació (RHB VI, *General Electric*) durant 2 hores a temperatura ambient i agitació constant en un *Thermomixer Comfort (Eppendorf)*.
- Tot seguit es quantifica la proteïna amb el mètode de Bradford.
- Finalment, es prenen 300 µg de proteïna, els quals es porten fins a un volum final de 340 µL amb tampó de rehidratació, 50 mM DTT i Amfòlits.

2.3.2.1. Primera Dimensió: Isoelectroenfoc

Un cop preparades les mostres es va seguir amb la primera dimensió o isoelectroenfoc, que consisteix en separar les proteïnes segons el seu punt isoelèctric. Aquesta primera dimensió es va realitzar sobre tires IPG (de l'anglès, *Immobilized pH Gradient*) de 17 cm i amb un rang de pH 3-10 no lineal (#1632009, *Bio-Rad*). Aquest protocol consta de dues parts, la rehidratació de la tira, durant la qual la mostra entra dins l'acrilamida de la tira, i l'isoelectroenfoc pròpiament dit, on es separen les mostres segons el seu punt isoelèctric.

Protocol:

- Es pren tot el volum de mostra (340 μ L) i es reparteix al llarg d'un carril de la cubeta d'isoelectroenfoc.
- Seguidament es deposita sobre la mostra la tira IPG i es cobreix amb oli mineral per a evitar l'oxidació i assecat de la mostra.
- Es realitza un procés de rehidratació activa, per al qual es marca un voltatge constant de 50 mV durant 12-16h a una temperatura de 20 °C en un *Protean IEF Cell* (*Bio-Rad*).
- Finalitzada la rehidratació, en la mateixa cubeta es realitza l'isoelectroenfoc, per la qual es marca una intensitat màxima de 50 μ A per tira i s'utilitza el següent programa:
 - o 500 V [↗] 30 minuts
 - o 1000 V [↗] 1 hora
 - o 10000 V [↗] 1 hora
 - o 10000 V/h [↗] 55000 V x h
 - o 500 V [↗] 2 hores
- Un cop acabada la primera dimensió les tires es guarden a -20°C fins al moment de ser utilitzades.

2.3.2.2. Segona Dimensió: SDS-PAGE

La segona dimensió consisteix en una separació per pes molecular o SDS-PAGE. Per a aquesta separació, es necessita un equilibrat de les tires que consisteix en incorporar SDS a la mostra per a donar-li càrrega negativa i realitzar els passos de reducció i alquilació per evitar la formació de ponts disulfur entre proteïnes de la mostra. Posteriorment, es realitza la separació en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants.

Protocol:

- Es descongelen les tires durant 15 minuts a temperatura ambient.
- Seguidament les tires es sotmeten a un equilibrat amb dos tampons diferents (Taula 10). En primer lloc s'afegeix tampó d'equilibrat I i s'incuben les tires durant 15 minuts. Posteriorment es retira aquest tampó i s'afegeix tampó d'equilibrat II durant 15 minuts més.
- Les proteïnes contingudes a les tires es migren en gels de 18 cm d'una concentració final d'acrilamida del 10% preparats en un *Protean II* (Bio-Rad).
- Les tires es col·loquen a la part superior del gel evitant la formació de bombolles entre les tires i el gel. Sobre les tires s'aplica una solució d'agarosa 0,5% i blau de bromofenol, que serveix per a fixar la tira sobre el gel i marcar el front de color blau.
- La migració es realitza durant 16h a una intensitat constant de 9 mA per gel.

Taula 10. Composició dels tampons equilibradors. Tampons utilitzats per a l'equilibrat de les tires IPG abans de la segona dimensió.

Tampó equilibrador I		Tampó equilibrador II	
Tris-HCl pH 8,8	375 mM	Tris-HCl pH 8,8	375 mM
Urea	6 M	Urea	6 M
SDS	2% (p/v)	SDS	2% (p/v)
Glicerol	20% (p/v)	Glicerol	20% (p/v)
DTT	130 mM	Iodoacetamida (IAM)	135 mM

Finalitzada la separació, els gels es tenyeixen amb diferents tincions fluorescents; els gels analítics es tenyeixen utilitzant Flamingo (*Bio-Rad*), mentre que els gels preparatius es tenyeixen amb Oriole (*Bio-Rad*).

2.4. Immunodetecció de Proteïnes, *Western Blot*

Després de la separació de proteïnes, ja sigui en un gel desnaturalitzant (SDS-PAGE) o en un gel natiu, aquestes es transfereixen a una membrana de PVDF o bé de nitrocel·lulosa per a la posterior immunodetecció.

Protocol transferència:

- La membrana de PVDF s'incuba en metanol durant 30-60 segons per treure-li la hidrofobicitat i seguidament es reserva en tampó de transferència (Taula 11).
- Al acabar la electroforesi s'incuba breument el gel en tampó de transferència.
- Seguidament es fa una transferència semi-seca en un equip *Hoeffer Semiphor*. S'aplica una intensitat de corrent de 1 mA/cm^2 (60 mA per membrana) durant una hora.

Alternativament, per a la detecció de proteïnes petites com frataxina, la transferència es realitza sobre una membrana de nitrocel·lulosa amb un tampó de transferència sense SDS i amb un 20 % de Metanol. Per a aquest tipus de membrana no es realitza el pas de hidratació amb metanol.

Taula 11. Composició del tampó de transferència.

Tampó de transferència	
Tris	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,0375% (p/v)
Metanol	10% (v/v)

Protocol immunodetecció:

- Finalitzada la transferència, la membrana es bloqueja utilitzant una solució de 0,3% (p/v) de reactiu de bloqueig (*I-block*, *Tropix*[®]) en tampó PBS i Tween 20 0,1% (v/v). Aquest pas es realitza durant un mínim de 1 hora a temperatura ambient o bé durant tota la nit a 4°C.
- Després del pas de bloqueig, es fan 2 rentats amb TBST + 5% de solució de bloqueig (v/v) per eliminar l'excés de solució de bloqueig.
- S'incuba la membrana amb l'anticòs primari durant 1 hora a temperatura ambient o tota la nit a 4°C. Els anticossos, tan primaris com secundaris, es dilueixen en la solució TBST + 5% solució de bloqueig.
- Seguidament, es realitzen dos rentats de 5 minuts amb TBST + 5% solució de bloqueig per eliminar l'excés d'anticòs primari.
- S'incuba la membrana amb l'anticòs secundari unit a peroxidasa durant 1 hora.
- Finalment, després es realitzen 5 rentats de 5 minuts amb TBST.
- Per a revelar, s'incuba la membrana amb el substrat de la peroxidasa (*Immobilon Western*, *Millipore*) durant 5 minuts.
- Les imatges de la membrana s'adquireixen en un equip *Chemidoc XRS* (*Bio-Rad*).

Taula 12. Composició dels tampons PBS i TBST utilitzats al llarg del protocol de immunodetecció.

Tampó PBS		Tampó TBST	
Na ₂ HPO ₄	5,8 mM	Tris-HCl	20 mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,7 mM	NaCl	125 mM
NaCl	6,8 mM	Tween-20	0,1% (v/v)

Taula 13. Llistat d'anticossos primaris utilitzats.

Anticòs Primari	Dilució ús	Origen
α -HA	1 en 1000	Roche (#1 867 423)
α -GFP	1 en 1000	Clontech (#632381)
α -Aco1	1 en 5000	Dr. Lill (Universitat de Marburg)
α -Sdh2	1 en 1000	Dr. Lill (Universitat de Marburg)
α -Porina	1 en 1000	Invitrogen (#459500)
α -SOD1	1 en 1000	Chemicon (#AB1237)
α -3NT	1 en 500	BioVision (#5416-50)
α -Myc	1 en 5000	Millipore (#06-549)

Taula 14. Llistat d'anticossos secundaris utilitzats.

Anticòs Secundari	Dilució d'ús	Origen
α -Rat	1 en 8000	Molecular Probes (#A10549)
α -Mouse	1 en 40000	Pierce (#31430)
α -Rabbit	1 en 40000	Pierce (#31460)

2.5. Mètodes de Tinció de Proteïnes

Tinció amb Blau de Comassie (CBB): Aquesta tinció es va utilitzar com a control de càrrega de la proteïna total permeten així la normalització dels resultats del Western Blot. Les membranes es tenyien després de realitzar la immunodetecció.

Protocol:

- Les membranes s'incuben durant un mínim de 10 minuts en solució de tinció: 0,1% (p/v) Comassie Brilliant Blue, 50% (v/v) metanol i 10% (v/v) àcid acètic.
- Acabat el temps de tinció, es retira la solució amb el colorant i es fan successius rentats amb la solució decolorant: 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) àcid acètic.

- Finalment, es realitza un últim rentat amb aigua destil·lada i es deixa assecar la membrana.

Tinció fluorescent: Es van utilitzar els reactius Oriole i Flamingo (*Bio-Rad*). Aquests mètodes de tinció es van emprar per a la tinció de gels tan mono com bidimensionals. Són tincions amb una gran sensibilitat i compatibles amb espectrometria de masses. Per ambdues tincions es varen seguir els passos detallats pel fabricant que es resumeixen a continuació.

Protocol tinció Oriole:

- El gel s'incuba directament amb el volum recomanat d'Oriole (*Bio-Rad*) durant un mínim de 90 minuts.
- Seguidament, es retira la solució de tinció i el gel es renta amb aigua destil·lada per eliminar del tot l'Oriole restant i reduir el soroll de fons.
- Per acabar, es prenen imatges en un Versadoc (*Bio-Rad*).

Protocol tinció amb Flamingo:

- Es fixen els gels incubant-los durant 2 hores amb una solució d'etanol 40% (v/v) i àcid acètic 10% (v/v) en un agitador.
- Seguidament, els gels s'incuben amb solució de tinció durant un mínim de 3 hores en agitació i protegit de la llum.
- Per a reduir el soroll de fons, els gels es renten amb una solució 0,1% Tween 20 durant 10 minuts.
- Finalment, es prenen imatges dels gels en un Versadoc (*Bio-Rad*).

2.6. Proteòmica Dirigida mitjançant MRM (*Multiple Reaction Monitoring*)

Per a la quantificació de nombroses proteïnes dins una mateixa mostra, es va posar a punt un mètode de proteòmica dirigida. Aquest mètode consisteix en obtenir extractes proteics, digerir les proteïnes en solució, separar els pèptids resultants en una cursa cromatogràfica en un HPLC i detectar diversos pèptids proteotípics de cada proteïna d'interès utilitzant espectrometria de masses. Per a la quantificació es van utilitzar com a estàndards versions pesades de cadascun dels pèptids que es volien analitzar.

2.6.1. Obtenció d'extractes

Per a obtenir els extractes, es va partir de 7 ODs de cèl·lules.

- El pèl·let de cèl·lules es resuspèn amb 150 µL de tampó 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 1 mM EDTA i inhibidors de proteases.
- S'afegeixen perles de vidre i les cèl·lules es lisen al *MiniBead Beater*.
- Seguidament, s'afegeix SDS a una concentració final del 2% i es barreja amb l'ajuda d'un vòrtex 1 minut.
- L'extracte s'incuba a 100°C durant 3 minuts.
- Es centrifuga a 12.000 rpm durant 10 minuts i es recupera el sobrenedant.
- L'extracte es quantifica utilitzant el mètode de Lowry.

2.6.2. Digestió en solució

Per a la digestió, utilitzem 50 µg de proteïna. Abans de la digestió, l'extracte proteic es sotmet a un procés de reducció i alquilació. Els passos es detallen a continuació:

- Es precipita la proteïna amb 9 volums d'acetona freda durant 30 minuts a -20°C.
- Es centrifuga a 10000 rpm durant 2 minuts i es descarta el sobrenedant. Es renta dues vegades el pèl·let amb acetona freda.

- Es resuspèn el pèl·let de proteïna amb 20 µL de 8M Urea - 0,1M Bicarbonat amònic, de forma que la mostra queda a una concentració de proteïna de 2,5 mg/mL.
- Reducció: S'afegeix ditiotreitòl (DTT) a una concentració final de 12 mM i s'incuba la mostra a 35°C durant 30 minuts en agitació (1000 rpm).
- Alquilació: Passat el temps d'incubació s'afegeix Iodoacetamida (IAA) a una concentració final de 40 mM i s'incuba la mostra a 25°C durant 45 minuts a la foscor en agitació (1000 rpm).
- Seguidament s'afegeix Bicarbonat amònic 0,1M amb l'objectiu de diluir la Urea fins a una concentració de 1,5M per a que no interfereixi en la digestió.
- Finalment, s'afegeix tripsina a la mostra en una relació enzim:substrat 1:100, és a dir que per 50 µg de proteïna s'afegeixen 0,5 µg de tripsina. S'incuba a 37°C durant tota la nit sense agitació en una atmosfera humida per a evitar que la mostra s'evapori.

2.6.3. Purificació en columna C18

A fi d'enriquir els pèptids i preparar la mostra per a la cromatografia, es van utilitzar columnes C18 (*Pierce C-18 Spin Columns, #89870, Thermo Scientific*) i es va seguir el següent protocol:

- Es prenen 60 µL de digestió, que equivalen a 30 µg de proteïna (càrrega màxima de la columna), i es barregen amb 20 µL de 20% ACN - 2% TFA. El pH hauria de ser < 4.
- En aquest punt s'afegeix a la mostra la barreja que conté els estàndards interns (pèptids pesats), 0,8 µL d'un *stock* on la concentració aproximada de cada pèptid és de 0,0035 nmol/µL. Els pèptids s'adquireixen a l'empresa JPT (SpikeTidesTM_L).
- Es passa l'extracte per la columna. Aquest pas consta de 4 passos principals: preparació de la columna, unió dels pèptids a la columna, rentat i elució dels pèptids.
 - o Preparació de la columna:
 - Es posa la columna sobre un tub de 1,5 mL i s'afegeixen 200 µL de solució activadora (50% ACN).
 - Es centrifuga a 1500 g durant 1 minut.
 - Es repeteixen els dos passos anteriors.

- S'afegeixen 200 µL de solució equilibradora (5% ACN - 0,5% TFA).
- Es centrifuga a 1500 g durant 1 minut.
- Es repeteixen els dos passos anteriors.
- Unió dels pèptids a la columna:
 - S'aplica la mostra a la resina (80 µL).
 - Es centrifuga a 1500 x g durant 1 minut. Es recupera l'elut i es torna a passar per la columna per assegurar una bona unió.
 - Es centrifuga a 1500 x g durant 1 minut i es descarta l'elut.
- Rentat de la columna:
 - S'afegeixen 200 µL de solució de rentat (5% ACN - 0,5% TFA) sobre la resina.
 - Es centrifuga a 1500 g durant 1 minut i es descarta l'elut.
 - Es repeteixen els dos passos anteriors dues vegades més per assegurar una bona eliminació de la Urea i el Bicarbonat Amònic.
- Elució dels pèptids:
 - S'afegeixen 20 µL de solució d'elució (70% ACN - 0,1% àcid fòrmic)
 - Es centrifuga a 1500 g durant 1 minut.
 - S'afegeixen 20 µL més de solució d'elució.
 - Es centrifuga a 1500 x g durant 1 minut de nou i es recull tot l'elut (40 µL).
 - Finalment s'evapora completament el solvent en un *Concentrator Plus* (*Eppendorf*). Un cop evaporat, la mostra es resuspèn en fase A de cromatografia, que en aquest cas és 5% ACN - 0,1% àcid fòrmic. S'afegeixen 15 µL de manera que la mostra queda a una concentració de 2 µg/µL.

2.6.4. Anàlisi per espectrometria de masses

Per a l'anàlisi de les mostres, aquestes es van separar utilitzant HPLC seguit d'un anàlisi per espectrometria de masses.

Per a cada cursa, es van injectar 5 µL de mostra; els pèptids de la mostra es van separar utilitzant una columna BIOShell A160 Peptide (C18 2,7 µm 1x150 mm, *Supelco*) en un sistema cromatogràfic 1200 Series (*Agilent Technologies*) acoblat,

mitjançant una font d'electrosprai, a un triple quadrupol model 6420 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies). Per a la separació cromatogràfica es va utilitzar una fase A (5% ACN - 0,1% àcid fòrmic) hidrofílica i una fase B (90% ACN - 0,1% àcid fòrmic) hidrofòbica amb un flux constant de 75 $\mu\text{L}/\text{min}$. El gradient que es va utilitzar és el que es mostra a la

Figura 14. A fi de conèixer els temps de retenció de cada pèptid i optimitzar les condicions de separació, detecció i, com a conseqüència, la posterior quantificació, es van realitzar diferents injeccions dels estàndards pesats.

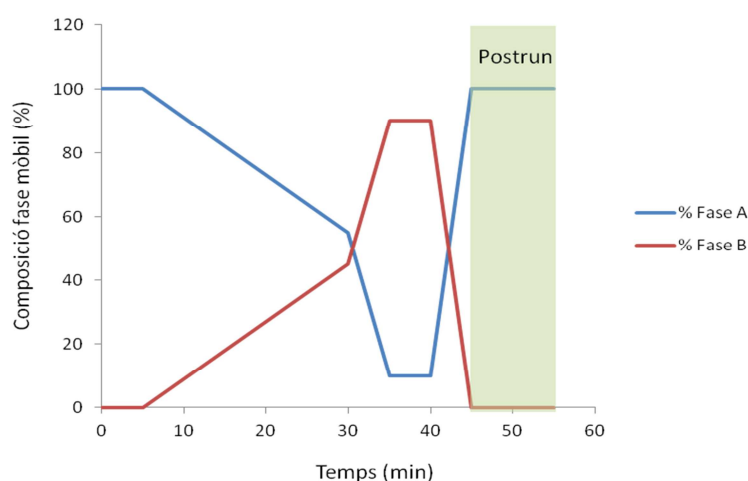


Figura 14. Gradient utilitzat en l'anàlisi per MRM. El gradient utilitzat en cada cursa cromatogràfica es mostra el percentatge de fase A i fase B que componen la fase mòbil al llarg del temps.

La detecció dels pèptids d'interès es va fer en mode MRM segons els paràmetres indicats a l'apartat de resultats. L'adquisició de les dades es va fer mitjançant el *software* Mass Hunter; posteriorment aquestes dades s'exportaven al programa *Skyline* amb el qual s'anàlitzaven i es quantificaven. Per a les quantificacions es calcula la relació entre l'àrea cromatogràfica del pèptid lleuger (corresponent a la mostra) i la del mateix pèptid pesat (corresponent a l'estàndard). Aquest valor es calcula per cada mostra i posteriorment es calcula el canvi entre mostres tractades i controls (*fold-change*).

3. Mètodes de Biologia Molecular

3.1. Electroforesi d'àcids nucleics

L'electroforesi d'àcids nucleics permet separar aquest tipus de molècules segons la seva mida en un gel d'agarosa.

Com estàndard es varen utilitzar gels del 0,8-1% agarosa (p/v). L'agarosa es dissol en tampó TAE i es porta fins a l'ebullició per a dissoldre-la completament. Abans de que solidifiqui, s'afegeix SYBR Safe (#S33102, *Invitrogen*) per a tenyir el DNA permeten així la posterior visualització. Seguidament l'agarosa es deixa refredar a la cubeta.

Per a córrer les mostres, aquestes es dilueixen en aigua i tampó de càrrega. Es va utilitzar el marcador de pes molecular 1Kb (*Invitrogen*).

La electroforesi es fa mantenint un voltatge constant de 90 V durant 45-60 minuts. Posteriorment el gel es visualitza en un transiluminador UV i/o se'n prenen imatges en un EZ Imager (*Bio-Rad*).

Taula 15. Tampons utilitzats en l'electroforesi d'àcids nucleics. En les dues taules es detalla la composició del tampó TAE i la del tampó de càrrega amb el que es preparaven les mostres.

Tampó TAE
40 mM Tris-HCl pH=8,5
20 mM Àcid acètic
2 mM EDTA

Tampó de càrrega (LB 5x)
15 % Ficoll (p/v)
100 mM Na ₂ EDTA pH=8
0,25 % Blau de Bromofenol (p/v)

3.2. Transformació de bacteris

Es varen utilitzar cultius de *E. coli* per a la producció de plasmidis d'interès. Concretament, es varen utilitzar cèl·lules competents DH5 α .

Protocol:

- Es descongelen les cèl·lules en gel durant 10 minuts.
- Es prenen 100 μ L de cèl·lules per a cada transformació.
- Es barregen les cèl·lules amb 10 ng del plasmidi que es vol transformar i s'incuba durant 20 minuts en gel.
- Seguidament es realitza un xoc tèrmic que consisteix en incubar les cèl·lules 45 segons a 42°C i seguidament 2 minuts en gel. Aquest pas permet l'entrada del DNA al bacteri.
- Tot seguit, s'afegeixen 900 μ L de medi LB preescalfat a 37°C i s'incuben les cèl·lules durant 1 hora a aquesta temperatura.
- Finalment, es prenen 50 μ L de la transformació i es sembren en una placa de LB amb ampicil·lina o l'antibiòtic corresponent per a seleccionar les cèl·lules positives.

3.3. Purificació de DNA plasmídic

Per a l'extracció i purificació de DNA plasmídic, es va créixer un cultiu d'*E. coli* amb el plasmidi d'interès en medi LB amb Ampicil·lina durant tota la nit. Al dia següent partint d'aquest cultiu, es va utilitzar el kit *NucleoSpin Plasmid QuickPure* (740 615.50, *Macherey-Nagel*) per a la purificació del DNA plasmídic seguint les instruccions del fabricant.

3.4. Amplificació de DNA plasmídic

Partint de diversos plasmidis, aquests es van amplificar amb encebadors específics amb la finalitat d'obtenir diferents *cassettes*, ja fos per a delecionar gens o bé per marcar proteïnes amb diferents epítops. Les parelles d'encebadors que s'utilitzen consten d'una

part “fixa” la qual hibrida dins els plasmidis, i d’una cua que determina les zones on hibridarà el *cassette*. Per altra banda, els plasmidis que s’han utilitzat com a motlle per a la construcció dels *cassettes*, són: pAG25 per delecionar gens (Goldstein & McCusker, 1999), i els plasmidis pYM20 i pYM25 per marcar proteïnes bé amb l’epítop 9MYC o amb la proteïna verda fluorescent (GFP) respectivament (Janke et al., 2004).

Per a la amplificació dels plasmidis, s’utilitza la polimerasa *Expand* (#11 732 641 001, Roche) una polimerasa d’alta fidelitat que introdueix molt poques mutacions. Per a cada amplificació preparam la següent mescla i es segueix el següent programa de PCR:

Taula 16. Composició de la mescla de PCR

Mescla PCR	
DNA motlle	100 ng
Encebador A (25 µM)	3 µL
Encebador B (25 µM)	3 µL
dNTPS (10 mM)	1,5 µL
Tampó Polimerasa Expand 10x	5 µL
MgCl ₂ (50 µM)	2 µL
Polimerasa Expand	1 µL
H ₂ O miliQ	Fins 50 µL

Taula 17. Programa de PCR utilitzat per a l'amplificació de plàsmids

Programa PCR	
94 °C	5 minuts
94 °C	1 minut
52 °C	45 segons
72 °C	3 minuts
72 °C	7 minuts
4 °C	∞

} x 30 cicles

3.5. Transformació de Llevats

A fi d’obtenir els mutants desitjats, es varen utilitzar els *cassettes* citats a l’apartat anterior i es va utilitzar el protocol de transformació que es detalla a continuació:

- Es creix la soca que es vol transformar en medi YPD fins a una OD₆₀₀ = 0,4 - 0,7.
- Es prenen 10 mL de cultiu per cada transformació, tenint en compte que per cada transformació s’ha d’incloure un control negatiu.

- Es centrifuga el cultiu a 5000 rpm durant 5 minuts i es descarta el sobrenedant.
- Es resuspenen les cèl·lules en 1 mL d'aigua miliQ estèril i es traspassen a un tub de 1,5 mL.
- Seguidament es centrifuga de nou a 4000 rpm durant 2 minuts.
- Es renta el pèl·let amb 1 mL de 100 mM Acetat de Liti (AcLi) / TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).
- Es centrifuga de nou a 4000 rpm durant 2 minuts.
- Seguidament, es resuspèn el pèl·let en: 5 µL AcLi 1M, 5 µL TE 10x, 5 µL ssDNA (desnaturalitzat prèviament: 3 minuts a 100°C i 5 minuts a 4°C), el volum del producte de PCR necessaris per a tenir 1 µg de DNA, i aigua miliQ fins arribar a 50 µL.
- S'agreguen 300 µL de polietilenglicol (PEG) 40% / TE / 100 mM AcLi i es barreja amb cura. Seguidament, s'incuba 30 minuts a 30°C i posteriorment 15 minuts a 42°C.
- Es centrifuga a 4000 rpm durant 2 minuts i es descarta el sobrenedant.
- S'afegeix 1 mL de YPD per resuspendre el pèl·let de cèl·lules, posteriorment es porta fins a un volum de 5 mL amb YPD en un erlenmeyer i s'incuba durant 4 hores a 30°C en un agitador orbital de calor sec.
- Finalment, es centrifuga el cultiu a 5000 rpm durant 5 minuts, es resuspèn en 300 µL de medi YPD, i posteriorment es sembren en plaques de selecció diferents volums (50-100-150 µL).
- Aquestes plaques s'incuben durant 2-3 dies a 30°C.

Passat el temps d'incubació, els transformants es plaquegen de nou, i s'analitzen ja sigui per PCR de colònia o bé per Western Blot. També es valida l'absència de creixement a la placa on hi hem sembrat el control negatiu de la transformació.

3.6. Creuament de soques i esporulació

El segon mètode utilitzat per a la obtenció de noves soques es basa en el creuament de dues soques amb *mating* o tipus sexuals diferents, *mat a* o *mat α* , per obtenir una nova soca que incorpori les característiques d'interès de les dues soques originàries.

Quan dos llevats de sexes oposats es posen en contacte formen un zigot que donarà lloc a una cèl·lula diploide (*mat a/mat α*). En condicions adverses, com la limitació de nutrients, aquests diploides esporulen donant lloc a 4 cèl·lules filles haploides. Aquestes cèl·lules filles queden retingudes dins d'un sac denominat asca, que pot ser digerit enzimàticament permetent així la recuperació de les cèl·lules filles utilitzant un microscopi amb micromanipulador. El protocol consta de 3 passos principals que es detallen a continuació:

Creuament i obtenció de diploides:

- Es sembren en *patch*, en una placa YPD, les dues soques que es volen creuar i es deixen créixer 24 hores en estufa a 30°C.
- Passat el temps, es pren una bona quantitat de cèl·lules de cada soca amb l'ansa de sembra i es barregen a la mateixa placa. A les 2-4 hores ja es pot observar la formació de zigots que tenen una forma característica de 8. Es deixa créixer 24 hores a 30°C per obtenir una bona quantitat de diploids.
- Es pren massa cel·lular de diploids amb l'ansa de sembra i es plaqueja per a seleccionar només els diploids. Es deixa créixer 24 hores a 30°C. Alternativament, els zigots es poden seleccionar amb l'ajuda del micromanipulador.
- Les colònies que creixen, es re-sembren de nou en plaques de selecció per a tenir aïllats diferents clons. Aquests clons es van sembrar també en *patch* en plaques YPD.

Esporulació:

- Es pren el *patch* de diploides i es sembra en una placa amb medi d'esporulació (ocupant el menor espai possible). La placa es segella amb parafilm i es col·loca dins d'una bossa amb la finalitat de que no es deshidrati. Aquesta placa s'incuba durant 7-10 dies a 25°C.
- Passats 7 dies es verifica la presència de tètredes al microscopi.

Processament de les espores i separació dels haploides:

- En un tub estèril de 10 mL es posen 500 μ L d'aigua miliQ estèril i la meitat de l'ansa de sembra plena de massa cel·lular provinent de la placa d' esporulació.
- S'afegeixen 12 μ L de b-Glucuronidase/arylsulfatase (#10 127 060 001, Roche) i s'incuba durant 15 minuts a 30°C a l'estufa evitant moviments bruscs.
- S'agreguen curosament 5 mL d'aigua estèril per aturar la reacció.
- Es centrifuga a 1000 rpm durant 10 minuts (sense fre).
- Seguidament, es retira el sobrenedant deixant un volum suficient per prendre les cèl·lules (100 μ L).
- Finalment, es sembren 5-10 μ L amb l'ansa de sembra sobre una placa YPD. Les tètredes es disseccionen utilitzant el micromanipulador (*Singer MSM Model 300*).
- S'incuba la placa a 30°C durant 2-3 dies.

Les espores que van créixer es van replaquejar en plaques YPD i plaques de selecció a fi d'identificar els mutants.

Un cop aïllats els mutants se'n verifica el *mating* creuant cada clon amb cèl·lules de *mating* conegut i observant al microscopi l'aparició de zigots. Finalment, les cèl·lules positives i amb el *mating* desitjat (*mat a*) es comproven per PCR de colònia i/o RT-PCR o bé per Western Blot.

3.7. Colony PCR

A fi d'analitzar la correcta deleció de gens de diferents transformants de forma ràpida, es va utilitzar el mètode de la PCR de colònia o *colony PCR*. Aquest mètode consisteix en prendre una colònia de cada clon o transformant que es vulgui analitzar, trencar les cèl·lules utilitzant microones i seguidament realitzar la PCR amb encebadors específics, de forma que s'utilitzen les cèl·lules senceres com a motlle per la PCR.

Protocol:

- Es pren una colònia i es deixa al fons d'un tub de 1,5 mL.
- S'escalfen els tubs amb les colònies durant 1 minut al microones a màxima potència i seguidament s'incuben en gel durant un mínim de 5 minuts.
- Es resuspèn la colònia amb 2 volums de mescla de PCR (Taula 18) sense els encebadors i es separa en dos tubs.
- Es realitzen dues PCRs en paral·lel, una positiva i una negativa.

Per la PCR positiva s'hi afegeix una parella de encebadors on el A (o *forward*) serà una seqüència del promotor i el B (o *reverse*) hibridarà dins el *cassette* de transformació.

Per altra banda als tubs de PCR negativa, s'hi afegirà el mateix encebador A, però el B estarà dissenyat per hibridar a una zona dins del gen.

Taula 18. Composició de la Mescla de PCR

Mescla de PCR (<i>Master Mix</i>)	
H2O	34,5 µL
Tampó Polimerasa 10x	5 µL
MgCl2 (50 mM)	2 µL
dNTPs (10 µM)	1,5 µL
Encebador A	3 µL
Encebador B	3 µL
Taq Polimerasa (Biotools)	0,5 µL

Taula 19. Programa de PCR utilitzat per a la *colony-PCR*

Programa PCR	
94 °C	5 minuts
94 °C	1 minut
52 °C	45 segons
68 °C	1,5 minuts
68 °C	7 minuts
4 °C	∞

} x 30 cicles

3.8. Anàlisi de l'expressió gènica

Es va analitzar l'expressió de diversos gens en múltiples soques per a identificar i analitzar-ne les possibles diferències. El protocol d'anàlisi de l'expressió gènica consta principalment de 3 passos: l'extracció de RNA total, transcripció reversa i obtenció de DNA codificant, i finalment la PCR quantitativa o PCR a temps real.

3.8.1. Extracció de RNA total

Per a purificar el RNA total, es va partir de 2-3 ODs de cèl·lules prèviament recollides i rentades amb aigua miliQ. Es va utilitzar el kit comercial *RNeasy Kit* (#74104, *Qiagen*) seguint les instruccions del fabricant. Un cop s'ha obtingut el RNA, aquest es quantifica i se'n analitza la puresa al Nanodrop a través de la mesura de les relacions entre les absorbàncies 260/280 i 260/230. Seguidament, se'n analitza la integritat en un gel d'agarosa 0,8% mitjançant la visualització del RNA ribosomal (rRNA).

3.8.2. Transcripció reversa i producció de DNA codificant (cDNA)

Per a la transcripció reversa s'utilitza 1 µg de RNA de cada mostra. La reacció té lloc en 3 passos per als quals necessitem preparar 2 barreges diferents.

Taula 20. Composició de la MIX1 per a la reacció de transcripció reversa

MIX1	Volum per 20 µL de volum total de reacció
dNTPS 10 mM (Sigma)	1 µL
Hexanucleotids Mix (1277081, Roche)	2 µL
RNA	1 µg

Taula 21. Composició de la MIX2 per a la reacció de transcripció reversa.

MIX2	Volum per 20 μ L de volum total de reacció
Tampó FS 5x	4 μ L
DTT 0,1 M	2 μ L
RNase OUT	1 μ L

En primer lloc, preparam la MIX1 que conté el RNA, hexanucleòtids que actuaran com a encebadors aleatoris i aigua miliQ per a completar el volum de la reacció. Amb aquesta MIX1 comencem la reacció al termociclador. Finalitzats els dos primers passos de temperatura, s'afegeixen 7 μ L de MIX2, que conté el tampó de la polimerasa, DTT i inhibidors de RNases, a cada mostra i es segueix amb el protocol al termociclador. Per acabar, s'afegeix 1 μ L de transcriptasa reversa *SuperScript II Reverse Transcriptase* (#18064-014, *Invitrogen*) i es continua amb la reacció. El protocol del termociclador es mostra a la Figura 15.

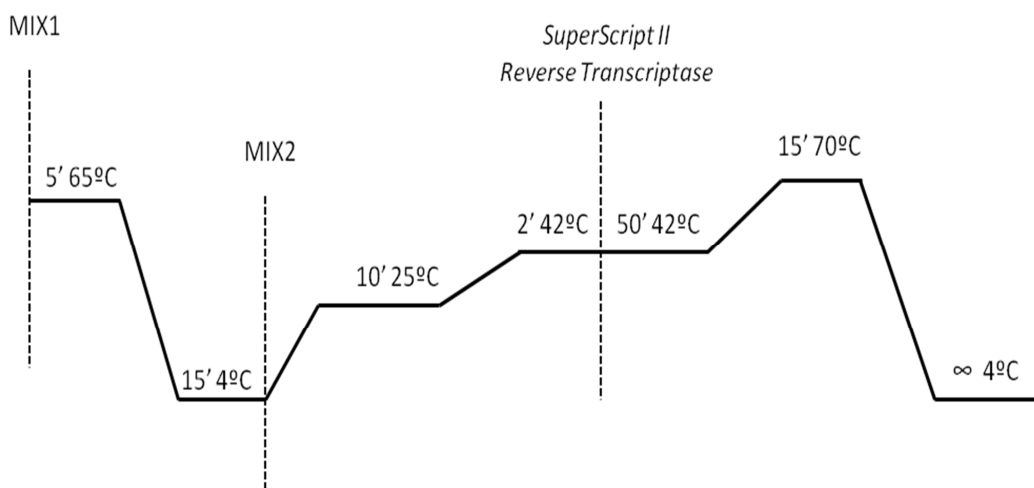


Figura 15. Programa de la reacció de transcripció reversa. Es detallen les temperatures i els temps així com els punts on s'afegeixen les diferents mescles (Mix1 i Mix2) i la transcriptasa reversa.

3.8.3. PCR quantitativa o a temps real (RT-PCR)

Per a l'anàlisi de l'expressió gènica, es van utilitzar 50 ng del cDNA obtingut en el pas anterior. Cada mostra es va analitzar per triplicat en un volum final de reacció de 20 µL. Per a la reacció, es va utilitzar la *Taqman Universal PCR Master Mix kit* (#4304437, *Applied Biosystems*) i es va utilitzar un termociclador *iCycler* (*Bio-Rad*) amb el següent programa:

- 50°C durant 2 minuts
 - 95°C durant 10 minuts
 - 95°C durant 15 segons
 - 60°C durant 1 minut
- } 40 cicles

Els encebadors i les sondes necessàries per la reacció estan dissenyades per *Applied Biosystems* (*Taqman Gene Expression Assays, Custom*). La quantificació es va fer a través del *software iCycler IQ Real-Time detection system* (versió 2.3, *Bio-Rad*). Els canvis en els nivells d'expressió dels gens analitzats es varen calcular en funció dels valors *Ct*. En tots els gens analitzats es va utilitzar el gen *ACT1* (actina) com a control intern i per a la normalització dels resultats.

4. Mesura de Ferro intracel·lular

Per a realitzar aquesta mesura es va seguir el mètode fotomètric descrit anteriorment a (Tamarit et al., 2006), que consisteix en una digestió de les cèl·lules amb àcid nítric 3%, una posterior reducció amb ascorbat sòdic i finalment la mesura de l'absorbància que dona l'agent quelant batofenantrolina disulfonat (BPS) unit a ferro.

Protocol:

- Es recullen 7 ODs de cèl·lules, les quals es renten dues vegades amb 1 mM EDTA.
- Aquest pèl·let es resuspèn en 500 µL d'àcid nítric 3% i s'incuba un mínim de 12 hores a 98°C en agitació constant. També es prepara un tub sense cèl·lules el qual s'utilitzarà com a blanc.

- El digerit es centrifuga 5 minuts a 10.000 rpm.
- Es prenen 400 µL del sobrenedant, i se li agreguen 300 µL d'aigua, 160 µL d'ascorbat sòdic (38 mg/mL) i 126 µL d'acetat amònic (dilució 1:3 d'una solució saturada).
- Aquesta mescla es transfereix a una cubeta d'espectrofotòmetre i se'n mesura l'absorbància a 535 nm i a 680 nm i en calculem la diferència (OD535 - OD680).
- Posteriorment s'afegeixen 15 µL de BPS (34 mg/mL), es tornen a mesurar les absorbàncies i se'n calcula la diferència.

Per a obtenir la concentració de ferro intracel·lular es calcula la diferència entre els valors obtinguts a la segona i a la primera mesura i se'ls hi resta el blanc. A les mostres control se'ls hi va donar el valor arbitrari de 1 i les mostres tractades es calculen com la variació en els nivells intracel·lulars de Ferro respecte el seu control.

5. Activitats enzimàtiques

5.1. Aconitasa

L'Aconitasa és un enzim del cicle de Krebs que catalitza la conversió de Citrat a Isocitrat. Aquesta reacció té un intermediari: el cis-Aconitat. La mesura de l'activitat Aconitasa es va dur a terme mitjançant un mètode fotomètric que mesura precisament la desaparició de cis-Aconitat conseqüència de l'activitat d'aconitasa (Darley-Usmar, Rickwood, & Wilson, 1987).

Protocol:

- Es parteix de 7 ODs de cèl·lules de les quals s'obté l'extracte proteic trencant amb tampó Tris-HCl 50 mM pH 8 + inhibidors de proteases. Seguidament es centrifuga 3 minuts a 10.000 rpm i es recupera el sobrenedant.
- Es parteix de la següent mescla de reacció:
 - o 500 µL de tampó 40 mM Tris-HCl pH 7,4 i 50 mM NaCl
 - o 4 µL de cis-aconitat 7 mg/mL
 - o 4-8 µL d'extracte proteic

Es va mesurar la disminució de l'absorbància a 240 nm durant 1 minut a 25 °C en una cubeta de quars. Es defineix una unitat d'enzim aconitasa (U) com la quantitat d'enzim necessària per a transformar 1 μmol de cis-aconitat per minut tenint en compte que el coeficient d'extinció molar del cis-aconitat és $\epsilon=4,28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'activitat específica es defineix com U/mg de proteïna.

5.2. Activitat peroxidasa lligada a grups Hemo

Per a detectar certes proteïnes d'interès, es va utilitzar l'activitat peroxidasa lligada als grups hemo. Aquest protocol es va utilitzar per a detectar les formes *holo* del citocrom C i de la flavohemoglobina de llevat Yhb1. El protocol difereix lleugerament per a cadascuna d'elles.

5.2.1. Citocrom C

Per a detectar el Citocrom C, podem córrer les mostres en un gel desnaturalitzant convencional però sense agents reductors ja que el seu grup hemo està unit covalentment a la proteïna.

Protocol:

- Es parteix de 7 ODs de cèl·lules que es trenquen al MBB-16 amb 75 μL de tampó de lisi que conté 100 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA i inhibidors de proteases i perles de vidre.
- Es recupera l'extracte perforant el tub i centrifugant a 1000 rpm durant 1 minut.
- Es centrifuga l'extracte a 3000 rpm durant 5 minuts, es pren el sobrenedant i es quantifica la proteïna utilitzant el mètode de Bradford.
- S'igualen la quantitat de proteïna entre les diferents mostres utilitzant 100 mM Tris-HCl pH 7.

- Es barreja la mostra amb 1 volum de tampó 2, que conté 135 mM Tris-HCl pH 7, 50% Glicerol i 0,1% SDS. S'incuba a 42°C durant 15 minuts en agitació.
- Es carreguen 20 µg de proteïna per carril en un gel del 13,5% d'acrilamida.
- Es transfereix a una membrana de PVDF.
- La membrana es renta amb TBS durant 20 minuts.
- S'incuba amb el substrat i es revela la membrana en un ChemiDoc XRS.

5.2.2. Yhb1

La detecció de la forma *holo-Yhb1*, es va fer seguint el mateix principi que per al Citocrom C. Únicament hem de tenir en compte que el grup hemo no està unit covalentment a la proteïna, per tant hem de separar les mostres en un gel natiu que no contingui cap tipus de detergent.

Protocol:

- Es parteix de 7 ODs de cèl·lules que es trenquen al MBB-16 amb 75 µL de tampó de lisi que conté 50 mM Tris-HCl pH 7,5 i inhibidors de proteases i perles de vidre.
- Es centrifuga 3000 rpm durant 5 minuts, es recupera el sobrenedant i es quantifica la proteïna.
- S'igualava la proteïna entre mostres amb tampó de lisi i s'hi afegeix SSx4.
- Es carreguen 20 µg d'extracte en un gel natiu (sense SDS).
- Un cop separats els extractes es realitza una transferència a una membrana de PVDF amb tampó de transferència sense SDS.
- La membrana es renta durant 20 minuts amb TBS.
- S'incuba la membrana amb el substrat i en prenem imatges en un ChemiDoc XRS.

6. Microscòpia de fluorescència

Es va utilitzar la microscòpia de fluorescència per a l'anàlisi de la localització de diferents proteïnes marcades amb la proteïna verda fluorescent GFP. Aquesta metodologia permet

per tant analitzar la localització de les proteïnes d'interès sota diferents condicions o estressos. Es va utilitzar un microscopi *Olympus BX51* acoblat a una càmera *Olympus DP30BW* per a la captura de les imatges.

6.1. Anàlisi de proteïnes marcades amb GFP

Protocol:

- Es prenen 0,5 – 1 ODs de cèl·lules, es centrifuguen durant 3 minuts a 6000 rpm i es descarta el sobrenedant.
- El pèl·let es renta una vegada amb PBS i seguidament es resuspèn amb 40 – 75 µL de PBS i s'homogenitza bé la suspensió per desfer possibles agregats.
- D'aquesta suspensió, es preparen 3-4 µL sobre un portaobjectes i seguidament es visualitzen al microscopi de fluorescència i se'n prenen imatges tant de fluorescència com de camp visible. Per cada condició s'analitzen un mínim de 100 cèl·lules.
- Per a analitzar les imatges obtingudes, es va utilitzar el programa ImageJ.

6.2. Tinció nuclear amb DAPI

A fi d'aconseguir una tinció nuclear i poder realitzar assajos de co-localització es va utilitzar el reactiu DAPI (4',6 - diamidino - 2 - phenylindole). Aquest reactiu s'aplicava sobre les mostres de forma que s'obtenia una tinció nuclear *in vivo*.

Protocol:

- Es parteix de 0,5 – 1 OD de cèl·lules que es centrifuguen 6000 rpm durant 3 minuts i s'elimina el medi de cultiu.
- El pèl·let es resuspèn en PBS 30% etanol, es barreja per inversió del tub 2-3 cops, i ràpidament es centrifuga de nou per eliminar l'etanol.
- El pèl·let es resuspèn amb 1 mL de PBS i 1 µg/mL de DAPI durant 10 minuts.

- Es centrifuguen de nou els tubs, s'elimina el PBS amb DAPI, i es fan dos rentats més amb PBS.
- Finalment les cèl·lules es resuspenen amb 40-75 µL de PBS, i d'aquests se'n prenen 3-4 µL que es preparen sobre un portaobjectes i es capturen les imatges utilitzant el filtre UV.

7. Mètodes fluorimètrics

7.1. Mesura de la producció de Superòxid (DHE)

A fi d'analitzar la producció de superòxid, es va utilitzar el compost Dihidroetidi (DHE)(#37291, *Sigma*). Aquest compost reacciona amb el superòxid oxidant-se i donant lloc a dihidroetidina, un compost fluorescent. Si fem mesures consecutives cada 5 minuts durant 30 minuts s'obté una cinètica, el pendent de la qual representa la producció de superòxid.

Protocol:

- Es creixen les cèl·lules fins a una densitat òptica OD₆₀₀= 0,4 - 0,7.
- Seguidament es prenen dues alíquotes de 0,5 ODs de cèl·lules per cada soca que es vulgui analitzar i es centrifuga a 6000 rpm durant 2 minuts.
- S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pèl·let en 1 mL de PBS + 0,1% Glicerol.
- S'afegeixen 0,5 µL de DMSO (blanc) o bé 0,5 µL de DHE 10 mg/mL, es barreja amb l'ajuda d'un vòrtex i s'utilitzen 100 µL per a la mesura.
- Es fa la mesura en un lector de plaques de fluorescència *Infinite M200 (Tecan)* utilitzant plaques negres de fons transparent (#655090, *Greiner Bio one*). Es fan lectures cada 5 minuts durant 30 minuts.
- Els resultats es representen en un gràfic com l'increment de fluorescència en funció del temps i d'aquest gràfic resultant es calcula la recta de regressió. El pendent d'aquesta recta representa la cinètica d'oxidació del DHE, equivalent a la producció de superòxid.

7.2. Mesura de la producció d'Òxid Nítric (DAF-FM DA)

Per a analitzar els nivells d'òxid nítric (NO) dins la cèl·lula, es va utilitzar la sonda fluorescent DAF-FM DA (#D-23844, *Life Technologies*). Aquesta sonda es permeable a les cèl·lules, i un cop al citosol reacciona amb l'òxid nítric augmentant la fluorescència. Aquesta fluorescència es va mesurar en un citòmetre de flux model *FACS Cantó II* (*Becton Dickinson*).

Protocol:

- Es creixen els cultius fins a una $OD_{600} = 0,4-0,5$
- Es prenen 2 mL de cultiu i s'incuben durant 1h a 30°C i a la foscor amb 10 µM DAF-FM DA. De la mateixa manera, es preparen controls amb DMSO.
- Els cultius es centrifuguen i es renten 2 vegades amb PBS estèril.
- Seguidament, es resuspenen les cèl·lules amb 1 mL de PBS i es deixen 15 minuts a temperatura ambient a la foscor.
- Finalment es soniquen els tubs suaument per a disgregar els agregats de cèl·lules i aquestes s'analitzen al citòmetre de flux.

8. Mètodes estadístics

Per a analitzar els resultats obtinguts i determinar si les diferències observades eren significatives o no es va utilitzar el programa *Xlstat 2015*. Les mostres es varen analitzar per ANOVA i un posterior anàlisi utilitzant el test de Tukey.

Els resultats es varen considerar significatius quan el *p-valor*, era inferior a 0,05. En els gràfics o taules, els resultats significatius s'indicaran amb * quan $p < 0,05$, ** quan $p < 0,01$ o *** quan $p < 0,001$.

Resultats

**CAPÍTOL 1: Estudi de la remodelació metabòlica en cèl·lules
deficients en YFH1 i de la implicació de Adr1 i Cth2**

1. Anàlisi proteòmica de la deficiència de Yfh1

La deficiència de frataxina en llevat provoca, entre altres fenotips, una pèrdua d'enzims amb centres ferro-sofre, una situació d'estrès oxidatiu, i una desregulació de l'homeòstasi del ferro observada per l'activació del reguló del ferro o reguló AFT1. En treballs previs del grup s'ha demostrat que la pèrdua de les proteïnes que contenen centres Fe-S, com Aconitasa, és un efecte secundari de la manca de frataxina tot i que sembla un efecte determinant en l'aturada del creixement; per altra banda l'activació del reguló AFT1 i l'augment d'enzims antioxidants com Sod1 i Sod2 són els primers fenotips observats després de la repressió de frataxina (Moreno-Cermeño et al., 2010).

Amb l'objectiu d'identificar més alteracions que portin finalment a aquesta aturada en el creixement o que puguin tenir relació amb l'activació d'Aft1 i la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S, vàrem utilitzar una aproximació proteòmica que consistia en una separació dels extractes proteics per electroforesi bidimensional i una posterior identificació per espectrometria de masses (MALDI-ToF/ToF).

Es va utilitzar la soca BQS201 en la que *YFH1* es troba sota el control del promotor tetO₇ i es van comparar mostres control (sense doxiciclina, *YFH1* expressat) i mostres tractades durant 14 hores amb doxiciclina (*YFH1* reprimat). Es va escollir aquest temps de repressió de l'expressió de *YFH1* ja que és un punt en el que els sistemes de captació de ferro ja estan induïts, així com els enzims antioxidants *SOD1* i *SOD2*, però encara no hi ha afectacions en el creixement ni en els enzims que contenen centres Fe-S. Per tant, l'anàlisi proteòmica en aquest punt podria aportar noves informacions de l'adaptació del llevat a la manca de Yfh1.

Es van analitzar tres rèpliques independents de cada condició. La primera dimensió es portà a terme en tires IPG de 18 cm, rang de pH 3-10 no lineal. Per a la segona dimensió es van utilitzar gels de 18x18 cm. Els gels obtinguts es varen tenyir utilitzant una tinció

fluorescent (Flamingo, Bio-Rad), seguidament se'n van prendre imatges utilitzant un Versadoc (Bio-Rad) i aquestes es van analitzar utilitzant el *software PDQuest* (Bio-Rad).

Tal com s'observa a les imatges dels gels (Figura 16 i Figura 17), es van detectar fins a 8 spots que presentaven diferències significatives ($p < 0,05$) amb canvis superiors o iguals a 2 vegades respecte als controls (Taula 22).

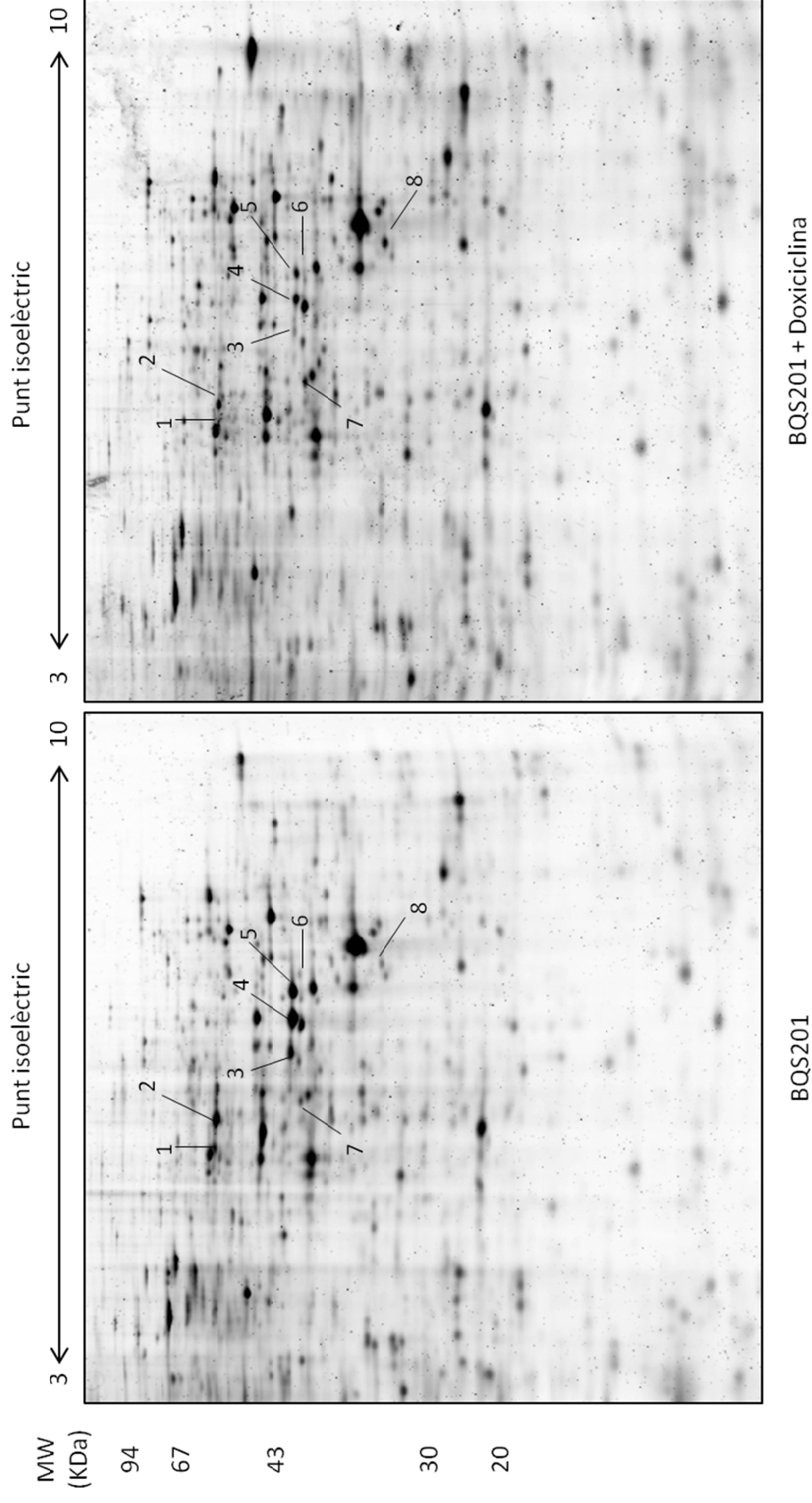


Figura 16. Anàlisi del proteoma de la soca BQS201 amb i sense doxiciclina mitjançant electroforesi bidimensional (2D). Les cèl·lules es van créixer en medi YPG amb o sense doxiciclina durant 14 hores i els extractes cel·lulars (50 µg de proteïna total) es van separar per electroforesi bidimensional. Els gels resultants es van tenyir amb Flamingo i es van analitzar utilitzant el software PDQuest (Bio-Rad). S'indiquen els spots que presentaven diferències significatives entre les dos condicions.

Taula 22. Identificació dels spots que mostaven diferències significatives entre les dues condicions analitzades. Es mostra el gen, la proteïna, el *spot* o *spots* corresponents, la diferència en els nivells de proteïna entre tractats i no tractats expressada com la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents, la puntuació Mascot, el nombre de pèptids identificats respecte als analitzats, la cobertura i la cobertura respecte la intensitat dels pics en l'espectre de masses.

Proteïna	Gen	Spots	Fold-change (YFH1 off/YFH1 on)	Mascot Score	Matched/ Searched	Sequence Coverage (%)	Intensity Coverage (%)
Aldehid Deshidrogenasa Mitochondrial	ALD4	1	<0,1	79	8/24	22	21
		2	0,6191 \pm 0,25	180	16/40	36	49
Alcohol Deshidrogenasa II reprimible per Glucosa	ADH2	3	0,1454 \pm 0,046	121	11/39	33	63
		4	0,2421 \pm 0,0028	119	13/58	40	64
		5	0,2931 \pm 0,047	132	14/44	132	49
Malat deshidrogenasa Citosòlica	MDH2	6	0,1408 \pm 0,2439	105	10/31	23	25
Flavoheproteïna	YHB1	7*	2,2501 \pm 0,2174	62	4/13	16	28
Alcohol Deshidrogenasa I	ADH1	7*	2,2501 \pm 0,2174	60	4/13	15	19
Succinil-CoA ligasa subunitat alfa	LSC1	8	2,2675 \pm 0,4534	86	8/32	29	19

* Aquest *spot* es va analitzar per MS/MS *Ion Search* per obtenir una identificació més acurada

Taula 23. Anàlisi per MS/MS dels 10 pics més intensos provinents de l'spot 7. Es van confirmar per MS/MS Ion Search, la presència tant de Yhb1 com de Adh1 a l'spot 7, i també es van identificar dos pèptids com a Fba1. A la taula s'indica la proteïna, el gen corresponent, la massa de cada pèptid analitzat, la seqüència i el Ion Score (el qual es va considerar com a significatiu >20).

Proteïna	Gen	Massa peptídica observada (Da)	Ion Score (MS/MS Ion Search)	Seqüència
Flavoheмоproteïna	YHB1	1136,5920	32	QENQYDALR
		1611,9660	40	ATVPVLEQQ GTVITR
Alcohol Deshidrogenasa I	ADH1	968,5359	41	EALDFFAR
		1251,7341	20	SISIVGSYVGNR
Fructosa 1,6-bifosfat aldolasa	FBA1	1042,6326	40	GAIAAAHYIR
		2160,2394	12	FAIPAINVTSSTAVAALEAAR
No identificat		933,5460		
		1860,9888		
		2839,5787		
		2312,2304		

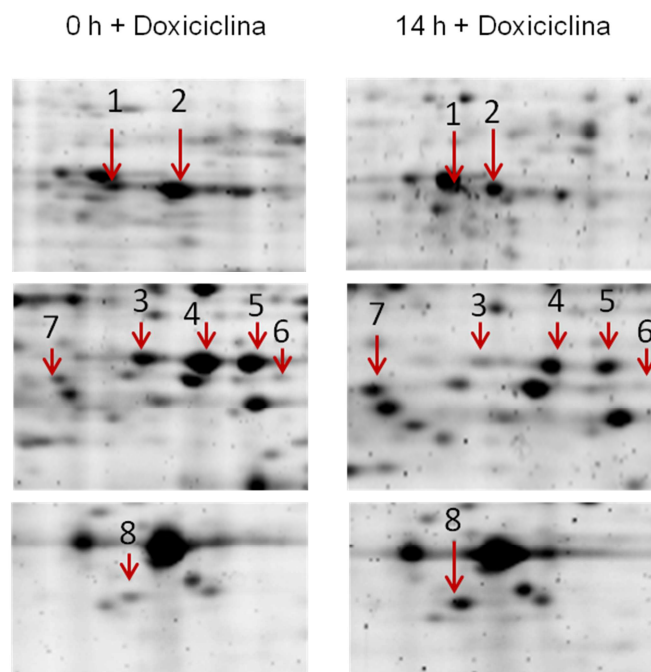


Figura 17. Ampliació dels gels de la Figura 16. Ampliació de tres zones dels gels on es mostren els 8 *spots* que van presentar diferències significatives ($\geq \pm 2$, $p=0,05$).

Per tal d'identificar a quines proteïnes corresponen els *spots* que van presentar canvis significatius, es va preparar un gel preparatiu en el qual es van carregar 300 μg de proteïna de la soca BQS201 sense tractar. D'aquest gel se'n van retallar els *spots*, es van digerir amb tripsina i es van analitzar per espectrometria de masses utilitzant un MALDI-ToF/ToF model AutoFlex Speed (Brucker). Amb els espectres de masses que es van obtenir, es va identificar a quines proteïnes corresponia cada *spot* per empremta peptídica utilitzant el *software Biotoools* (Brucker) que alhora, fa servir el motor de cerca MASCOT (Taula 22). En el cas de l'*spot* 7, la identificació per empremta peptídica va aportar dos resultats positius, pel que es va procedir a realitzar un anàlisi amb més profunditat per *MS/MS Ion Search*. Per a aquest anàlisi per *MS/MS*, es van seleccionar els 10 pèptids més intensos de l'espectre de masses, els quals es van fragmentar i se'n van detectar els ions resultants. Aquest protocol, permet obtenir informació de la seqüència i per tant una identificació més acurada (Taula 23). D'aquesta manera es va confirmar la presència tant de Yhb1 com d'Adh1 a l'*spot* 7.

Entre les proteïnes identificades, es pot observar com les que veuen reduïts els seus nivells (*spots* 1-6) són enzims del metabolisme respiratori i pertanyen al grup dels gens reprimits per glucosa. Aquests gens, augmenten la seva expressió en absència de glucosa i participen en el metabolisme de fonts de carboni alternatives com són el glicerol o l'etanol entre altres (revisat a Turcotte et al. 2010). Tenint en compte que el medi de cultiu és un medi respiratori (YPG) que no conté glucosa, la pèrdua d'aquests enzims suposaria un repte per la cèl·lula ja que tindria dificultats en l'obtenció d'energia. Entre aquestes proteïnes regulades a la baixa hi trobem Adh2 i Ald4 implicades en el metabolisme de l'etanol i per tant requerides per créixer en un medi amb fonts de carboni no fermentables. Per altra banda, també es va identificar Mdh2 que catalitza la conversió de malat a oxalacetat durant la gluconeogènesis. Aquestes proteïnes estan sota el control d'un dels principals reguladors dels gens reprimits per glucosa, el factor transcripcional Adr1 (de l'anglès, *Alcohol Dehydrogenase Regulator 1*). Adr1 és un factor transcripcional que juga un paper clau en el metabolisme de fonts de carboni alternatives ja que a banda d'*ADH2*, la seva diana més estudiada, també regula molts altres gens entre els quals hi ha *ALD4* i *MDH2*. Aquesta regulació la pot fer en solitari o de forma coordinada amb Cat8, un altre regulador del metabolisme de fonts de carboni alternatives (Young et al., 2003)

Per altra banda es van identificar tres proteïnes que veien augmentats els seus nivells en deficiència de Frataxina; la flavohemoglobina Yhb1, l'enzim Adh1 i l'enzim del cicle de Krebs Lsc1. Tot i que a l'*spot* 7 també es van identificar dos pèptids de la proteïna Fba1, es va descartar ja que no s'havia trobat en la primera identificació per empremta peptídica i un dels pèptids identificats per MS/MS mostrava una baixa puntuació de *MS/MS Ion Search*.

En relació a *YHB1*, s'ha descrit que participa en la resposta front estrès oxidatiu i nitrosatiu actuant com a òxid nítric oxidorreductasa (Cassanova et al., 2005). Curiosament, també s'ha descrit que pot interaccionar amb frataxina tot i que no s'ha trobat una explicació funcional per a aquesta interacció (González-Cabo et al., 2005). Al mateix *spot*, es va identificar també Adh1, enzim implicat en la fermentació de la glucosa, concretament en la reacció que catalitza el pas de acetaldehid a etanol. Tant per Adh1

com *Lsc1*, el seu increment podria ser una resposta de la cèl·lula a incrementar l'activitat d'altres vies metabòliques en resposta a la pèrdua dels gens regulats per glucosa per a mantenir un equilibri energètic, promovent així una remodelació o redirecció metabòlica cap a vies menys oxidatives en resposta a la deficiència de frataxina.

En paral·lel a aquest estudi proteòmic, es va realitzar un estudi transcriptòmic utilitzant “*microarrays*”. En aquest estudi transcriptòmic, també es va detectar un descens en el grup dels gens reprimits per glucosa. Dins d'aquest grup de gens, es va poder observar com els gens que no estan regulats per *Adr1* no mostraven alteracions, fet que apuntava definitivament cap a una alteració en la regulació d'aquest factor transcripcional en absència de *Yfh1*. També es va detectar, entre d'altres, la inducció del gen *YHB1* confirmant així les dades obtingudes en l'estudi proteòmic (Moreno Cermeño 2011, Tesi Doctoral).

1.1. Validació de dianes

A fi de confirmar l'afectació en les dianes identificades a l'estudi proteòmic i la possible implicació del factor de transcripció *Adr1*, es va analitzar l'expressió per PCR a temps real dels gens *ADH2* i *ALD4*, identificats en l'anàlisi proteòmic, i *FDH1* i *GUT1* gens del metabolisme de fonts de carboni alternatives també regulats per *Adr1*. També es varen analitzar els nivells d'expressió del propi *ADR1* i del transportador de ferro d'alta afinitat *FET3*, regulat pel factor transcripcional *Aft1* i induït en absència de frataxina com a control.

Tal com es mostra a la Figura 18, es va confirmar el descens, també en els nivells d'expressió, dels gens *ALD4* i *ADH2* que havien estat identificats a l'anàlisi proteòmica. De la mateixa manera, es va observar un clar descens en els altres dos gens analitzats *FDH1* i *GUT1*. Aquest descens en els nivells d'expressió s'observa ja abans de les 14 hores de repressió de frataxina, temps al que es va fer l'anàlisi proteòmica, concretament a les 10

hores després d'afegir la doxiciclina. Per altra banda, no es va observar cap alteració en els nivells d'expressió d'*ADR1*.

Aquests resultats, per tant, varen confirmar que existeix una afectació sobre el metabolisme respiratori que podria tenir un impacte directe sobre el creixement ja que comprometria l'obtenció d'ATP. Aquesta regulació a la baixa dels gens reprimits per glucosa semblava ser conseqüència d'algun problema amb el factor transcripcional *Adr1* ja que si comparem els nivells d'expressió de *FDH1*, exclusivament regulat per *Adr1*, amb els de *GUT1*, regulat per *Adr1* i *Cat8*, després de la repressió de frataxina hi ha diferències clares entre els nivells de repressió d'ambdós gens. També cal destacar, que els resultats de l'estudi transcriptòmic citat anteriorment, apuntaven en la mateixa direcció.

Finalment, es va observar un fort increment en l'expressió de *FET3*, el transportador de ferro d'alta afinitat, d'acord amb el que s'havia descrit anteriorment.

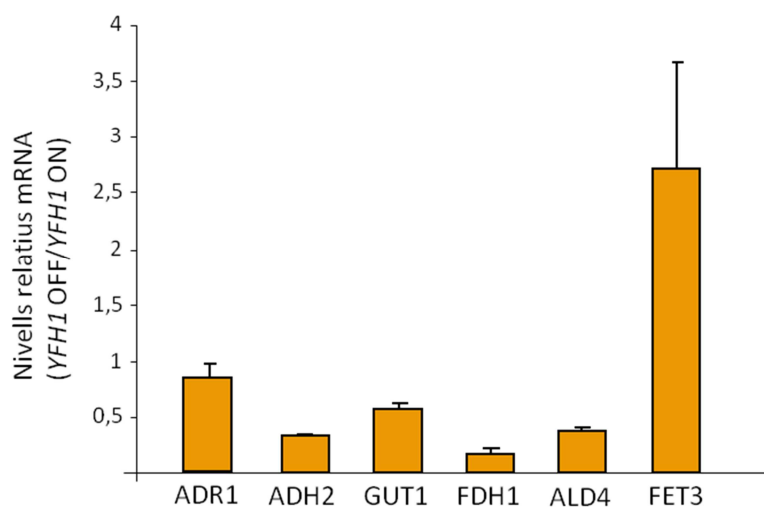


Figura 18. Anàlisi de l'expressió gènica de *ADR1*, *ADH2*, *GUT1*, *FDH1*, *ALD4* i *FET3*. Es va créixer la soca BQS201 en medi YPG i es va tractar amb doxiciclina durant 10 hores. Les cèl·lules es varen recollir i se'n va analitzar l'expressió relativa (Tractat/No tractat) dels gens indicats. Els resultats es mostren com la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents.

Així doncs, tant l'estudi proteòmic com les dades d'expressió obtingudes per PCR quantitativa, apunten cap a una remodelació metabòlica que implicaria la regulació a la

baixa de molts gens del metabolisme de fonts de carboni alternatives, principalment els regulats pel factor transcripcional Adr1.

En les seccions posteriors, es tractarà el mecanisme o mecanismes pels quals Adr1 modifica la seva activitat en absència de frataxina i com fenotips previs a la pèrdua d'aquests enzims respiratoris com són l'activació del reguló del ferro i l'estrès oxidatiu poden influir en l'activitat de Adr1.

2. Estudi del factor transcripcional Adr1

Dels resultats de l'apartat anterior es va concloure que el factor transcripcional Adr1 podria jugar un paper clau en la pèrdua d'enzims encarregats del metabolisme de fonts de carboni alternatives i contribuir d'aquesta manera a l'aturada en el creixement observada en estudis anteriors del grup. S'ha descrit, que Adr1 té múltiples vies de regulació entre les que hi ha la regulació de la transcripció, les fosforilacions de les Serines 98 i 230 que modularien la unió al DNA i l'activitat d'aquest factor de transcripció respectivament, i també la unió amb les proteïnes 14-3-3 de *S. cerevisiae*, també conegudes com Bmh1-2, que alhora depèn de la fosforilació de la Ser230 (revisat a Hahn & Young 2011).

2.1. Canvis en els nivells de proteïna i la localització d'Adr1 després de la repressió de frataxina

A fi d'analitzar el paper que juga Adr1 en la pèrdua dels gens reprimits per glucosa en absència de frataxina, es van construir diferents mutants. Concretament es va marcar Adr1 amb els epítops HA o GFP en els fons W303 i BQS201 (soques BQS213-BQS216, Taula 6 de l'apartat materials i mètodes), per així analitzar-ne tant els nivells de proteïna com la localització en diferents condicions. En primer lloc, ja que Adr1 regula els gens reprimits per glucosa, es va estudiar com aquesta proteïna responia a diferents medis

utilitzant la soca *W303 ADR1-GFP* (BQS213). Es van créixer dos cultius d'aquesta soca, un en medi YPD i l'altre en medi YPG, i quan aquests van arribar a una densitat òptica de 0,4-0,7 es varen prendre 0,5 ODs per visualitzar les cèl·lules al microscopi de fluorescència i la resta del cultiu es va recollir per a analitzar els nivells de ADR1 per Western Blot seguint el protocol d'extracció amb TCA.

Els resultats confirmen, d'acord amb el descrit prèviament (Blumberg et al., 1988), que un dels mecanismes principals de regulació d'Adr1 és la regulació de la transcripció i per tant la regulació dels seus nivells de proteïna. Tal com es mostra a la Figura 19, en un medi fermentatiu com el YPD els nivells de ADR1-GFP són pràcticament indetectables tant per Western Blot com per microscòpia de fluorescència. Per contra, en medi respiratori, YPG, els nivells de ADR1-GFP augmenten i té una clara localització nuclear com es mostra en la superposició de la imatge de ADR1-GFP i les del marcador nuclear DAPI.

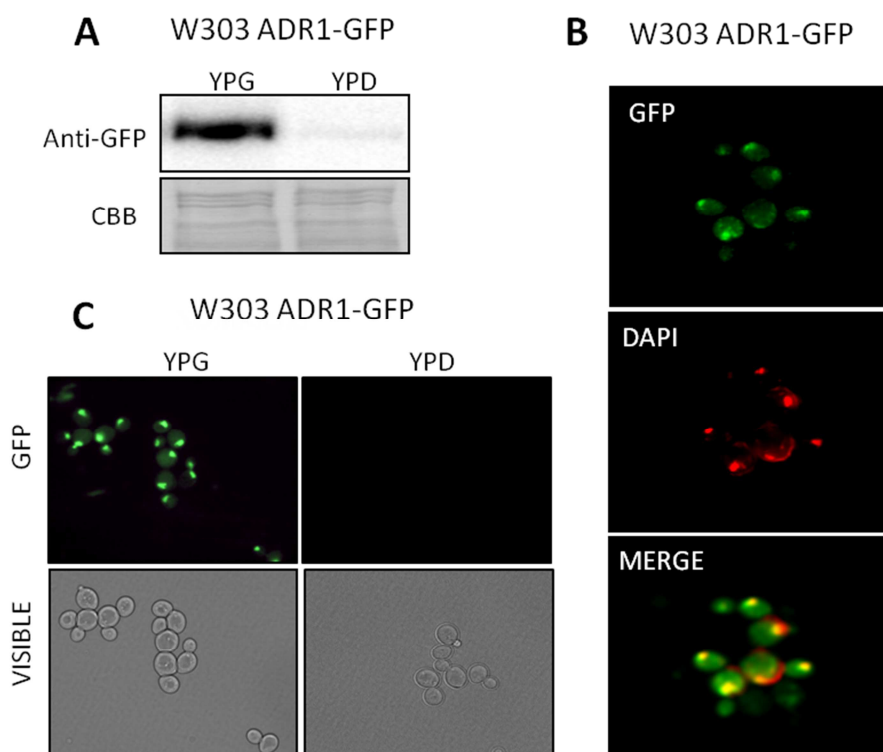


Figura 19. Nivells de proteïna i localització de ADR1-GFP en els medis YPD i YPG. Es van analitzar per Western Blot els nivells de proteïna de ADR1-GFP (A), així com la seva localització (B-C). Es va utilitzar la tinció nuclear DAPI per confirmar la localització nuclear de ADR1-GFP (B).

Un cop vist com es regula Adr1 en presència i absència de glucosa, la pregunta era: com respon aquest factor transcripcional a la manca de Yfh1?

En primer lloc, es varen analitzar els nivells de proteïna Adr1 utilitzant la soca *tetO₇-YFH1 ADR1-HA* (BQS216) on *YFH1* es troba sota el control del promotor *tetO₇* i Adr1 marcat amb l'epítot HA. Aquesta soca es va créixer en medi YPG, es va tractar amb doxiciclina i es varen recollir cèl·lules a diferents temps. També es va incloure una mostra d'aquesta soca crescuda en medi YPD com a control. Els extractes es van obtenir realitzant una extracció amb TCA de la mateixa manera que s'havia fet anteriorment.

Tal com es mostra a la Figura 20, no s'aprecia un descens dels nivells de Adr1-HA després de la repressió de frataxina contràriament al que passa en la seva regulació per glucosa. Si bé, s'observa un lleuger increment no significatiu en els nivells de proteïna com es mostra a la quantificació relativa del senyal per a la que es va utilitzar com a control de carga la tinció de la mateixa amb Blau de Coomassie.

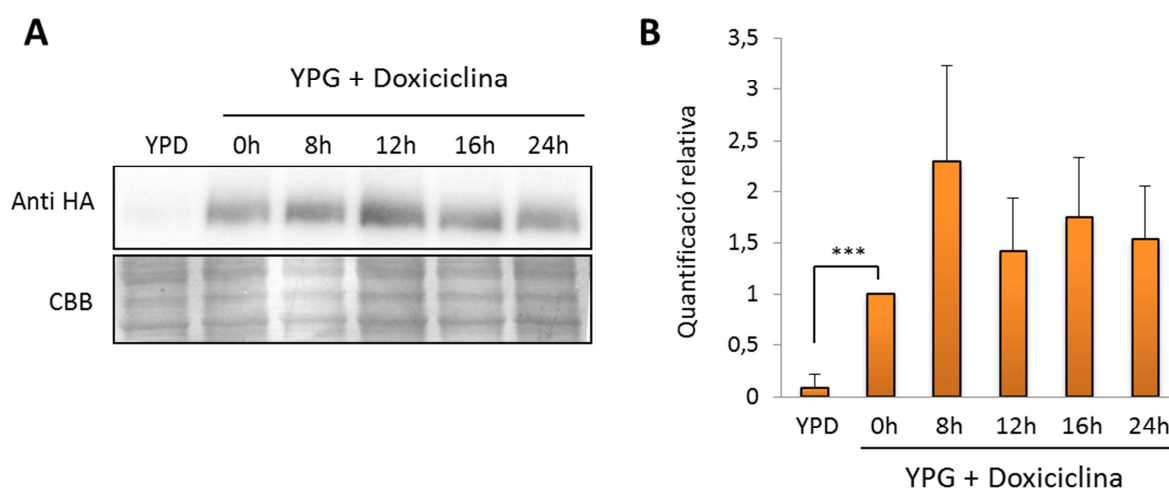


Figura 20. Nivells de Adr1-HA en absència de YFH1. Es va créixer la soca BQS216 en medi YPG, es va tractar amb doxiciclina i es van avaluar els nivells de ADR1-HA als temps indicats per Western Blot utilitzant anticossos específics contra l'epítot HA. Es van calcular els nivells relatius de ADR1-HA a través de la quantificació del senyal de quimioluminescència i utilitzant com a control de càrrega la tinció amb blau de Coomassie de la membrana després de la detecció. La quantificació es mostra com la mitjana \pm la desviació estàndard de com a mínim tres experiments independents relativitzats a la mostra crescuda en YPG sense doxiciclina (***) $p < 0,001$.

Seguidament, es va utilitzar la soca *tetO₇-YFH1 ADR1-GFP* (BQS215), on ADR1 està fusionada a la proteïna GFP per a analitzar-ne la localització després de la repressió de YFH1. Aquesta soca es va créixer en medi YPG, es va tractar amb doxiciclina i es van prendre cèl·lules als temps indicats per a analitzar-ne la localització de ADR1-GFP al microscopi de fluorescència. Tal com es mostra a la Figura 21A, a mesura que augmenta el temps de tractament amb doxiciclina es pot observar una deslocalització del factor transcripcional ADR1 el qual passa del nucli al citosol. Aquest efecte es comença a observar a les 8 hores de repressió de YFH1 però és molt més evident als temps posteriors. Per descartar efectes col·laterals de la doxiciclina, es va utilitzar com a control la soca BQS213, la qual no conté el promotor tetO₇, tractada amb doxiciclina durant 15 hores. No es va observar cap efecte de la doxiciclina sobre ADR1 *per se* (Figura 21B), confirmant així que el canvi de localització observat és conseqüència de la manca de frataxina.

En conjunt, aquests resultats mostren que ADR1 canvia de localització en absència de frataxina, del nucli al citosol, sense afectar els nivells de proteïna. Aquesta regulació, que difereix de la regulació clàssica descrita en presència de glucosa al medi, explica la regulació a la baixa d'alguns gens reprimits per glucosa observada a l'apartat anterior i que comprometria el metabolisme de fonts de carboni alternatives.

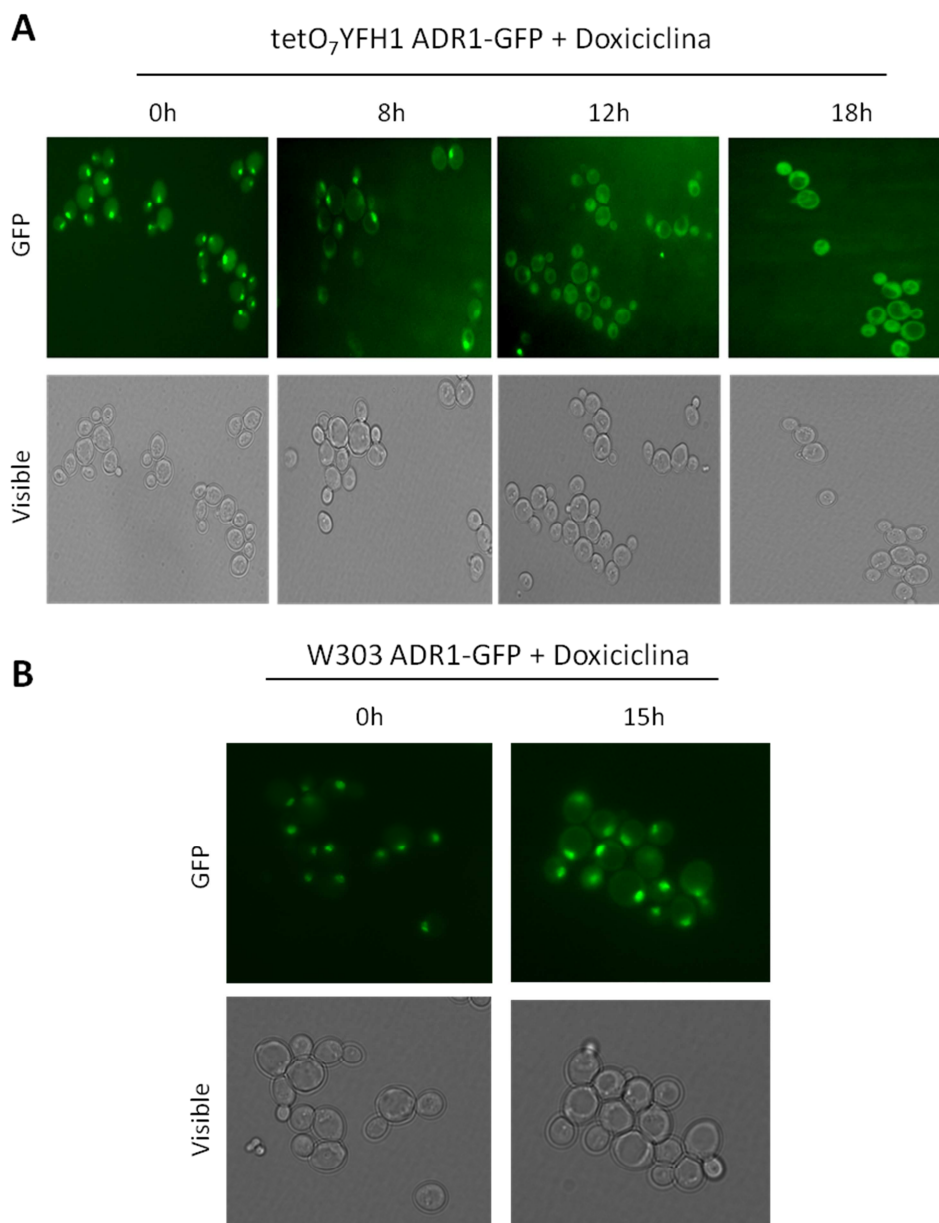


Figura 21. Localització de Adr1-GFP després de la repressió de *YFH1*. Es va créixer la soca BQS215 en medi YPG i es va tractar amb doxiciclina. Seguidament es va analitzar la localització de Adr1-GFP al microscopi de fluorescència als temps indicats (A). Com a control es va utilitzar la soca BQS213 tractada durant 15 hores amb doxiciclina (B).

2.2. Estudi de Adr1 en mutants *GRX5*

Adr1 presenta una regulació en absència de Yfh1 que difereix de la regulació clàssica. Per determinar si aquest és un efecte exclusiu de la manca de frataxina o també té lloc en altres mutants de proteïnes mitocondrials, vàrem decidir estudiar aquest fenotip en mutants de la Glutaredoxina 5 (Grx5). Grx5 és una proteïna mitocondrial que participa en la biogènesi de centres ferro-sofre. Els mutants $\Delta grx5$ presenten un fenotip que té molts punts en comú amb els mutants de *yfh1* com són: a) activació del reguló del ferro, b) estrès oxidatiu i c) pèrdua de proteïnes amb centres ferro-sofre (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002).

De la mateixa manera que amb *YFH1*, vàrem utilitzar un mutant condicional de *GRX5* (*tetO7-GRX5*) en el qual es va marcar *ADR1* amb la proteïna verda fluorescent (GFP) i posteriorment se'n va analitzar la localització després de reprimir l'expressió de *GRX5* durant 14 hores. Aquest és un temps suficient per a reduir els nivells de Grx5 i en el qual el reguló del ferro i els sistemes antioxidants estan induïts, tal com passa amb els mutants *YFH1*.

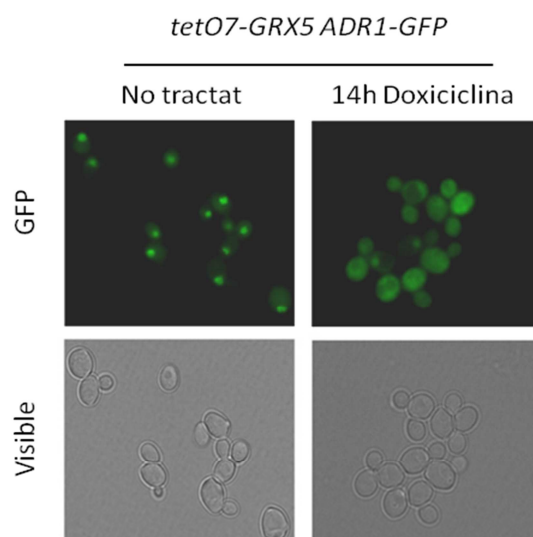


Figura 22. Localització de Adr1 en mutants *tetO7-GRX5*. La soca BQS217 es va créixer en medi YPG, es va tractar amb doxiciolina durant 14 hores i es va analitzar la localització de Adr1-GFP.

Com s'observa a la Figura 22, la resposta de Adr1 observada en els mutants *tetO₇-GRX5 ADR1-GFP* és la mateixa que la descrita en l'apartat anterior pels mutants *tetO₇-YFH1*. S'observa un clar canvi de localització del nucli al citosol. Per tant, aquests resultats apunten cap a un mecanisme de regulació general, que no és exclusiu de la manca de frataxina.

2.3. Anàlisi de l'efecte de diferents estressos sobre Adr1

Els resultats obtinguts fins al moment, suggereixen que Adr1 tindria diferents vies de regulació: una dependent de la presència de glucosa al medi, i una segona que és la que succeeix en absència de Yfh1 o Grx5. Aquestes dues vies difereixen principalment en la regulació dels nivells de proteïna tal com s'ha demostrat prèviament. Tant de resultats previs del grup com d'altres investigadors, es sap que la manca de frataxina i la de Grx5 provoca tant l'activació del reguló del ferro com una situació d'estrès oxidatiu. Ambdós fenotips s'observen abans del canvi de localització d'Adr1, fet que podria apuntar a una relació entre ells. A fi d'identificar si l'estrès oxidatiu o la senyalització a baixos nivells de ferro provoquen el mateix efecte sobre Adr1 que la manca de frataxina, vàrem tractar la soca BQS213 (*W303 ADR1-GFP*) amb l'agent oxidant H₂O₂, a diferents concentracions per induir una situació d'estrès oxidatiu, i per altra banda, també vàrem induir la senyalització a baixos nivells de ferro tractant les cèl·lules amb el quelant de ferro BPS.

En primer lloc es va analitzar el tractament amb quelant de ferro. Per fer-ho, es va afegir BPS a una concentració de 100 µM als cultius i es van prendre mostres a diferents temps, concretament 6, 9 i 12 hores. Abans d'analitzar la localització de Adr1, es van mesurar els nivells d'expressió del gen *FET3* a fi de comprovar que aquest tractament estava induint el reguló Aft1. Tal com mostren els resultats, el tractament amb BPS indueix clarament l'expressió de *FET3* el que indica que Aft1 es trobaria actiu. Pel que fa a la localització d'Adr1, no es van observar canvis respecte al control a cap dels temps que es van analitzar, resultat que ens permet concloure que l'activació d'Aft1 *per se* no afecta a l'activitat d'Adr1 (Figura 23).

Seguidament es va analitzar l'efecte que produïa una situació d'estrès oxidatiu en forma de peròxid d'hidrogen sobre la localització d'Adr1. Es van escollir dues concentracions, 0,2 mM i 1 mM per reproduir diferents nivells d'estrès. A l'analitzar l'efecte de les dues concentracions de peròxid sobre Adr1, es va observar com, mentre que un estrès suau, 0,2 mM H₂O₂, no tenia cap efecte sobre la localització d'Adr1, un estrès més sever, 1 mM H₂O₂, provocava la sortida d'Adr1 del nucli als 30 minuts de tractament amb peròxid d'hidrogen. A més, de forma similar al que passa en absència de Yfh1, els nivells de proteïna de Adr1-GFP no es veuen alterats (Figura 23).

Amb aquests resultats es va concloure que Adr1 es pot regular en una situació d'estrès oxidatiu modificant-ne la localització sense alterar els nivells de proteïna, un mecanisme de regulació que no s'havia descrit prèviament.

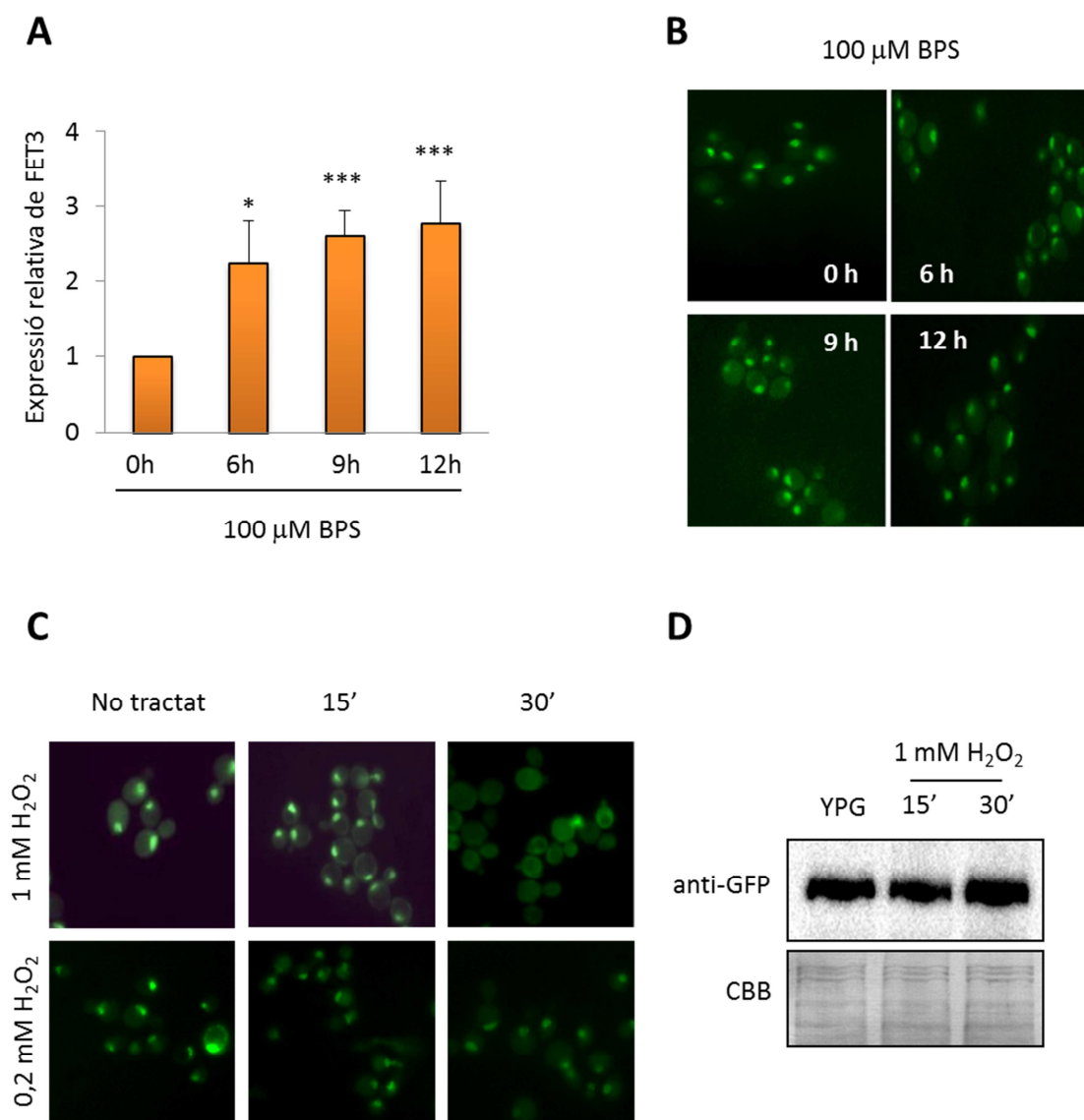


Figura 23. Localització de Adr1-GFP en diferents situacions d'estrès. Es va créixer la soca BQS213 en medi YPG i es va tractar amb els compostos indicats a diferents temps. A) Mesura de l'expressió de *FET3* per RT-qPCR al llarg del tractament amb BPS. B) Localització de Adr1-GFP durant el tractament amb BPS. C-D) Localització i nivells de proteïna de Adr1-GFP durant el tractament amb peròxid d'hidrogen. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

3. Estudi de la implicació de *CTH2* en la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S

La pèrdua de proteïnes que contenen centres Fe-S és un dels fenotips paradigmàtics en cèl·lules deficientes en frataxina. Tot i que l'explicació principal d'aquest fenotip sempre ha estat la implicació de frataxina en el procés de biosíntesis de clústers Fe-S al mitocondri,

aquesta hipòtesi queda en dubte per nombroses evidències de diferents grups on es demostra que la pèrdua de proteïnes que contenen centres ferro-sofre no té lloc o és conseqüència de la situació d'estrès i de l'acumulació de ferro que pateixen els mutants de frataxina (Irazusta et al., 2006; Navarro et al., 2015). En el model condicional *tetO₇-YFH1*, la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S es va classificar com a fenotip secundari, fet que descartaria una funció essencial de frataxina en la biosíntesi d'aquests clústers (Moreno-Cermeño et al., 2010). Per tant, tenint en compte aquestes dades, la implicació essencial de frataxina en el procés de biosíntesis de clústers Fe-S quedaria en dubte, però llavors la pregunta que sorgeix és: quina és la raó de la pèrdua de les proteïnes que contenen centres Fe-S?

Des de la seva identificació a l'any 2005 fins l'actualitat, s'han caracteritzat dues proteïnes Cth1 i Cth2 que duen a terme una funció de remodelació metabòlica en situacions de deficiència de ferro (Puig et al., 2005, 2008). Aquestes proteïnes, que pertanyen al reguló del ferro i per tant la seva transcripció està regulada per Aft1, s'uneixen als mRNAs diana i en promouen la seva degradació. Aquesta resposta permet a la cèl·lula optimitzar els recursos de ferro disponibles ja que les seves dianes són majoritàriament proteïnes que contenen ferro en forma de centres ferro-sofre com Aconitasa, grups hemo com el citocrom C, o bé de centres diferro com la ribonucleòtid reductasa.

Donat que les cèl·lules deficientes en frataxina activen el reguló del ferro, i ja que *CTH2* és un dels gens del reguló, en primer lloc vàrem decidir analitzar-ne els nivells d'expressió en deficiència de Yfh1. Aquesta anàlisi es va fer a diferents temps després de l'addició de doxiciclina, concretament a 14 hores, on encara no hi ha afectacions sobre les proteïnes que contenen centres Fe-S; i a 24 i 48 hores, on ja s'observen pèrdues d'activitat, una reducció en els nivells de proteïnes com Aconitasa i Succinat deshidrogenasa, i finalment una disminució dràstica en la velocitat de creixement.

Tal com es mostra a la Figura 24 s'observa un increment en els nivells d'expressió del gen *CTH2* després de l'addició de doxiciclina al medi. Aquest increment ja s'observa a les 14 hores, però es fa molt més evident a les 24 i a les 48 hores, arribant a assolir uns nivells

≈10 vegades superiors al control. Aquest és un punt interessant ja que aquest increment té lloc en paral·lel a la pèrdua d'enzims com Aconitasa i Succinat Deshidrogenasa, els quals són dianes de Cth2. Aquesta correlació d'ambdós fenòmens en el temps suggereix una possible relació entre l'increment dels nivells de Cth2 i la pèrdua de proteïnes que contenen centres Fe-S.

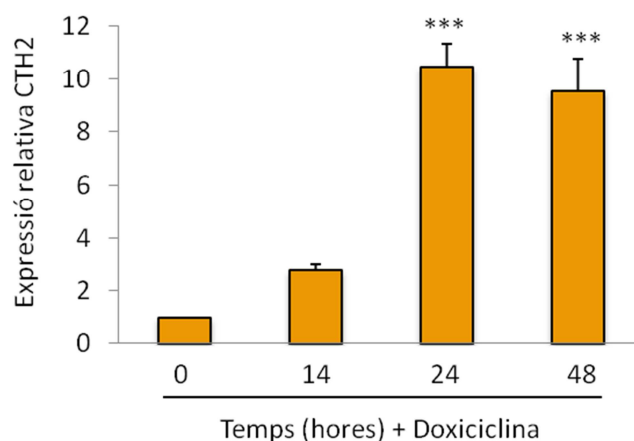


Figura 24. Expressió del gen *CTH2*. Es va créixer la soca BQS201 en medi YPG i es va tractar amb doxiciclina. Seguidament, es va mesurar l'expressió del gen *CTH2* per RT-qPCR als temps indicats. Els resultats indiquen la mitjana ± la desviació estàndard de tres experiments independents (***) $p < 0,001$.

A fi de confirmar aquesta relació, es van construir mutants $\Delta cth2$ en un fons salvatge i en un fons *tetO₇-YFH1*, donant lloc a les soques BQS252 i BQS251.

En aquestes noves soques, es van estudiar tant la activitat enzimàtica com els nivells de proteïna aconitasa (*Aco1*). També es van analitzar altres dianes de Cth2, concretament, es van analitzar els nivells de proteïna de succinat deshidrogenasa 2 per immunodetecció i del citocrom C a través de l'activitat peroxidasa lligada al grup hemo. Aquests assajos es van fer a les 48 hores de repressió de *YFH1*, un temps on l'activitat aconitasa és molt baixa i on hi ha una forta inducció de l'expressió del gen *CTH2*.

Tal com ja s'havia descrit prèviament s'observa un descens significatiu d'activitat Aconitasa en el mutant *tetO₇-YFH1* després de tractar aquesta soca durant 48 hores amb doxiciclina. Aquest descens mostra una correlació amb els nivells de proteïna, els quals

també mostren un fort descens tal com mostra la imatge del *Western Blot*. D'acord amb la hipòtesi de que *CTH2* podria regular a la baixa les proteïnes analitzades, la deleció d'aquest gen en la soca *tetO₇-YFH1*, permet que al reprimir l'expressió de frataxina es mantingui l'activitat aconitasa. Aquest efecte, també va en correlació amb el manteniment dels nivells de proteïna, ja que en aquest mutant tant els nivells de proteïna Aco1 com de els de Sdh2 i Cyc1 són similars a la situació inicial (sense doxiciclina). Els resultats obtinguts no varen mostrar diferències significatives entre les soques W303 i Δ cth2 ni pel que fa referència a l'activitat i nivells d'aconitasa, ni pels nivells de la resta de proteïnes analitzades.

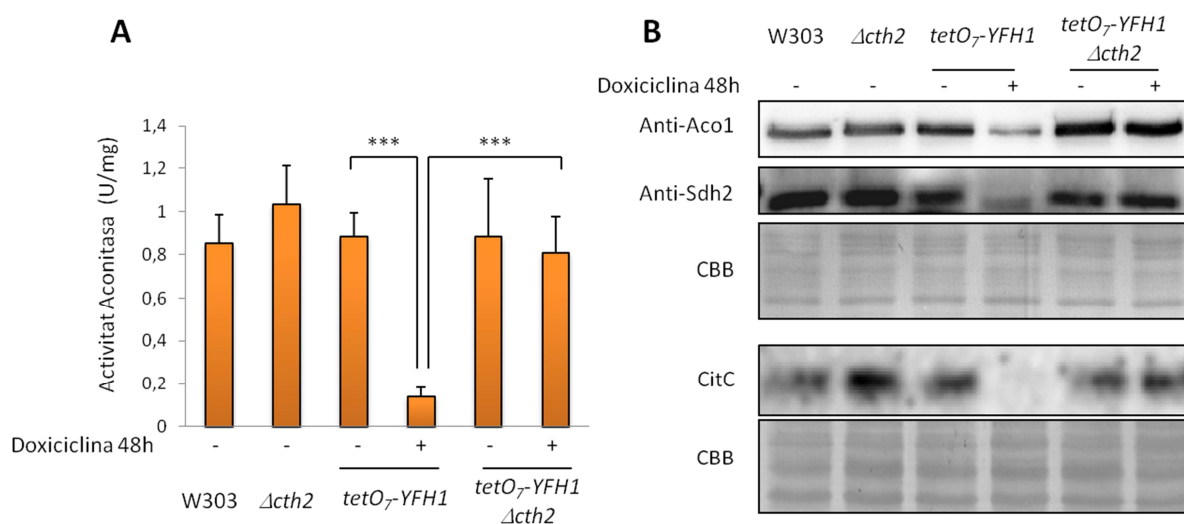


Figura 25. Activitat Aconitasa i nivells de proteïnes de dianes de *CTH2*. A) Es va analitzar l'activitat Aconitasa de les soques indicades 48 hores després de l'addició de doxiciclina al medi. Les Unitats representen la conversió de Cis-Aconitat en μ mols/min. B) Nivells de Aco1, Sdh2 i Cyc1 analitzats per Western Blot. Els resultats mostren la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents (***) $p < 0,001$

Pel que fa a la resta de proteïnes analitzades, s'observa el mateix efecte que per aconitasa; mentre que els seus nivells disminueixen dràsticament en la soca BQS201 després de 48 hores amb doxiciclina, en el doble mutant els nivells es mantenen.

D'aquests resultats en podem extreure dues conclusions principals:

- a) Cth2 és el principal responsable de la pèrdua d'enzims i proteïnes que contenen centres Fe-S en els mutants de frataxina. Alhora, aquests resultats confirmen que la pèrdua d'aquestes proteïnes és un efecte secundari derivat de l'activació del reguló del ferro, del qual *CTH2* en forma part.
- b) Frataxina no és essencial per a la biogènesi de centres Fe-S ni de grups hemo. Com s'observa en els resultats, la pèrdua d'activitat de proteïnes amb centres Fe-S com Aco1 48 hores després de la repressió de *YFH1* va en relació amb la pèrdua dels nivells de proteïna. En els mutants de *CTH2*, on els nivells de proteïna es mantenen, aquestes proteïnes segueixen sent funcionals, el que indica que contenen els seus respectius clústers o grups hemo tot i la manca de frataxina.

A fi de tenir una conclusió més ferma pel que fa a la relació de frataxina amb la biogènesi de centres Fe-S i descartar un efecte general de Cth2, es va repetir el mateix experiment utilitzant les soques *tetO₇-GRX5* i *tetO₇-GRX5 Δcth2*. Tal com s'ha explicat anteriorment, Grx5 és una proteïna mitocondrial que té un rol perfectament definit en la biosíntesis de centres Fe-S, concretament en la transferència d'aquests centres des de Isu1 fins a les proteïnes receptores (Mühlenhoff et al., 2003). En els mutants *tetO₇-GRX5* la pèrdua d'activitat aconitasa, entre altres, és molt més ràpida que no pas en els mutants *tetO₇-YFH1*, i es pot observar un descens molt marcat de l'activitat aconitasa 12 hores després d'afegir doxiciclina al medi (Rodríguez-Manzanaque et al., 2002). Es per això, que per analitzar l'efecte de Cth2 en els mutants de *GRX5* els experiments es varen realitzar 14 hores després de l'addició de doxiciclina i no a les 48 hores com amb els mutants de frataxina.

Després de reprimir l'expressió de *GRX5* durant 14 hores, s'observa un clar descens en l'activitat aconitasa tant en el mutant simple com en el doble. Aquests resultats apuntarien per tant a que Cth2 no té cap influència en els mutants de *GRX5* i que la pèrdua d'activitat és conseqüència de la pèrdua del centre Fe-S de Aco1. Si ens fixem en

els nivells de proteïna, hi ha un descens similar en ambdós mutants que es podria atribuir a la inestabilitat de la apo-aconitasa (Figura 26).

Aquests resultats també confirmen que frataxina no té una funció essencial en la biosíntesis de centres Fe-S, al contrari que Grx5, ja que queda demostrat que l'efecte de la deleció de *CTH2* és exclusiu pels mutants de frataxina i no té efecte en altres mutants de components clarament involucrats en la maquinària de biosíntesis de centres Fe-S.

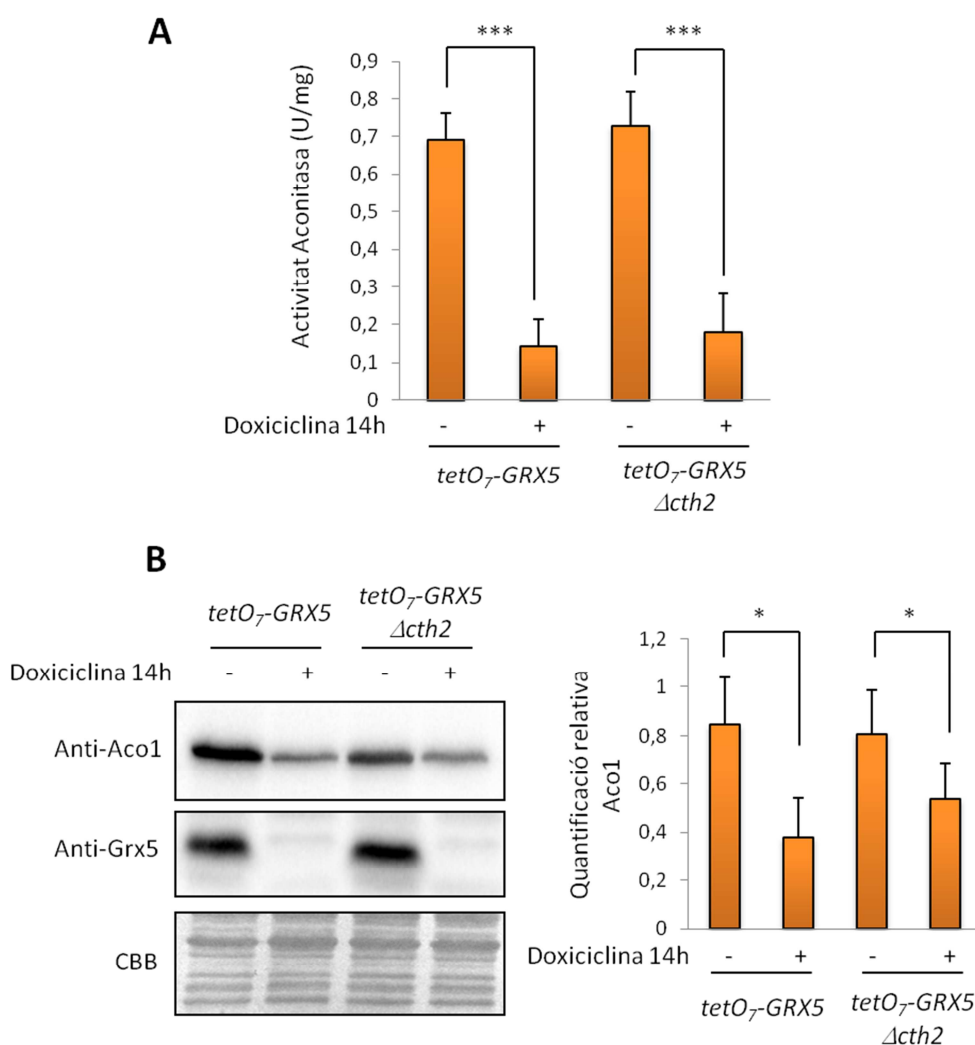


Figura 26. Activitat i nivells d'Aconitasa en mutants *tetO₇-GRX5*. A) es van analitzar l'activitat aconitasa en els mutants indicats abans i després del tractament amb doxiciclina. Les Unitats representen la conversió de Cis-Aconitat en $\mu\text{mols}/\text{min}$. B) Anàlisi dels nivells de proteïna Aco1 i Grx5. Es mostra la quantificació relativa de les membranes per a Aco1. Els resultats indiquen la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

3.1. Estudi de la influència de *CTH2* en la reducció de la velocitat de creixement

Després de concloure que *CTH2* és el responsable de la pèrdua de proteïnes que contenen ferro en els mutants *tet-YFH1*, és va estudiar quin impacte tenia en la reducció de la velocitat de creixement descrita anteriorment. Per fer-ho, es van utilitzar les soques *tetO₇-YFH1* i *tetO₇-YFH1 Δcth2* les quals es varen tractar amb doxiciclina i es va mesurar la densitat òptica a 600 nm cada mitja hora en un lector de plaques. A partir de les dades obtingudes es va calcular el temps de generació de cada hora.

Els resultats obtinguts en aquest experiment mostren un alentiment en el creixement de la soca *tetO₇-YFH1* en presència de doxiciclina d'acord amb el que s'havia descrit prèviament (Figura 27). Per altra banda, en els mutants *Δcth2* no s'observa aquest alentiment de forma que no hi ha diferències entre les cèl·lules tractades amb doxiciclina de les no tractades.

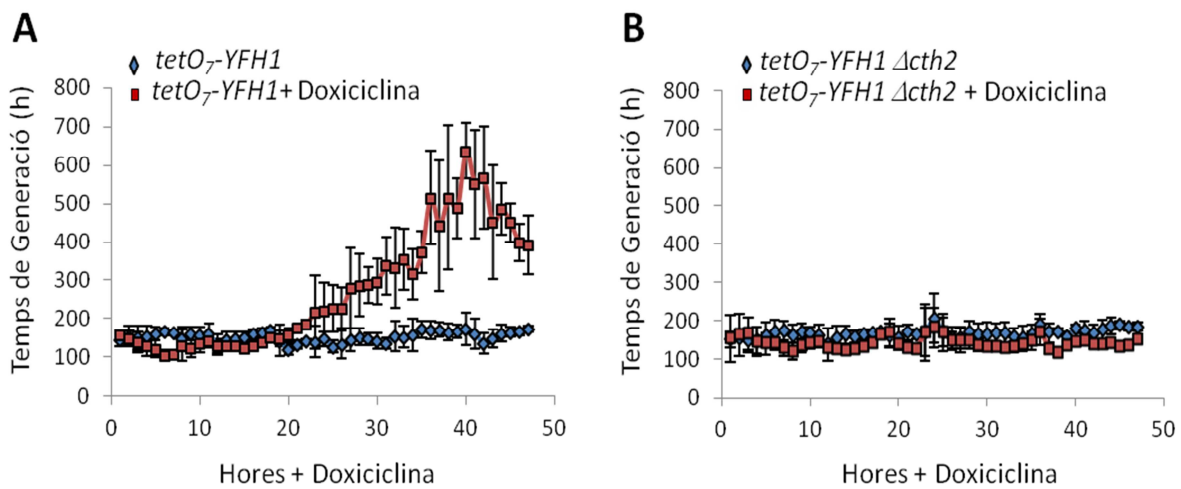


Figura 27. Estudi de la velocitat de creixement de les soques *tetO₇-YFH1* i *tetO₇-YFH1 Δcth2*. Es va estudiar la velocitat de creixement de les soques indicades en un medi ric YPG i amb o sense doxiciclina al medi. Els punts representen el temps de generació al temps indicat i representen la mitjana ± la desviació estàndard de tres experiments independents.

Si ens fixem amb més profunditat en aquests resultats, aquest alentiment progressiu de la soca BQS201, es correlaciona amb la pèrdua d'enzims amb centres Fe-S, com per exemple aconitasa, que tenen especial rellevància al créixer les cèl·lules en un medi respiratori. Sense aquestes proteïnes les cèl·lules no poden mantenir el ritme de creixement normal. Quan delecionem *CTH2*, aconseguim que es mantinguin els nivells de les seves proteïnes diana. A més a més aquestes són funcionals com s'ha demostrat prèviament, i això permet a la cèl·lula mantenir el ritme de creixement. Tot i que els resultats demostren que *CTH2* tenia un paper determinant, ens vàrem preguntar quin era el paper que jugava *Adr1* en aquesta desceleració del creixement. Donat que les cèl·lules estan creixent en un medi ric, hi ha múltiples fonts de carboni que els llevats poden utilitzar, com per exemple aminoàcids. Ja que aquestes vies no depenen d'*Adr1*, vàrem decidir repetir l'experiment anterior utilitzant únicament la soca *tetO₇-YFH1 Δcth2* en medi mínim SC on la font de carboni principal fos l'etanol. D'aquesta manera la implicació d'*Adr1* es major ja que aquest factor de transcripció regula, entre altres, el principal enzim del metabolisme del etanol: *Adh2*.

Els resultats obtinguts mostren que la soca *tetO₇-YFH1 Δcth2*, al afegir doxiciclina, també pateix un alentiment o aturada del creixement quan es troba en medi mínim SC Etanol. Aquests resultats apunten a que *Adr1*, el qual també està afectat en aquesta soca, també juga un paper important en la pèrdua de velocitat de creixement (Figura 28).

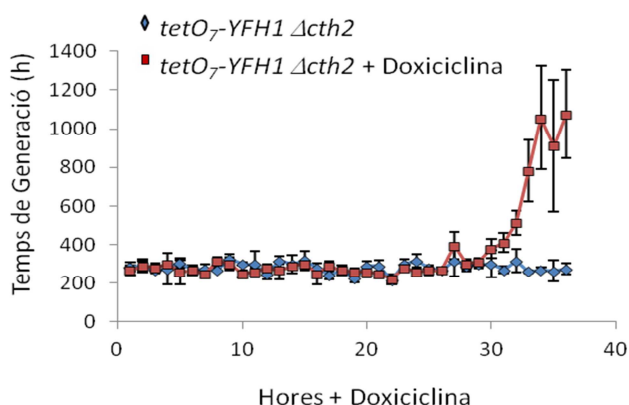


Figura 28. Creixement de la soca *tetO₇-YFH1 Δcth2* en medi mínim SC Etanol. Es va créixer la soca BQS251 en medi mínim SC Etanol en presència o absència de Doxiciclina al medi. Els punts mostren el temps de generació de cada hora i representen la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents.

3.2. Impacte de la deleció de *CTH2* en el metabolisme del ferro

Dels apartats anteriors podem concloure que mitjançant la deleció del gen *CTH2* en mutants de frataxina aconseguim mantenir els nivells i l'activitat de proteïnes amb centres Fe-S i això permet mantenir la velocitat de creixement. Per a aprofundir una mica més en el metabolisme d'aquests mutants, vàrem decidir analitzar-ne els nivells de ferro 48 hores després de l'addició de doxiciclina al medi.

Tal com mostren els resultats representats a la Figura 29, la soca deficient en *CTH2* i *YFH1* (*tetO₇-YFH1 Δcth2*) pràcticament no acumula ferro en comparació amb la soca *tetO₇-YFH1* després de tractar-les 48 hores amb doxiciclina. En la mateixa línia, l'anàlisi de l'expressió de *FET3* mostrava una menor inducció d'aquest gen en els dobles mutants, que només mostrava un increment del 50% comparat amb un increment del 500% del mutant simple, el que indicaria un menor grau d'activació del reguló del ferro.

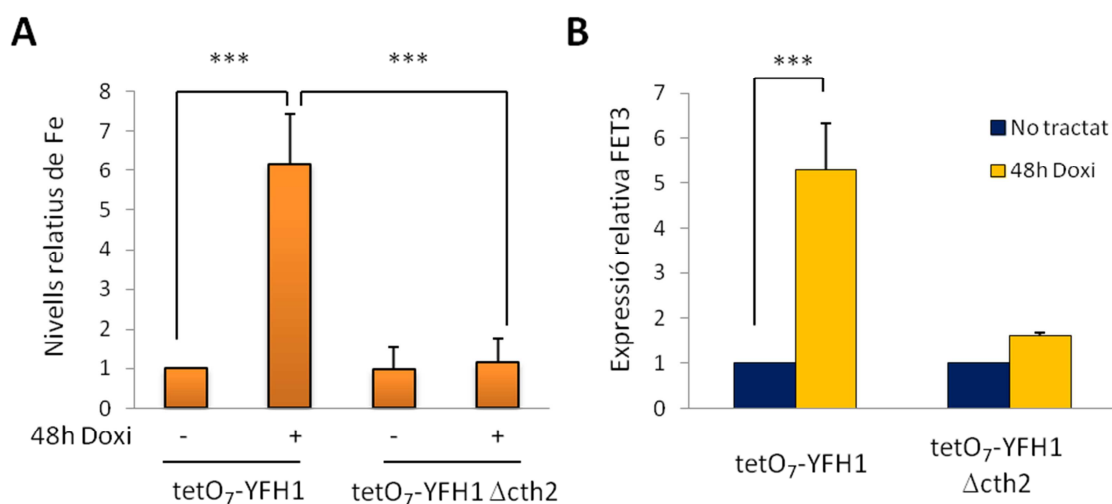


Figura 29. Nivells de ferro i expressió de *FET3*. Les soques BQS201 i BQS251 es varen créixer en medi YPG i es varen tractar amb doxiciclina durant 48 hores. Posteriorment es varen analitzar els nivells de ferro (A) i l'expressió de *FET3* (B). Els resultats mostren la mitjana ± la desviació estàndard de tres experiments independents (***) $p < 0,001$

Aquests resultats varen ser alhora interessants i sorprenents ja que no esperàvem que la deleció d'una diana del reguló del ferro com és *CTH2* podria afectar a l'activació de la resta de gens activats pel factor transcripcional Aft1. Tanmateix, una possibilitat fora que entre les múltiples dianes regulades per Cth2, n'hi hauria alguna o algunes que podrien participar en el metabolisme del ferro i en l'activació d'Aft1 i el reguló del ferro. És a dir, la deleció de *CTH2* podria augmentar els nivells basals de proteïna corresponents a les seves dianes les quals dificultarien l'activació d'Aft1.

Entre les més de 200 dianes identificades de *CTH2* a Puig et al. 2008, apareixen diversos grups interessants que podrien jugar algun paper, com ho són les proteïnes de resposta a estrès Prx1 i Tsa1. Diversos treballs ja han senyalat que aquestes proteïnes podrien regular l'activació del reguló del ferro en situacions d'estrès (Diab & Kane, 2013; McDonagh et al., 2011). En qualsevol cas aquesta qüestió es tracta a l'apartat de discussió de la tesi.

CAPÍTOL 2: Estudi de la Flavohemoglobina de llevat YHB1 en deficiència de Frataxina i la seva relació amb el Metabolisme del Ferro

1. Inducció de *YHB1* en absència de Frataxina

L'activació del reguló del ferro, regulat pel factor transcripcional Aft1, segueix essent una de les grans incògnites en les cèl·lules deficientes en Yfh1. Els resultats anteriors indiquen que frataxina no és essencial per a la biosíntesi de centres Fe-S, de forma que aquests cofactors es seguirien produint en mutants de *YFH1* tal com s'ha demostrat. Per tant, aquests resultats descartarien que Aft1 seguís un mecanisme de regulació clàssic on la seva activació depèn de la biosíntesis de centres Fe-S (Chen et al., 2004).

En l'estudi proteòmic descrit al capítol anterior, va aparèixer entre les proteïnes regulades a l'alça la flavohemoglobina de llevat Yhb1. Curiosament, s'ha descrit que aquesta proteïna pot interaccionar amb Yfh1 tot i que no s'ha donat cap explicació funcional a aquesta interacció (González-Cabo et al., 2005). A més, aquesta proteïna presenta doble localització ja que es pot localitzar tant al mitocondri com al citosol, i s'ha descrit que podria jugar algun paper en la resposta a estrès oxidatiu i en la detoxificació d'òxid nítric actuant com òxid nítric oxidoreductasa (Cassanova et al., 2005; Zhao et al., 1996). Amb aquests precedents, vàrem decidir investigar si Yhb1 jugava algun paper en els fenotips observats en els mutants de frataxina, més concretament, en l'activació de Aft1 i la resposta a estrès oxidatiu.

En primer lloc, es varen construir diferents mutants nuls $\Delta yhb1$ tant en el fons salvatge com en un fons *tetO₇-YFH1* per a obtenir dobles mutants. De la mateixa manera, Yhb1 es va marcar amb GFP per a obtenir una proteïna de fusió que permetés tant avaluar-ne els nivells de proteïna per immunodetecció com observar-ne la localització per microscòpia de fluorescència.

Un cop obtinguts els mutants, es va confirmar la inducció d'aquesta proteïna observada en l'estudi proteòmic per Western Blot. A més a més se'n va avaluar la localització ja que, com s'ha citat anteriorment, aquesta proteïna pot tenir tant localització citosòlica com localització mitocondrial (Figura 30).

Els resultats varen confirmar una clara inducció de *YHB1* 6 hores després d'afegir doxiciclina al medi. Pel que fa a la seva localització, no es va observar cap canvi dràstic després de reprimir l'expressió de *YFH1* però sí que es va observar la doble localització citosòlica-mitocondrial.

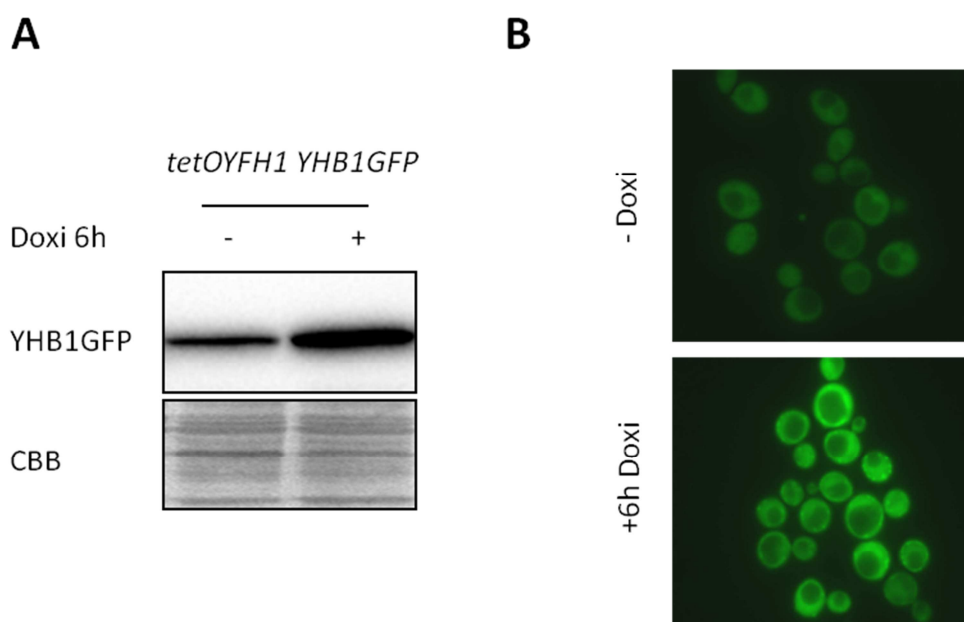


Figura 30. Nivells de Yhb1 en absència de Yfh1. Es va créixer la soca BQS259 en medi YPG i es va tractar amb doxiciclina durant 6 hores. Es varen analitzar els nivells de proteïna Yhb1-GFP per Western Blot (A) i la localització subcel·lular d'aquesta proteïna per microscòpia de fluorescència (B).

A banda de la inducció, vàrem voler investigar si aquesta proteïna conservava els seus cofactors, el grup hemo i la flavina (FAD), essencials per la seva activitat com òxid nítric oxidoreductasa. Per això, vàrem fer una separació electroforètica en condicions natives de diferents extractes cel·lulars (Figura 31). Un dels gels resultants es va transferir a una membrana de PVDF per a analitzar-ne l'activitat peroxidasa del grup hemo, i el segon dels gels es va rentar amb TBS i se'n van prendre imatges de fluorescència a fi de detectar el grup FAD. Com a controls, es van incorporar extractes provinents de soques deficientes en *YHB1*. A més, per a descartar efectes secundaris de la doxiciclina, també es van tractar les soques *W303* i $\Delta yhb1$ i es varen analitzar en paral·lel a les soques *tetO₇-YFH1* i *tetO₇-YFH1 $\Delta yhb1$* .

Els resultats d'aquest experiment estaven d'acord amb els obtinguts anteriorment (Figura 17 i Taula 22), en el sentit que hi ha un clar increment en la senyal del grup hemo en la soca *tetO₇-YFH1* tractada amb doxiciclina. Per altra banda aquest increment no es va observar tant clarament en la detecció de la flavina, degut probablement a que la senyal era molt lleu i feia difícil la seva detecció. Pel que fa als controls, no es va observar cap canvi significatiu després de tractar amb doxiciclina la soca salvatge W303.

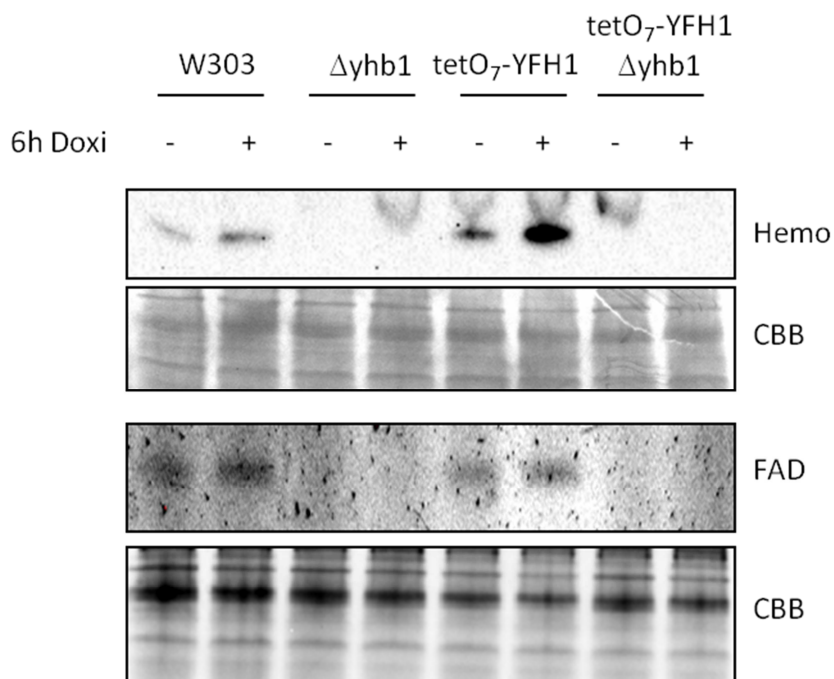


Figura 31. Detecció dels grups Hemo i FAD de Yhb1. Es van separar extractes de les mostres indicades en gels natius. El grup hemo es va detectar a través de la seva activitat peroxidasa, mentre que el FAD es va detectar gràcies a la seva fluorescència.

En conjunt aquests resultats confirmen que hi ha una forta inducció del gen *YHB1* en absència de frataxina. A més l'increment dels nivells de proteïna van acompanyats de l'increment dels cofactors d'aquesta proteïna, el que apuntaria a que aquesta proteïna seria potencialment funcional.

2. Relació entre Yhb1 i l'activació del reguló del ferro

Ja que l'increment en els nivells de proteïna de Yhb1 tenen lloc simultàniament a l'activació del reguló del Ferro, es va decidir investigar una possible relació entre ambdós processos. Per a estudiar aquesta possible interacció entre fenotips, es va analitzar en primer lloc el contingut de ferro de les soques *tetO₇-YFH1* i *tetO₇-YFH1 Δyhb1*, després de tractar-les durant 24 hores amb doxiciclina. A més, es va marcar la proteïna Fet3 amb l'epítot 9myc en les dues soques i se'n varen avaluar els nivells a les 24 hores de tractament amb doxiciclina per així establir paral·lelismes entre l'acumulació de ferro i l'expressió d'aquesta proteïna la qual s'utilitza com a *reporter* de l'activació d'Aft1 i del reguló del ferro.

Tal com mostren els resultats (Figura 32) la soca BQS201 acumula alts nivells de ferro quan reprimim l'expressió de frataxina d'acord amb el que s'havia descrit prèviament (Moreno-Cermeño et al., 2010). Per contra l'acumulació de ferro no té lloc en el doble mutant *tetO₇-YFH1 Δyhb1*.

En la mateixa línia, en analitzar els nivells de proteïna de Fet3-9myc en les dues soques veiem que segueix la mateixa tendència: hi ha un clar increment en els nivells de proteïna en el mutant *tetO₇-YFH1* tractat amb doxiciclina, mentre que aquest increment és molt menor en el seu mutant de *YHB1* tot i que s'observa un lleuger increment. Aquests resultats apuntarien a que Yhb1 juga algun paper en la activació de Aft1.

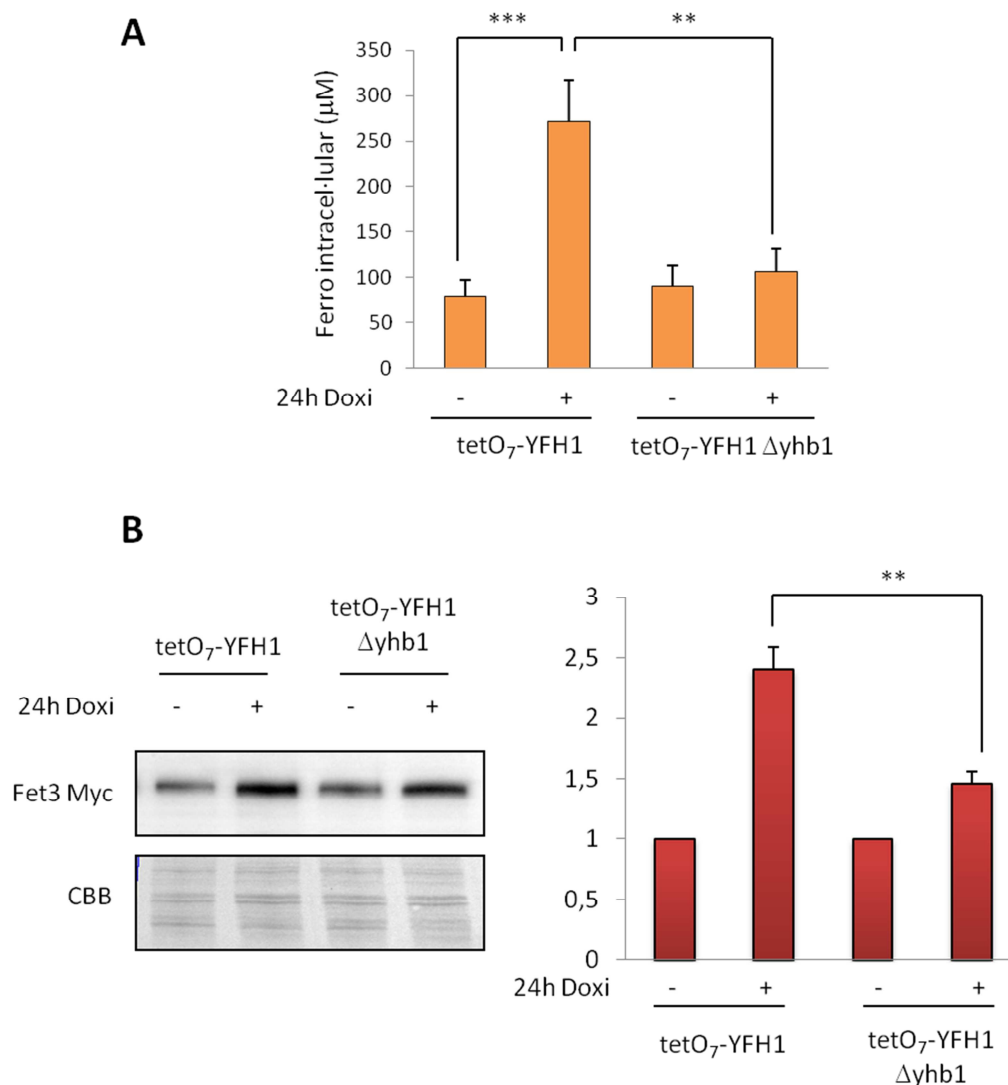


Figura 32. Anàlisi del contingut de ferro i els nivells de Fet3 en les soques BQS201 i BQS255. A) Les soques BQS201 i BQS255 crescudes en medi YPG, es varen tractar amb doxiciclina durant 24 hores i es va analitzar el contingut de ferro. B) Anàlisi dels nivells de Fet3-Myc en ambdós fons genètics (BQS201 i BQS255) després del tractament amb doxiciclina durant 24 hores. Els resultats es varen quantificar i es representen com els valors relatius de proteïna respecte les mostres no tractades. Els resultats representen la mitjana \pm la desviació estàndard de com a mínim tres experiments independents (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Donats aquests resultats, la pregunta era si Yhb1 participa en l'activació d'Aft1 en absència de frataxina o també ho fa en altres situacions com és l'exposició de les cèl·lules a situacions de deficiència de ferro. Per a donar resposta a aquests interrogants, es varen créixer les soques W303 i $\Delta yhb1$ en medi YPG i aquestes es varen tractar amb el quelant de ferro BPS durant 4 hores. Passat aquest temps, es va analitzar l'expressió de Fet3, una de les dianes d'Aft1. De la mateixa manera, també es va analitzar la capacitat d'aquestes

dues soques de créixer en un medi amb poc ferro. Per a aquest experiment es varen preparar plaques SC + BPS, es varen preparar dilucions seriades de cada soca començant en una $OD_{600} = 0,5$ i es varen plaquejar. Com a control es va utilitzar un mutant nul de *AFT1* ($\Delta aft1$) el qual es incapaç de créixer en condicions de baix ferro.

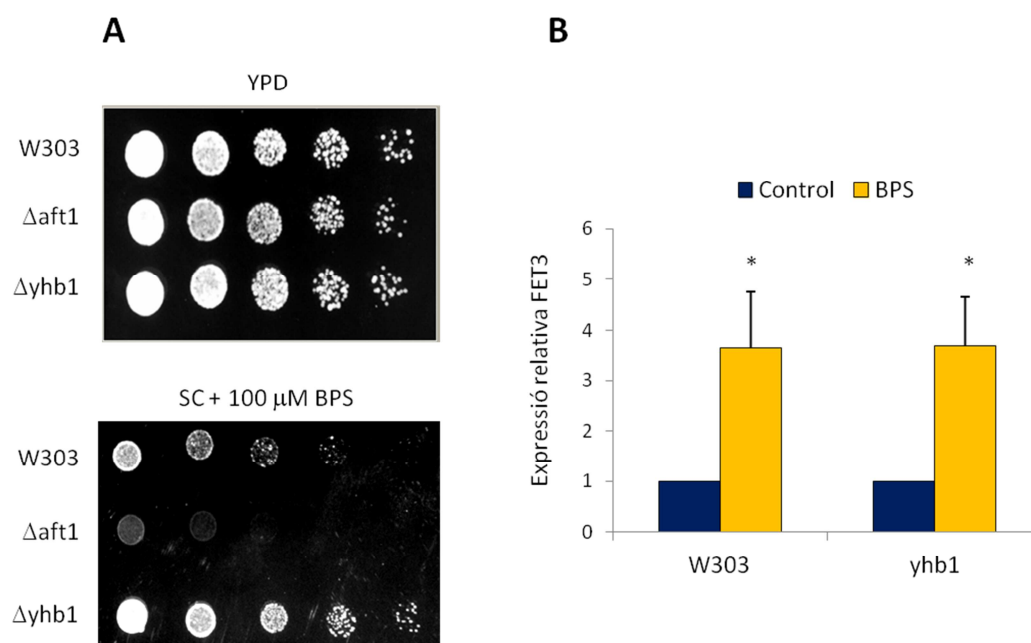


Figura 33. Resposta de les cèl·lules $\Delta yhb1$ a deficiència de ferro. A) Anàlisi de la supervivència en condicions de deficiència de ferro. Partint de cultius a una $OD_{600} = 0,5$ es varen fer dilucions seriades i es varen incubar en plaques SC que contenien 100 μ M BPS. B) Anàlisi de l'expressió de *FET3* després de tractar les soques W303 i $\Delta yhb1$ amb 100 μ M BPS durant 4 hores. Els resultats mostren la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents (* p < 0,05).

Al tractar la soca salvatge i la soca deficient en *YHB1*, es va observar que no hi havia diferències significatives entre elles. Les dues són capaces d'activar l'expressió de *FET3* en presència de BPS al medi. A més, els nivells d'expressió en les dues soques són idèntics. De la mateixa manera, ambdues soques són capaces de créixer en un medi amb baixos nivells de ferro a diferència del mutant $\Delta aft1$ que és incapaç de créixer. De fet, la soca deficient en *YHB1* creix fins i tot millor que la soca salvatge (Figura 33). Aquests resultats ens permeten concloure que en condicions de baixa disponibilitat de ferro, *Yhb1* no és necessari per a activar el reguló del ferro.

En conjunt, els resultats que s'aporten en aquest apartat, mostren que la deleció de *YHB1* té un efecte supressor sobre el fenotip d'acumulació de ferro dels mutants deficients en frataxina. Tot i això, en presència del quelant de ferro BPS aquests mutants són capaços de respondre igual que la soca salvatge. Per tant, aquests resultats suggereixen que existeixen com a mínim dues vies per a activar el factor transcripcional Aft1. El primer d'aquests mecanismes seria la regulació clàssica per la qual en deficiència de ferro hi hauria una baixa producció de clústers i conseqüentment l'activació de Aft1 que no pot ser retinut al citosol (Chen et al., 2004; Rutherford et al., 2005). Per altra banda, en deficiència de frataxina l'activació seguiria una via diferent i pel que s'ha mostrat Yhb1 hi juga un paper determinant.

2.1. Mesura de la producció de espècies reactives de l'oxigen i d'òxid nítric

En l'apartat anterior, s'ha demostrat com l'activació d'Aft1 segueix una via alternativa a la regulació clàssica descrita per aquest factor de transcripció. Altres grups, ja han demostrat la possibilitat de que Aft1 es reguli per altres mecanismes, concretament en situacions d'estrès oxidatiu (Castells-Roca et al., 2011). Aquesta possibilitat entra dins els mecanismes plausibles de regulació d'Aft1 en absència de frataxina ja que la manca d'aquesta proteïna produeix, entre altres fenotips, una situació d'estrès oxidatiu a la cèl·lula. A banda d'aquest estrès oxidatiu, la inducció de YHB1 suggereix que també podria haver-hi un increment d'òxid nítric el que provocaria una situació d'estrès nitro-oxidatiu. Per avaluar la producció d'espècies reactives del oxigen i la producció d'òxid nítric es varen utilitzar dos compostos fluorescents, el dihidroetidi (DHE) que reacciona principalment amb superòxid i el DAF-FM DA que s'utilitza per la mesura d'òxid nítric.

L'anàlisi de la producció d'aquests radicals en les soques *tetO₇-YFH1* i *tetO₇-YFH1 Δyhb1* amb i sense doxiciclina, va aportar els resultats que es mostren a la Figura 34. Ambdues soques tenen una producció més elevada de superòxid després de l'addició de doxiciclina al medi durant 6 hores, fet que estaria d'acord amb les dades d'altres autors i del grup en les quals es descrivia una situació d'estrès oxidatiu.

Pel que fa a l'òxid nítric, cal destacar que existeix una diferència clara entre ambdues soques, i s'observa com la deleció de *YHB1* provoca una acumulació d'òxid nítric. Per altra banda, no es va observar cap increment després d'afegir doxiciclina al medi, més aviat el contrari, ja que en les dues soques els nivells d'òxid nítric són significativament inferiors al reprimir l'expressió de frataxina.

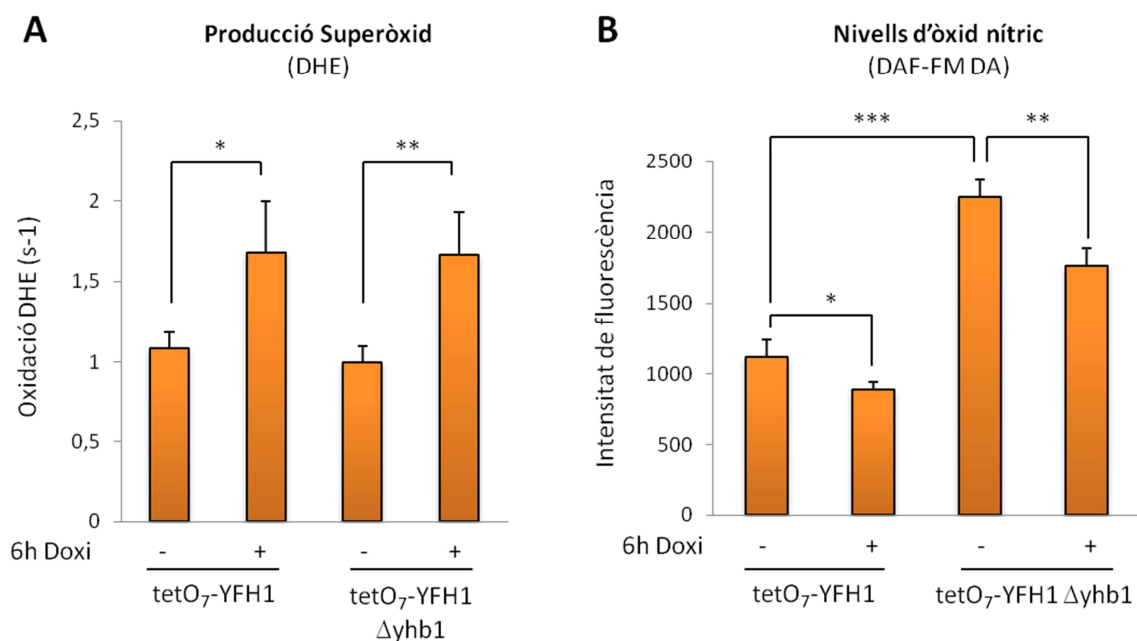


Figura 34. Anàlisi de la producció de superòxid i dels nivells d'òxid nítric. Les soques BQS201 i BQS255 crescudes en medi YPG, es varen tractar amb doxiciclina durant 6 hores i posteriorment es va analitzar la producció de superòxid amb la sonda DHE (A), o bé els nivells d'òxid nítric amb la sonda fluorescent DAF-FM DA (B). Els resultats mostren la mitjana \pm la desviació estàndard de com a mínim tres experiments independents (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Per a aprofundir en aquesta situació d'estrès nitro-oxidatiu, es va utilitzar com a marcador la nitració de tirosines. La presència de superòxid i d'òxid nítric dona lloc a la formació de peroxinitrit, un agent altament oxidant que pot reaccionar amb les cadenes laterals de les tirosines donant lloc a nitrotirosines, les quals es poden immunodetectar amb anticossos específics. Així, es varen tractar les soques *tetO₇-YFH1* i *tetO₇-YFH1 Δyhb1* durant 6 hores amb doxiciclina i es va analitzar per Western Blot la presència de nitrotirosines. Seguidament, es quantificava la senyal de quimioluminescència de les

imatges obtingudes, es normalitzava per la senyal de Comassie de la membrana, corresponent a la proteïna total, i finalment es calculava el valor relatiu de nitrotirosines tenint com a referència el valor corresponent a les mostres de la soca BQS201 sense doxiciclina .

L'anàlisi de nitrotirosines (Figura 35), va mostrar un lleuger augment no significatiu d'aquestes tant en la soca *tetO₇-YFH1* com en la soca *tetO₇-YFH1 Δyhb1* essent superior en aquesta segona. Si tenim presents els resultats obtinguts prèviament de producció de superòxid i dels nivells d'òxid nítric, hi ha una alta correlació donat que el contingut de 3-NT augmenta en relació a la presència dels diferents radicals necessaris per a la modificació de tirosines. En la soca BQS201 amb doxiciclina tenim un augment del superòxid però els nivells de NO són aparentment normals per tant l'increment en 3-NT és molt lleu. Per altra banda, si ens fixem en la soca BQS255 tractada amb doxiciclina que és la que presenta un major increment en el contingut de 3-NT, podem veure com és la situació propícia per a la formació d'aquestes modificacions ja que tenim un alt contingut de NO i una major producció de superòxid.

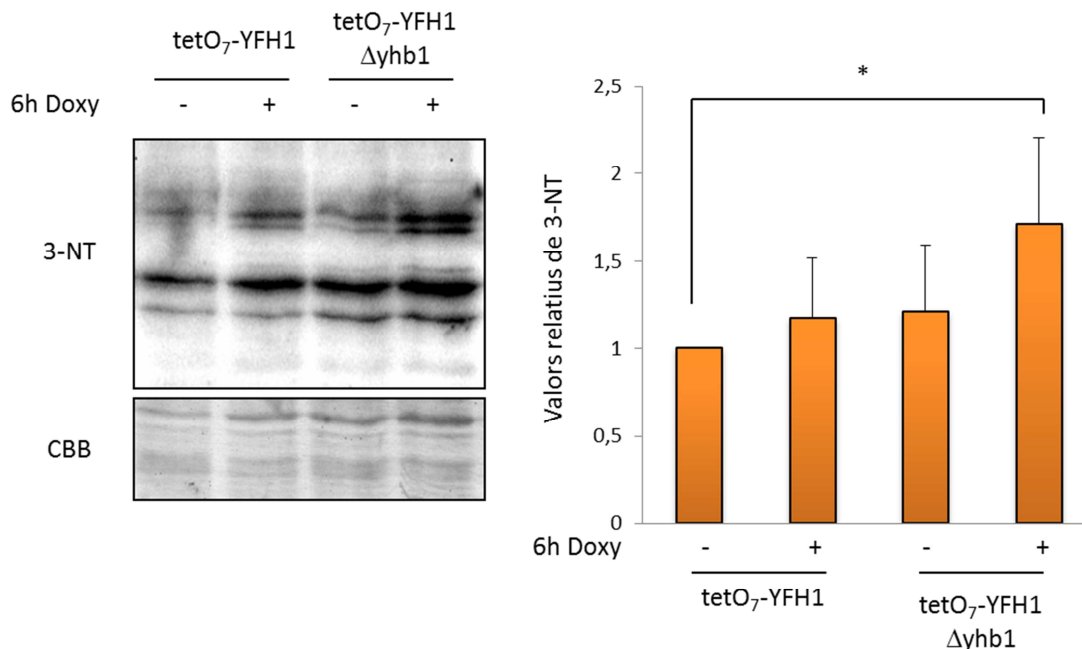


Figura 35. Anàlisi del contingut de nitrotirosines (3-NT). Les soques BQS201 i BQS255 crescudes en medi YPG es varen tractar amb doxiciclina durant 6 hores i se'n va analitzar el contingut de nitrotirosines per Western Blot. Es va quantificar la senyal i es representa com el contingut relatiu de 3-NT respecte la soca BQS201 sense tractar. Els resultats mostren la mitjana \pm la desviació estàndard de sis experiments independents. (* $p < 0,05$).

Si analitzem tots els resultats en conjunt podem afirmar que el descens observat en els nivells de NO després de l'addició de doxiciclina, podria ser conseqüència de la reacció del NO amb el superòxid, que també s'està generant, provocant la formació de peroxinitrit i, com a conseqüència, de nitrotirosines en proteïnes. Per tant, el NO en aquest cas estaria exercint en certa forma una funció antioxidant com a quelant de superòxid tot i que alhora és prooxidant ja que es genera com a producte secundari peroxinitrit. A fi de comprovar si nivells elevats de NO poden tenir efecte antioxidant més que no pas prooxidant, vàrem decidir realitzar un assaig de viabilitat. Es varen créixer les soques W303 i $\Delta yhb1$ en medi YPG i quan arribaven a una densitat òptica de $OD_{600} = 0,4-0,6$ es varen tractar amb diferents concentracions de Menadiona (10 i 20 mM) i peròxid d'hidrogen (1 i 2,5 mM) durant 45 minuts i finalment s'incubaven en una placa de YPD.

Tal com mostren els resultats (Figura 36), la soca $\Delta yhb1$ és més resistent al tractament amb els agents oxidants MD i H_2O_2 . Per tant, aquests resultats confirmarien que l'acumulació de NO en les cèl·lules deficientes per Yhb1 té un efecte protector front l'estrès oxidatiu. Tot i això, no es pot descartar que l'efecte antioxidant del NO sigui també a través d'altres mecanismes com la inducció de defenses antioxidants, ja que hi ha dades bibliogràfiques que indiquen que llargues exposicions a NO poden provocar l'acumulació de certs enzims antioxidants (Horan et al. , 2006).

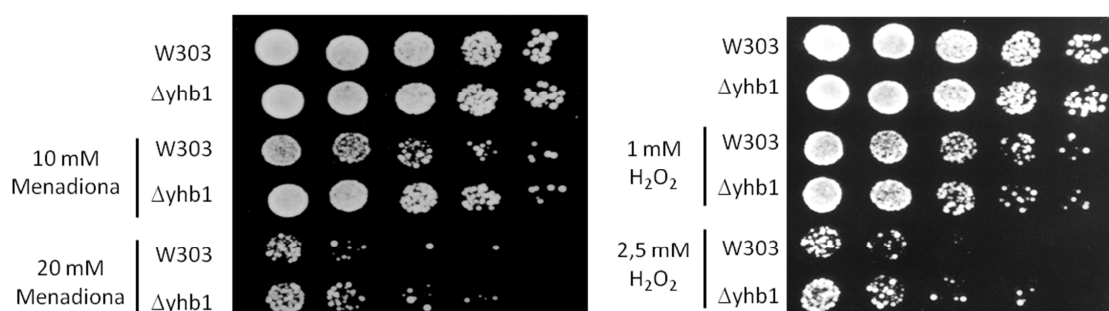


Figura 36. Viabilitat de les soques W303 i $\Delta yhb1$ front estrès oxidatiu. Es van créixer ambdues soques en medi YPD i es varen tractar amb diferents concentracions de menadiona o peròxid d'hidrogen durant 45 minuts. Seguidament, partint d'una $OD_{600} = 0,5$ es varen fer dilucions sèries i es va plaquejar en plaques YPD.

2.2. Regulació de la localització d'Aft1 en condicions d'estrès oxidatiu

A fi de confirmar que l'activació d'Aft1, en absència de frataxina, es produeix a través d'algun tipus de senyalització redox que es veu bloquejada en els mutants $\Delta yhb1$, es van construir diferents soques on Aft1 es va marcar amb la proteïna verda fluorescent (soques BQS271-BQS272) i es va analitzar la localització d'aquest factor de transcripció en diferents situacions tant d'estrès com de manca de ferro. Aquestes soques, ens varen permetre analitzar de forma ràpida i senzilla l'activació del reguló del ferro a través d'observar la localització del factor transcripcional Aft1.

Per a simular una situació d'estrès oxidatiu el més semblant possible al que passa en els mutants de frataxina, es varen tractar les cèl·lules amb menadiona, un generador de superòxid, a una concentració de 50 μM . Com a control del canvi de localització d'Aft1, també es va analitzar la localització de Aft1-GFP després de tractar les cèl·lules durant 4 hores amb 100 μM BPS. Tal com mostren els resultats, ambdues soques responen igual al tractament amb quelants de ferro, tal com s'havia demostrat anteriorment per les dades d'expressió de *FET3* (Figura 33). Per altra banda, i d'acord amb les dades obtingudes per (Castells-Roca et al., 2011), una situació d'estrès oxidatiu, provocada per l'addició de menadiona al cultiu, provoca un canvi de localització en Aft1 que incrementa la presència al nucli en les cèl·lules W303. Per contra, en les cèl·lules $\Delta yhb1$ no s'observa un canvi significatiu de localització d'Aft1 després de l'addició de menadiona als temps indicats respecte la situació inicial (cèl·lules no tractades)(Figura 37). Si comparem les dues situacions, cal apuntar que el canvi de localització és més evident en el tractament amb BPS que no pas amb la menadiona.

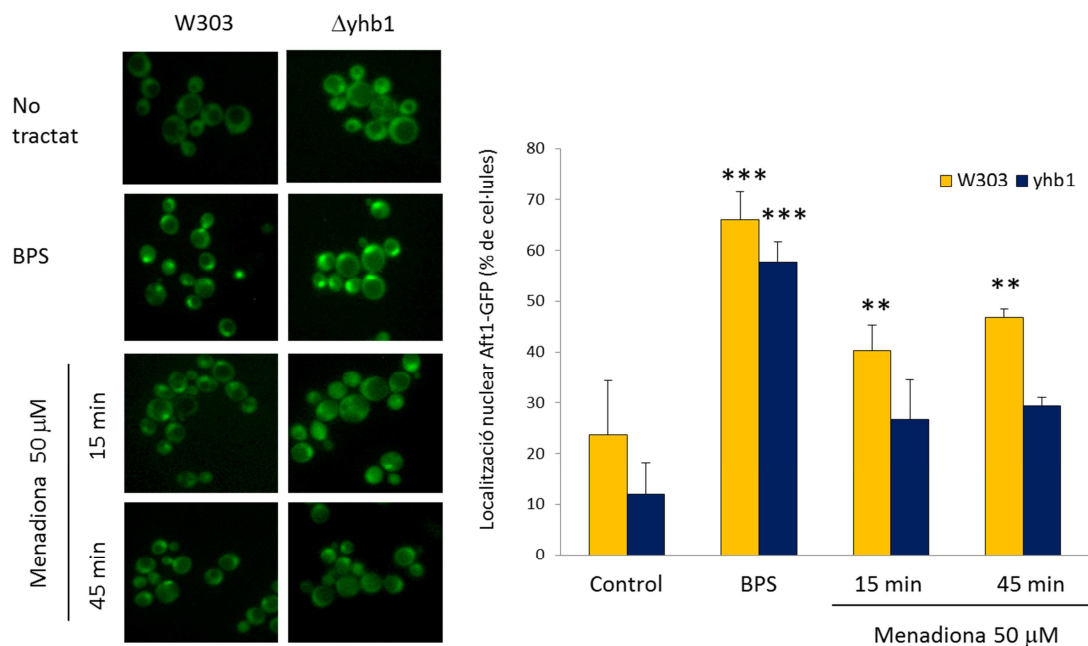


Figura 37. Anàlisi de la localització d'Aft1-GFP. Es van créixer les soques W303 i $\Delta yhb1$ on la proteïna Aft1 estava marcada amb GFP en medi YPD i es va analitzar la localització de la mateixa en condicions de deficiència de ferro (100 μM BPS 4 hores) i d'estrès oxidatiu (50 μM menadiona 15 i 45 minuts). El gràfic mostra el percentatge de cèl·lules amb senyal Aft1-GFP al nucli i representa la mitjana \pm la desviació estàndard de 3 experiments independents. En cada experiment es varen analitzar un mínim de 100 cèl·lules. S'indiquen les condicions que mostren diferències significatives respecte el control (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

De la mateixa manera que s'havia realitzat en les soques BQS201 i BQS255, es varen analitzar els nivells d'òxid nítric i la nitració de tirosines en les soques W303 i $\Delta yhb1$ sense tractar i tractades amb 50 μM menadiona durant 1 hora amb la finalitat d'analitzar possibles paral·lelismes entre una situació d'estrès en forma de menadiona i la generada per la deficiència de frataxina. Tal com es mostra a la Figura 38 el tractament amb menadiona provoca un descens en els nivells d'òxid nítric en ambdues soques. Aquest descens es pot atribuir a la formació de peroxinitrit, ja que la immunodetecció de 3-nitrotirosines, producte de la reacció del peroxinitrit amb les cadenes laterals de les tirosines, també mostra un increment en presència de menadiona. Si hom compara tant els resultats de les mesures d'òxid nítric com els de les nitrotirosines, amb els mateixos resultats obtinguts per les soques BQS201 i BQS255, s'observen grans similituds que ens permetrien afirmar que existeix un mecanisme comú.

Conjuntament, aquestes dades confirmen que Aft1 pot tenir dos tipus de regulació, la que és conseqüència de una situació de deficiència de ferro i una regulació mitjançada per una senyalització tipus redox. Aquesta senyalització és la que té lloc en absència de Yfh1, i la deleció de Yhb1 és capaç de bloquejar-la gràcies a l'acumulació d'òxid nítric que en aquesta situació pot funcionar com a quelant de superòxid.

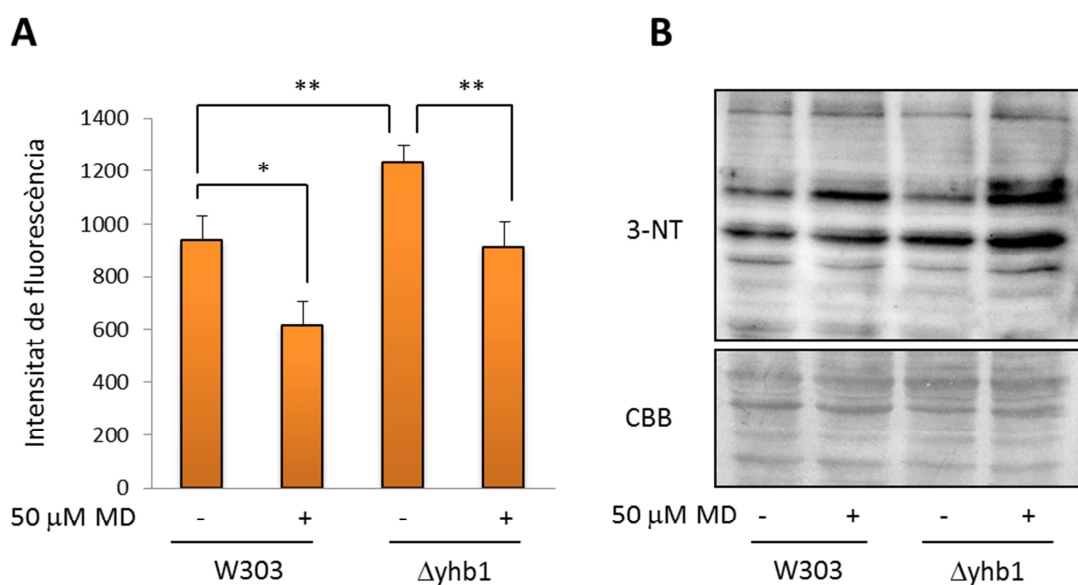


Figura 38. Anàlisi dels nivells d'òxid nítric i contingut de nitrotirosines en presència de menadiona. Cèl·lules de les soques W303 i Δ yhb1 crescudes en YPG es varen tractar amb menadiona 50 μ M durant 1 hora, posteriorment es varen analitzar els nivells d'òxid nítric amb la sonda fluorescent DAF-FM DA (A), i també el contingut de nitrotirosines per Western Blot (B). Els resultats mostren la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

CAPÍTOL 3: Anàlisi per proteòmica dirigida (MRM) de diferents dianes afectades en els mutants de frataxina

1. Selecció de dianes, rang dinàmic

La manca de frataxina provoca una sèrie de fenotips característics. Concretament, en els mutants *tetO₇-YFH1* podem destacar l'activació del reguló del ferro, un augment dels enzims antioxidants, la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S i, tal i com s'ha destacat en el primer capítol, una remodelació del metabolisme respiratori (Moreno-Cermeño et al., 2010; Moreno-Cermeño et al., 2013). Al llarg d'aquest treball es va posar a punt un mètode de proteòmica dirigida per a poder detectar i quantificar tot una sèrie de proteïnes característiques dels fenotips citats anteriorment. Aquesta metodologia, està basada en la digestió amb tripsina d'una mostra, la separació cromatogràfica dels pèptids obtinguts i la posterior detecció i quantificació d'aquests en un espectròmetre de masses de tipus triple quadrupol (Apartat 2.6 de Materials i Mètodes).

Per a aquest experiment, es varen seleccionar un total de 50 proteïnes d'interès, i per a cadascuna d'aquestes es varen obtenir pèptids proteotípics i les respectives transicions de la web SRMAtlas. Aquestes proteïnes es varen escollir amb la finalitat de que representessin diferents processos cel·lulars d'interès: resposta a estrès oxidatiu, cadena de transport electrònic, metabolisme energètic, metabolisme del ferro, biosíntesis de centres Fe-S i diverses proteïnes control.

Després de diversos cribratges, de les 50 proteïnes inicials es va elaborar una llista final de 32 proteïnes i un total de 54 pèptids que eren els que oferien una detecció més òptima i reproducible (Taula 24). Aquesta selecció final, mantenia proteïnes representatives dels diferents processos cel·lulars citats anteriorment. Tal com es mostra a la Taula 24, per a algunes de les proteïnes seleccionades només es va utilitzar un pèptid, un fet que comporta tenir un marge d'error superior en la quantificació. Entre les proteïnes que es van eliminar de la selecció final de 32 proteïnes, destaquen sobretot aquelles de difícil detecció com proteïnes de membrana, per exemple Fet3, Arn4 o Mrs4; i proteïnes poc abundants com les que formen part de la maquinària de biosíntesi de centres Fe-S com Isu1, Nfs1 o Isa1-2.

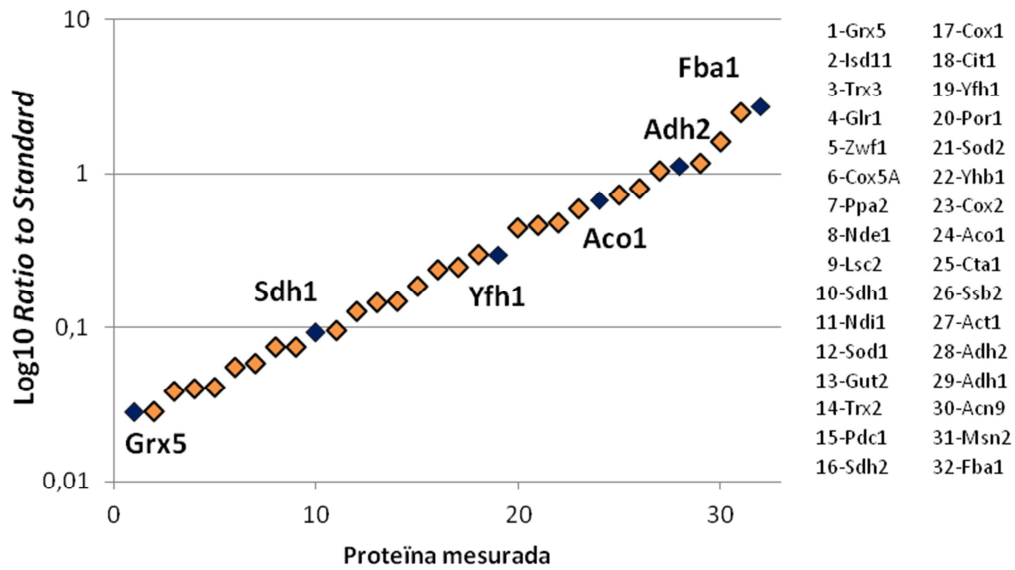


Figura 39. Rang dinàmic. Les proteïnes detectades es varen ordenar segons la seva abundància atenent al valor de la relació entre els pèptids de la mostra i els estàndards interns (*Ratio to Standard*). Cada punt representa una proteïna de la llista. Els punts blaus indiquen diferents proteïnes representatives al llarg del rang dinàmic.

En primer lloc es va realitzar una detecció i quantificació de les proteïnes seleccionades en mostres provinents de la soca BQS201 sense doxiciclina. Després de la digestió, es va afegir una quantitat d'aproximadament 0,093 nmol/mg proteïna d'una versió sintètica pesada de cada pèptid d'interès. Aquesta versió pesada es va utilitzar com a estàndard intern. Amb els resultats obtinguts es va calcular el rang dinàmic atenent a la relació entre la quantificació dels pèptids de la mostra i la quantificació dels estàndards interns (*Ratio to Standard*). Els resultats obtinguts mostraven un rang dinàmic de dos ordres de magnitud (Figura 39), essent la proteïna menys abundant Grx5 i la més abundant Fba1 segons les dades obtingudes. Entre els dos extrems podem veure com frataxina s'ubica en una zona central probablement com a conseqüència de la sobreexpressió provocada pel promotor tetO₇. Un resultat estrany va ser els alts nivells obtinguts per la proteïna Msn2, un factor transcripcional de resposta a estrès que segons estudis previs recollits a la base de dades PaxDB és una proteïna molt poc abundant. Tot i això, donat que els nostres estudis es varen realitzar amb extractes de cèl·lules crescudes en medi respiratori YPG, no es varen poder establir grans paral·lelismes amb altres estudis proteòmics que servissin per a donar més validesa a les nostres quantificacions, ja que tots els estudis disponibles a

la base de dades PaxDB, citada anteriorment, estan fets amb medis fermentatius, ja siguin YPD o SC.

Taula 24. Proteïnes analitzades en l'estudi de proteòmica dirigida Es mostren els pèptids analitzats per cada proteïna i la relació massa/càrrega (m/z) utilitzada en cada cas per aïllar-lo en l'espectròmetre de masses. Els pèptids "light" corresponen al pèptid generat per digestió triptica de les proteïnes indicades. Els pèptids "heavy" corresponen als estàndards interns (marcats isotòpicament).

Proteïna	Pèptid	l _ó precursor (m/z)
Yfh1	LTDILTEEEVK.light	645,345383
	LTDILTEEEVK.heavy	649,352482
	QIWLASPLSGPNR.light	719,8937
	QIWLASPLSGPNR.heavy	724,897834
Sod1	LIGPVSVVGR.light	499,803291
	LIGPVSVVGR.heavy	504,807425
Grx5	ATIGLLGNQGVDPK.light	727,404098
	ATIGLLGNQGVDPK.heavy	731,411197
	FAAYNVLEDPELR.light	768,88828
	FAAYNVLEDPELR.heavy	773,892415
Trx3	IIGANPTALEK.light	563,826963
	IIGANPTALEK.heavy	567,834063
	LTNLTEFR.light	497,271824
	LTNLTEFR.heavy	502,275958
Cta1	LGPVFHQIPVNC[+57.0]PYASK.light	647,992844
	LGPVFHQIPVNC[+57.0]PYASK.heavy	650,664243
Sod2	AIDEQFGSLDELIK.light	789,406503
	AIDEQFGSLDELIK.heavy	793,413602
	AIWNVVNWK.light	565,311283
	AIWNVVNWK.heavy	569,318383
Yhb1	VGAQPNALATTVLAAAK.light	798,459404
	VGAQPNALATTVLAAAK.heavy	802,466504
	ATVPVLEQQGTVITR.light	806,456861
	ATVPVLEQQGTVITR.heavy	811,460996
Zwf1	FGNQFLNASWNR.light	727,352199
	FGNQFLNASWNR.heavy	732,356334
	TFPALFGLFR.light	584,829309
	TFPALFGLFR.heavy	589,833443
Trx2	AEVSSMPTLIFYK.light	743,386528
	AEVSSMPTLIFYK.heavy	747,393627
	SASEYDSALASGDK.light	700,812435

Resultats

	SASEYDSALASGDK.heavy	704,819535
Glr1	VELTPVAIAAGR.light	598,853512
	VELTPVAIAAGR.heavy	603,857647
Msn2	NSISHSLDLWNHPK.light	549,946111
	NSISHSLDLWNHPK.heavy	552,61751
Sdh2	DLVPDLTNFYQQYK.light	872,433052
	DLVPDLTNFYQQYK.heavy	876,440151
	DGTEVLQSIEDR.light	681,330795
	DGTEVLQSIEDR.heavy	686,33493
Sdh1	GEGGFLVNSEGER.light	675,817855
	GEGGFLVNSEGER.heavy	680,821989
	DVAAPVTLK.light	457,271292
	DVAAPVTLK.heavy	461,278392
Cox2	LNQVSALIQR.light	571,338029
	LNQVSALIQR.heavy	576,342164
	LLDTDTSMVVPVDTHIR.light	637,999664
	LLDTDTSMVVPVDTHIR.heavy	641,335753
Cox1	APDFVESNTIFNLNTVK.light	636,994907
	APDFVESNTIFNLNTVK.heavy	639,666307
	WLYSTNAK.light	491,753267
	WLYSTNAK.heavy	495,760366
Cox5A	LPWAQLTEPEK.light	656,350802
	LPWAQLTEPEK.heavy	660,357902
Nde1	GALAYIGSDK.light	497,763831
	GALAYIGSDK.heavy	501,770931
Ndi1	YNDLGALAYLGSER.light	771,383362
	YNDLGALAYLGSER.heavy	776,387497
Gut2	MSNYLVQNYGTR.light	723,345725
	MSNYLVQNYGTR.heavy	728,34986
	TPLDFLLR.light	487,78711
	TPLDFLLR.heavy	492,791244
Pdc1	TPANAAPVASTPLK.light	669,374809
	TPANAAPVASTPLK.heavy	673,381908
Lsc2	DLSQEDPDEVK.light	637,790972
	DLSQEDPDEVK.heavy	641,798071
Aco1	TIFTVTPGSEQIR.light	724,890823
	TIFTVTPGSEQIR.heavy	729,894957
	QNVETLDIVR.light	593,824952
	QNVETLDIVR.heavy	598,829086
Cit1	AIGVLPQLIIDR.light	654,405912
	AIGVLPQLIIDR.heavy	659,410046
Adh2	ANGTVVLVGLPAGAK.light	683,906276
	ANGTVVLVGLPAGAK.heavy	687,913376

	VVGLSSLPEIYEK.light	717,39795
	VVGLSSLPEIYEK.heavy	721,405049
Adh1	ANELLINVK.light	507,303124
	ANELLINVK.heavy	511,310223
	VVGLSTLPEIYEK.light	724,405775
	VVGLSTLPEIYEK.heavy	728,412874
Isd11	LVVEPLQGR.light	505,803291
	LVVEPLQGR.heavy	510,807425
	VLMNLFK.light	432,754224
	VLMNLFK.heavy	436,761323

2. Estudi de proteòmica dirigida en les soques BQS201 i BQS255

Un cop definides les proteïnes i pèptids a analitzar, es va dur a terme un estudi per a comparar les soques *tetO₇-YFH1* i *tetO₇-YFH1 Δyhb1* sense tractar i tractades durant 24 hores amb doxiciclina. Es va escollir aquest temps de repressió de frataxina ja que és un punt on ja s'observen la gran majoria de fenotips descrits prèviament: situació d'estrès, pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S i remodelació metabòlica entre altres. Així doncs, amb aquest anàlisi es pretenia estudiar amb més profunditat l'impacte de la deleció de *YHB1* en absència de frataxina més enllà de l'efecte que s'ha descrit prèviament en l'activació del reguló del ferro.

Les proteïnes analitzades es varen dividir en quatre grups: resposta a estrès oxidatiu, cadena de transport electrònic, metabolisme energètic i biosíntesis de centres ferro-sofre. Per a la representació dels resultats, es varen utilitzar els resultats de la soca *tetO₇-YFH1* sense doxiciclina com a control. Per tant, la resta de mostres es varen calcular com els nivells relatius de proteïna respecte a la soca BQS201. D'aquesta manera, es va aconseguir una quantificació que ens servia per a comparar ambdues soques entre elles a més de veure que passava amb les mostres sense frataxina. Les proteïnes Act1 i Por1 (actina i porina) es van utilitzar com a controls (*House-keeping*).

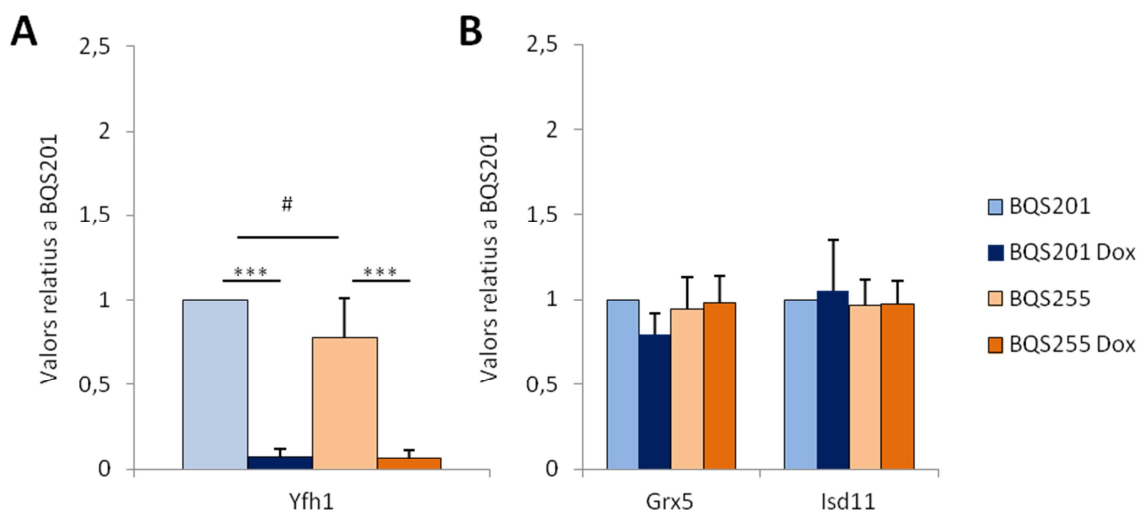


Figura 40. Grup Frataxina i proteïnes de biosíntesis de centres Fe-S. Es mostra la quantitat relativa de cada proteïna respecte la soca BQS201 sense doxiciclina com la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents. (* tractat vs no tractat, # BQS201 vs BQS255)(*** $p < 0,001$, # $p < 0,05$).

En primer lloc, es va analitzar la repressió de frataxina en ambdues soques com a control de l'experiment. Tal com s'observa a la Figura 40, en els dos casos s'obté una molt bona repressió després del tractament de 24 hores amb doxiciclina, i els nivells de frataxina són aproximadament un 10% dels nivells inicials. Seguidament es varen analitzar dues proteïnes que participen en la biosíntesis de centres Fe-S: la proteïna Isd11, que actua com a accessòria de la desulfurasa Nfs1 i la glutaredoxina 5, que participa en la transferència dels centres Fe-S a les proteïnes receptores. En cap de les condicions analitzades es varen observar alteracions en els nivells d'aquestes dues proteïnes, el que apuntaria a que la absència de frataxina no provoca canvis severes a la maquinària de biosíntesis de clústers Fe-S a nivell de proteïna, tot i que convindria analitzar-ne amb més profunditat altres membres com les proteïnes Isu1 i Nfs1 les quals no es varen poder detectar en aquest anàlisi per a establir-ne conclusions més fermes.

El segon bloc de proteïnes analitzat, on s'inclouen les proteïnes de resposta a estrès oxidatiu, és el que va deixar més dubtes en comparació amb resultats obtinguts anteriorment.

En primer lloc, no es va observar un increment en Yhb1 tal com s'ha descrit en el capítol anterior, tot i que, cal recordar que aquest estudi proteòmic s'ha realitzat 24 hores després de reprimir frataxina mentre que els resultats obtinguts anteriorment fan referència a temps de repressió de 6 hores.

Seguint amb l'anàlisi dins aquest bloc de proteïnes de resposta a estrès, veiem com les superòxid dismutases 1 i 2 (Sod1 – Sod2) no mostren cap increment tot i que resultats anteriors del grup ho havien demostrat per Western Blot (Irazusta et al., 2006; Moreno-Cermeño et al., 2010). Per a Sod2 no és va observar cap canvi, més aviat una tendència a la baixa en el cas de la soca BQS201. Per contra Sod1 mostra una lleugera tendència a l'alça, tot i que no significativa, en ambdues soques si es compara amb els controls no tractats. En el cas de Sod1, els resultats deixen més dubtes ja que únicament es va utilitzar un pèptid per a la quantificació i per tant convindria analitzar-ne un altre a fi de refermar les dades obtingudes.

Pel que fa a la resta de proteïnes incloses en aquest bloc, es va observar un clar increment en la catalasa Cta1 en la soca *tetO₇-YFH1* després de l'addició de doxiciclina, un efecte que es reverteix en la soca on hi manca la flavohemoglobina Yhb1. Aquesta reversió del fenotip podria suggerir un menor grau d'estrès en aquesta soca (BQS255). Prèviament, ja s'havia identificat un increment en els nivells de catalasa (Cta1) en mutants $\Delta yfh1$ (Irazusta et al., 2008). També es varen observar canvis significatius en el factor transcripcional Msn2, concretament un descens en el cas de la soca BQS201 revertit a l'alça en la soca BQS255. Aquest va ser un resultat inesperat, ja que Msn2 és un factor transcripcional de resposta a estrès, i, tot i que potser no esperàvem un gran increment ja que la seva activitat es regula a través de la localització d'aquest factor, un descens en els seus nivells de proteïna varen ser sorprenents (Görner et al., 2002). A fi de completar aquest resultat, convindria analitzar també els nivells de Msn4, un altre factor que té funcions redundants amb Msn2 en la resposta a estrès (revisat a Estruch, 2000). També es varen trobar canvis significatius en la xaperona Ssb2 en la soca BQS255 després de reprimir l'expressió de frataxina, concretament es va detectar un lleuger increment. Finalment, no es varen trobar canvis en els nivells de proteïna de les tioredoxines Trx2 i

Trx3, en la glutatió reductasa, Glr1 ni tampoc en l'enzim de la via de les pentoses fosfat Zwf1.

Amb aquests resultats, es podria concloure que tot i que s'ha demostrat prèviament que hi ha una situació d'estrès, aquesta no comporta un gran increment de les defenses antioxidants, ja que únicament veiem un gran increment en la catalasa Cta1. Tot i que aquests resultats mostren algunes incongruències amb resultats previs del grup on s'havia demostrat, per exemple, un clar increment dels enzims Sod1 i Sod2 convindria realitzar una posterior validació dels resultats obtinguts.

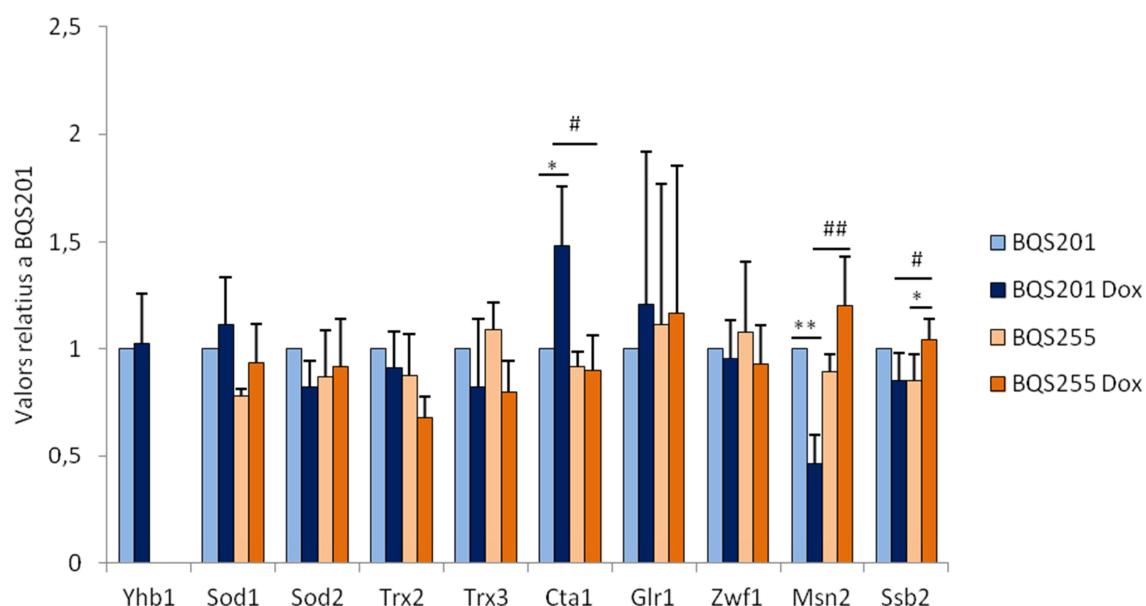


Figura 41 Grup resposta a estrès oxidatiu. Es mostra la quantitat relativa de cada proteïna respecte la soca BQS201 sense doxiciclina com la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents (* tractat vs no tractat, # BQS201 vs BQS255)(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$).

El tercer bloc de proteïnes agrupava diferents components de la cadena de transport electrònic. Concretament es varen analitzar, les deshidrogenases Nde1 i Ndi1 que duen a terme la funció del complex I en llevat juntament amb Nde2; les proteïnes del complex II Sdh1 i Sdh2; i diferents components de la citocrom c oxidasa (complex IV), concretament les proteïnes Cox1, Cox2 i Cox5A.

Per a aquestes proteïnes es van obtenir resultats altament interessants, sobretot per les Sdh1 i Sdh2. Cal recordar que aquestes proteïnes són dianes de la proteïna Cth2, activada per Aft1 el qual s'activa en absència de frataxina. Els resultats mostren un clar descens 24 hores després de reprimir l'expressió de *YFH1* en la soca BQS201, tal com s'havia descrit prèviament (Moreno-Cermeño et al., 2010) i com s'ha mostrat en el primer capítol d'aquesta tesi. Per contra, en la soca BQS255 no tan sols no s'observa aquest descens, sinó que hi ha un increment significatiu d'ambdues proteïnes comparat amb la situació control (sense doxiciclina). Aquests resultats per tant, confirmen els obtinguts en el capítol anterior on s'apuntava que la deleció de *YHB1* en cèl·lules deficientes per frataxina evita la activació del reguló del ferro Aft1 i com a conseqüència la posterior activació de Cth2 que és la proteïna responsable de degradar els mRNAs de Sdh1 i Sdh2.

Per altra banda també es va detectar un descens, tot i que no significatiu, de la NADH deshidrogenasa interna (Ndi1). A més, s'observa com la deleció de *YHB1* bloqueja aquest efecte i els nivells d'aquest enzim es mantenen similars als inicials. Per a la resta de proteïnes analitzades no es van trobar diferències significatives entre les 4 condicions analitzades.

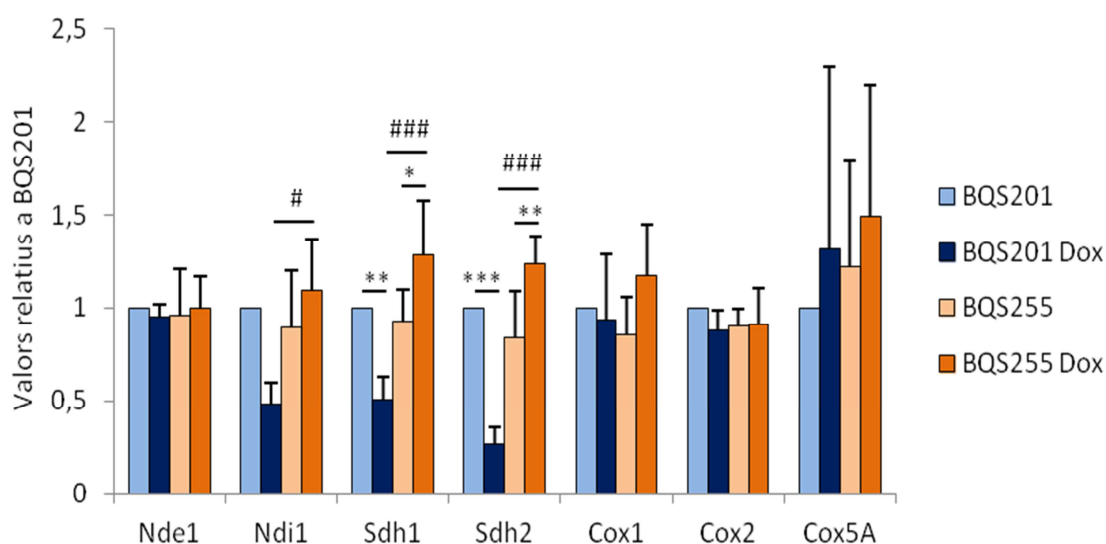


Figura 42. Grup cadena de transport electrònic. Es mostra la quantitat relativa de cada proteïna respecte la soca BQS201 sense doxiciclina com la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents (* tractat vs no tractat, # BQS201 vs BQS255) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$)

Finalment, a l'últim grup de proteïnes es varen incloure aquelles que participen en l'obtenció d'energia a banda de la cadena de transport electrònic analitzada al grup anterior. En aquest grup es varen incloure proteïnes que participen en el metabolisme respiratori així com les proteïnes Pdc1 i Adh1 que participen en la fermentació.

De la mateixa manera que es va observar per les succinat deshidrogenases, tornem a veure i confirmar l'efecte de Cth2 sobre Aconitasa (Aco1): en primer lloc observem un fort descens 24 hores després de reprimir l'expressió de *YFH1* i en segon lloc, s'observa com la deleció de *YHB1* en absència de frataxina prevé aquest descens.

Si analitzem la resta de proteïnes conjuntament, observem l'efecte de remodelació metabòlica que s'ha descrit al primer capítol. Les dades proteòmiques segueixen indicant un descens de les proteïnes regulades per Adr1 com són Adh2 i Gut2. Una altra dada que confirma la remodelació metabòlica que pateixen els mutants de frataxina, és l'increment dels enzims Pdc1 i Adh1, enzims capitals en el procés de fermentació. Tot i que aquest increment no és estadísticament significatiu, sí que mostra una clara tendència d'aquestes cèl·lules a reduir el seu metabolisme respiratori i a incrementar la fermentació. De nou, els resultats obtinguts en els mutants de *YHB1*, mostren una reversió dels fenotips observats en la soca BQS201. A priori, l'explicació més senzilla seria la major capacitat antioxidant de les cèl·lules deficientes en Yhb1 (descrita prèviament) que evitaria, entre altres coses, la inactivació del factor transcripcional Adr1 el qual s'ha demostrat que s'inactiva en una situació d'estrès oxidatiu.

Pel que fa referència a la resta de proteïnes analitzades, no es varen trobar diferències significatives entre les 4 condicions.

Així doncs, els resultats presentats en aquest capítol mostren la utilitat de la proteòmica dirigida per a analitzar i quantificar un gran nombre de proteïnes al mateix temps dins una mateixa mostra. A més, els resultats obtinguts mostren com en el doble mutant *tetO₇-YFH1 Δyhb1* es reverteixen la majoria de fenotips observats en el mutant condicional el que mostra la importància d'aquesta proteïna en els fenotips derivats del dèficit de frataxina, un fet que s'analitzarà a la discussió.

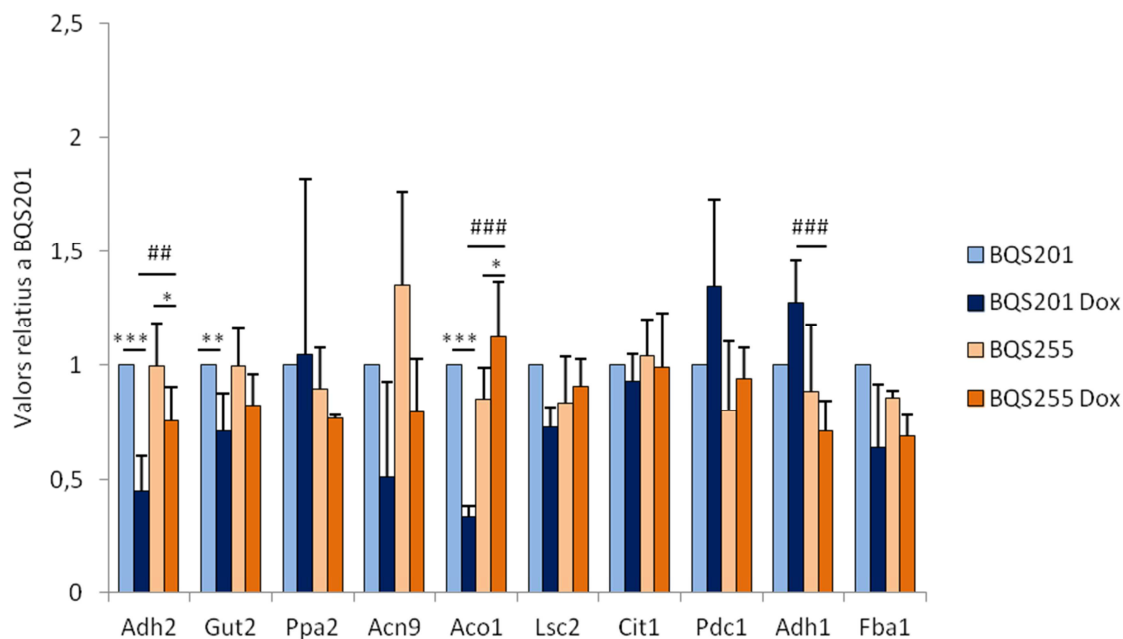


Figura 43. Grup metabolisme energètic. Es mostra la quantitat relativa de cada proteïna respecte la soca BQS201 sense doxiciclina com la mitjana \pm la desviació estàndard de tres experiments independents (* tractat vs no tractat, # BQS201 vs BQS255) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$)

Discussió

Els resultats presentats en aquesta tesi, mostren l'adaptació metabòlica dels llevats a la deficiència de la proteïna mitocondrial Yfh1. En primer lloc s'ha identificat una remodelació en el metabolisme energètic on participen les proteïnes ADR1 i CTH2. Per altra banda s'ha analitzat el paper de la flavohemoglobina, Yhb1, en els mutants de frataxina, el que ha permès identificar una nova via d'activació d'Aft1 dependent d'estrès. Els resultats obtinguts posen en dubte el paper essencial de frataxina en la biosíntesi de centres Fe-S i suggereixen que l'estrès oxidatiu juga un paper principal en els diferents fenotips observats. Aquests punts es discuteixen a continuació.

1. Adaptació metabòlica en absència de Yfh1: el paper d'ADR1 i CTH2

L'Atàxia de Friedreich és una malaltia amb una fisiopatologia complexa que afecta a diferents teixits, especialment el sistema nerviós. Els principals teixits afectats en aquesta patologia són aquells que tenen una major demanda i consum energètics com el propi sistema nerviós, el cor o el pàncrees. De l'afectació sobre aquests teixits en deriven els principals símptomes de la malaltia com la miopatia, la diabetis i les afectacions neurològiques (revisat a Abrahão et al., 2015). Sembla clara doncs la implicació de frataxina en el metabolisme energètic i en la generació d'energia al mitocondri. Anteriorment, ja s'havia apuntat a que les cèl·lules deficientes en frataxina patien una remodelació metabòlica que en el cas d'un model de *Drosophila melanogaster* i de cultius primaris de miòcits cardíacs afectava al metabolisme dels lípids (Navarro et al., 2010; Obis et al., 2014).

En el present treball s'ha mostrat com les cèl·lules de llevat reorganitzen el seu metabolisme en absència de Yfh1 cap a un metabolisme menys oxidatiu, i en aquesta remodelació hi participen principalment dues proteïnes, el factor transcripcional ADR1 i la proteïna d'unió a mRNA CTH2. Si bé el paper de CTH2 pot semblar lògic ja que és un gen regulat per Aft1 i l'activació d'aquest factor de transcripció és un dels fenotips clàssics de la deficiència de Yfh1 en llevat (Chen & Kaplan, 2001; Moreno-Cermeño et al., 2010), per a ADR1 es va identificar un nou mecanisme de regulació que no s'havia observat prèviament.

1.1. La inactivació d'Adr1: un mecanisme de resposta front l'estrès oxidatiu?

Els resultats obtinguts en aquest treball mostrats a les Figures 21 i 23, indiquen que Adr1 s'exporta del nucli al citosol en absència de frataxina així com en situacions d'estrès oxidatiu en forma de peròxid d'hidrogen. Donat que l'estrès oxidatiu és també un dels fenotips clàssics de la manca de frataxina en llevat (Bulteau et al., 2012; Irazusta et al., 2010; Marobbio et al., 2012), la resposta que mostra Adr1 en ambdues situacions a priori es donaria a través del mateix mecanisme. A més, la deleció d'una altra proteïna mitocondrial com és Grx5 la qual també provoca estrès oxidatiu i acumulació de ferro (Rodríguez-Manzanaque et al., 2002) genera el mateix fenotip de sortida d'Adr1 del nucli (Figura 22). Aquest fenotip és d'especial rellevància ja que el medi utilitzat per al creixement dels llevats és un medi respiratori (YPG) on l'activitat d'Adr1 és fonamental ja que molts dels gens que regula participen en el metabolisme de fonts de carboni alternatives com el propi glicerol. Aquest mecanisme de regulació a través de la localització sense alteració dels nivells de proteïna, permetria regular transitòriament l'activitat d'Adr1. Així doncs, en una situació d'estrès oxidatiu es redueix l'activitat d'Adr1, i, com a conseqüència, es redueixen les activitats de les vies metabòliques oxidatives regulades per aquest factor transcripcional afavorint així una menor producció de ROS. Aquest mecanisme permetria que un cop rebaixada la situació d'estrès, Adr1 tornés a ser actiu ràpidament, sense necessitat de sintetitzar proteïna Adr1 de nou. A més, els resultats obtinguts en els experiments de proteòmica dirigida que es mostren a la Figura 43 indiquen que els llevats deficientes en Yfh1 intentarien virar cap a un metabolisme més fermentatiu com mostren els augments, tot i que no significatius, de les proteïnes Adh1 i Pdc1 les quals són altament importants en la fermentació alcohòlica ja que catalitzen les dues reaccions que hi ha entre el piruvat i l'etanol. Aquests resultats mostrarien que aquestes cèl·lules estan remodelant el seu metabolisme, des d'un metabolisme respiratori cap a un metabolisme més fermentatiu. La principal pregunta que roman és, quin és el mecanisme que regula aquesta resposta a l'estrès oxidatiu? Entre les múltiples possibilitats potser dues són les que tenen més sentit.

En primer lloc, donat que una situació d'estrès, per peròxid d'hidrogen, es produeix la mateixa resposta que per la manca de frataxina, es podria especular amb una possible

modificació oxidativa en ADR1 com un pont disulfur per exemple. Tot i que aquesta possibilitat podria tenir bastant sentit, existeixen dades a la bibliografia que suggeririen un altre mecanisme. Si ens fixem en els factors de resposta a estrès com Yap1 o el seu ortòleg de *Schizosaccharomyces pombe* Pap1, aquests responen a concentracions baixes de peròxid (200-400 μ M) i en un temps d'entre 5 i 12 minuts (Delaunay et al., 2000; Vivancos et al., 2006). Per contra, en el cas de ADR1, tal com es mostra a la Figura 23, aquesta resposta és més lenta (30 minuts) i a majors concentracions de peròxid d'hidrogen (1 mM). Tot i això, cal tenir present que les condicions experimentals entre els articles citats i les que s'han utilitzat en aquest treball són diferents, ja que en el nostre cas els experiments s'han realitzat en medi respiratori YPG en el qual els llevats són més resistents a situacions d'estrès oxidatiu en comparació amb el medi fermentatiu YPD (Cabiscol et al., 2000). Aquesta diferència entre els medis utilitzats podria fer variar el temps de resposta a agents oxidants així com les concentracions necessàries per a observar una resposta similar.

Un altre mecanisme de regulació possible que uneix la resposta a estrès amb la regulació transcripcional és a través d'una fosforilació. Per ADR1 s'han descrit múltiples fosforilacions, tant en el domini d'unió al DNA (S98) com en una zona reguladora de la seva estructura (S230) (Kacherovsky et al., 2008; Ratnakumar et al., 2009). En relació amb l'estrès oxidatiu, en resposta a altes concentracions de peròxid (1 mM o més) s'activen tota una sèrie de vies de senyalització MAPK com és la via PKC en *S. cerevisiae* que acaba amb la fosforilació de la quinasa Slt2 o bé la via de Sty1 en *S. pombe* (de la Torre-Ruiz et al., 2010; Vivancos et al., 2006). Tot i que no s'han descrit interaccions entre aquestes vies i la regulació d'ADR1 aquesta possibilitat no es pot excloure ja que tampoc es coneixen amb precisió les quinases que actuen sobre ADR1 i s'ha suggerit que diferents quinases podrien fosforil·lar diferents residus regulant l'activitat d'ADR1 a través de diferents mecanismes (Kacherovsky et al., 2008; Ratnakumar et al., 2009).

1.2. Cth2, la baula perduda: Frataxina no és essencial en la biosíntesi de centres Fe-S

A banda d'Adr1, la proteïna Cth2 també juga un paper important en el canvi metabòlic observat en deficiència de Yfh1. L'expressió de *CTH2* està regulada pel factor transcripcional Aft1, i per tant l'expressió d'aquest gen augmenta en situacions de deficiència de ferro (Puig et al., 2005). Un dels fenotips més paradigmàtics en els models d'estudi de dèficit de frataxina, és la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S. Aquest fenotip juntament amb la identificació de la interacció de Yfh1 amb les proteïnes que formen l'estructura central de la biosíntesi de centres Fe-S van portar a la conclusió que frataxina era una proteïna essencial en aquest procés (Gerber et al., 2003). No obstant, els resultats obtinguts pel nostre grup així com resultats d'altres grups han posat en dubte aquesta hipòtesi al detectar que la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S, com aconitasa, només s'observava en determinades circumstàncies com estrès per ferro o hiperòxia i per tant no es podia considerar com un fenotip principal (Irazusta et al., 2006; Navarro et al., 2015; Obis et al., 2014). El model condicional de llevat *tetO₇-YFH1*, utilitzat en aquesta tesi, va permetre classificar la pèrdua d'aquestes proteïnes com un fenotip secundari (Moreno-Cermeño et al., 2010). La pèrdua d'activitat d'aquests enzims anava acompanyada d'una pèrdua en els nivells de proteïna, el que feia sospitar en un mecanisme de regulació post-transcripcional ja que aquesta pèrdua d'activitat i de proteïna no podria explicar-se únicament per la pèrdua del centre Fe-S. Donat que un dels fenotips primaris després de la repressió de Yfh1 és l'activació del reguló del ferro, es va investigar el paper de la proteïna Cth2.

Tal com mostren els resultats (Figura 25) l'activitat de Cth2 és crucial en la pèrdua de proteïnes que contenen centres Fe-S en absència de Yfh1. La deleció de *CTH2* no només protegeix les seves dianes de ser degradades sinó que aquest efecte reverteix l'aturada en el creixement observada prèviament en aquest model de llevat (Figura 27). Aquests resultats per tant són la confirmació que frataxina no és essencial en la biosíntesi de centres Fe-S ja que 48 hores després de reprimir l'expressió de *YFH1*, l'activitat de

proteïnes amb centres Fe-S com aconitasa es manté. Aquest resultat es veu reforçat amb els resultats obtinguts en la soca *tet-GRX5*, una proteïna essencial en el procés de biosíntesi d'aquests cofactors, on la pèrdua d'activitat aconitasa no es recupera quan delecionem el gen *CTH2*.

De forma similar a aquests resultats, estudis realitzats amb *Schizosaccharomyces pombe* van identificar que la proteïna Php4 realitzava una funció equivalent a Cth2 en mutants deficients en l'homòleg de frataxina (*pfh1*). Php4 reprimeix l'expressió de gens que promouen l'emmagatzematge de ferro i de gens de proteïnes que contenen centres Fe-S en situacions de dèficit de ferro. Per tant, duu a terme una funció semblant a Cth2 tot i que segueix un mecanisme d'acció diferent. Cal mencionar que malgrat en aquest treball no es va analitzar si en el doble mutant $\Delta pfh1 \Delta php4$ es recuperaven les activitats de proteïnes amb centres Fe-S com aconitasa, sí que es va mostrar una millora en el creixement d'aquestes soques respecte als mutants simples $\Delta pfh1$ (Gabrielli et al., 2012). Per tant, aquests resultats estan en concordança amb els que hem obtingut en *S. cerevisiae*, en el sentit que existeixen mecanismes per a regular a la baixa les proteïnes amb centres Fe-S en absència de frataxina, i per tant, la pèrdua d'activitat en aquestes proteïnes és conseqüència d'aquesta regulació i no de la pèrdua dels centres Fe-S.

Donat que *CTH2* està sota el control d'Aft1, entendre els mecanismes de regulació d'aquest factor transcripcional és clau per entendre la successió de fenotips en els mutants de *Yfh1* així com la funció o funcions que du a terme frataxina a la cèl·lula. Per altra banda, la posta a punt d'un mètode de proteòmica dirigida ens ha permès analitzar diferents proteïnes representatives dels processos afectats en deficiència de frataxina com dianes de Cth2, gens del metabolisme energètic i de la resposta a estrès oxidatiu. En aquest estudi on s'han comparat les soques *tetO₇-YFH1* i *tetO₇-YFH1 $\Delta yhb1$* s'han obtingut uns resultats que van en la mateixa direcció que els obtinguts en els mutants de *CTH2*. En els dobles mutants, on l'activació d'Aft1 no es produeix tal com mostren els resultats de la Figura 32, s'observa com els nivells de proteïna de les dianes de Cth2, Aco1, Sdh1 i Sdh2 es mantenen. Aquests resultats, reforcen encara més les conclusions obtingudes en els mutants de *CTH2*, és a dir, que frataxina no és essencial per la biosíntesi de centres Fe-S, i

que la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S és conseqüència de l'activació de *CTH2* que depèn d'Aft1.

2. L'activació d'Aft1 en absència de frataxina, una via dependent de *redox signaling*?

Molts dels fenotips observats en llevats deficients en *Yfh1* depenen de l'activació d'Aft1, com per exemple l'acumulació de ferro i la pèrdua de proteïnes amb centres Fe-S en un mecanisme que depèn de *Cth2*. L'activitat d'Aft1 es regula a través de regular-ne la seva localització un procés en el que hi participen les glutaredoxines monotioliques *Grx3* i *Grx4*, les proteïnes *Fra1* i *Fra2* i els centres Fe-S (Kumánovics et al., 2008; Li et al., 2009). En condicions de dèficit de ferro, la producció de centres Fe-S es veu afectada com a conseqüència del dèficit d'aquest metall el que genera un senyal que fa que Aft1 es localitzi al nucli i activi el reguló del ferro. Aquest senyal, es creu que és la pèrdua del centre Fe-S que manté el complex *Grx3/4-Fra2-Aft1* unit i localitzat al citosol, provocant així que aquest complex es trenqui (Outten & Albetel, 2013). En una situació de dèficit de frataxina també es genera un senyal de dèficit de ferro, ja que el factor transcripcional Aft1 s'activa ben aviat després de reprimir l'expressió de *YFH1*, tot i que els nivells de ferro al medi siguin normals i la biosíntesi de centres Fe-S es mantingui al llarg del temps tal com es va demostrar prèviament en el model condicional de llevat (Moreno-Cermeño et al., 2010). Aquests resultats previs obtinguts al grup ja apuntaven a que hauria d'existir un mecanisme de senyalització independent de la biosíntesi de centres Fe-S que servís per activar el factor transcripcional Aft1. Els resultats obtinguts amb el doble mutant *tetO-YFH1 Δyhb1* apunten clarament cap a aquesta possibilitat. En aquest mutant, s'evita l'acumulació de ferro a través d'evitar l'activació del reguló del ferro, i, per tant, l'augment en els nivells de proteïna de Fet3 (Figura 32). Tot i aquests resultats, l'activació d'Aft1 no es veu afectada en mutants *Δyhb1* tractats amb quelants de ferro (Figura 33) un resultat que definitivament apunta a vies de regulació diferents. *Yhb1* s'ha descrit com una proteïna amb activitat òxid nítric oxidoreductasa, per tant la seva funció seria detoxificar NO (Cassanova et al., 2005). A més, tot i existir dades contradictòries, s'ha

descriu que la seva expressió es veuria augmentada en diferents situacions d'estrès oxidatiu i que per tant jugaria un paper important en aquesta resposta (Zhao et al., 1996), probablement evitant la formació de peroxinitrit a través de reduir els nivells d'òxid nítric. De fet, la principal diferència entre els mutants simples i els dobles són els nivells d'òxid nítric com a conseqüència de la manca de Yhb1, ja que la producció de superòxid és idèntica en les dues soques. Com a conseqüència, el doble mutant té una major formació de peroxinitrit i alhora un contingut més alt de nitrotirosines (Figura 35), el que confirma el paper protector de Yhb1. Però, com influeixen els nivells d'òxid nítric en l'activació del reguló del ferro? Pràcticament no hi ha informació clara dels efectes de l'òxid nítric sobre el metabolisme de *S. cerevisiae*, però sí que s'ha descrit que la seva producció per part de l'enzim Tah18 és important per fer front a una situació d'estrès tèrmic (Nishimura et al., 2013). La resposta front estrès tèrmic i estrès oxidatiu comparteix un alt nombre de dianes (Gasch et al., 2000), el que podria apuntar a que l'òxid nítric també podria participar en la resistència a estrès oxidatiu. Per altra banda, estudis d'altres grups han apuntat a que alteracions en l'estat redox del mitocondri poden provocar l'activació del reguló del ferro, per exemple la deleció de la peroxiredoxina mitocondrial (Prx1) o la deleció de les metionina sulfòxid reductases (Mxr) (McDonagh et al., 2011; Sideri et al., 2009). A més, altres situacions oxidatives com el tractament de les cèl·lules amb peròxids o mutacions a la bomba de protons vacuolar també generen situacions d'estrès que activen en major o menor mesura el reguló del ferro (Castells-Roca et al., 2011; Diab & Kane, 2013). De la mateixa manera, en eucariotes superiors també s'ha observat que la proteïna IRP1 pot activar-se en situacions d'estrès per peròxid d'hidrogen o per òxid nítric (Fillebeen & Pantopoulos, 2002). Així doncs, amb aquestes evidències, podria seguir Aft1 un mecanisme de regulació ROS-depenent en absència de frataxina?

Els resultats que es mostren a la Figura 37 corroboren aquesta possibilitat ja que en presència de baixes concentracions de menadiona Aft1 es localitza al nucli en major proporció a la soca salvatge en comparació amb el mutant $\Delta yhb1$. Tot i que caldria obtenir dades d'expressió per a obtenir conclusions més fermes, aquests resultats confirmarien que l'activació d'Aft1 a través d'un mecanisme ROS-depenent pot obstaculitzar-se en mutants $\Delta yhb1$. Una possible explicació, es que les soques deficientes en *YHB1* siguin més resistents a estrès oxidatiu, que de fet és el cas tal com es mostra a la

Figura 36. Entre els possibles mecanismes que poden portar a aquesta major resistència a estrès oxidatiu, un d'ells seria que el NO reaccionaria directament amb el superòxid actuant com a quelant. Aquest és un mecanisme factible ja que la reacció entre superòxid i òxid nítric és més ràpida que la reacció catalitzada per les SOD (Beckman & Koppenol, 1996) i per tant nivells més alts de NO podrien proporcionar protecció front un estrès de superòxid. Els resultats mostrats a la Figura 38 donen suport a aquesta hipòtesi, ja que un tractament amb menadiona sobre la soca salvatge i la soca $\Delta yhb1$ provoca una baixada en la fluorescència en la sonda DAF-FM, el que indica un descens en els nivells de NO. Al mateix temps s'observa un lleuger augment en el contingut de nitrotirosines igual que passa en els mutants de frataxina. Per tant, aquests resultats donarien suport a que la deleció de *YHB1* protegeix front estrès oxidatiu a través de l'augment en els nivells d'òxid nítric. Aquest mecanisme d'interacció entre l'òxid nítric i el superòxid ja s'ha suggerit que té lloc al sistema vascular amb la finalitat de controlar l'alliberament de superòxid i així controlar la vascularització (Guzik et al., 2002).

Tot i el benefici que proporciona la deleció de *YHB1*, sembla contradictori que en deficiència de frataxina s'indueixi l'expressió d'aquest gen. L'explicació més senzilla és que l'expressió de *YHB1* estigui regulada pels factors transcripcionals de resposta a estrès oxidatiu; de fet, a aquesta proteïna se l'ha relacionat des de fa temps amb la resposta a front aquest tipus d'estrès (Zhao et al., 1996). Cal tenir present, que, tot i que la deleció de *YHB1* pugui tenir un efecte protector a curt termini a través de l'efecte quelant de l'òxid nítric sobre el superòxid, aquesta reacció dona lloc a peroxinitrit que a la llarga pot produir problemes de toxicitat. Per tant, la inducció de *YHB1* protegiria front aquest dany derivat de la producció de peroxinitrit.

Un altre mecanisme possible de resistència front una situació d'estrès oxidatiu en els mutants $\Delta yhb1$ implicaria un augment en els nivells basals de diversos enzims antioxidants. D'acord amb el que s'ha descrit prèviament, en situacions d'estrès per RNS, *S. cerevisiae* modifica l'expressió de nombrosos gens entre els quals hi ha gens descrits com gens de resposta a estrès oxidatiu (Horan et al., 2006). Si entenem que el dèficit d'*Yhb1* comporta un lleuger estrès per RNS de forma crònica, podríem esperar que aquestes soques tinguessin parcialment induïdes certes defenses antioxidants el que faria que aquestes cèl·lules fossin més resistents a estrès. En aquest mateix sentit podríem

trobar una explicació al perquè les cèl·lules deficientes en frataxina i *CTH2* tampoc acumulen ferro (Figura 29). Donat que Cth2 pot regular un gran nombre de dianes entre les quals hi podem trobar diversos gens de resposta a estrès (Puig et al., 2008), algunes amb un paper prèviament descrit en la regulació del metabolisme del ferro com seria la *PRX1* o les *TSAs*, podríem esperar que la deleció de Cth2 provoqués un lleuger augment en els nivells d'aquestes proteïnes proporcionant a les cèl·lules una major capacitat antioxidant que seria determinant per a bloquejar l'activació d'Aft1 a través d'aquest mecanisme ROS-depenent.

Si l'activació d'Aft1 depèn d'una via de senyalització redox, el següent pas seria esbrinar quin és el mecanisme que regula aquesta via. Donat que la localització d'Aft1 està regulada per un complex que depèn de la coordinació d'un centre Fe-S, un dels mecanismes més obvis seria l'oxidació d'aquest clúster com a conseqüència d'un augment en la producció d'espècies reactives de l'oxigen provocant així l'entrada d'Aft1 al nucli i l'activació del reguló del ferro. Un altre possible mecanisme a investigar és l'oxidació de cisteïnes d'Aft1. Aquesta és una possibilitat interessant ja que una variant natural d'Aft1 la qual és constitutivament activa, és una mutació d'una cisteïna per una fenilalanina (C291F), el que fa pensar en que una oxidació d'aquesta cisteïna podria provocar un fenotip d'activació d'Aft1 semblant.

2.1. L'estrès oxidatiu en la fisiopatologia de l'Atàxia de Friedreich

Entendre la successió de fenotips en els diferents models d'estudi del dèficit de frataxina és un pas clau per entendre millor la fisiopatologia de l'Atàxia de Friedreich, la funció de la pròpia frataxina i poder dissenyar teràpies més efectives. Si bé en *S. cerevisiae* el paper de l'estrès oxidatiu és d'especial importància ja que, tal com s'ha mostrat en el present treball, és l'origen de la resta de fenotips, en altres models d'estudi el paper de l'estrès oxidatiu es creu secundari. L'augment en la producció de ROS mostrada en el model de llevat (Figura 34) no s'ha arribat a identificar en altres models tot i que la gran majoria de models comparteixen una hipersensibilitat front agents oxidants (revisat a Bayot et al., 2011). Tot i les diferents hipòtesis que existeixen pel paper de l'estrès oxidatiu en

superiors, no hi ha motius per a deixar de pensar que les ROS podrien tenir un paper important en l'inici de la patologia, potser no a nivell de toxicitat però sí a nivell de senyalització. Donat que els ROS es produeixen principalment al mitocondri, podríem pensar en una alteració en la senyalització mitocondri-nucli, en la qual els ROS hi jugarien un paper important. En el cas dels llevats, aquesta alteració en la senyalització porta a un trencament de l'homeòstasi del ferro tal com s'ha explicat a l'apartat anterior. En el cas dels models d'eucariotes superiors sembla ser que s'alterarien altres vies abans que l'alteració de l'homeòstasi del ferro, com per exemple la del calci. En estudis previs del grup, es va descriure que en cultius primaris de neurones de l'arrel dorsal de rata existeix una alteració del metabolisme del calci que finalment porta a la mort per apoptosi (Mincheva-Tasheva et al., 2014). La connexió entre l'estrès oxidatiu i el metabolisme del calci ha estat àmpliament estudiada al llarg dels anys i s'han descrit diferents vies pels quals un augment de l'estrès oxidatiu pot alterar el metabolisme del calci (revisat a Yan, et al., 2006). Així doncs, podríem parlar d'una alteració en la senyalització depenent de ROS en els diferents models d'atàxia de Friedreich? Si fos així, podríem pensar en una teràpia antioxidant de cara al tractament de l'Atàxia de Friedreich. En aquest sentit cal apuntar que, tot i que alguns compostos antioxidants com la idebenona (un anàleg del coenzim Q10 amb activitat antioxidant) han fracassat al no observar-se diferències entre els tractaments i els placebo en assajos clínics, hi ha diverses línies de recerca amb compostos com EPI-743 (*Edison*), SHP622 (*Shire*), RTA-408 (*Reata*), RT001 (*Retrotape*) que ja es troben en fase I-II d'assajos clínics que busquen millorar la resposta antioxidant (font: www.curefa.org/pipeline), el que de nou confirma l'important paper que se li atorga a l'estrès oxidatiu en la fisiopatologia de l'Ataxia de Friedreich.

3. Sobre la funció de Frataxina, podem parlar d'una proteïna *moon-lightning*?

Després de 20 anys d'investigació des que es va identificar el gen de frataxina com a responsable de l'Atàxia de Friedreich (Campuzano et al., 1996), la funció d'aquesta proteïna segueix essent un tema de debat candent a les reunions científiques. Fins fa uns anys, la hipòtesi més acceptada és que frataxina actuava com a donador de ferro en la

biosíntesi de centres Fe-S i per tant aquesta tindria un paper essencial en el procés. Tal com s'ha explicat prèviament, frataxina no és essencial en la biosíntesi de centres Fe-S i per tant no pot ser el donador de ferro en aquest procés. Recentment, s'ha suggerit un altre rol per frataxina dins aquest procés, concretament el de regulador al·lostèric de la biosíntesis de clústers a través de regular l'activitat de la desulfurasa Nfs1 (Adinolfi et al., 2009; Colin et al., 2013; Pandey et al., 2013). Aquesta funció no estaria en contra dels nostres resultats ja que podria considerar-se una funció no essencial. En favor d'aquesta funció hi ha una sèrie de treballs que han caracteritzat un mutant puntual de Isu1 (M141I) el qual pot restaurar els fenotips derivats del dèficit de frataxina (H. Yoon et al., 2012). Aquesta mutació en Isu1 actuaria de la mateixa manera que ho fa frataxina sobre la desulfurasa promovent l'activitat d'aquest enzim en un mecanisme de regulació al·lostèrica (Pandey et al., 2013). Curiosament, els procariotes, que també disposen de maquinària de biosíntesi de centres Fe-S, disposen d'aquesta versió de la proteïna-bastida (IscU), el que fa que aquests organismes no depenguin de la presència de frataxina tot i que disposen d'ella, com és CyaY en el cas d'*E. coli* (Roche et al., 2015). Juntament amb aquests resultats, la reproducció del procés de biosíntesi de centres Fe-S *in vitro* realitzat pel Dr. Lill i els seus col·laboradors mostren de la importància de frataxina, així com altres components, en el procés de biosíntesi de centres Fe-S. Tot i així, cal dir que també es mostra que poca frataxina, concretament a una relació 1:10 respecte la desulfurasa és suficient per mantenir la formació de centres ferro sofre tot i que a una velocitat una mica inferior, i en una relació 1:4 la velocitat de reacció és pràcticament idèntica a una relació 1:1 (Webert et al., 2014). Donada aquesta independència de frataxina per a la biosíntesi de centres Fe-S perduda al llarg de l'evolució i els resultats obtinguts pel grup del Dr. Lill, la pregunta que ens podem fer és: té frataxina alguna funció secundària? Moltes són les funcions que s'han proposat per frataxina tot i que posteriorment no s'han pogut provar *in vivo*, però una d'elles podria encaixar amb els fenotips observats en els mutants de frataxina. Prèviament s'ha observat que frataxina pot interaccionar amb proteïnes de la cadena de transport electrònic com la succinat deshidrogenasa i les ETFs de llevat i s'ha suggerit que frataxina podria participar en la transferència d'electrons (González-Cabo et al., 2005). Tot i que la presència de frataxina en els grans macrocomplexes mitocondrials no s'ha descrit, des del seu descobriment es va suggerir

que, tot i ser una proteïna de la matriu mitocondrial, podria estar associada a la membrana interna (Campuzano et al., 1997). Estudis previs del grup, pendents de confirmació, realitzats en condicions menys restrictives que les utilitzades per identificar els macrocomplexes mitocondrials, també suggereixen que frataxina podria formar complexos amb proteïnes implicades en la transferència d'electrons (Elia Obis, 2014, Tesi Doctoral). Per tant, podríem especular que la manca de Yfh1 podria provocar que aquesta transferència fos menys eficient donant lloc per exemple a fenòmens de transferència reversa d'electrons, RET (de l'anglès, *Reverse Electron Transfer*), una situació que genera estrès oxidatiu, el qual juga un paper central segons les dades del nostre model.

Així doncs en una situació patològica on els nivells de frataxina cauen per sota del 30% respecte els nivells normals, però resta una certa quantitat de frataxina, podem hipotetitzar que no hi hauria prou frataxina per cobrir ambdues funcions. Per tant, malgrat es poguessin mantenir uns nivells de síntesi de centres Fe-S aparentment normals, la situació d'estrès que es generaria com a conseqüència d'un mal funcionament de la cadena de transport electrònic podria provocar altres alteracions que inclourien la destrucció d'aquests clústers i com a conseqüència la pèrdua d'activitat de les proteïnes afectades. D'acord amb aquesta hipòtesi, la teràpia antioxidant o una teràpia que millori la funcionalitat dels mitocondris seria la millor opció mentre no s'arribi a la teràpia gènica o cel·lular. En aquest sentit, a banda dels fàrmacs citats anteriorment, existeixen diversos estudis preclínics on s'ha demostrat que compostos com el blau de metilè, el qual pot participar en reaccions de transferència d'electrons a la cadena de transport electrònic, o bé tractaments amb rapamicina, que augmenten les defenses antioxidants a través de la inhibició del complex TORC1, milloren els fenotips observats en diferents models (Tricoire et al., 2014; Calap-Quintana et al., 2015), i donen suport a la idea de la teràpia antioxidant com una aproximació terapèutica a mig termini.

Conclusions

1. L'anàlisi proteòmica revela que hi ha una regulació a la baixa de diversos gens reprimits per glucosa després de reprimir l'expressió de *YFH1*.
2. El factor transcripcional *Adr1* pateix un canvi de localització nucli-citosol en absència de frataxina, el que provoca la seva inactivació i com a conseqüència el descens en les proteïnes que participen en el metabolisme de fonts de carboni alternatives identificades a l'estudi proteòmic.
3. Una situació d'estrès oxidatiu en forma de peròxid d'hidrogen, o bé com a conseqüència de la deleció de *Grx5* provoca el mateix efecte sobre *Adr1* que l'observat després de la repressió de *Yfh1*, el que suggereix que *Adr1* regula la seva activitat a través d'un mecanisme depenent de ROS.
4. *Cth2* és la responsable de la pèrdua de les proteïnes amb centres Fe-S en mutants deficients en frataxina.
5. Frataxina no és essencial en la biosíntesi de centres Fe-S.
6. L'aturada en el creixement observada en els mutants condicionals de *Yfh1* és conseqüència de l'activitat de *Cth2* i en menor mesura de la inactivació del factor transcripcional *Adr1*.
7. La deleció del gen de la flavohemoglobina de llevat (*Yhb1*) en el mutant condicional de frataxina reverteix els fenotips depenents d'*Aft1* com l'acumulació de ferro i la deleció de les proteïnes amb centres Fe-S com aconitasa.
8. En absència d'*Yfh1*, *Aft1* s'activa per una via de senyalització diferent a la que ho fa en situacions de deficiència de ferro.

9. Aft1 pot activar-se de forma ROS-depenent. Aquesta resposta es dóna en menor grau en mutants $\Delta yhb1$ com a conseqüència de l'augment en els nivells d'òxid nítric en aquesta soca que augmenten la capacitat antioxidant d'aquestes cèl·lules.

Bibliografia

- A -

- Abate, G., Bastonini, E., Braun, K. a., Verdone, L., Young, E. T., & Caserta, M. (2012). Snf1/AMPK regulates Gcn5 occupancy, H3 acetylation and chromatin remodelling at *S. cerevisiae* ADY2 promoter. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(5), 419–427. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.01.009>
- Abrahão, A., Pedroso, J. L., Braga-Neto, P., Bor-Seng-Shu, E., de Carvalho Aguiar, P., & Barsottini, O. G. P. (2015). Milestones in Friedreich ataxia: more than a century and still learning. *Neurogenetics*, *16*(3), 151–60. <http://doi.org/10.1007/s10048-015-0439-z>
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W. G., Naylor, S., Benson, L. M., Gacy, A. M., & Isaya, G. (2000). Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *American Journal of Human Genetics*, *67*(3), 549–62. <http://doi.org/10.1086/303056>
- Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S. R., ... Pastore, A. (2009). Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(4), 390–6. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1579>
- Adinolfi, S., Nair, M., Politou, A., Bayer, E., Martin, S., Temussi, P., & Pastore, A. (2004). The factors governing the thermal stability of frataxin orthologues: how to increase a protein's stability. *Biochemistry*, *43*(21), 6511–8. <http://doi.org/10.1021/bi036049+>
- Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S., & Leibold, E. A. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1823*(9), 1468–83. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.010>
- Anderson, P. R., Kirby, K., Orr, W. C., Hilliker, A. J., & Phillips, J. P. (2008). Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(2), 611–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0709691105>
- Andrew, A. J., Dutkiewicz, R., Knieszner, H., Craig, E. A., & Marszalek, J. (2006). Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(21), 14580–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M600842200>

- B -

- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., ... Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science (New York, N.Y.)*, *276*(5319), 1709–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180083>
- Bayeva, M., Khechaduri, A., Puig, S., Chang, H. C., Patial, S., Blackshear, P. J., & Ardehali, H. (2012). mTOR regulates cellular iron homeostasis through tristetraproline. *Cell Metabolism*, *16*(5), 645–657. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.001>
- Bayot, A., Santos, R., Camadro, J.-M., & Rustin, P. (2011). Friedreich's ataxia: the vicious circle hypothesis revisited. *BMC Medicine*, *9*(1), 112. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-9-112>
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American Journal of Physiology*, *271*(5 Pt 1), C1424–37.

- Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8944624>
- Bellí G, Polaina J, Tamarit J, De La Torre MA, Rodríguez-Manzanque MT, Ros J, H. E. (2002). Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37590–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12138088>
- Bidichandani, S. I., Ashizawa, T., & Patel, P. I. (1998). The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *American Journal of Human Genetics*, 62(1), 111–21. <http://doi.org/10.1086/301680>
- Bleier, L., & Dröse, S. (2013). Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(11-12), 1320–1331. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.002>
- Blumberg, H., Hartshorne, T. A., & Young, E. T. (1988). Regulation of expression and activity of the yeast transcription factor ADR1. *Molecular and Cellular Biology*, 8(5), 1868–76. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=363364&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bouton, C. (1999). Nitrosative and oxidative modulation of iron regulatory proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 55(8-9), 1043–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484662>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22763–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428860>
- Braun, K. a, Parua, P. K., Dombek, K. M., Miner, G. E., & Young, E. T. (2013). 14-3-3 (Bmh) proteins regulate combinatorial transcription following RNA polymerase II recruitment by binding at Adr1-dependent promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 33(4), 712–24. <http://doi.org/10.1128/MCB.01226-12>
- Bridwell-Rabb, J., Fox, N. G., Tsai, C.-L., Winn, A. M., & Barondeau, D. P. (2014). Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry*, 53(30), 4904–13. <http://doi.org/10.1021/bi500532e>
- Bulteau, a. L., Planamente, S., Jornea, L., Dur, a., Lesuisse, E., Camadro, J. M., & Auchère, F. (2012). Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in $\Delta yfh1$ yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(2), 212–225. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.003>

- C -

- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., & Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27393–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M003140200>
- Calap-Quintana, P., Soriano, S., Llorens, J. V., Al-Ramahi, I., Botas, J., Moltó, M. D., & Martínez-Sebastián, M. J. (2015). TORC1 Inhibition by Rapamycin Promotes Antioxidant Defences in a *Drosophila* Model of Friedreich's Ataxia. *PloS One*, 10(7), e0132376. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132376>

- Campanella, A., Isaya, G., O'Neill, H. A., Santambrogio, P., Cozzi, A., Arosio, P., & Levi, S. (2004). The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Human Molecular Genetics*, 13(19), 2279–88. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddh232>
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., ... Koenig, M. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1771–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9302253>
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., ... Pandolfo, M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5254), 1423–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596916>
- Cañizares, J., Blanca, J. M., Navarro, J. A., Monrós, E., Palau, F., & Moltó, M. D. (2000). dfh is a Drosophila homolog of the Friedreich's ataxia disease gene. *Gene*, 256(1-2), 35–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054533>
- Casas, C., Aldea, M., Espinet, C., Gallego, C., Gil, R., & Herrero, E. (1997). The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 13(7), 621–37. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19970615\)13:7<621::AID-YEA121>3.0.CO;2-U](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19970615)13:7<621::AID-YEA121>3.0.CO;2-U)
- Cassanova, N., O'Brien, K. M., Stahl, B. T., McClure, T., & Poyton, R. O. (2005). Yeast flavohemoglobin, a nitric oxide oxidoreductase, is located in both the cytosol and the mitochondrial matrix: Effects of respiration, anoxia, and the mitochondrial genome on its intracellular level and distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7645–7653. <http://doi.org/10.1074/jbc.M411478200>
- Castello, P. R., David, P. S., McClure, T., Crook, Z., & Poyton, R. O. (2006). Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism*, 3(4), 277–87. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.011>
- Castells-Roca, L., Mühlhoff, U., Lill, R., Herrero, E., & Bellí, G. (2011). The oxidative stress response in yeast cells involves changes in the stability of Aft1 regulon mRNAs. *Mol Microbiol*, 81(1), 232–248. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07689.x>
- Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O., & Isaya, G. (2000). Two-step Processing of Human Frataxin by Mitochondrial Processing Peptidase: PRECURSOR AND INTERMEDIATE FORMS ARE CLEAVED AT DIFFERENT RATES. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 41469–41475. <http://doi.org/10.1074/jbc.M006539200>
- Cavadini, P., Gellera, C., Patel, P. I., & Isaya, G. (2000). Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Human Molecular Genetics*, 9(17), 2523–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030757>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 11(3), 217–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823441>
- Charbon, G., Breunig, K. D., Wattiez, R., Vandehaute, J., & Noël-Georis, I. (2004). Key role of Ser562/661 in Snf1-dependent regulation of Cat8p in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), 4083–91. Retrieved

- from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121831>
- Chen, O. S., Crisp, R. J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D. R., & Kaplan, J. (2004). Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(28), 29513–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M403209200>
- Chen, O. S., & Kaplan, J. (2001). YFH1-mediated iron homeostasis is independent of mitochondrial respiration. *FEBS Letters*, *509*(1), 131–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734220>
- Chen, X. Z., Peng, J. B., Cohen, A., Nelson, H., Nelson, N., & Hediger, M. A. (1999). Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(49), 35089–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574989>
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Rai, M., Begu, A., Serroukh, Y., Depondt, C., ... Féry, F. (2012). Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Annals of Neurology*, *72*(6), 971–82. <http://doi.org/10.1002/ana.23698>
- Coleman, S. T., Epping, E. A., Steggerda, S. M., & Moye-Rowley, W. S. (1999). Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(12), 8302–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567555>
- Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.-M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., ... Ollagnier de Choudens, S. (2013). Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe₄S₄ cluster assembly. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(2), 733–40. <http://doi.org/10.1021/ja308736e>
- Condò, I., Ventura, N., Malisan, F., Rufini, A., Tomassini, B., & Testi, R. (2007). In vivo maturation of human frataxin. *Human Molecular Genetics*, *16*(13), 1534–40. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddm102>
- Crichton, R. (2001). *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*. *Iron Metabolism – From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1002/0470845791>

- D -

- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(10), 813–24. <http://doi.org/10.1038/nrm2256>
- Darley-Usmar, V. M., Rickwood, D. (David), & Wilson, M. T. (1987). *Mitochondria, a practical approach*. IRL Press.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, *44*(2), 149–56. <http://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>
- de la Torre-Ruiz, M. A., Mozo-Villarías, A., Pujol, N., & Petkova, M. I. (2010). How budding yeast sense and transduce the oxidative stress signal and the impact in cell growth and morphogenesis. *Current Protein & Peptide Science*, *11*(8), 669–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21235503>
- Delaunay, A., Isnard, A. D., & Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO Journal*, *19*(19), 5157–66. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5157>

- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., & Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, *111*(4), 471–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12437921>
- Denis, Fontaine, Chase, Kemp, & Bemis. (1992). ADR1c mutations enhance the ability of ADR1 to activate transcription by a mechanism that is independent of effects on cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Ser-230. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(4), 1507.
- Diab, H. I., & Kane, P. M. (2013). Loss of vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) activity in yeast generates an iron deprivation signal that is moderated by induction of the peroxiredoxin TSA2. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(16), 11366–77. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.419259>
- Dix, D., Bridgham, J., Broderius, M., & Eide, D. (1997). Characterization of the FET4 protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(18), 11770–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115232>

- E -

- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(4), 469–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978547>

- F -

- Fang, J., & Beattie, D. S. (2003). External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*, *34*(4), 478–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566073>
- Filla, A., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G., & Coccozza, S. (1996). The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *American Journal of Human Genetics*, *59*(3), 554–60. [http://doi.org/10.1016/S0013-4694\(97\)88573-6](http://doi.org/10.1016/S0013-4694(97)88573-6)
- Fillebeen, C., & Pantopoulos, K. (2002). Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, *7*(1), 15–22. <http://doi.org/10.1179/135100002125000136>
- Flattery-O'Brien, J. A., Grant, C. M., & Dawes, I. W. (1997). Stationary-phase regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* SOD2 gene is dependent on additive effects of HAP2/3/4/5- and STRE-binding elements. *Molecular Microbiology*, *23*(2), 303–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9044264>
- Froschauer, E. M., Schweyen, R. J., & Wiesenberger, G. (2009). The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1788*(5), 1044–50. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.004>

- G -

- Gabrielli, N., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2012). Cells lacking pfh1, a fission yeast homolog of mammalian frataxin protein, display constitutive activation of the iron starvation response. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 43042–51. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.421735>
- Gakh O, Park S, Liu G, Macomber L, Imlay JA, Ferreira GC, I. G. (2006). Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum Mol Genet.*, 15(3), 467–79.
- Gakh, O., Bedekovics, T., Duncan, S. F., Smith, D. Y., Berkholz, D. S., & Isaya, G. (2010). Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(49), 38486–501. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.145144>
- Galea, C. A., Huq, A., Lockhart, P. J., Tai, G., Corben, L. A., Yiu, E. M., ... Evans-Galea, M. V. (2016). Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in friedreich ataxia. *Annals of Neurology*, 79(3), 485–95. <http://doi.org/10.1002/ana.24595>
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241–57. <http://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>
- Gerber, J., Mühlhoff, U., & Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Reports*, 4(9), 906–911. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.embor918>
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., ... Winderickx, J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *The FEBS Journal*, 278(21), 3978–90. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08315.x>
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., & Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 722–8. <http://doi.org/10.1038/nrm2240>
- Goldstein, A. L., & McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 15(14), 1541–53. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K)
- González-Cabo, P., Vázquez-Manrique, R. P., García-Gimeno, M. A., Sanz, P., & Palau, F. (2005). Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Human Molecular Genetics*, 14(15), 2091–8. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddi214>
- Görner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E. L., Ammerer, G., Ruis, H., & Schüller, C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *The EMBO Journal*, 21(1-2), 135–44. <http://doi.org/10.1093/emboj/21.1.135>
- Grabczyk, E., & Usdin, K. (2000). The GAA*TTC triplet repeat expanded in Friedreich's ataxia impedes transcription elongation by T7 RNA polymerase in a length and supercoil dependent manner. *Nucleic Acids Research*, 28(14), 2815–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10908340>
- Grant, C. M., Luikenhuis, S., Beckhouse, A., Soderbergh, M., & Dawes, I. W. (2000).

- Differential regulation of glutaredoxin gene expression in response to stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1490(1-2), 33–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10786615>
- Guo, B., Phillips, J. D., Yu, Y., & Leibold, E. A. (1995). Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21645–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665579>
- Guzik, T. J., West, N. E. J., Pillai, R., Taggart, D. P., & Channon, K. M. (2002). Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*, 39(6), 1088–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052847>

- H -

- Hahn, S., & Young, E. T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189(3), 705–736. <http://doi.org/10.1534/genetics.111.127019>
- Haurie, V., Boucherie, H., & Sagliocco, F. (2003). The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45391–6. <http://doi.org/10.1074/jbc.M307447200>
- Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenö, P., Sagliocco, F., & Boucherie, H. (2001). The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 76–85. <http://doi.org/10.1074/jbc.M008752200>
- He Y1, Alam SL, Proteasa SV, Zhang Y, Lesuisse E, Dancis A, S. T. (2004). Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferrochelatase interaction. *Biochemistry.*, 28(43(51)), 16254–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610019>
- 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. *Nature Chemical Biology*, 2(10), 551–8. <http://doi.org/10.1038/nchembio815>
- Herrero, E., & de la Torre-Ruiz, M. A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 64(12), 1518–30. <http://doi.org/10.1007/s00018-007-6554-8>
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(11), 1217–1235. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>
- Hick, A., Wattenhofer-Donzé, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J. P., Vaucamps, N., ... Puccio, H. (2013). Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Disease Models & Mechanisms*, 6(3), 608–21. <http://doi.org/10.1242/dmm.010900>
- Hiltunen, J. K., Mursula, A. M., Rottensteiner, H., Wierenga, R. K., Kastaniotis, A. J., Gurvitz, A., ... Hashimoto, T. (2003). The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1), 35–64.

[http://doi.org/10.1016/s0168-6445\(03\)00017-2](http://doi.org/10.1016/s0168-6445(03)00017-2)

Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2275–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783>

Hong, S.-P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D., & Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8839–8843. <http://doi.org/10.1073/pnas.1533136100>

Horan, S., Bourges, I., & Meunier, B. (2006). Transcriptional response to nitrosative stress in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast (Chichester, England)*, 23(7), 519–35. <http://doi.org/10.1002/yea.1372>

- I -

Irazusta, V., Cabisco, E., Reverter-Branchat, G., Ros, J., & Tamarit, J. (2006). Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12227–32. <http://doi.org/10.1074/jbc.M511649200>

Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Cabisco, E., Ros, J., & Tamarit, J. (2008). Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(9), 1712–23. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.014>

Irazusta, V., Obis, E., Moreno-Cermeño, A., Cabisco, E., Ros, J., & Tamarit, J. (2010). Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 48(3), 411–20. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.010>

Isnard, R., Kalotka, H., Dürr, A., Cossée, M., Schmitt, M., Pousset, F., ... Komajda, M. (1997). Correlation between left ventricular hypertrophy and GAA trinucleotide repeat length in Friedreich's ataxia. *Circulation*, 95(9), 2247–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142000>

Isoyama, T., Murayama, A., Nomoto, A., & Kuge, S. (2001). Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21863–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M009258200>

Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic Saccharomyces cerevisiae. *Biochem. J*, 320, 61–67.

Izquierdo, A., Casas, C., Mühlhoff, U., Lillig, C. H., & Herrero, E. (2008). Saccharomyces cerevisiae Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryotic Cell*, 7(8), 1415–26. <http://doi.org/10.1128/EC.00133-08>

- J -

Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., ... Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent

proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11), 947–962.
<http://doi.org/10.1002/yea.1142>

Jeong, W., Bae, S. H., Toledano, M. B., & Rhee, S. G. (2012). Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(3), 447–56.
<http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.020>

- K -

Kacherovsky, N., Tachibana, C., Amos, E., Fox, D., & Young, E. T. (2008). Promoter Binding by the Adr1 Transcriptional Activator May Be Regulated by Phosphorylation in the DNA-Binding Region. *PLoS ONE*, 3(9), e3213.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003213>

Karplus, P. A. (2015). A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radical Biology & Medicine*, 80, 183–90. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.009>

Koutnikova, H., Campuzano, V., & Koenig, M. (1998). Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Human Molecular Genetics*, 7(9), 1485–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700204>

Krzepińko, A., Swieciło, A., Wawryn, J., Zadrag, R., Koziół, S., Bartosz, G., & Biliński, T. (2004). Ascorbate restores lifespan of superoxide-dismutase deficient yeast. *Free Radical Research*, 38(9), 1019–24. <http://doi.org/10.1080/10715760410001717327>

Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E. A., Altun, G., Laurent, L. C., ... Gottesfeld, J. M. (2010). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA·TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*, 7(5), 631–7. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.09.014>

Kuge, S., & Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *The EMBO Journal*, 13(3), 655–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8313910>

Kumánovics, A., Chen, O. S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., ... 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10276–86. <http://doi.org/10.1074/jbc.M801160200>

Kwok, E. Y., Severance, S., & Kosman, D. J. (2006). Evidence for iron channeling in the Fet3p-Ftr1p high-affinity iron uptake complex in the yeast plasma membrane. *Biochemistry*, 45(20), 6317–27. <http://doi.org/10.1021/bi052173c>

- L -

Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., ... Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6140), 1567–70. <http://doi.org/10.1126/science.1230381>

Le, D. T., Lee, B. C., Marino, S. M., Zhang, Y., Fomenko, D. E., Kaya, A., ... Gladyshev, V. N. (2009). Functional analysis of free methionine-R-sulfoxide reductase from

- Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4354–64. <http://doi.org/10.1074/jbc.M805891200>
- Lesuisse, E., & Labbe, P. (1989). Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 135(2), 257–63. <http://doi.org/10.1099/00221287-135-2-257>
- Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Naik, S. G., Lees, N. S., Hoffman, B. M., ... Outten, C. E. (2009). The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry*, 48(40), 9569–81. <http://doi.org/10.1021/bi901182w>
- Li, L., Bagley, D., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2008). Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 28(4), 1326–37. <http://doi.org/10.1128/MCB.01219-07>
- Li, L., Chen, O. S., McVey Ward, D., & Kaplan, J. (2001). CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29515–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M103944200>
- Li, L., Jia, X., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2011). Yap5 protein-regulated transcription of the TYW1 gene protects yeast from high iron toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38488–97. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.286666>
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Heidenreich, T., Mascarenhas, J., Netz, D. J., ... Mühlhoff, U. (n.d.). The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *European Journal of Cell Biology*, 94(7-9), 280–91. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.05.002>
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., ... Mühlhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(9), 1491–508. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.009>
- Lill, R., Srinivasan, V., & Mühlhoff, U. (2014). The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron-sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 22, 111–9. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.015>
- Llorens, J. V., Navarro, J. A., Martínez-Sebastián, M. J., Baylies, M. K., Schneuwly, S., Botella, J. A., & Moltó, M. D. (2007). Causative role of oxidative stress in a Drosophila model of Friedreich ataxia. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(2), 333–44. <http://doi.org/10.1096/fj.05-5709com>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12275–12280. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12275>
- 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. *Molecular Biology of the Cell*, 9(5), 1081–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571241>

- M -

- Marobbio, C. M. T., Pisano, I., Porcelli, V., Lasorsa, F. M., & Palmieri, L. (2012). Rapamycin reduces oxidative stress in frataxin-deficient yeast cells. *Mitochondrion*, *12*(1), 156–61. <http://doi.org/10.1016/j.mito.2011.07.001>
- Martelli, A., & Puccio, H. (2014). Dysregulation of cellular iron metabolism in Friedreich ataxia: from primary iron-sulfur cluster deficit to mitochondrial iron accumulation. *Frontiers in Pharmacology*, *5*, 130. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00130>
- Martínez-Pastor, M., Vergara, S. V., Puig, S., & Thiele, D. J. (2013). Negative feedback regulation of the yeast CTH1 and CTH2 mRNA binding proteins is required for adaptation to iron deficiency and iron supplementation. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(11), 2178–87. <http://doi.org/10.1128/MCB.01458-12>
- McDaniel, D. O., Keats, B., Vedanarayanan, V. V., & Subramony, S. H. (2001). Sequence variation in GAA repeat expansions may cause differential phenotype display in Friedreich's ataxia. *Movement Disorders*, *16*(6), 1153–1158. <http://doi.org/10.1002/mds.1210>
- McDonagh, B., Padilla, C. A., Pedrajas, J. R., & Bárcena, J. A. (2011). Biosynthetic and iron metabolism is regulated by thiol proteome changes dependent on glutaredoxin-2 and mitochondrial peroxiredoxin-1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(17), 15565–76. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.193102>
- Mesecke, N., Mittler, S., Eckers, E., Herrmann, J. M., & Deponte, M. (2008). Two Novel Monothiol Glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* Provide Further Insight into Iron-Sulfur Cluster Binding, Oligomerization, and Enzymatic Activity of Glutaredoxins[†]. *Biochemistry*, *47*(5), 1452–1463. <http://doi.org/10.1021/bi7017865>
- Mincheva-Tasheva, S., Obis, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2014). Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein. *Human Molecular Genetics*, *23*(7), 1829–41. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt576>
- Morano, K. a., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*(4), 1157–1195. <http://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Moreno Cermeño, A. J. (n.d.). *Papel de YFHI en la homeostasis del hierro y su relación con el estrés oxidativo en Saccharomyces cerevisiae*. Universitat de Lleida. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/51088>
- Moreno-Cermeño, A., Alsina, D., Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2013). Metabolic remodeling in frataxin-deficient yeast is mediated by Cth2 and Adr1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(12), 3326–3337.
- Moreno-Cermeño, A., Obis, E., Bellí, G., Cabiscol, E., Ros, J., & Tamarit, J. (2010). Frataxin depletion in yeast triggers up-regulation of iron transport systems before affecting iron-sulfur enzyme activities. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(53), 41653–64. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.149443>
- Moroishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K., & Nakayama, K. I. (2011). The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metabolism*, *14*(3), 339–51. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.011>
- Mühlenhoff, 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*. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(35), 36906–15.

<http://doi.org/10.1074/jbc.M406516200>

Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., & Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *The EMBO Journal*, 22(18), 4815–25. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg446>

Mühlenhoff, U., Stadler, J. A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R. J., ... Wiesenberger, G. (2003). A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40612–20. <http://doi.org/10.1074/jbc.M307847200>

- N -

Nath, N., McCartney, R. R., & Schmidt, M. C. (2003). Yeast Pak1 Kinase Associates with and Activates Snf1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3909–3917. <http://doi.org/10.1128/MCB.23.11.3909-3917.2003>

Navarro, J. A., Botella, J. A., Metzendorf, C., Lind, M. I., & Schneuwly, S. (2015). Mitoferrin modulates iron toxicity in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Free Radical Biology & Medicine*, 85, 71–82. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.014>

Navarro, J. A., Ohmann, E., Sanchez, D., Botella, J. A., Liebisch, G., Moltó, M. D., ... Schneuwly, S. (2010). Altered lipid metabolism in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, 19(14), 2828–40. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddq183>

Nishimura, A., Kawahara, N., & Takagi, H. (2013). The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), 137–43. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.023>

- O -

O'Neill, H. A., Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S. M., Sampson, M., ... Isaya, G. (2005). Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry*, 44(2), 537–45. <http://doi.org/10.1021/bi048459j>

Obis Monné, E. (2014). *L'Atàxia de Friedreich : estudi del dèficit de frataxina en miòcits cardíacs. Tesi Doctoral.*

Obis, È., Irazusta, V., Sanchís, D., Ros, J., & Tamarit, J. (2014). Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets mitochondria and lipid metabolism. *Free Radical Biology & Medicine*, 73, 21–33. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.016>

Ohshima, K., Montermini, L., Wells, R. D., & Pandolfo, M. (1998). Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14588–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603975>

Outten, C. E., & Albetel, A.-N. (2013). Iron sensing and regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Ironing out the mechanistic details. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), 662–8. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.020>

- P -

- Pandey, A., Gordon, D. M., Pain, J., Stemmler, T. L., Dancis, A., & Pain, D. (2013). Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(52), 36773–86. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.525857>
- Pandolfo, M., & Pastore, A. (2009). The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J Neurol*, 256, 9–17. <http://doi.org/10.1007/s00415-009-1003-2>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31340–51. <http://doi.org/10.1074/jbc.M303158200>
- Parua, P. K., Ratnakumar, S., Braun, K. a, Dombek, K. M., Arms, E., Ryan, P. M., & Young, E. T. (2010). 14-3-3 (Bmh) proteins inhibit transcription activation by Adr1 through direct binding to its regulatory domain. *Molecular and Cellular Biology*, 30(22), 5273–5283. <http://doi.org/10.1128/MCB.00715-10>
- Pastore, A., & Adinolfi, S. (2014). Chronochemistry in neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7(March), 20. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00020>
- Pastore, A., & Puccio, H. (2013). Frataxin: A protein in search for a function. *Journal of Neurochemistry*, 126(SUPPL.1), 43–52. <http://doi.org/10.1111/jnc.12220>
- Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizueté, A., Gustafsson, J. A., Wright, A. P., & Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(10), 6366–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037727>
- Pedrajas, J. R., Porras, P., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Miranda-Vizueté, A., & Bárcena, J. A. (2002). Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. *The Biochemical Journal*, 364(Pt 3), 617–23. <http://doi.org/10.1042/BJ20020570>
- Pedro-Segura, E., Vergara, S. V, Rodríguez-Navarro, S., Parker, R., Thiele, D. J., & Puig, S. (2008). The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase SDH4 mRNA in response to iron deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28527–35. <http://doi.org/10.1074/jbc.M804910200>
- Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., & Pook, M. A. (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *Journal of Neurochemistry*, 126(SUPPL.1), 65–79. <http://doi.org/10.1111/jnc.12219>
- Philpott, C. C., & Protchenko, O. (2008). Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 20–7. <http://doi.org/10.1128/EC.00354-07>
- Pimentel, C., Vicente, C., Menezes, R. A., Caetano, S., Carreto, L., & Rodrigues-Pousada, C. (2012). The role of the Yap5 transcription factor in remodeling gene expression in response to Fe bioavailability. *PLoS One*, 7(5), e37434. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0037434>
- Pomposiello, P. J., Demple, B., Sies, H., Hidalgo, E., Demple, B., Storz, G., ... al., et. (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in*

- Biotechnology*, 19(3), 109–114. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01542-0](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01542-0)
- Puig, S., Askeland, E., & Thiele, D. J. (2005). Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell*, 120(1), 99–110. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.032>
- Puig, S., Vergara, S. V., & Thiele, D. J. (2008). Cooperation of Two mRNA-Binding Proteins Drives Metabolic Adaptation to Iron Deficiency. *Cell Metabolism*, 7(6), 555–564. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.010>
- Puigpinós, J., Casas, C., & Herrero, E. (2015). Altered intracellular calcium homeostasis and endoplasmic reticulum redox state in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Grx6 glutaredoxin. *Molecular Biology of the Cell*, 26(1), 104–16. <http://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1137>
- Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., & de la Torre-Ruiz, M. A. (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 21), 4554–64. <http://doi.org/10.1242/jcs.03229>

- R -

- Randez-Gil F1, Bojunga N, Proft M, E. K. (1997). Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Molecular Cell Biology*, 17(5), 2502–10.
- Raspor, P., Plesnicar, S., Gazdag, Z., Pesti, M., Miklavcic, M., Lah, B., ... Poljsak, B. (2005). Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid). *Cell Biology International*, 29(1), 57–63. <http://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.010>
- Ratnakumar, S., Kacherovsky, N., Arms, E., & Young, E. T. (2009). Snf1 controls the activity of Adr1 through dephosphorylation of Ser230. *Genetics*, 182(3), 735–745. <http://doi.org/10.1534/genetics.109.103432>
- Rietzschel, N., Pierik, A. J., Bill, E., Lill, R., & Mühlenhoff, U. (2015). The basic leucine zipper stress response regulator Yap5 senses high-iron conditions by coordination of [2Fe-2S] clusters. *Molecular and Cellular Biology*, 35(2), 370–8. <http://doi.org/10.1128/MCB.01033-14>
- Robertson, L. S., Causton, H. C., Young, R. A., & Fink, G. R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function.
- Roche, B., Agrebi, R., Huguenot, A., Ollagnier de Choudens, S., Barras, F., & Py, B. (2015). Turning *Escherichia coli* into a Frataxin-Dependent Organism. *PLoS Genetics*, 11(5), e1005134. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005134>
- Rodríguez-Colman, M. J., Sorolla, M. A., Vall-Llaura, N., Tamarit, J., Ros, J., Cabisco, E., & Rodríguez-Colman MJ, Sorolla MA, Vall-Llaura N, Tamarit J, Ros J, C. E. (2013). The FOX transcription factor Hcm1 regulates oxidative metabolism in response to early nutrient limitation in yeast. Role of Snf1 and Tor1/Sch9 kinases., 1833(8), 2004–15. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.015>
- Rodríguez-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*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), 8180–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567543>
- Rodríguez-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. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1109–21. <http://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0517>
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., ... Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature Genetics*, 17(2), 215–7. <http://doi.org/10.1038/ng1097-215>
- Rutherford, J. C., & Bird, A. J. (2004). Metal-Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and Copper Homeostasis in Eukaryotic Cells MINIREVIEW Metal-Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and Copper Homeostasis in Eukaryotic Cells. *Eukaryotic Cell*, 3(1), 1–13. <http://doi.org/10.1128/EC.3.1.1>
- Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Mühlenhoff, U., Lill, R., & Winge, D. R. (2005). Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10135–40. <http://doi.org/10.1074/jbc.M413731200>

- S -

- Sahoo, R., Bhattacharjee, A., Majumdar, U., Ray, S. S., Dutta, T., & Ghosh, S. (2009). A novel role of catalase in detoxification of peroxynitrite in *S. cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(4), 507–11. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.062>
- Salminen A, Kauppinen A, & Kaarniranta K. (2016). AMPK/Snf1 signaling regulates histone acetylation: Impact on gene expression and epigenetic functions. *Cellular Signaling*, 50898-6568(16), 30063–8. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.03.009>
- Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A., & Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 20(4), 1321–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648618>
- Schagerlöf, U., Elmlund, H., Gakh, O., Nordlund, G., Hebert, H., Lindahl, M., ... Al-Karadaghi, S. (2008). Structural basis of the iron storage function of frataxin from single-particle reconstruction of the iron-loaded oligomer. *Biochemistry*, 47(17), 4948–54. <http://doi.org/10.1021/bi800052m>
- Schiavi, A., Maglioni, S., Palikaras, K., Shaik, A., Strappazon, F., Brinkmann, V., ... Ventura, N. (2015). Iron-Starvation-Induced Mitophagy Mediates Lifespan Extension upon Mitochondrial Stress in *C. elegans*. *Current Biology: CB*, 25(14), 1810–22. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.059>
- Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., & Puccio, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Human Molecular Genetics*, 17(22), 3521–31. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddn244>
- Seguin, A., Sutak, R., Bulteau, A.-L., Garcia-Serres, R., Oddou, J.-L., Lefevre, S., ... Lesuisse, E. (2010). Evidence that yeast frataxin is not an iron storage protein in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(6), 531–8. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.03.008>
- Sideri, T. C., Willetts, S. a., & Avery, S. V. (2009). Methionine sulphoxide reductases protect iron-sulphur clusters from oxidative inactivation in yeast. *Microbiology*, 155(2), 612–623. <http://doi.org/10.1099/mic.0.022665-0>
- Soderberg, C. G., Gillam, M. E., Ahlgren, E.-C., Hunter, G. A., Gakh, O., Isaya, G., ... Al-

- Karadaghi, S. (2016). The Structure of the Complex Between Yeast Frataxin and Ferrochelatase: Characterization and pre-Steady State Reaction of Ferrous Iron Delivery and Heme Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.701128>
- Soriano, S., Llorens, J. V, Blanco-Sobero, L., Gutiérrez, L., Calap-Quintana, P., Morales, M. P., ... Martínez-Sebastián, M. J. (2013). Deferiprone and idebenone rescue frataxin depletion phenotypes in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Gene*, *521*(2), 274–81. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2013.02.049>
- Spickett, C. M., Smirnoff, N., & Pitt, A. R. (2000). The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, *28*(2), 183–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11281285>
- Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., & Culotta, V. C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(41), 38084–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M105296200>

- T -

- Tamarit, J., Belli, G., Cabiscol, E., Herrero, E., & Ros, J. (2003). Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(28), 25745–51. <http://doi.org/10.1074/jbc.M303477200>
- Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., & Ros, J. (2006). Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Analytical Biochemistry*, *351*(1), 149–51. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2005.12.001>
- Toledano, M. B., & Huang, B. (2016). Microbial 2-Cys Peroxiredoxins: Insights into Their Complex Physiological Roles. *Molecules and Cells*, *39*(1), 31–9. <http://doi.org/10.14348/molcells.2016.2326>
- Tricoire, H., Palandri, A., Bourdais, A., Camadro, J.-M., & Monnier, V. (2014). Methylene blue rescues heart defects in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, *23*(4), 968–79. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt493>
- Trotter, E. W., & Grant, C. M. (2003). Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO Reports*, *4*(2), 184–8. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.embor729>
- Trotter, E. W., & Grant, C. M. (2005). Overlapping Roles of the Cytoplasmic and Mitochondrial Redox Regulatory Systems in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Reports*, *4*(2), 392–400. <http://doi.org/10.1128/EC.4.2.392-400.2005>
- Tsai, C.-L., & Barondeau, D. P. (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry*, *49*(43), 9132–9. <http://doi.org/10.1021/bi1013062>
- Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F., & Soontorngun, N. (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Research*, *10*(1), 2–13. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00555.x>

- U -

- Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K., & Yamaguchi-Iwai, Y. (2007). Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(8), 2980–90. <http://doi.org/10.1091/mbc.E06-11-1054>
- Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K., & Yamaguchi-Iwai, Y. (2012). Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(24), 4998–5008. <http://doi.org/10.1128/MCB.00726-12>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(53), 38061–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608875>
- Uzarska, M. A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.-A., Lill, R., & Mühlenhoff, U. (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(12), 1830–41. <http://doi.org/10.1091/mbc.E12-09-0644>

- V -

- Vall-Llaura, N., Reverter-Branchat, G., Vived, C., Weertman, N., Rodríguez-Colman, M. J., & Cabisco, E. (2016). Reversible glutathionylation of Sir2 by monothiol glutaredoxins Grx3/4 regulates stress resistance. *Free Radical Biology & Medicine*, *96*, 45–56. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.008>
- Vázquez-Manrique, R. P., González-Cabo, P., Ros, S., Aziz, H., Baylis, H. A., & Palau, F. (2006). Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *20*(1), 172–4. <http://doi.org/10.1096/fj.05-4212fje>
- 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*(2), 109–12. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00149.x>
- Vivancos, A. P., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M., & Hidalgo, E. (2006). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, *276*(6), 495–502. <http://doi.org/10.1007/s00438-006-0175-z>

- W -

- Wallace, M. A., Liou, L.-L., Martins, J., Clement, M. H. S., Bailey, S., Longo, V. D., ... Gralla, E. B. (2004). Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(31), 32055–62. <http://doi.org/10.1074/jbc.M403590200>
- Webert, H., Freibert, S.-A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., ... Lill, R. (2014). Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1

- reveals the involvement of ferredoxin. *Nature Communications*, 5(May), 5013. <http://doi.org/10.1038/ncomms6013>
- Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Müller, H., Lohaus, C., Meyer, H. E., ... Pfanner, N. (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *The EMBO Journal*, 25(1), 184–95. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600906>
- Wilkinson, N., & Pantopoulos, K. (2014). The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 176. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00176>
- Wilson, R. B., & Roof, D. M. (1997). Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nature Genetics*, 16(4), 352–7. <http://doi.org/10.1038/ng0897-352>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 8(3), 425–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9949201>

- X -

- Xia, H., Cao, Y., Dai, X., Marelja, Z., Zhou, D., Mo, R., ... Li, K. (2012). Novel frataxin isoforms may contribute to the pathological mechanism of Friedreich ataxia. *PLoS One*, 7(10), e47847. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047847>

- Y -

- Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., & Klausner, R. D. (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14(6), 1231–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7720713>
- Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., & Klausner, R. D. (1996). Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *The EMBO Journal*, 15(13), 3377–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8670839>
- Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., & Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18914–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M200949200>
- Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M., Rouault, T. A., ... Iwai, K. (2003). Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nature Cell Biology*, 5(4), 336–40. <http://doi.org/10.1038/ncb952>
- Yan, Y., Wei, C., Zhang, W., Cheng, H., & Liu, J. (2006). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(7), 821–6. <http://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00390.x>
- Yang, Y., Yamashita, T., Nakamaru-Ogiso, E., Hashimoto, T., Murai, M., Igarashi, J., ... Kosaka, H. (2011). Reaction mechanism of single subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for a ternary complex mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9287–9297. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.175547>
- Yoon, H., Golla, R., Lesuisse, E., Pain, J., Donald, J. E., Lyver, E. R., ... Dancis, A. (2012).

- Mutation in the Fe-S scaffold protein Isu bypasses frataxin deletion. *The Biochemical Journal*, 441(1), 473–80. <http://doi.org/10.1042/BJ20111637>
- Yoon, T., & Cowan, J. A. (2004). Frataxin-mediated Iron Delivery to Ferrochelatase in the Final Step of Heme Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 25943–25946. <http://doi.org/10.1074/jbc.C400107200>
- Young, E. T., Dombek, K. M., Tachibana, C., & Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 26146–58. <http://doi.org/10.1074/jbc.M301981200>

- Z -

- Zhao, X. J., Raitt, D., V Burke, P., Clewell, a S., Kwast, K. E., & Poyton, R. O. (1996). Function and Expression of Flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. EVIDENCE FOR A ROLE IN THE OXIDATIVE STRESS RESPONSE. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25131–25138. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.41.25131>

Articles publicats



Metabolic remodeling in frataxin-deficient yeast is mediated by Cth2 and Adr1



Armando Moreno-Cermeño^{1,2}, David Alsina², Elisa Cabiscol, Jordi Tamarit, Joaquim Ros^{*}

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, IRB-Lleida, Universitat de Lleida, Lleida, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2013

Received in revised form 10 September 2013

Accepted 27 September 2013

Available online 5 October 2013

Keywords:

Friedreich ataxia

Yeast frataxin

Iron

Oxidative stress

ABSTRACT

Frataxin is a mitochondrial protein involved in iron metabolism whose deficiency in humans causes Friedreich ataxia. We performed transcriptomic and proteomic analyses of conditional Yeast Frataxin Homologue (Yfh1) mutants (*tetO₊-YFH1*) to investigate metabolic remodeling upon Yfh1 depletion. These studies revealed that Yfh1 depletion leads to downregulation of many glucose-repressed genes. Most of them were Adr1 targets, a key transcription factor required for growth in non-fermentable carbon sources. Using a GFP-tagged Adr1, we observed that Yfh1 depletion promotes the export of Adr1 from the nucleus to the cytosol without affecting its protein levels. This effect was also observed upon H₂O₂ treatment, but not by iron overload/starvation, indicating the presence of a regulatory pathway involved in Adr1 export and inactivation upon stress conditions. We also observed that *CTH2*, a gene involved in the mRNA degradation of several iron-containing enzymes, was induced upon Yfh1 depletion. Accordingly, decreased levels of aconitase and succinate dehydrogenase were observed. Nevertheless, their levels were maintained in a Δ *cth2* mutant even in the absence of Yfh1. From these results we can conclude that, in addition to altering iron homeostasis, frataxin depletion involves drastic metabolic remodeling governed by Adr1 and Cth2 that finally leads to downregulation of iron–sulfur proteins and other proteins involved in respiratory metabolism.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Frataxin is a small, highly conserved, mitochondrial protein whose deficiency in humans causes Friedreich ataxia. Ortholog proteins have been described in bacteria, yeasts and plants [1]. Thus, non-mammalian models have been widely used to investigate frataxin function and the consequences of frataxin deficiency on cell metabolism. Indeed, soon after the discovery of frataxin, it was reported that yeasts deficient in its ortholog Yfh1 (from Yeast frataxin homolog³) accumulated increased amounts of iron [2]. This was the first evidence relating this protein to iron metabolism. However, the precise function of Frataxin is controversial. For years, the most accepted hypothesis was that it provided the iron required for iron–sulfur biogenesis, a highly conserved process that takes place in mitochondria and requires several specialized proteins. This hypothesis was supported by several biochemical studies indicating direct interaction between frataxins and proteins involved in iron–sulfur biogenesis [3]. However, many biological studies indicate that frataxin is not essential to iron–sulfur protein activity [4,5]. In this

context, a mutation (M107I) in *Isu1* ameliorates most of the traits attributed to frataxin depletion [6]. The apparent paradox between the involvement of frataxin in iron–sulfur machinery and its dispensable role in this process may have found an explanation in recent studies that suggest frataxin may play a regulatory role in iron–sulfur biogenesis in response to iron availability [7]. Additionally, other roles for frataxin have been suggested, such as iron storage [8], electron transfer to flavoproteins [9], or regulation of Iron Regulatory Protein 1 [10].

Biological systems contain many regulatory networks that promote metabolic remodeling in response to environmental conditions. One example is adaptation to growth in the presence of different carbon sources in yeasts. Glucose is the preferred carbon source in *Saccharomyces cerevisiae*, and consequently this sugar exerts a strong repressive effect over many genes involved in the utilization of other carbon sources, including many mitochondrial genes required for respiration or NADH generation. Yeast grown under conventional YPD media (which contains 2% glucose) display a mixed fermentative-respiratory metabolism in which most of the glucose used is converted to ethanol. This phenomenon is known as the Crabtree effect [11–13]. Nevertheless, *S. cerevisiae* can also grow efficiently in carbon sources such as glycerol, acetate, ethanol, or oleate when glucose is scarce. This requires a marked metabolic rearrangement that is governed by the AMP-activated protein kinase Snf1 and involves several transcription factors, being Adr1 one of the most relevant [14]. Another example of metabolic remodeling is response to iron scarcity. The Aft1/2 transcription factors, which promote upregulation of iron uptake systems, are activated [15]

^{*} Corresponding author at: Dept. Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure, 80, 25198, Lleida. Tel.: +34 973 702 275.

E-mail addresses: ajmoreno@unav.es (A. Moreno-Cermeño), joaquim.ros@cmb.udl.cat (J. Ros).

¹ Present address: University of Navarra (CIMA).

² These authors contributed equally to this work.

³ Abbreviations: YFH1, Yeast Frataxin Homologue 1; CBB, Coomassie Brilliant Blue; qPCR, quantitative real-time PCR; DHE, dihydroethidium.

and Aft1 induces the expression of Cth2, an mRNA binding protein that promotes the degradation of several mRNAs coding for iron-containing proteins. The nearly 100 transcripts downregulated by Cth2 are involved in iron-dependent metabolic pathways such as cellular respiration, heme and Fe-S cluster biosynthesis, iron homeostasis, or fatty acid metabolism. Cth2 has a paralog protein, Cth1, known to target 20 transcripts, of which 13 are shared with Cth2 [16].

Frataxin depletion in yeast leads to respiratory failure, loss of iron-sulfur proteins, and growth arrest. In previous work, we used yeast frataxin conditional mutants to investigate the sequence of events occurring after frataxin depletion [5]. By this approach, activation of iron uptake and response to oxidative stress were classified as early events after frataxin depletion. In contrast, respiratory failure and loss of iron-sulfur proteins were classified as late events. Late events may be governed by the regulatory networks used by cells to respond to environmental challenges. In the present work, proteomic and transcriptomic data have been used to explore the mechanisms that trigger these late events. The results obtained indicate that the transcription factor Adr1 is inactivated after frataxin depletion, while Cth2 is induced. Both events cause the downregulation of several genes involved in respiratory metabolism and promote growth arrest.

2. Materials and methods

2.1. Organism and culture conditions

The strains used for this study are shown in Table 1. All of them are derived from W303-1A (MATa *ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1*), which is considered wild-type in this work. Most experiments were performed using YPG media (1% yeast extract, 2% peptone and 3% glycerol). Unless otherwise stated, YPD media contained 2% glucose. SC medium contained 0.67% yeast nitrogen base, 3% ethanol plus dropout mixture and auxotrophic requirements. The cells were cultured in a rotary shaker at 30 °C. All the experiments described in this work were performed with exponentially growing cells at optical densities ranging from 0.5 to 0.7 ($\lambda = 600$ nm, 1 cm light path).

2.2. Plasmids and genetic methods

The plasmid pCYC106 (supplied by Dr. E. Garí, Universitat de Lleida) was used for 3HA-tagging the c-terminus of the chromosomal copies of *ADR1*. Plasmid pYM25 was used for GFP-tagging the c-terminus of *ADR1* [17].

2.3. Two-dimensional gel electrophoresis and protein identification

The cells were resuspended in 25 mM Tris-HCl buffer pH 8, plus 8 M urea and a mixture of protease inhibitors (200 μ M phenylmethylsulphonyl fluoride, 20 μ M TPCK, 200 μ M pepstatin A) 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), 50 μ g of protein (quantitated by Biorad Protein Assay, approximately 10 μ l of the supernatant) were diluted in 350 μ l of Rehydration Buffer V (General Electric Life Sciences) containing 50 mM DTT and 1% Biolytes 3–10 (BioRad). Isoelectric focusing was performed in 18 cm immobilized pH gradient strips (3–10 NL Bio-Rad) using a BioRad Protean IEF cell. Second-dimension SDS-PAGE was performed on 12.5% polyacrylamide gels. The gels were Flamingo-stained. Images were acquired in a Versadoc MP4000 (Bio-Rad) and analyzed with PDQuest software (Bio-Rad). For protein identification, the desired spots were excised from the gels and subjected to tryptic digestion. Peptides were analyzed in a Bruker Ultraflex MALDI-TOF/TOF. Proteins were identified by peptide mass fingerprinting or MS/MS ion search with Mascot.

2.4. Western blot analysis

The cells were resuspended in 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 plus a mixture of protease inhibitors and disrupted using glass beads. An equal volume of 7.5% SDS, and 7.5% β -mercaptoethanol was added to the lysed cells and after centrifugation (12,000 rpm for 5 min), 15 μ g of protein were separated in SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. For Adr1 detection, the cells were lysed in 12.5% TCA and after centrifugation, the pellets were washed with cold acetone and resuspended in a 0.67 M Tris-HCl buffer pH 8.0 plus 1% SDS and 1 mM EDTA. The following primary antibodies were used: Aco1 (from R. Lill, Marburg, Germany), Sdh2 (from B. Lemire), Grx5 [18], and antibodies against HA epitope (Roche, 1867423) and GFP (Clontech, 632381). Peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse and anti-rat antibodies were used for detection. Image acquisition was performed in a ChemiDoc XRS (Bio-Rad). When required, chemiluminescent data were analyzed by Quantity One software (BioRad). Protein load was verified by post-western Coomassie Blue (CBB) staining of the PVDF membranes.

2.5. Microscopy studies

To analyze Adr1p cellular localization, cells expressing an *ADR1-GFP* version were observed in both YPD and YPG media by fluorescence microscopy (Olympus DP30 BW) using U-MNUA3 filter. For DAPI nuclear staining of living cells expressing the GFP-*ADR1* fusion proteins, samples from exponentially growing cultures were directly incubated with DAPI (5 mg/ml) during 40 min in the dark, before visualization with an Olympus DP30 BW fluorescence microscope with U-MNUA2 filter.

2.6. Gene expression analysis

Microarray analysis was performed as described [19] in the genomic facilities at the Universitat Autònoma de Barcelona. Comparison was

Table 1
Strains used in this work.

Strain	Name used in text	Relevant genotype	Comments
W303-1A	Wild-type	MATa <i>ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1</i>	Wild-type
W303-1B		MAT α <i>ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1</i>	Wild-type
BQS201	<i>tetO₇-YFH1</i>	W303-1A <i>tetO₇-YFH1::kanMX4</i>	Chromosomal <i>YFH1</i> promoter replaced with <i>tetO₇</i> promoter [5]
BQS213	W303 <i>ADR1-GFP</i>	W303-1A <i>ADR1-GFP::hphNT1</i>	Chromosomal <i>ADR1</i> tagged with GFP in wild-type strain
BQS215	<i>tetO₇-YFH1 ADR1-GFP</i>	BQS201 <i>ADR1-GFP::hphNT1</i>	Chromosomal <i>ADR1</i> tagged with GFP in <i>tetO₇-YFH1</i> strain
BQS214	W303 <i>ADR1-HA</i>	W303-1A, <i>ADR1-3HA::natMX4</i>	Chromosomal <i>ADR1</i> tagged with 3HA in wild-type strain
BQS216	<i>tetO₇-YFH1 ADR1-HA</i>	<i>tetO₇-YFH1</i> , <i>ADR1-3HA::natMX4</i>	Chromosomal <i>ADR1</i> tagged with 3HA in <i>tetO₇-YFH1</i> strain
MML313	<i>tetO₇-GRX5</i>	W303-1A <i>grx5::kanMX4(pMML117[tTA tetO-GRX5])::tetR'-Ssn6::LEU2 URA3</i>	<i>GRX5</i> under the control of a <i>tetO₇</i> promoter [33].
BQS217	<i>tetO₇-GRX5 ADR1-GFP</i>	MML313, <i>ADR1-GFP::hphNT1</i>	Chromosomal <i>ADR1</i> tagged with GFP in MML313 strain
BQS250		W303-1B <i>cth2::natMX4 (mat α)</i>	Deletion of CTH2 in W303-1B
BQS252	Δ <i>cth2</i>	W303-1A <i>cth2::natMX4 (mat a)</i>	Spore from a cross BQS201xBQS250
BQS251	<i>tetO₇-YFH1 Δcth2</i>	W303-1A <i>tetO₇-YFH1::kanMX4 cth2::natMX4</i>	Spore from a cross BQS201xBQS250
BQS257	<i>tetO₇-GRX5Δcth2</i>	MML313, <i>cth2::natMX4</i>	Spore from a cross MML313xBQS250

done between *tetO₇-YFH1* and *tetO₇-YFH1* plus doxycycline. Data represent two biological repeats. For quantitative real-time PCR analysis (qPCR), total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, ref. 74104) according to manufacturer's instructions. From each sample, 1 µg of total RNA was converted into cDNA and 50 ng were used for each individual real-time PCR reaction. The assays were performed in an iCycler (Bio-Rad) using the TaqMan Universal PCR Master Mix kit from Applied Biosystems. Actin (ACT1) was used as an internal control. Primer sequences and probes were provided by Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression Assays, Custom). Quantification was completed using iCycler IQ Real-Time Detection System software (version 2.3, Bio-Rad). Relative expression ratios were calculated on the basis of delta Cp values with efficiency correction based on multiple samples [20].

2.7. 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. The plates were sealed with Breathe Easy membranes (Diversified Biotech, Boston, MA). Optical density (600 nm) was recorded every 30 min. Generation times were calculated every hour using four measurements around the desired time-point. Gen5 Data Analysis software and Microsoft Excel were used for these calculations.

2.8. Other methods

Alcohol dehydrogenase activities were analyzed in zymograms. Briefly, the cells were disrupted using glass beads in a 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0; 10 µg of protein was loaded on native Tris-glycine polyacrylamide gels. After electrophoresis, the gels were stained for ADH activity as described [21]. Native gels were scanned in a GS800 densitometer (BioRad). Aconitase enzymatic activity was assayed in a Shimadzu UV-2401PC spectrophotometer, using cis-aconitate as substrate [22]. Heme bound to cytochrome c was detected as described [23], using the Supersignal detection system (Pierce). Superoxide ion levels were measured in a fluorescence microplate reader (Infinite M200, Tekan). Exponentially growing cells were washed in water and resuspended in PBS plus 0.1% glycerol and 5 µg/ml of dihydroethidium (DHE, Fluka). The rate of oxidation of DHE was calculated from the rate of increase in fluorescence for 20 min (excitation 520 nm, emission 590 nm).

3. Results

The present study used yeast *tetO₇-YFH1* mutant strains in which the endogenous *YFH1* gene was substituted by a regulatable Tet promoter that can be repressed by doxycycline. In a previous report [5] we show that Yfh1 protein levels were undetectable in this strain 8 h after doxycycline addition. Compared to wild-type cells, untreated *tetO₇-YFH1* strain showed no differences in growth rate, aconitase activity and iron content. Also, the addition of doxycycline in wild-type cells had no effects on cellular iron content or on the activity of the iron-sulfur-containing enzyme, aconitase. To avoid the Crabtree effect exerted by glucose, most experiments were performed in cells grown in rich media containing glycerol (YPG), which strongly promotes mitochondrial function. It is worth emphasizing that frataxin is a mitochondrial protein and that tissues with high oxygen consumption are the most affected in Friedreich ataxia [24].

3.1. Proteomic analysis

Whole-cell lysates obtained from doxycycline-treated and untreated *tetO₇-YFH1* cells were analyzed by 2D-electrophoresis to identify new protein targets regulated by Yfh1 depletion. These analyses were

performed 14 h after doxycycline addition because we had previously shown that cellular iron uptake systems are already induced at that point, and higher content of antioxidant defenses such as SOD1 can be detected, but respiratory function and iron-sulfur proteins are not yet affected [5]. Thus, this time-point could provide new information on how cells adapt to the loss of frataxin. Proteins from whole-cell lysates were separated by two-dimensional gel electrophoresis and gels were stained with Flamingo for total protein staining. Experiments were performed in triplicate and the 6 resulting gels were analyzed with PD-Quest software in a single matchset. We identified 8 protein spots that had significant (more than two-fold) differences between control and treated cells (6 downregulated and 2 upregulated, Fig. 1). These protein spots were subjected to tryptic digestion and identified by peptide mass fingerprinting analysis or MS/MS Ion Search. They corresponded to five proteins listed in Table 2. Down-regulated spots corresponded to Adh2, Ald4, and Mdh2. Up-regulated spots corresponded to Yhb1 and Lsc1. Adh1 was also identified in spot 7 (up-regulated) but, contrary to Yhb1, its induction was not confirmed by microarray analysis (see below). In addition, intensity coverage was higher for Yfhb1 than for Adh1. Details about identifications are presented in supplemental Tables 1 and 2. Interestingly, the three down-regulated proteins were enzymes required for growth in non-fermentable carbon sources and known to be repressed by glucose.

3.2. Alcohol dehydrogenase in-gel enzymatic activity

One of the targets of the proteomic analysis was the alcohol dehydrogenase isoenzyme Adh2. In *S. cerevisiae*, five alcohol dehydrogenases (Adh1–Adh5) are involved in ethanol metabolism. Adh1p, Adh3p, Adh4p, and Adh5p reduce acetaldehyde to ethanol during glucose fermentation, while Adh2p catalyzes the conversion of ethanol to acetaldehyde. Adh1 and Adh2 are the most abundant isoenzymes. Adh1 accounts for most of the Adh activity in the presence of glucose, while Adh2 is repressed in the presence of glucose and strongly induced in the presence of non-fermentable carbon sources such as glycerol or ethanol [25]. In order to validate the changes observed in Adh2 content by the proteomic analysis, Adh activities were analyzed in native gels. In such gels, Adh1 appears as a slower migrating band than Adh2 [26]. We tested YPG-grown *tetO₇-YFH1* cells untreated or treated by doxycycline at different times. As a control, YPD-grown cells were also included in the analysis. As observed in Fig. 2A, YPD-grown cells presented a single band, which corresponds to Adh1. In YPG-grown untreated cells, a strong induction of Adh2 could be observed, while some remaining Adh1 still could be detected. Upon doxycycline treatment, the Adh2 band strongly decreased, confirming the results from the proteomic analysis. This decrease could be observed 10 h after doxycycline addition and was not reversed at longer incubation times. Adh1 did not show significant changes.

3.3. Microarray DNA analysis

To search for more genes down-regulated in Yfh1 depleted cells, we performed a DNA microarray analysis of doxycycline-treated cells after 10 h of treatment because, as indicated, the Adh activity assay revealed decreased activity of Adh2 at this time-point. Two independent analyses were performed for each strain. Data analysis revealed 78 genes that exhibited more than two-fold changes in expression at 10 h after doxycycline treatment in *tetO₇-YFH1* cells (26 induced; 52 repressed). Data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE44871 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44871>). Visual inspection of these data revealed that *ALD4*, *MDH2* and *YHB1*, three of the targets identified in the proteomic analysis, were also found in the transcriptomic analysis. Another induced gene was *FET3*, involved in iron uptake and previously described to be induced in this strain upon doxycycline addition. *YFH1* presented 8% of its basal level,

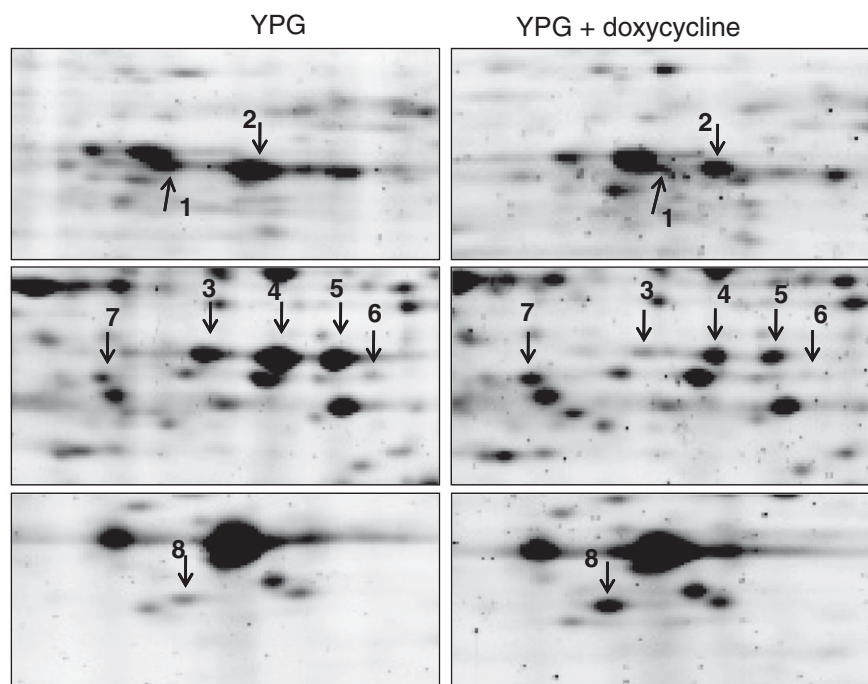


Fig. 1. Analysis of the proteome of *tetO₇-YFH1* cells upon 14 h of doxycycline treatment. Proteins were separated by isoelectric focusing (pH range: 3–10, NL) followed by SDS-PAGE and stained with Flamingo total protein stain. Sections containing the differentially expressed spots are shown. Spot numbers are described in Table 2.

confirming efficient repression of this gene. The lists of repressed and induced genes were analyzed in greater detail using the SGD Gene Ontology Term Finder (Yeast GO: Process). Table 3 shows the repressed genes, classified according to different GO terms. Some of these terms have been omitted from these tables to avoid redundancy. The complete list of GO terms generated by the analysis is provided in supplemental material (Supplemental Table 3). Gene ontology analysis revealed the presence of several genes involved in catabolism of carboxylic acids and fatty acids. This pointed to a rearrangement of the energy metabolism, which would be consistent with the proteomic analysis, as the three targets of the proteomic analysis – *ADH2*, *ALD4*, and *MDH2* – are involved in catabolism of carboxylic acids. Some terms related to coenzyme metabolism also appeared in the analysis. However, most of the genes included in these terms are involved in catabolic processes and the presence of these terms in the analysis may not indicate any specific effect on coenzyme metabolism. Finally,

two catalases and four additional genes involved in response to oxidative stress were identified among the repressed genes. This was an unexpected result, as induction of other antioxidant enzymes has been reported in *Yfh1*-deficient cells [27,28]. Indeed, both SOD isoenzymes are induced in the same conditional mutant upon doxycycline addition [5]. Concerning induced genes, the SGD Gene Ontology Term Finder (Yeast GO: Process) was unable to find significant shared GO terms among these 26 genes. A component analysis using Yeast GO slim mapper revealed the presence of 11 mitochondrial

Table 2

Proteins identified by proteomic analysis in *tetO₇-Yfh1* cells. The indicated proteins correspond to the spots shown in Fig. 1 and were identified by peptide mass fingerprinting analysis or, where indicated, MS/MS ion search using MASCOT as search engine. Relative content was calculated using PDQuest software and represent mean \pm SD from three independent experiments.

Spot	Gene	Protein	Mascot Score	Relative content (YFH1 off/YFH1 on)
1	<i>ALD4</i>	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	79	<0.1
2	<i>ALD4</i>	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	180	0.6191 \pm 0.25
3	<i>ADH2</i>	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II	121	0.1454 \pm 0.046
4	<i>ADH2</i>	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II	119	0.2421 \pm 0.0028
5	<i>ADH2</i>	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II	132	0.2931 \pm 0.047
6	<i>MDH2</i>	Cytoplasmic malate dehydrogenase	105	0.1408 \pm 0.2439
7	<i>YHB1</i>	Flavohemoprotein	58 ^a	2.2501 \pm 0.2174
8	<i>LSC1</i>	Alpha subunit of succinyl-CoA ligase	86	2.2675 \pm 0.4534

^a Two peptides identified by MS/MS ions search.

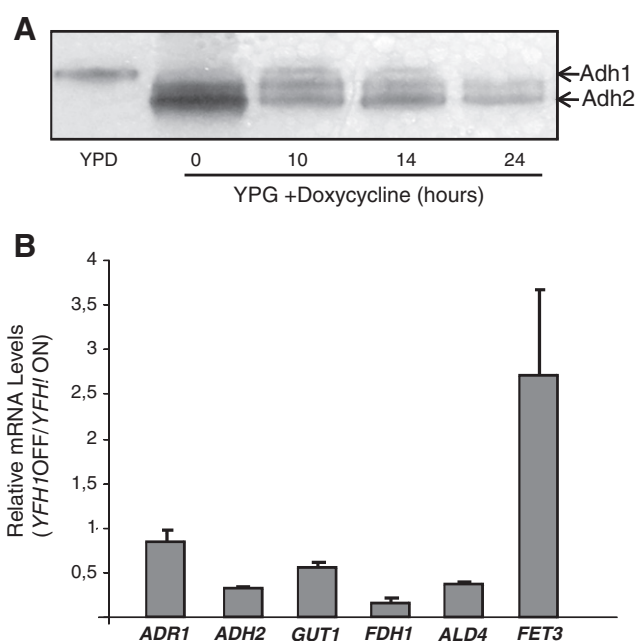


Fig. 2. A) In-gel alcohol dehydrogenase activity levels were tested in crude extracts from *tetO₇-YFH1* cells grown in YPD and YPG supplemented with 2 μ g/ml doxycycline for the indicated times. B) Relative expression of the indicated genes was analyzed by quantitative qPCR in YPG-grown *tetO₇-YFH1* cells at 10 h after addition of doxycycline. Actin expression was used as an internal control to normalize expression levels.

Table 3
Genes repressed (<0.5) after 10 h of doxycycline addition classified according to GO terms. Cluster frequency indicates the number and percentage of repressed genes classified under the indicated GO term. Background frequency indicates the number and percentage of total yeast genes classified under the indicated GO term.

GOID	GO_term	Cluster frequency	Background frequency	Repressed genes annotated to the term
9056	Catabolic process	19, 36.5%	681, 9.5%	<i>TKL2, NDE2, CTA1, POX1, GND2, POT1, YJR096W, FOX2, ALD3, ALD2, PAI3, GAD1, SPS19, GCY1, FDH1, FDH2, CIT3, PDH1, ICL2</i>
19752	Carboxylic acid metabolic process	16, 30.8%	343, 4.8%	<i>ACS1, YAT2, POX1, POT1, FOX2, ALD3, ALD2, GAD1, SPS19, MDH2, ALD4, FDH1, FDH2, CIT3, PDH1, ICL2</i>
55114	Oxidation-reduction process	11, 21.2%	174, 2.4%	<i>ACS1, TKL2, NDE2, GIP2, POX1, GND2, RGI2, POT1, FOX2, ALD4, CIT3</i>
46395	Carboxylic acid catabolic process	10, 19.2%	73, 1.0%	<i>POX1, POT1, FOX2, GAD1, SPS19, FDH1, FDH2, CIT3, PDH1, ICL2</i>
6732	Coenzyme metabolic process	7, 13.5%	124, 1.7%	<i>ACS1, TKL2, NDE2, GND2, ALD4, FDH1, CIT3</i>
6979	Response to oxidative stress	6, 11.5%	87, 1.2%	<i>CTA1, HSP12, CTT1, YJR096W, GAD1, GCY1</i>
46496	Nicotinamide nucleotide metabolic process	5, 9.6%	48, 0.7%	<i>TKL2, NDE2, GND2, ALD4, FDH1</i>
19362	Pyridine nucleotide metabolic process	5, 9.6%	51, 0.7%	<i>TKL2, NDE2, GND2, ALD4, FDH1</i>
46365	Monosaccharide catabolic process	5, 9.6%	51, 0.7%	<i>TKL2, NDE2, GND2, YJR096W, GCY1</i>
72524	Pyridine-containing compound metabolic process	5, 9.6%	53, 0.7%	<i>TKL2, NDE2, GND2, ALD4, FDH1</i>
9062	Fatty acid catabolic process	4, 7.7%	15, 0.2%	<i>POX1, POT1, FOX2, SPS19</i>
19541	Propionate metabolic process	3, 5.8%	5, 0.1%	<i>CIT3, PDH1, ICL2</i>
15696	Ammonium transport	3, 5.8%	6, 0.1%	<i>ADY2, ATO3, ATO2</i>
19483	Beta-alanine biosynthetic process	2, 3.8%	2, <0.1%	<i>ALD3, ALD2</i>
19543	Propionate catabolic process	2, 3.8%	2, <0.1%	<i>CIT3, PDH1</i>

genes (see Supplemental Table 4). Of note, two of them (*YHB1* and *CIR1*) had been previously reported to interact with Yfh1 [9].

3.4. Validation of several targets by qPCR

To validate the targets identified by proteomic and transcriptomic approaches, five target genes were analyzed by qPCR: *FET3*, involved in iron import and a target of Aft1, and four downregulated genes, *ADH2*, *ALD4*, *FDH1* and *GUT1*. Expression levels of all five genes were analyzed after 10 h of doxycycline addition in YPG-grown *tetO7-YFH1* cells. Actin (*ACT1*) expression levels were used for normalization. As shown in Fig. 2B, *FET3* was induced and the other four genes were repressed upon doxycycline addition. Thus, the qPCR analysis confirmed the results of -omics analysis.

3.5. Presence of glucose-repressed genes among the downregulated genes

Both proteomic and transcriptomic analyses revealed the presence of many glucose-repressed genes among the down-regulated proteins or genes. Therefore, we decided to analyze the presence of known glucose-repressed genes among the downregulated genes found in

Table 4

List of the 20 most strongly glucose-repressed genes and their dependence on the regulators Adr1, Snf1 and Cat8 (data according to reference [27]). *yfh1/YFH1*: expression ratios (mean of 2 experiments) found in our analysis at 10 h after doxycycline addition (ratio is *yfh1* off/*YFH1* on). Those genes showing more than two-fold change are shown in bold.

Gene	<i>yfh1/YFH1</i>	ADR1-dependent	SNF1-dependent	CAT8-dependent
<i>FBP1</i>	0.91	–	+	+
<i>JEN1</i>	0.45	+	+	+
<i>SPG1</i>	0.50	+	+	–
<i>PCK1</i>	1.01	–	+	+
<i>SFC1</i>	0.98	–	+	+
<i>RGI2</i>	0.29	+	+	–
<i>SPG4</i>	0.50	+	+	–
<i>ADY2</i>	0.25	+	+	+
<i>ATO3</i>	0.24	+	+	+
<i>FDH2</i>	0.13	+	+	–
<i>CIT3</i>	0.18	+	–	–
<i>POX1</i>	0.24	+	–	+
<i>PDH1</i>	0.50	+	–	–
<i>ACS1</i>	0.16	+	+	+
<i>FDH1</i>	0.12	+	+	–
<i>FAT3</i>	1.11	+	+	+
<i>CTA1</i>	0.26	+	+	+
<i>FOX2</i>	0.42	+	+	–
<i>YGR067C</i>	0.91	–	+	+
<i>YNL195C</i>	0.53	+	+	–

doxycycline-treated *tetO7-YFH1* cells. Using a list of glucose-repressed genes generated by Young and collaborators [29], we focused on the 20 genes that present the strongest changes in expression ratio when de-repressed and glucose-repressed growth conditions are compared. Fourteen genes from this list were downregulated in Yfh1-depleted cells (Table 4), which suggested to us that the activity of a transcription factor involved in glucose repression should be regulated after Yfh1 depletion. Several transcription factors are known to play a central

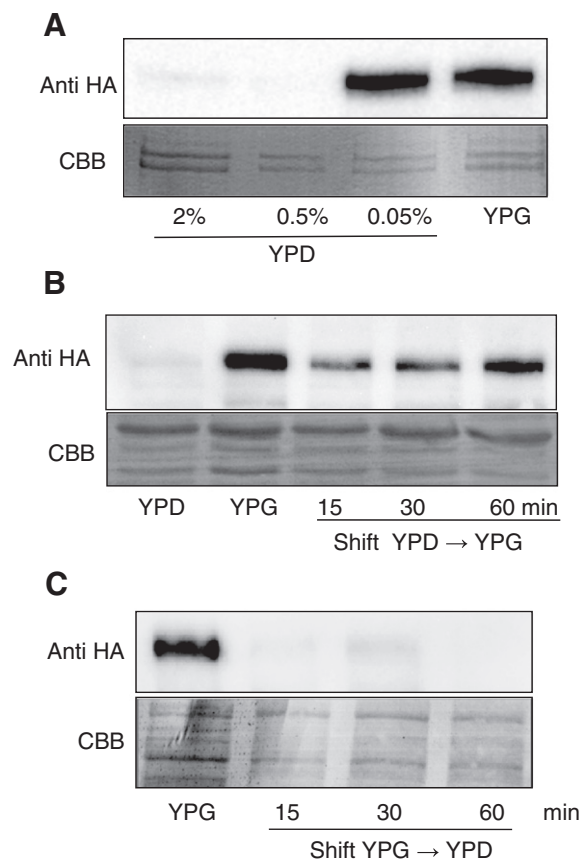


Fig. 3. Adr1-HA protein levels were evaluated in crude extracts by western blot in strain W303 ADR1-HA. A) Adr1 protein levels in cells grown in YPG or YPD media containing the indicated amount of glucose. B) Induction of Adr1 upon transition from YPD to YPG media. C) A shift from YPG to YPD promotes a marked decrease in Adr1 protein levels. Protein load was verified by post-western Coomassie Blue (CBB) staining of the PVDF membranes.

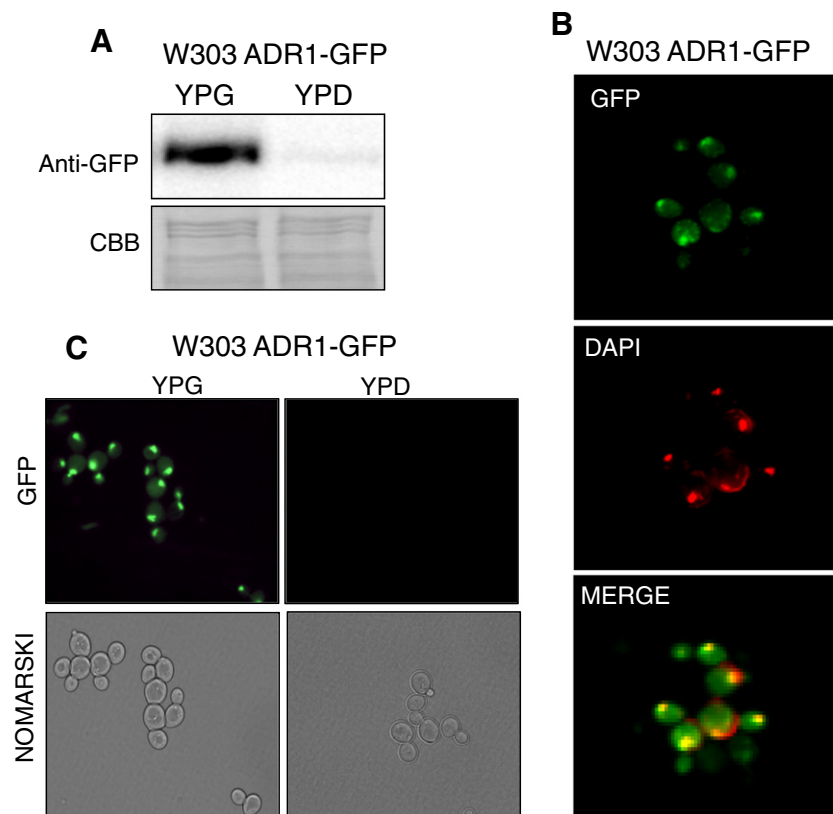


Fig. 4. Cellular localization of Adr1. A) Levels of ADR1-GFP in cells grown in YPG and YPD culture media tested by western blot. B) Exponentially growing W303 ADR1-GFP cells were analyzed for GFP fluorescence in YPG or YPD medium. B) Nuclear co-localization was analyzed with fluorescence microscopy using DAPI staining.

role in metabolic adaptation to carbon sources. The most relevant may be Adr1 and Cat8. Another relevant gene is Snf1, an AMP-activated protein kinase that plays a central role in glucose repression [30]. The list of known genes targeted by these different proteins partly overlaps [29]. Among those shown in Table 4, 16 are regulated by Adr1, 17 by Snf1, and 11 by Cat8. Interestingly, most of these Adr1 targets were downregulated upon Yfh1 depletion (14 from 16), while a lower proportion of Snf1 (11 of 17) and Cat8 (6 of 11) targets were affected by Yfh1 depletion. This observation suggested that Adr1 could play a crucial role in the metabolic rearrangement caused by Yfh1 depletion.

3.6. Changes in Adr1 content and localization upon Yfh1 depletion

From the proteomic and transcriptomic analyses we concluded that several targets of the transcription factor Adr1 were downregulated in Yfh1-deficient cells. Thus, we decided to explore whether or not this transcription factor was inactivated after doxycycline addition in *tetO₇-YFH1* cells. Several mechanisms are known to regulate Adr1 activity. Protein levels increase when glucose is scarce. In addition, Adr1 transcriptional activity can be inhibited by phosphorylation of Ser230 [31] and binding to Bmh proteins [32]. Snf1 plays a role in such regulation, although the precise mechanism is not completely understood. Although regulation by nuclear export has not been described, it should not be excluded because overall analysis of protein localization in yeast (performed in glucose-rich media) indicates that a GFP-tagged version of Adr1 is localized in the cytoplasm [33]. We decided to explore which changes in Adr1 expression or localization were experienced in YPD or YPG media and after doxycycline addition in *tetO₇-YFH1* cells. For this purpose, versions of Adr1 tagged by HA or GFP were prepared in wild-type and *tetO₇-YFH1* strains. In both strains we confirmed that the expression levels of Adr1-HA were lower in cells grown in 2% glucose than in the same strains grown in YPG or low glucose levels (Figs. 3A and 4A). In the GFP-tagged strain, a marked

fluorescent signal was clearly observed in the nucleus of YPG-grown cells, which was confirmed by DAPI staining (Fig. 4B). In YPD-grown cells, the GFP signal was very low (Fig. 4C). We also explored the behavior of Adr1 when cells were shifted from YPD to YPG and vice versa. To perform these experiments, exponentially growing cells were collected, washed in sterile water, and resuspended in the desired media. As shown in Fig. 3B–C, change from YPD to YPG triggered a progressive increase in Adr1 content, while a shift from YPG to YPD triggered a rapid decrease in Adr1 content. We next explored the effects of Yfh1 depletion on Adr1. We did not observe any significant change in Adr1-HA levels by western blot after doxycycline addition (Fig. 5A). We also did not observe changes in *ADR1* mRNA levels analyzed by qPCR (Fig. 2B), a result consistent with the transcriptomic analysis, which found no changes in *ADR1* expression. Nevertheless, by fluorescence microscopy, we observed that Adr1-GFP moved from the nucleus to the cytosol around 10 h after doxycycline addition (Fig. 5B). Such mislocalization of Adr1 may be the reason explaining the decreased expression of its target genes. To rule out the possibility that such a change in localization could be triggered by doxycycline treatment (and not to Yfh1 depletion), W303-Adr1-GFP cells were treated with doxycycline. As shown in Fig. 5C, in this control strain doxycycline did not promote mislocalization of Adr1-GFP.

3.7. Effect of oxidative stress on Adr1 localization

In the previous section we demonstrated that Yfh1 depletion triggers Adr1 inactivation by promoting a change in its subcellular localization without altering its expression or promoting its degradation. This regulation mechanism differs from that exerted by glucose, which promotes degradation of Adr1. We wanted to explore whether other stimuli such as iron starvation or oxidative stress could exert an effect similar to that of Yfh1 depletion. Previous work by our group and others had shown that Yfh1 depletion promoted activation of the iron regulon

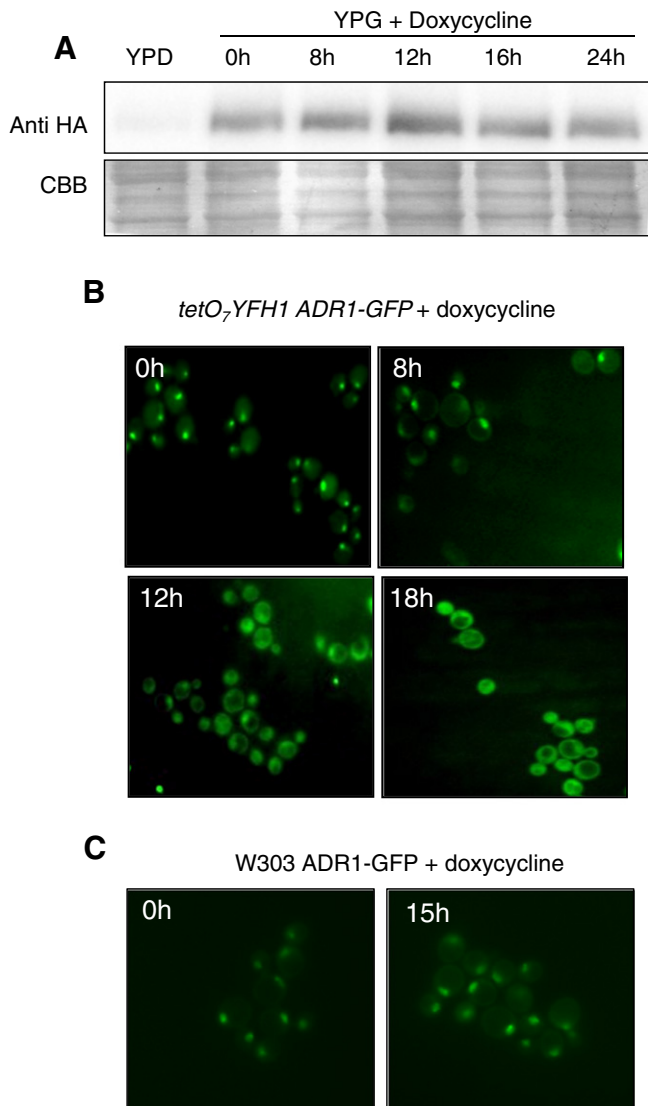


Fig. 5. Adr1 localization shifts from nucleus to the cytoplasm upon doxycycline addition. A) *tetO₇-YFH1 ADR1-HA* cells grown exponentially in YPG were treated with doxycycline. At the indicated times, Adr1-HA content was evaluated by western blot. B) *tetO₇-YFH1 ADR1-GFP* cells grown exponentially in YPG were treated with doxycycline. At the indicated times, images were obtained by fluorescence microscopy. C) *W303 ADR1-GFP* cells grown exponentially in YPG were treated with doxycycline. After 15 h, images were obtained by fluorescence microscopy.

and oxidative stress [2,34]. Indeed, in the conditional model used, both effects occurred early and could be detected before 10 h of doxycycline addition [5]. Thus, we explored the effect of the iron chelator BPS and the oxidant molecule H₂O₂ on localization and content of Adr1 in the W303 Adr1-GFP/HA strains (Fig. 6A and B). BPS was added to the growth media at 100 μM, for 6, 9 and 12 h, conditions which induce the iron regulon as indicated by the measurements in *FET3* expression (Fig. 6C). Under such conditions no changes were observed in Adr1-GFP localization (Fig. 6A). Concerning oxidative stress, we first confirmed that frataxin depletion promoted an increase of the rate of oxidation of the superoxide specific probe DHE. This parameter was increased by 50% in *tetO₇-YFH1* yeast cells after 14 h of doxycycline treatment (supplemental Fig. S1A). We also observed an induction of the antioxidant enzyme SOD1 in frataxin-depleted cells by western-blot (supplemental Fig. S1B), as previously reported [5]. We then explored the effect of H₂O₂, both at low (0.2 mM) and intermediate (1 mM) concentrations on ADR1 localization. Treatment with 1 mM H₂O₂ promoted an effect similar to Yfh1 depletion, as Adr1 exited the

nucleus without changes in its protein content (Fig. 6A and B). These results suggest that under oxidative stress Adr1 behaves as in Yfh1-deficient cells. Treatment with 200 μM H₂O₂ had no effect on Adr1-GFP localization.

We finally analyzed Adr1 localization after depletion of Grx5, another mitochondrial protein involved in iron metabolism. For that purpose, we used a *tetO₇-GRX5 ADR1-GFP* strain, in which Grx5 was under the control of a *tetO₇* promoter. Addition of doxycycline promoted a change in Adr1 localization, similar to that observed in *tetO₇-YFH1* cells (Fig. 6D). This result suggests that depletion of other mitochondrial proteins involved in iron metabolism may promote Adr1 inactivation.

3.8. Cth2 promotes loss of iron–sulfur proteins in Yfh1-deficient cells

Cytosolic localization of Adr1 may explain the changes observed in the expression of several genes after 10 h of frataxin depletion. However growth arrest occurs late (after 24–30 h) and is preceded by a decline in the content and activity of the iron–sulfur enzymes aconitase and succinate dehydrogenase 2 [5]. These two proteins, which are not regulated by Adr1, are targeted by the mRNA-binding protein Cth2, a protein with a central role in yeast metabolism remodeling under low iron conditions. Cth2 is induced by Aft1 after iron starvation and it binds to AU-rich elements located in the 3'UTR of mRNAs coding for several iron-related proteins promoting its degradation [16]. Thus, we decided to analyze Cth2 expression by q-PCR at different times after doxycycline addition. Cth2 experienced a marked induction after 24 h of frataxin depletion (Fig. 7A). We previously reported that the amounts and activity of Aco1 initiated a marked decline after this time-point [5]. Therefore, in order to investigate the contribution of Cth2 to the loss of aconitase, we prepared a double *tetO₇-YFH1Δcth2* mutant and analyzed the content and activity of aconitase, as well as Sdh2 content, after 48 h of growth in the presence of doxycycline. Aconitase activity as well as the amounts of Aco1 and Sdh2 were maintained, compared to the single *tetO₇-YFH1* mutant, which presented a marked loss of both proteins and of aconitase activity (Fig. 7B and C). Similar results were observed with the heme-containing protein Cyc, another target of Cth2 (Fig. 7C). These results indicate that Cth2 mediates a marked metabolic remodeling in Yfh1-deficient cells. Cth2 deletion did not attenuate the oxidative stress phenotype, as the double mutant also presented an increased oxidation rate of DHE when treated with doxycycline (Fig. S1 A, B).

3.9. Cth2 contributes to growth arrest in Yfh1-deficient cells

To further investigate the effect of Cth2 on growth arrest in frataxin-deficient cells, we followed the effect of Yfh1 depletion on the growth rate of the *tetO₇-YFH1* and *tetO₇-YFH1Δcth2* strains. We performed these experiments in 24-well plates containing 1 ml YPG cultures. These plates, containing control cells and doxycycline treated cells, were incubated in a Biotek PowerWave XS Microplate Spectrophotometer. As described in materials and methods, cultures were kept at log phase by diluting in a new plate every 12 h. Optical density was measured every 30 min and generation times were calculated for each culture considering 2 h time-lapses. As observed in Fig. 8A, a significant increase in generation time was observed after 30 h of treatment with doxycycline in *tetO₇-YFH1*. In contrast, such increase was not observed in the double *tetO₇-YFH1Δcth2* mutant (Fig. 8B) suggesting that metabolic remodeling triggered by Cth2 was the main contributor to such growth arrest and that Adr1 inactivation may have minor effects under the culture media tested. Nevertheless, as the Adr1-dependent genes required for growth in ethanol were strongly repressed in the *tetO₇-YFH1* mutant upon doxycycline addition, we analyzed if a decrease in growth rate occurs in *tetO₇-YFH1Δcth2* cells grown in SC-ethanol media. Under these conditions, this mutant showed an increase in generation time 30 h after doxycycline addition. Overall, these experiments indicated that both Cth2 and Adr1 contribute to growth failure in Yfh1 deficient mutants (Fig. 8C).

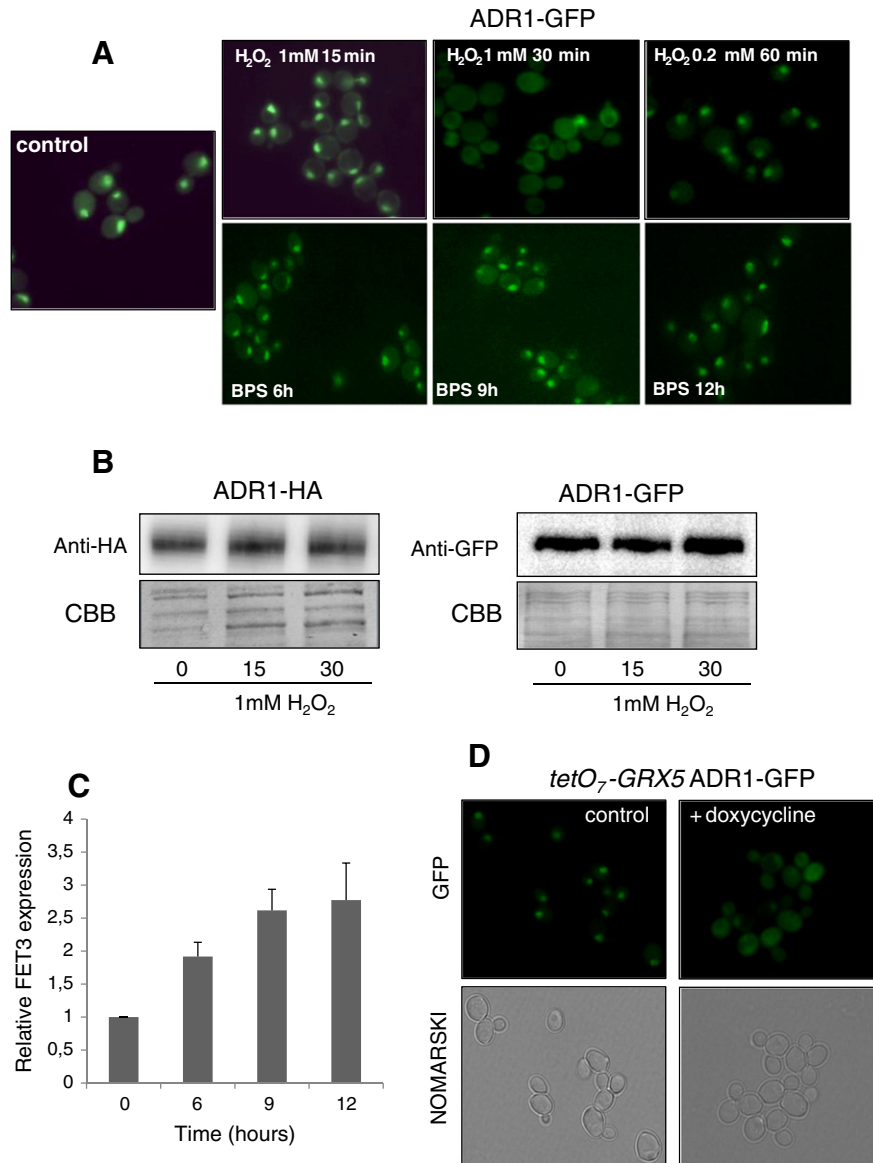


Fig. 6. Adr1 localization shifts from nucleus to the cytoplasm upon H_2O_2 addition. A) W303 *ADR1-GFP* cells grown exponentially in YPG were treated with the indicated compounds and images were obtained by fluorescence microscopy. B) W303 *ADR1-HA* and W303 *ADR1-GFP* cells grown exponentially in YPG were treated with 1 mM H_2O_2 . At the indicated times, Adr1 content was evaluated by western blot with the indicated antibody. C) Induction of FET3 by iron starvation at indicated times using 100 μ M BPS. Relative expression of FET3 was analyzed by qPCR in YPG-grown wild-type cells at indicated times after BPS addition. Reference values are those observed in untreated cells. *ACT1* was used as a control. D) *tetO₇-GRX5 ADR1-GFP* cells grown exponentially in YPG were treated with doxycycline for 14 h. Images were obtained by fluorescence microscopy.

3.10. Cth2 is not involved in aconitase activity loss in *Grx5*-deficient cells

To further analyze the contribution of Cth2 to the loss of aconitase content and activity we decided to use a *tetO₇-GRX5* strain. *Grx5* is a well-known component of the iron–sulfur cluster biogenesis system. *Grx5* deficiency promotes loss of aconitase activity and iron accumulation [18]. Doxycycline addition for 14 h to YPG-grown *tetO₇-GRX5* cells promoted a clear decrease of GRX5, as indicated by western blot (Fig. 9A). Interestingly, aconitase activity shows a progressive decrease (Fig. 9B), which becomes evident immediately upon decrease of *Grx5*. These results are in clear contrast to the events observed in *tetO₇-YFH1* cells after frataxin depletion in which the aconitase activity is maintained even after 24 h after doxycycline treatment [5]. To analyze whether Cth2 is mediating the loss of aconitase activity in *tetO₇-GRX5* mutants, we measured aconitase activity in a *tetO₇-GRX5 Δ cth2* strain 14 h after doxycycline addition (Fig. 9C). In this strain, aconitase activity was not maintained, in contrast to the results obtained in *tetO₇-YFH1 Δ cth2*. This result indicates that Cth2 is not contributing to the decrease of aconitase

activity in *tetO₇-GRX5* cells. Concerning aconitase amounts, a 55% decrease was observed in doxycycline-treated *tetO₇-GRX5* cells. In *tetO₇-GRX5 Δ cth2* strain this decrease was slightly minor (around 40%) (Fig. 9 D and E). Nevertheless, these differences between both strains were not statistically significant.

4. Discussion

Respiratory failure and loss of iron–sulfur proteins are hallmarks of frataxin-deficient cells and have been usually considered direct consequences of the absence of frataxin. We describe here that neither event is caused by the lack of Yfh1 per se. Instead, both events may be caused by Adr1 and Cth2, two regulatory proteins that promote metabolic remodeling in Yfh1-deficient cells in response to the disturbances generated by the lack of this protein.

Our results indicate that Yfh1 depletion promotes the export of Adr1 from the nucleus to the cytosol by still unknown mechanisms. This regulation differs from that exerted by the presence of glucose, which

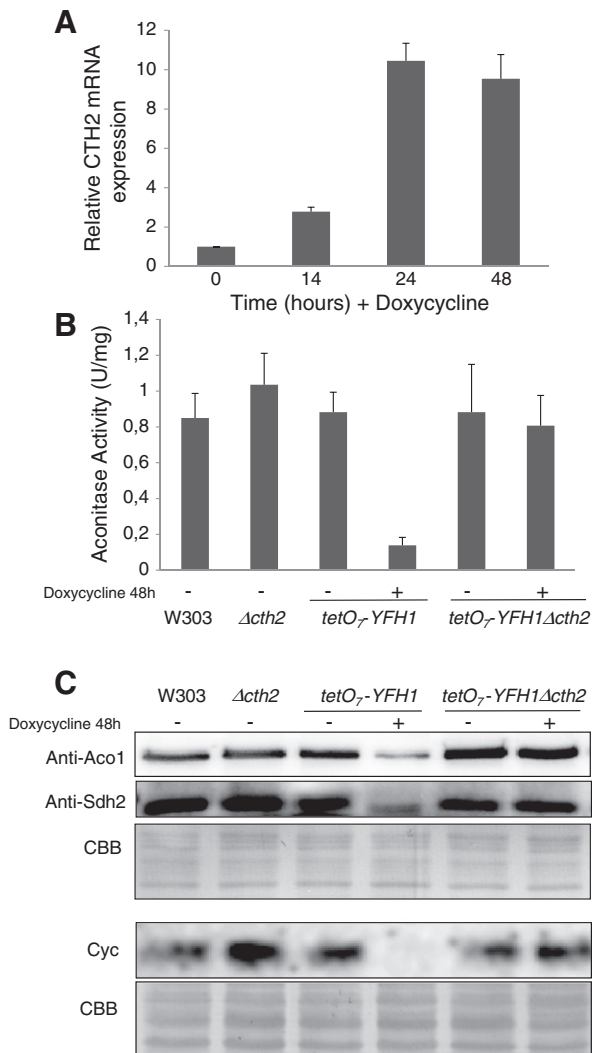


Fig. 7. A) Relative *CTH2* expression was analyzed by qPCR in YPG-grown *tetO₇-YFH1* cells after addition of doxycycline for the indicated times. Actin expression was used as an internal control to normalize expression levels. B) Aconitase activity was measured in whole cell extracts of the indicated strains grown in YPG media. Where indicated, doxycycline was added to the growth media for 48 h. Units represent $\mu\text{mol}/\text{min}$. C) Aconitase and succinate dehydrogenase were detected by western blot using specific antibodies. Cytochrome C (Cyc) was detected based on its peroxidase activity in whole cell lysates separated by non-reducing SDS-PAGE blotted onto a PVDF membrane. CBB staining was used as loading control.

affects Adr1 protein levels and chromatin binding [29]. Adr1 export may be part of a regulatory pathway leading to downregulation of proteins required for respiratory growth under stress conditions. Remarkably, oxidative stress (in the form of H_2O_2) clearly promoted Adr1 mislocalization, while iron overload or starvation did not promote such changes. Adr1 export was also observed in the absence of Grx5, a mitochondrial protein related to iron metabolism and oxidative stress [18]. Adr1 mislocalization may allow a rapid and reversible way to arrest growth under adverse conditions, and also rapid restoring of functions once the stress conditions have been overcome. Thus, our hypothesis is that lack of Yfh1 would promote oxidative stress, which in turn would lead to Adr1 inactivation and decreased expression of genes required for respiratory growth. Oxidative stress is found in most models of FRDA, although the precise mechanism linking frataxin deficiency and oxidative stress are not clearly established. It has been suggested that misregulation of iron–sulfur biogenesis in the absence of frataxin would lead to oxidative stress [34]. Alternative roles suggested for frataxin, such as iron storage or detoxification [8] or electron transfer to flavoproteins [9] could also explain how the lack of frataxin would lead to oxidative stress.

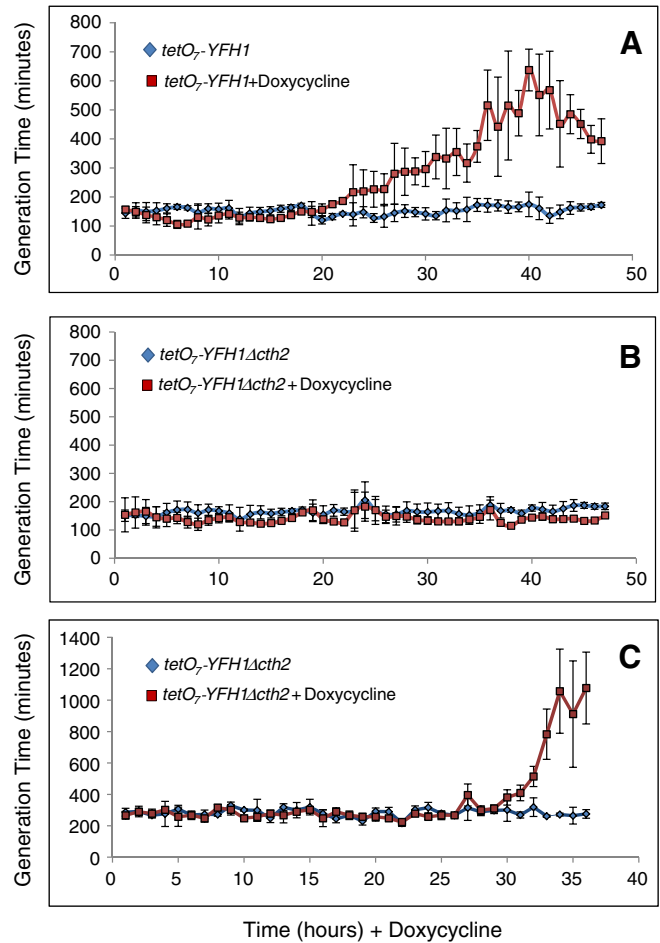


Fig. 8. Growth curves of *tetO₇-YFH1* (A) and *tetO₇-YFH1 $\Delta acth2$* (B) cells grown on YPG. Bottom panel (C) shows *tetO₇-YFH1 $\Delta acth2$* cells grown on SC-ethanol. Cultures were grown in 24-well plates in culture media not containing (blue line) or containing 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline (red line). Generation time was calculated for each condition as explained under experimental procedures. Data are represented as mean \pm confidence intervals ($p < 0.05$) from five independent cultures.

The pathway leading to Adr1 export and the proteins involved in such a process are not known. Adr1 may suffer a posttranslational modification upon stress that could promote a change in cellular localization. Adr1 is known to be modified by phosphorylation in several residues. The most studied modifications are ser98 and ser230 [31]. Additional phosphorylation sites have been identified in high-throughput studies [35], but the effect of such modifications on Adr1 are not known. Cysteine modification could be another posttranslational modification that could promote changes in Adr1 localization. H_2O_2 is known to promote oxidation of transcription factors such as Yap1. However, there are two arguments against cysteine modification. First, nuclear export occurs at 1 mM, but not at a 200 μM H_2O_2 concentration. Both in *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, oxidation of Yap1 or its ortholog Pap1 are triggered by low (200 μM) H_2O_2 concentrations, while higher H_2O_2 concentrations regulate the phosphorylation of proteins related to MAPK pathways such as Slit2 [36] or Sty1 [37]. Second, nuclear export is not observed 15 min after treatment, while Yap1 import can be observed 5 min after H_2O_2 treatment [38]. Nevertheless, we should be cautious about this conclusion, as most experiments in the literature were performed in glucose-rich media and our experiments were performed in YPG media. Cells grown in this non-fermentable carbon source are more resistant to oxidative stress than YPD-grown cells [39]. Another point of interest would be the identification of the upstream regulators of Adr1. Snf1 has been described to modify Adr1 and participate in the inactivation of Adr1 by

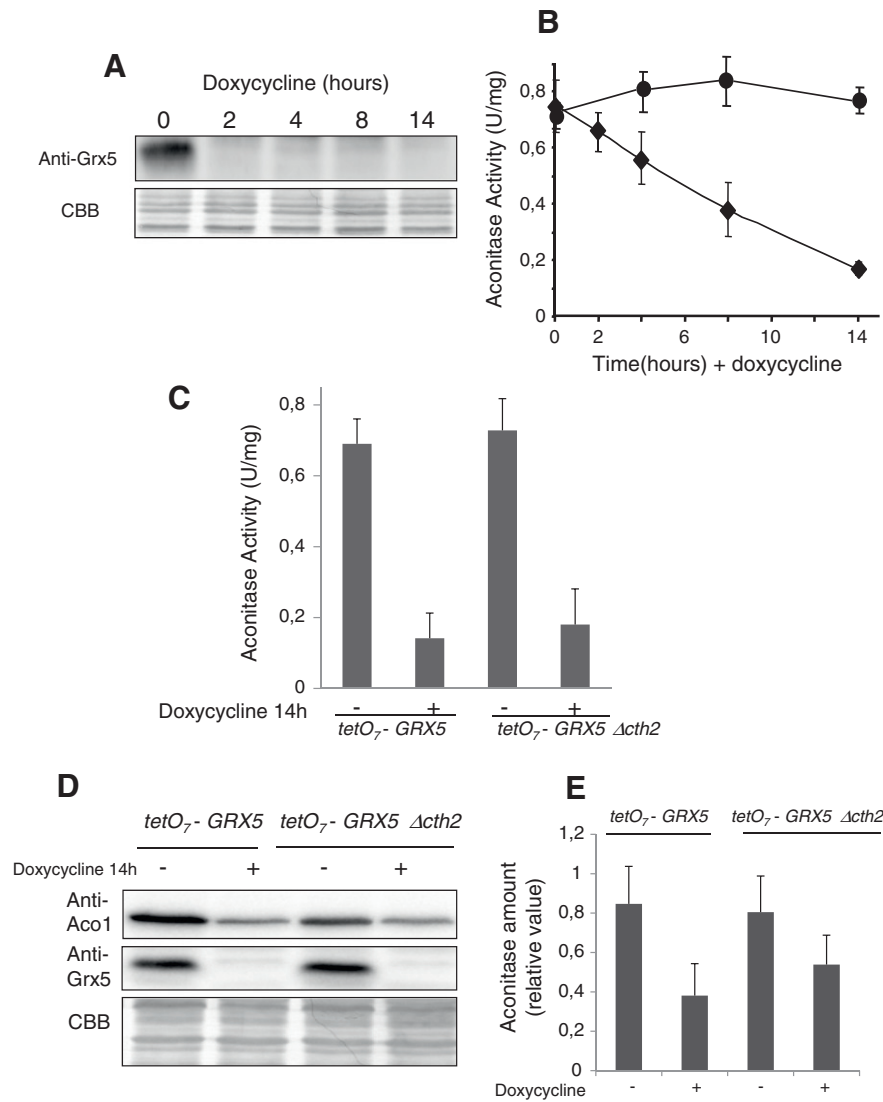


Fig. 9. Effect of Grx5 in aconitase amount and activity. A) Grx5 depletion after doxycycline treatment. B) Aconitase activity tested on *tetO₇-GRX5* strain after doxycycline addition (◆). Aconitase activity in a *tetO₇-YFH1* (●) after doxycycline addition was also included for comparison. (C) Comparison of aconitase activity on a *tetO₇-GRX5* and *tetO₇-GRX5 Δact2* at the indicated time after doxycycline addition. (D) A representative image of aconitase amounts were measured in *tetO₇-GRX5* and *tetO₇-GRX5Δact2* strains grown in YPG at indicated times after doxycycline addition. Grx5 depletion in both strains is also shown. Coomassie stained gels are used as loading controls. The histogram shown in (E) represents mean ± confidence intervals ($p < 0.05$) of aconitase amounts measured from western blots of four independent experiments.

glucose, but its contribution in this stress response seems not very probable as genes down-regulated after Yfh1 depletion do not include some clear Snf1 targets such as *FBP1* or *PCK1*.

The results shown in the present paper let us conclude that loss of iron–sulfur proteins in Yfh1-deficient cells is mediated by Cth2 and that Yfh1 is not essential for iron–sulfur biogenesis. This process is preserved in the *tetO₇-YFH1Δact2* mutant, as judged by maintenance of aconitase and succinate dehydrogenase activities when Yfh1 was absent. In contrast, *CTH2* deletion does not prevent aconitase activity loss in Grx5-deficient cells. Decrease of aconitase amounts observed in Grx5-deficient cells could be mostly attributable to destabilization of the apoform as in *tetO₇-GRX5Δact2* cells normal aconitase amounts are not restored.

This paper also shows that Cth2 and Adr1 would be involved in growth arrest. In YPG media, the contribution of Cth2 seems to be preponderant since its deletion prevents growth arrest. Sustained growth in *tetO₇-YFH1Δact2* cells (despite Adr1 inactivation) could be explained by the utilization of alternative carbon sources present in

the rich media such as amino acids. Enzymes required for amino acid utilization are not targets of Adr1; also, remaining Gut1 levels (around 50%) may still allow some glycerol utilization. The role of Adr1 in growth arrest is highlighted when cells are grown in SC-ethanol, where no alternative carbon substrates can be used as energy supply.

Cth2 is under the control of Aft1 [15] and the maximal induction of Cth2 arrives at 24 h. This seems to disagree with Aft1 activation which occurs as an early event after frataxin depletion. As described recently [40], a possible explanation could come from the fact that there exist auto- and cross-regulation between Cth1 and Cth2 to fine tune protein levels in response to iron deficiency. According to this regulation, when Fe is scarce Cth1 levels will rise at the beginning but if the situation persists over time, then Cth2 is the dominant regulator and responsible for the massive metabolic remodeling.

As Cth2 is under Aft1 control, the key point is to understand how the lack of frataxin activates the iron regulon in yeast and whether or not a regulatory [7], non-essential role of frataxin in iron–sulfur biogenesis could trigger such an activation without compromising the activity of

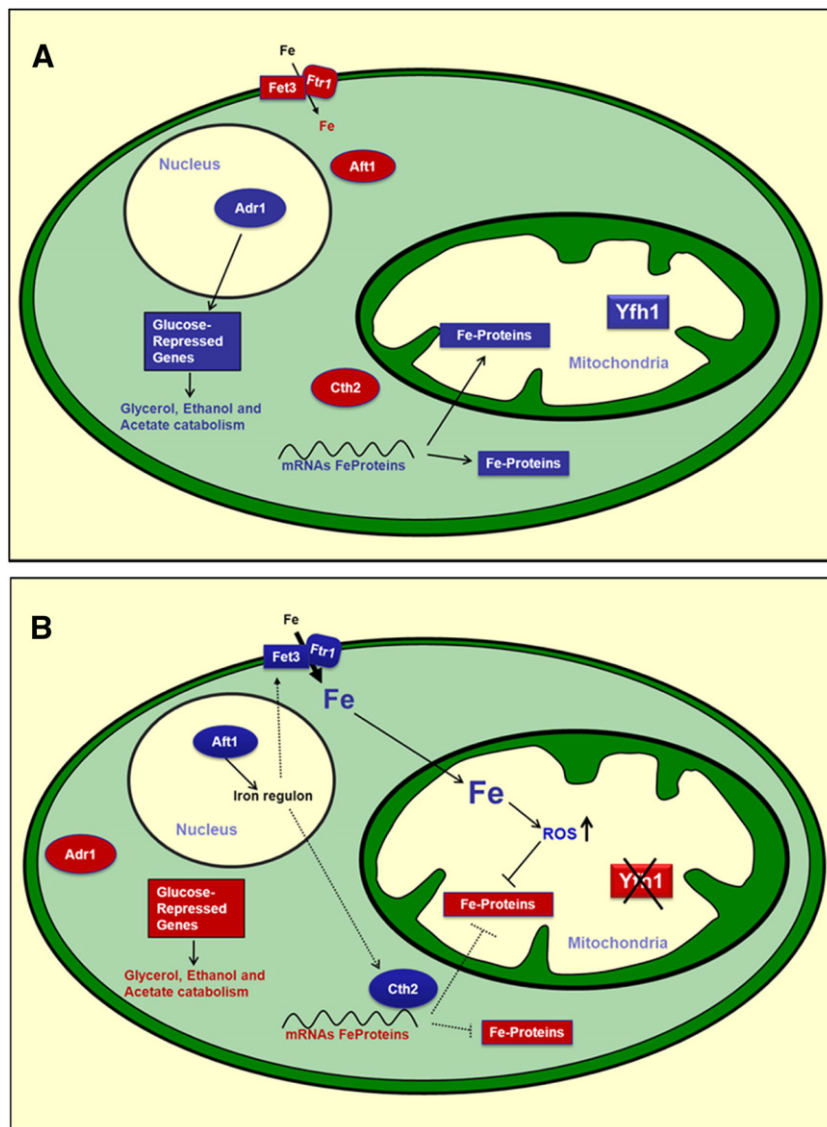


Fig. 10. Metabolic remodeling upon Yfh1 depletion. (Activated or induced pathways are shown in blue, while repressed or inactivated pathways are shown in red). (A) Under basal conditions, Adr1 is located in the nucleus where promotes the expression of glucose-repressed genes required for glycerol, ethanol and acetate catabolism. Aft1 would be preferentially located in the cytosol and consequently levels of Cth2 and iron uptake systems are low. (B). Upon Yfh1 depletion, Aft1 is activated and iron acquisition is increased through Fet3-Ftr1. Cth2 is induced and would trigger degradation of mRNAs coding for iron-containing proteins (including iron-sulfur proteins). Adr1 will exit from the nucleus and consequently, glucose-repressed genes will not be expressed.

iron-sulfur enzymes. Nevertheless, a similar situation may occur in other organisms, because most of them present pathways that lead to decreased expression of iron-sulfur proteins under iron-limiting conditions. Recently, it has been shown that loss of iron-sulfur proteins in frataxin deficient *S. pombe* is mediated by the repressor Php4 [41], a protein with a Cth2-like function. In mammals, iron-regulatory proteins 1 and 2 bind to iron-responding elements present in the mRNAs coding for mitochondrial aconitase or succinate dehydrogenase and inhibit their translation upon iron starvation [42]. In mammals, down-regulation of iron requiring genes is mediated by TTP, a Cth2 homolog which is induced by iron starvation [43].

Besides Adr1 and Cth2, it is worth mentioning the flavohemoprotein Yhb1, as induction of this protein was observed in both the proteomic and the transcriptomic analysis. This protein has nitric oxide reductase activity and participates in nitric oxide detoxification [44]. Interestingly, Yhb1 has been described to interact with Yfh1 [9]. Null Yhb1 mutants showed decreased resistance to the iron chelator ferrozine in a large scale survey [45], suggesting a role for this protein in iron metabolism. These intriguing coincidences certainly deserve future research.

5. Conclusion

We have described that frataxin deficiency in yeasts affects two regulatory networks that promote metabolic remodeling which would be responsible for many phenotypes observed in frataxin-deficient yeast. Fig. 10 summarizes the main events described in this paper. Similar responses could occur in mammalian cells mediated by other signaling proteins. We conclude that many effects observed in frataxin deficient cells may be caused by metabolic remodeling, which in humans will contribute to Friedreich ataxia pathophysiology.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.09.019>.

Acknowledgements

We thank Roser Pané for the technical assistance. We also thank Elaine Lilly, Ph.D., for the English language review. This work was supported by grants to J.R. BFU2010-19193, and CSD2007-00020 Consolider Ingenio 2010 from Ministerio de Economía y Competitividad

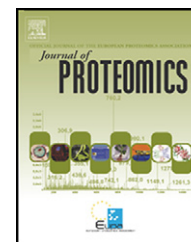
(Spain), SGR2009-00196 from the Generalitat de Catalunya and to J.T. from La Marató de TV3 2010.

References

- [1] M. Pandolfo, Friedreich ataxia: the clinical picture, *J. Neurol.* 256 (Suppl. 1) (2009) 3–8.
- [2] 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.
- [3] S. Schmucker, A. Martelli, F. Colin, A. Page, M. Wattenhofer-Donze, L. Reutenauer, H. Puccio, Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron–sulfur assembly complex, *PLoS One* 6 (2011) e16199.
- [4] P.R. Anderson, K. Kirby, W.C. Orr, A.J. Hilliker, J.P. Phillips, Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 611–616.
- [5] A. Moreno-Cermeño, E. Obis, G. Belli, E. Cabisco, J. Ros, J. Tamarit, Frataxin depletion in yeast triggers up-regulation of iron transport systems before affecting iron–sulfur enzyme activities, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 41653–41664.
- [6] H. Yoon, R. Golla, E. Lesuisse, J. Pain, J.E. Donald, E.R. Lyver, D. Pain, A. Dancis, Mutation in the Fe–S scaffold protein Isu bypasses frataxin deletion, *Biochem. J.* 441 (2012) 473–480.
- [7] J. Bridwell-Rabb, C. Iannuzzi, A. Pastore, D.P. Barondeau, Effector role reversal during evolution: the case of frataxin in Fe–S cluster biosynthesis, *Biochemistry* 51 (2012) 92506–92514.
- [8] U. Schagerlof, H. Elmlund, O. Gakh, G. Nordlund, H. Hebert, M. Lindahl, G. Isaya, S. Al-Karadaghi, Structural basis of the iron storage function of frataxin from single-particle reconstruction of the iron-loaded oligomer, *Biochemistry* 47 (2008) 4948–4954.
- [9] P. Gonzalez-Cabo, R.P. Vazquez-Manrique, M.A. Garcia-Gimeno, P. Sanz, F. Palau, Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2091–2098.
- [10] I. Condo, F. Malisan, I. Guccini, D. Serio, A. Rufini, R. Testi, Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 1221–1229.
- [11] W.H. Swanson, C.E. Clifton, Growth and assimilation in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 56 (1948) 115–124.
- [12] R. Diaz-Ruiz, N. Averet, D. Araiza, B. Pinson, S. Uribe-Carvajal, A. Devin, M. Rigoulet, Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 26948–26955.
- [13] E. Rozpedowska, L. Hellborg, O.P. Ishchuk, F. Orhan, S. Galafassi, A. Merico, M. Woolfit, C. Compagno, J. Piskur, Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts, *Nat. Commun.* 2 (2011) 302.
- [14] R. Ghillebert, E. Swinnen, J. Wen, L. Vandesteene, M. Ramon, K. Norga, F. Rolland, J. Winderickx, The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation, *FEBS J.* 278 (2011) 3978–3990.
- [15] C.C. Philpott, S. Leidgens, A.G. Frey, Metabolic remodeling in iron-deficient fungi, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 1509–1520.
- [16] S. Puig, S.V. Vergara, D.J. Thiele, Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency, *Cell Metab.* 7 (2008) 555–564.
- [17] C. Janke, M.M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel, M. Knop, A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes, *Yeast* 21 (2004) 947–962.
- [18] M.T. Rodríguez-Manzanique, J. Tamarit, G. Belli, J. Ros, E. Herrero, Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 1109–1121.
- [19] L. Viladevall, R. Serrano, A. Ruiz, G. Domenech, J. Giraldo, A. Barcelo, J. Arino, Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 43614–43624.
- [20] M.W. Pfaffl, Relative quantification, in: T. Dorak (Ed.), *Real-time PCR*, Taylor and Francis Group, New York, 2006, pp. 63–82.
- [21] G.P. Manchenko, *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 1994.
- [22] J. Robinson, L. Brent, B. Sumegi, P. Srerre, *Mitochondria: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK, 1987, 153–179.
- [23] C. Vargas, A.G. McEwan, J.A. Downie, Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence, *Anal. Biochem.* 209 (1993) 323–326.
- [24] J. Kaplan, Friedreich's ataxia is a mitochondrial disorder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 10948–10949.
- [25] O. de Smidt, J.C. du Preez, J. Albertyn, The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review, *FEMS Yeast Res.* 8 (2008) 967–978.
- [26] G. Reverter-Branchat, E. Cabisco, J. Tamarit, M.A. Sorolla, M. Angeles de la Torre, J. Ros, Chronological and replicative life-span extension in *Saccharomyces cerevisiae* by increased dosage of alcohol dehydrogenase 1, *Microbiology* 153 (2007) 3667–3676.
- [27] V. Irazusta, E. Cabisco, G. Reverter-Branchat, J. Ros, J. Tamarit, Manganese is the link between frataxin and iron–sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 12227–12232.
- [28] V. Irazusta, E. Obis, A. Moreno-Cermeño, E. Cabisco, J. Ros, J. Tamarit, Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 411–420.
- [29] E.T. Young, K.M. Dombek, C. Tachibana, T. Ideker, Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 26146–26158.
- [30] B. Turcotte, X.B. Liang, F. Robert, N. Soontornngun, Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast, *FEMS Yeast Res.* 10 (2010) 2–13.
- [31] S. Ratnakumar, N. Kacheroovsky, E. Arms, E.T. Young, Snf1 controls the activity of adr1 through dephosphorylation of Ser230, *Genetics* 182 (2009) 735–745.
- [32] P.K. Parua, S. Ratnakumar, K.A. Braun, K.M. Dombek, E. Arms, P.M. Ryan, E.T. Young, 14-3-3 (Bmh) proteins inhibit transcription activation by Adr1 through direct binding to its regulatory domain, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 5273–5283.
- [33] W.K. Huh, J.V. Falvo, L.C. Gerke, A.S. Carroll, R.W. Howson, J.S. Weissman, E.K. O'Shea, Global analysis of protein localization in budding yeast, *Nature* 425 (2003) 686–691.
- [34] S. Adinolfi, C. Iannuzzi, F. Prisch, C. Pastore, S. Iametti, S.R. Martin, F. Bonomi, A. Pastore, Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron–sulfur cluster formation catalyzed by IscS, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 390–396.
- [35] C.P. Albuquerque, M.B. Smolka, S.H. Payne, V. Bafna, J. Eng, H. Zhou, A multi-dimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 1389–1396.
- [36] F. Vilella, E. Herrero, J. Torres, M.A. de la Torre-Ruiz, Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 9149–9159.
- [37] A.P. Vivanos, M. Jara, A. Zuin, M. Sanso, E. Hidalgo, Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways, *Mol. Genet. Genomics* 276 (2006) 495–502.
- [38] A. Delaunay, A.D. Isnard, M.B. Toledano, H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor, *EMBO J.* 19 (2000) 5157–5166.
- [39] E. Cabisco, E. Piulats, P. Echave, E. Herrero, J. Ros, Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27393–27398.
- [40] M. Martínez-Pastor, S.V. Vergara, S. Puig, D.J. Thiele, Negative feedback regulation of the yeast CTH1 and CTH2 mRNA binding proteins is required for adaptation to iron deficiency and iron supplementation, *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 2178–2187.
- [41] N. Gabrielli, J. Ayte, E. Hidalgo, Cells Lacking Pfh1, a fission yeast homolog of mammalian frataxin, display constitutive activation of the iron starvation response, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 43042–43051.
- [42] M. Sanchez, B. Galy, B. Schwanhäusser, J. Blake, T. Bahr-Ivacevic, V. Benes, M. Selbach, M.U. Muckenthaler, M.W. Hentze, Iron regulatory protein-1 and -2: transcriptome-wide definition of binding mRNAs and shaping of the cellular proteome by iron regulatory proteins, *Blood* 118 (2011) 168–179.
- [43] M. Bayeva, A. Khechaduri, S. Puig, H.C. Chang, S. Patial, P.J. Blackshear, H. Ardehali, mTOR regulates cellular iron homeostasis through tristetraprolin, *Cell Metab.* 16 (2012) 645–657.
- [44] N. Cassanova, K.M. O'Brien, B.T. Stahl, T. McClure, R.O. Poyton, Yeast flavohemoglobin, a nitric oxide oxidoreductase, is located in both the cytosol and the mitochondrial matrix: effects of respiration, anoxia, and the mitochondrial genome on its intracellular level and distribution, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7645–7653.
- [45] H. van Bakel, E. Strengman, C. Wijmenga, F.C. Holstege, Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism, *Physiol. Genomics* 22 (2005) 356–367.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides

Jordi Tamarit, Anouk de Hoogh, Elia Obis, David Alsina, Elisa Cabiscol, Joaquim Ros*

Departament de Ciències Bàsiques, IRB Lleida, University of Lleida, Lleida, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2011

Accepted 30 April 2012

Available online 8 May 2012

Keywords:

Protein carbonyls

Oxidative stress

Yeast

Fluorescent hydrazides

ABSTRACT

Protein carbonyl detection has been commonly used to analyze the degree of damage to proteins under oxidative stress conditions. Most laboratories rely on derivatization of carbonyl groups with dinitrophenylhydrazine followed by Western blot analysis using antibodies against the dinitrophenyl moiety. This paper describes a protein carbonyl detection method based on fluorescent Bodipy, Cy3 and Cy5 hydrazides. Using this approach, Western blot and immunodetection are no longer needed, shortening the procedure and increasing accuracy. Combination of Cy3 and Cy5 hydrazides allows multiplexing analyses in a single two-dimensional gel. Derivatization with Bodipy hydrazide allows easy matching of the spots of interest and those obtained by general fluorescent protein staining methods, which facilitates excising target proteins from the gels and identifying them. This method is effective for detecting protein carbonylation in samples of proteins submitted to metal-catalyzed oxidation “in vitro” and assessing the effect of hydrogen peroxide and chronological aging on protein oxidative damage in yeast cells.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oxidative stress is described as a situation in which the cell antioxidant defenses are insufficient to completely inactivate the reactive oxygen species (ROS) [1]. This imbalance between production and destruction of ROS can affect cellular components and structures [2–5]. Many of the changes that occur during aging and during the progression of certain diseases are a consequence of oxidative stress [6,7]. Oxidatively modified proteins suffer structural changes which lead to partial or total loss of their function [4,8,9]. In this context, protein oxidative damage plays an important role in aging and in atherosclerosis, cancer and several neurodegenerative diseases [10]. Oxidative modification of proteins by ROS mainly affects amino acid side chains, and carbonyl groups are among the products of such modification. Their detection and quantification have become the most accepted method for measuring oxidative protein

damage in situations where oxidative stress plays a role. Protein carbonyl groups can be generated by metal-catalyzed oxidation (MCO) [11], by addition of oxidized sugars or by reaction with lipid peroxidation products [12]. Detection and quantitative analysis of carbonyl groups have been based on the formation of stable hydrazones after derivatization with dinitrophenylhydrazine (DNPH). Antibodies against dinitrophenyl allow the immunodetection of this compound bound to proteins using classic Western blot techniques [13–16]. Carbonyl groups can also be detected by hydrazides, which react specifically with protein carbonyls by forming a Schiff base; this can be stabilized by reduction with cyanoborohydride reviewed in [17]. The advantages of this approach are a greater stability of the final reaction product and the presence of a wide range of functional groups coupled to the hydrazide moiety, allowing the design of strategies for detection or capture of carbonylated proteins. One example is the use of biotin hydrazide [18,19], the method of

* Corresponding author at: Biochemistry of Oxidative Stress Group, IRB Lleida. University of Lleida, Av. Montserrat Roig 2, 25008-Lleida, Spain. Tel.: +34 973702275; fax: +34 973702426.

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

choice to track protein damage, allowing its isolation and further identification by mass spectrometry. Here we describe a method for easy detection of protein carbonyls based on fluorescent hydrazides, which avoids Western-blot methods to detect the derivatized proteins and allows timely detection and excision of the protein spot after two-dimensional gel electrophoresis for further identification. Multiplexing experiments also can be performed. We tested this approach on an analysis of oxidatively modified *Saccharomyces cerevisiae* proteins during chronological aging or by hydrogen peroxide stress and considered the effect of the MCO system on purified pyruvate kinase.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The Cy5 hydrazide (PA15120) and Cy3 hydrazide (PA13120) were obtained from GE Healthcare. BodipyFL hydrazide (D-2371) was purchased from Invitrogen. Acrylamide solutions and electrophoresis reagents from BioRad. Pyruvate kinase (ref. P1506) and the rest of the reagents were from Sigma.

2.2. Organisms, cell cultures and protein extraction

The wild type strain used in this study was *S. cerevisiae* W303-1A (MATa *ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1*). Yeast cells were grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone with 2% glucose) by incubation in a rotary shaker at 30 °C (160 rpm). Cultures of exponentially growing cells at optical densities (OD) ranging from 0.5 to 0.7 ($\lambda = 600$ nm) were challenged with 2 mM H₂O₂ for 45 min at 30 °C. Chronological aged cells were obtained after 7 and 14 days of culture on YPD media. Cells were then collected by centrifugation (5 min at 4000 rpm, 4 °C), washed once with MilliQ water and centrifuged again. Pellets were resuspended in 25 mM Tris buffer pH 8 plus 8 M urea and a protease inhibitor cocktail (Sigma P8215). Crude extracts were obtained by cell disruption in a Mini-Beadbeater-16 (Biospec Products Inc.) using acid-washed glass beads with a particle size of 425–600 μ m (3 strokes of 45 s at 550 rpm). After removing glass beads, the cell extracts were cleared by centrifugation at 12,000 rpm for 5 min at 4 °C. The protein was quantified by the Bradford method.

2.3. Metal-catalyzed oxidation of pyruvate kinase

Protein oxidation was achieved by using an ascorbate/iron system. Inactivation of the enzyme was performed in opened 1.5 ml polypropylene tubes in a Thermomixer Comfort (Eppendorf) for 30 min at 20 °C and 1000 rpm. The reaction mixture (20 μ l) contained 9 pmol of pyruvate kinase, 50 μ M FeCl₃ and 10 mM ascorbate in 50 mM MES–KOH buffer pH 6.2.

2.4. Derivatization procedure

The BodipyFL-hydrazide (Bodipy-Hz) and cyanine dyes (Cy3-Hz and Cy5-Hz) were diluted to 50 mM in DMSO and stored at –80 °C. For protein carbonyl derivatization, the stock solution of the corresponding hydrazide was diluted 1:10 in

0.1 M sodium acetate pH 5, 1 mM EDTA and 1% SDS. Then 50 μ l of this solution was added to 50 μ l of protein sample containing 50 μ g of protein (either purified pyruvate kinase or from crude extracts). The mixture was incubated at 25 °C at 500 rpm in a Thermomixer Comfort. After the desired incubation time, 27.5 μ l of 2 M Tris and 7.5 μ l of 0.2 M NaCNBH₄ were added to the reaction mixture and incubated at 25 °C for 15 min. This treatment stops the reaction and stabilizes the hydrazone formed. A scheme of the reaction is shown in Fig. S1. When indicated, the derivatized proteins were precipitated by adding 13.5 μ l of 100% TCA and kept for 30 min on an ice bath. Proteins were concentrated by centrifugation at 14,500 rpm for 5 min and the pellets washed by repeating 3 cycles of ethanol/ethyl acetate (50% v/v), and then centrifuged at 14,500 rpm 5 min. For polyacrylamide gel electrophoresis, samples were resuspended in Laemmli's sample buffer and loaded on a 10% SDS-PAGE. For 2D-gel electrophoresis pellets were air dried and resuspended in Protein Extraction Reagent type 4 (C0356 Sigma), which consists of 40 mM Trizma Base, 7.0 M urea, 2.0 M thiourea and 1% C7BzO with low agitation for 2 h.

2.5. Two-dimensional electrophoresis

A volume of 200 μ l containing 100 μ g of protein in Protein Extraction Reagent type 4 was used to rehydrate 11 cm IPG strips (3–10 NL, BioRad) for 12 h and then focused using a Protean IPG Cell (BioRad) for a total of 31250 Vhr. After isoelectric focusing, strips were incubated for 15 min in 6 M urea, 2% SDS, 20% glycerol, 375 mM Tris pH 8.8 and 130 mM DTT. For alkylation, strips were incubated with 135 mM iodoacetamide in the same buffer (without DTT) for an additional 15 min period. Two parallel 11-cm strips (control and oxidized samples) were loaded side by side on the same 10% polyacrylamide gel (crosslinker ratio 37.5:1) using an EttanDalt 6-electrophoresis system (GE Healthcare). Derivatized proteins were visualized by epifluorescence in a VersaDoc MP4000 imager (BioRad) using specific channel settings for Bodipy, Cy3 and Cy5 dyes. Once this image was captured, the total protein was stained with Flamingo fluorescent gel stain (BioRad) and the resulting images were superimposed on those obtained from the Cy or Bodipy. Images were analyzed with PDQuest Advanced software (BioRad).

2.6. Protein identification by tryptic digestion and MALDI-TOF

Protein spots were excised from gels and subjected to *in gel* digestion with trypsin on a perforated microtiter plate (Proxeon Biosystems). Gel pieces were washed with MilliQ water and dehydrated with 50 mM ammonium bicarbonate/50% ethanol solution for 10 min followed by 10 min with 100% ethanol. Reduction and alkylation of cysteines were performed as follows: i) 10 mM DTT/50 mM ammonium bicarbonate; ii) 55 mM iodoacetamide/50 mM ammonium bicarbonate; iii) two washes (15 min each) with 50 mM ammonium bicarbonate; iv) dehydration performed by incubation (15 min) in each of 3 solutions, a) 25 mM ammonium bicarbonate/5% acetonitrile, b) 25 mM ammonium bicarbonate/50% acetonitrile, and c) 100% acetonitrile; and v) digestion with 15 μ l of 20 ng/ μ l Trypsin Gold (Promega) solution for 45 min at 4 °C and overnight at 35 °C in

25 mM ammonium bicarbonate. Tryptic peptides were recovered and spotted onto a MALDI plate in the presence of α -cyano-4-hydroxy-cynamic acid. Spectra resolutions higher than 8000 were obtained in a Voyager DE-PRO MALDI-ToF (AB Sciex) operating in a reflector positive mode. External calibration was performed with calibration mixtures PepMix4 (C104) from LaserBio Labs and, when possible, internal calibration was performed with peptides from the autodigestion of trypsin. The acquired spectra were processed by Data Explorer [v. 4.0] software. Proteins were identified by peptide mass fingerprint, searching against the SwissProt database using MASCOT Server 2.3. Peptide mass fingerprinting assumes that peptides are monoisotopic, oxidized at methionine residues (variable modification), and carbamidomethylated at cysteine residues (fixed modification). One maximum missed cleavage was allowed with a maximum peptide mass tolerance of 100 ppm.

2.7. Derivatization procedure by DNPH

Oxidative damage to proteins can also be evaluated by the use of 2,4-DNPH, as already mentioned. Derivatization with DNPH was performed as previously described [11]. Antibodies against DNP (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).

3. Results

3.1. Detection of protein carbonyls in purified proteins

Metal-catalyzed oxidation is one of the mechanisms that generate carbonyl groups in the amino acid side chains of the

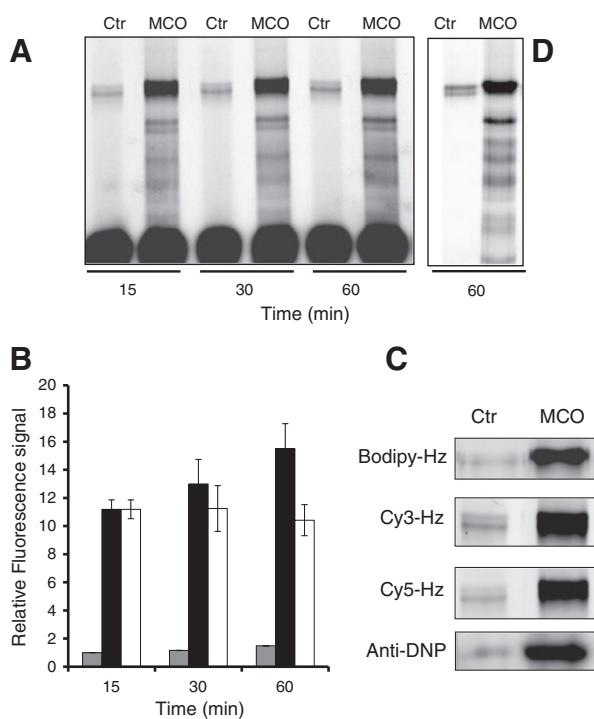


Fig. 1 – Pyruvate kinase preparations were derivatized with fluorescent hydrazides after metal-catalyzed oxidation (MCO). Samples (2 μ g) of control (Ctrl) and oxidized preparations (MCO) were taken at times indicated and analyzed in SDS-PAGE as shown in A for Cy5-Hz derivatization. In B a plot of relative fluorescence intensity of the pyruvate kinase band at indicated derivatization times: gray bars (control) and black bars (MCO). Data represent the fluorescence intensity of pyruvate kinase under each condition, relative to the fluorescence intensity of control samples at 15 min. White bars represent the ratio between MCO and control sample at each time-point. Data are mean \pm SD from three different experiments. C shows a comparison of signal after Western blot (DNPH) or fluorescence (Bodipy-Hz, Cy3-Hz and Cy5-Hz). Samples of control and oxidized preparations taken after 60 min under the MCO system were TCA precipitated before electrophoresis (D).

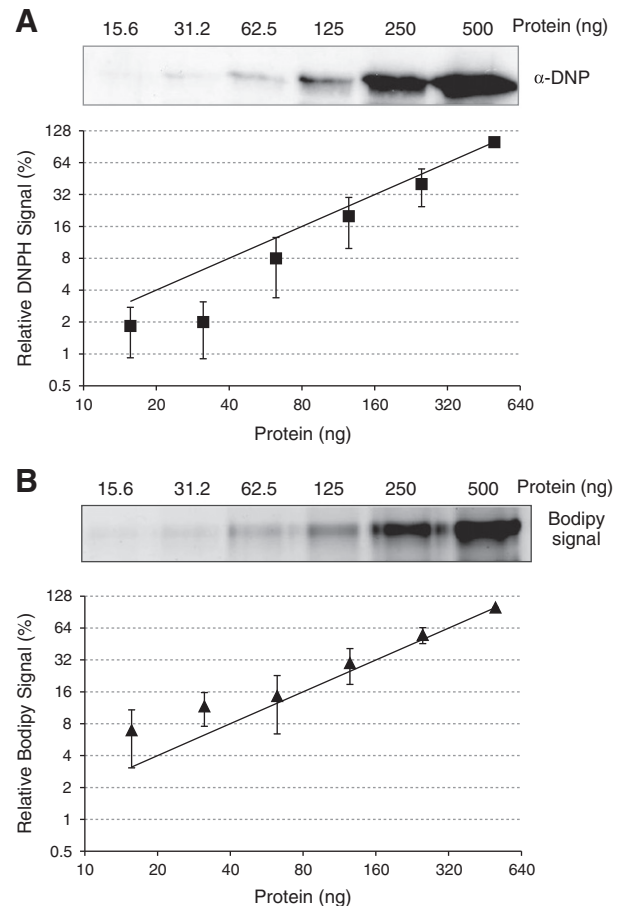


Fig. 2 – Different amounts of oxidized pyruvate kinase derivatized with either DNPH or BodipyFL-Hz were loaded on SDS-PAGE gels and analyzed for carbonyl detection by Western blot (DNPH) (A) or fluorescence (BodipyFL-Hz) (B). Images were analyzed by Quantity One software and the relative intensity of the pyruvate kinase band was plotted against the protein amount loaded in the gel. Data are mean \pm standard deviation from four different experiments. Values are represented in log(2) scale. Straight line represents values of a theoretical dilution curve.

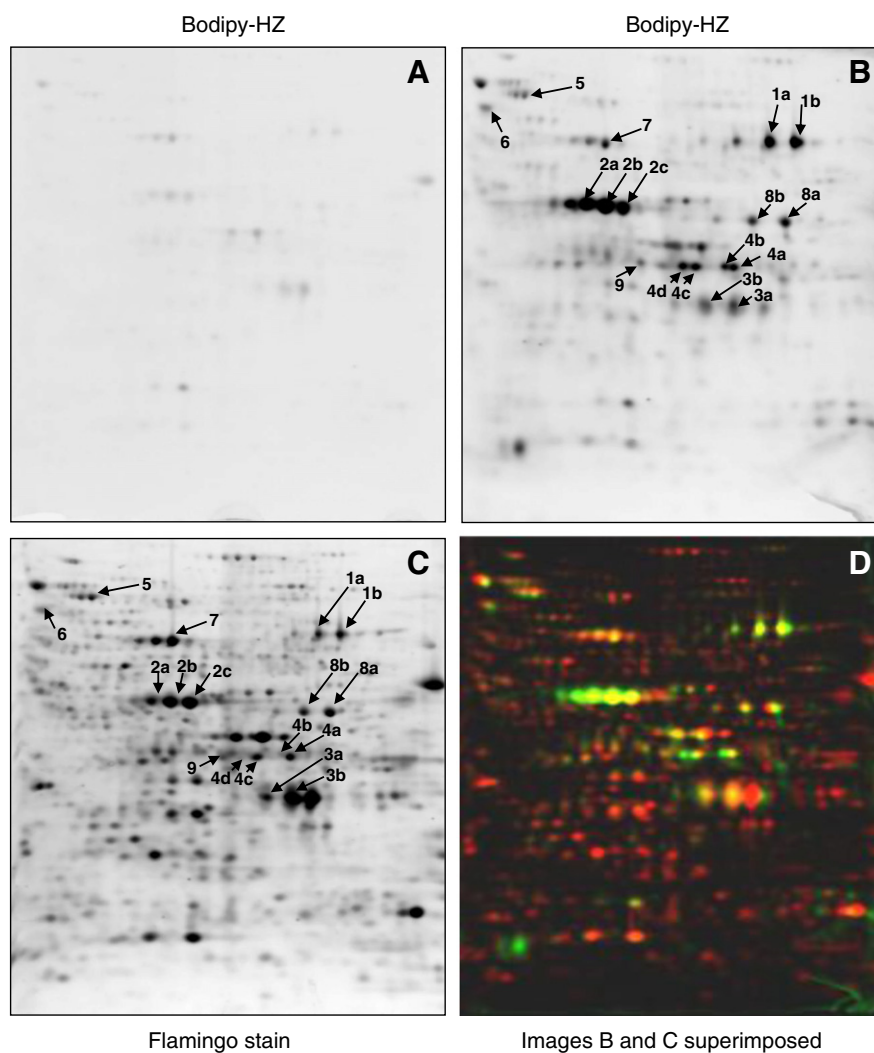


Fig. 3 – Crude extracts obtained from control or hydrogen peroxide-treated cultures were derivatized with Bodipy-Hz and analyzed by 2D-gel electrophoresis. The images shown correspond to Bodipy signal in control conditions (A) or after hydrogen peroxide stress (B); total protein stain by Flamingo (BioRad) of the hydrogen peroxide-treated sample (C); images B and C superimposed (D). Spot numbers correspond to identified proteins summarized in Table 1.

proteins. Such modification can be performed “in vitro” by incubating proteins in the presence of a reductant and a redox-active metal. To that purpose, purified pyruvate kinase was oxidized by an ascorbate/iron system and derivatized with either DNPH or with the fluorescent dyes Bodipy-Hz, Cy3-Hz or Cy5-Hz as described in [Materials and methods](#). Reaction mixtures were incubated for 15, 30 and 60 min. As shown in [Fig. 1A](#), fluorescence detection of oxidized samples using Cy5-Hz is clear after 15 min with slight increase up to 60 min. At this incubation time, signal from control protein band showed a significant increase that can be observed in [Fig. 1B](#). For this reason the incubation time for derivatization in further experiments was fixed at 30 min. Similar results were obtained with Cy3-Hz and Bodipy-Hz. Oxidized pyruvate kinase shows higher signal intensity when compared to control samples with a ratio around 10, which was similar for all fluorescent dyes used ([Fig. 1C](#)). Bands of low molecular weight correspond to fragmentation of the protein as a

consequence of metal-catalyzed oxidation. For comparison, the figure includes an image obtained by Western blot using DNPH for derivatization. As observed in [Fig. 1A](#), unbound fluorescent reagent is clearly present at the bottom of the gel. To avoid the possibility that the reagent could mask low molecular weight protein bands and also to obtain a clearer image, samples were precipitated with 10% TCA prior to electrophoresis. The precipitated protein was resuspended in Laemmli’s sample buffer and loaded on a polyacrylamide gel. As shown in [Fig. 1D](#), this treatment efficiently eliminates the free dye without loss of specific fluorescent signal.

3.2. Linearity between Bodipy and DNPH-derivatized samples

To compare protein carbonyl detection by DNPH and by Bodipy-Hz derivatization, oxidized pyruvate kinase was serially diluted and analyzed for carbonyl detection as described in experimental

Table 1 – Oxidatively modified yeast proteins identified as targets of 2 mM hydrogen peroxide treatment. Spot numbers correspond to Fig. 3.

Protein	Accession number ^a	Mass (Da)	Spot	Coverage %	Matched/unmatched peptides	Score ^b	Oxidation fold ^c
KPYK1, pyruvate kinase 1	P00549	54,909	1a	39	21/20	235	7.4±0.25
			1b	43	24/14	269	10.1±2.1
ENO2, enolase 2	P00925	46,932	2a	33	12/16	134	18.9±4.1
			2b	20	8/10	74	5.0±2.4
			2c	19	7/6	76	3.4±1.4
			3a	30	9/6	118	2.5±0.4
G3P3, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	P00359	35,838	3b	25	7/5	86	3.1±0.6
ILV5, keto-acid reductoisomerase, mitochondrial	P06168	44,512	4a	22	10/11	119	18.6±6.2
			4b	25	12/19	127	14.9±5.3
			4c	48	18/7	264	11.4±0.9
			4d	20	9/14	99	17.8±4.3
HSP75, heat shock protein SSB1	P11484	66,732	5	33	16/3	226	2.4±0.9
HSP60, heat shock protein 60	P19862	60,999	6	24	15/21	145	6.8±2.8
ALDH4, potassium-activated aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P46367	56,973	7	47	20/12	263	5.4±1.2
PGK, phosphoglycerate kinase	P00560	44,768	8a	51	18/28	192	5.1±0.85
			8b	51	19/23	208	3.6±1.4
QCR2, cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	P07257	40,510	9	19	6/10	70	8.6±1.5

^a Accession numbers according to Uniprot.

^b Score values according to MASCOT 2.3.

^c This value represents the fold increase of the ratio [Bodipy signal/protein signal] of each spot between stressed and control conditions. Data are the mean of three independent gels±standard deviation.

procedures. Images were acquired, avoiding saturation of intensity in more prominent bands. Intensity of the bands (arbitrary units) obtained by Quantity One software (BioRad) was plotted against the protein amount loaded in the gel. As shown in Fig. 2, linearity obtained by both methods was optimal along one order of magnitude (from 62.5 to 500 ng of protein). Below these values, both methods failed to give reproducible results, showing some variation between replicas.

3.3. Two-dimensional gel electrophoresis of Bodipy-derivatized samples

Once derivatization conditions were established, the protocol was applied to samples obtained from yeast cultures challenged with 2 mM hydrogen peroxide and analyzed by 2D-gel electrophoresis as described in experimental procedures. Carbonyl detection in control conditions (Fig. 3A) or after hydrogen peroxide stress (Fig. 3B) is shown. To match these gels with the total protein pattern, gel B was stained with the Flamingo fluorescent protein dye (Fig. 3C) and images in B and C were superimposed (Fig. 3D). Protein spots (red) coincide with the Bodipy-derivatized spots (green). Images were analyzed using PD-Quest software. For each spot, the ratio between the Bodipy signal and the Flamingo signal was calculated. This ratio was considered a relative measure of the carbonyl content of each spot. Those showing an increase of at least twice that ratio in 3 independent gels of hydrogen peroxide-treated cells were considered for further identification. We did not observe any spot showing a reproducible decrease in carbonyl content in treated cells. To identify the oxidatively modified proteins, spots of interest were excised

from the gel and identified by peptide mass fingerprinting. The identified proteins are summarized in Table 1.

3.4. Two-dimensional gel electrophoresis of samples derivatized with cyanine-hydrazide dyes

The availability of hydrazides derived from Cy3 or Cy5 offers the possibility to mix control and oxidized samples and run them in a single gel for multiplexing analysis. Samples from control and hydrogen peroxide-treated cultures, as described in the previous section, were derivatized with Cy-Hz and analyzed by 2D-gel electrophoresis. The results (shown in Fig. 4) were similar using either Cy5-Hz or Cy3-Hz to derivatize control or stressed samples, as observed when gels were viewed using the Cy3 channel or Cy5 channel. Under the detection conditions used, the fluorescent signal of these dyes does not overlap (Fig. S2). A similar experiment was performed in which extracts from H₂O₂ treated cells were derivatized with either Cy5-Hz or Bodipy-Hz, mixed and analyzed on the same gel. This experiment showed that the pattern obtained with these Cy dyes is equivalent to that of the Bodipy-derivatized samples, although with Cy5-Hz dye the spot intensity is higher than that observed when using Bodipy-Hz (Fig. 5A and B). Nevertheless, derivatization with Cy-Hz dyes results in spot shifting that can be observed when images obtained from both dyes were overlaid. As shown in Fig. 5C, a shift in either pI or molecular weight corresponding to the Cy-derivatized proteins was observed (blue spots). In contrast, Fig. 5D shows the correct matching between protein stain and Bodipy-derivatized spots. Consequently, Cy-derivatized proteins do not precisely match with protein spots.

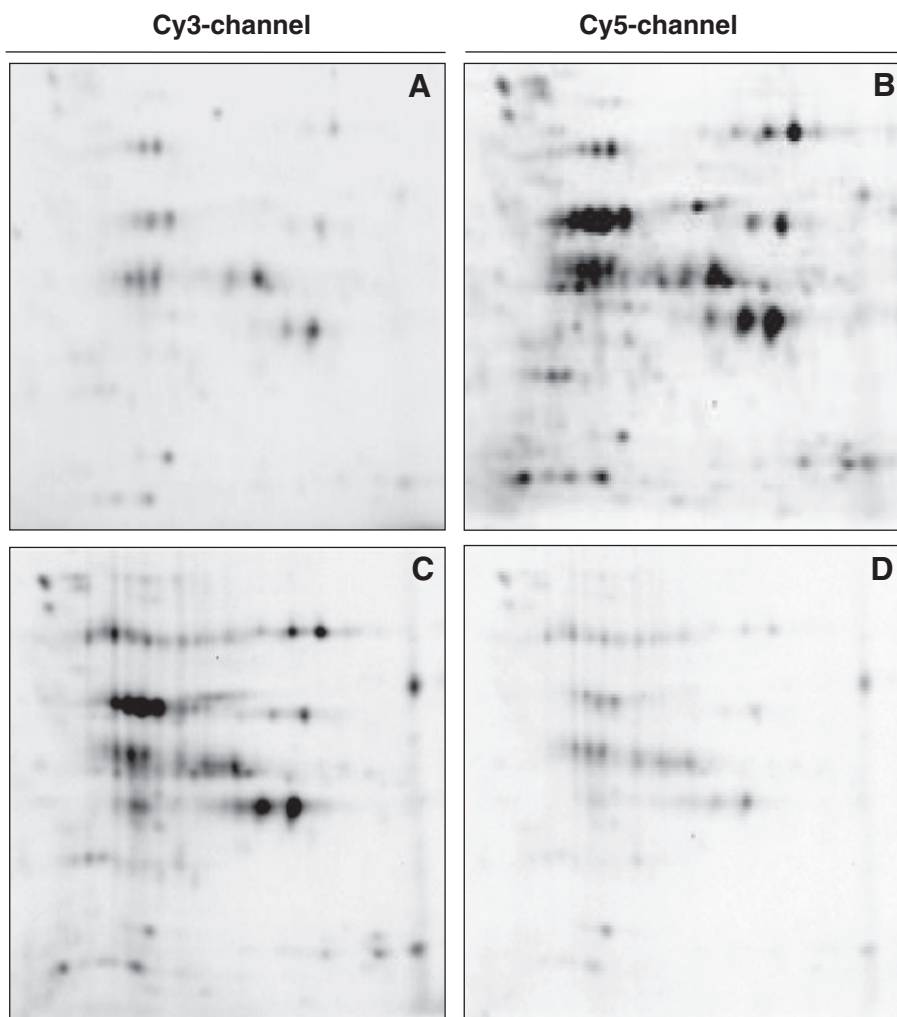


Fig. 4 – Crude extracts obtained from control or hydrogen peroxide-treated cultures were derivatized with Cy3-Hz and Cy5-Hz and analyzed by 2D-gel electrophoresis. Two samples were loaded on the same gel and two different gels were used: gel 1 contained 20 μg control sample derivatized with Cy3-Hz and 20 μg H_2O_2 sample derivatized with Cy5-Hz; gel 2 contained 20 μg control sample derivatized with Cy5-Hz and 20 μg H_2O_2 sample derivatized with Cy3-Hz. The images shown correspond to: A, gel 1, Cy3 channel; B, gel 1 Cy5 channel; C, gel 2 Cy3 channel; D, gel 2 Cy5 channel.

3.5. Protein oxidative damage in chronological aged yeast

It is known that yeast cells in stationary phase show markers of oxidative stress. In this phase, yeasts gain resistance to such stress by inducing antioxidant systems. Nevertheless, damage to macromolecules occurs in this physiological situation [20,21]. To test whether this method was useful for the analysis of protein oxidation under such physiological conditions, samples from aged cultures (obtained after 7 or 14 day culture on YPD) were compared to cells harvested at mid-exponential phase. Crude extracts were obtained as previously described and Bodipy-derivatized proteins were analyzed by 2D-gel electrophoresis. In the second dimension, proteins from control and aged cells were run in parallel in the same gel. Proteins stained with Flamingo are shown in Fig. 6A, C and E while carbonylated proteins are shown in Fig. 6B, D and F. Given that aged cultures experience major metabolic

changes, marked differences can be observed in the quantities of many protein spots between controls and aged cells. Under these conditions, the strategy for data analysis described in the previous section is not suitable; therefore, an alternative analytical strategy was followed. Three controls and three aged cultures were analyzed. The Bodipy/Flamingo signal ratio (B/F) was calculated for every spot in the analyzed gels. The mean B/F value obtained from all protein spots in the gels from exponentially growing cells, was used as a reference value indicating basal protein damage. This value was 0.33 ± 0.01 . Spots showing B/F ratios at least three times higher than this reference value in at least two different gels were considered highly carbonylated spots. In gels from aged cultures, 16 proteins were identified as highly carbonylated (Fig. 6F). Results are summarized in Table 2. Proteins identified using this procedure showed only slight variations from those we previously identified in aged *S. cerevisiae* cells

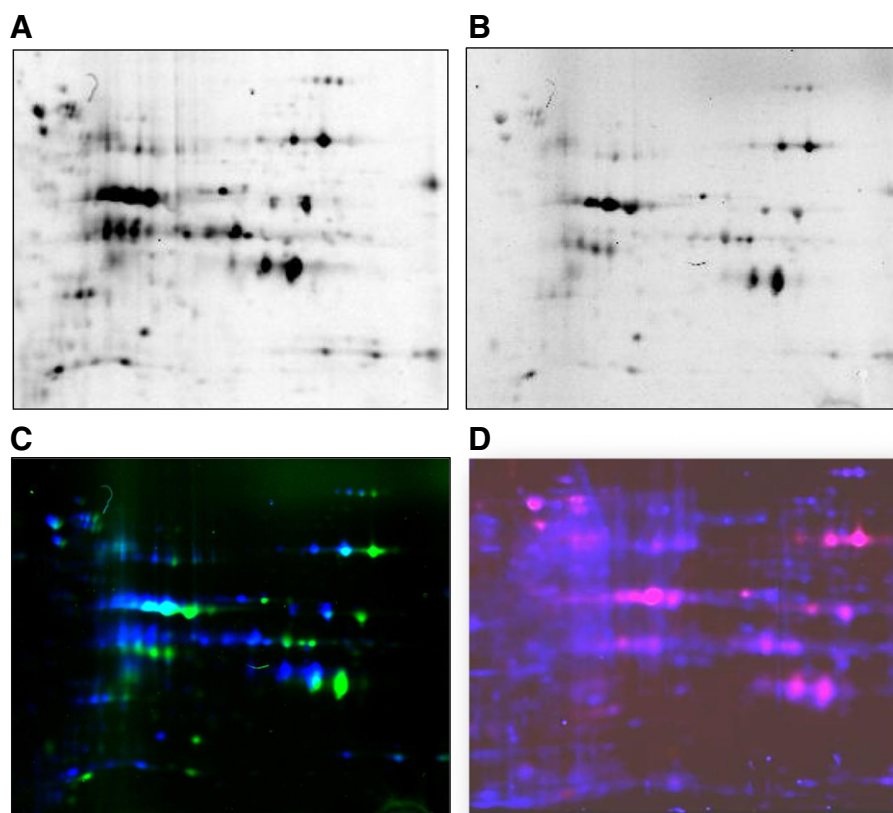


Fig. 5 – Extracts obtained from hydrogen peroxide-treated cultures were derivatized with Cy5-Hz and Bodipy-Hz and analyzed by 2D-gel electrophoresis. Both samples (20 μ g each) were mixed and analyzed on the same 2D-gel system. The images shown correspond to: A, Cy5 channel; B, Bodipy channel; C, overlay from images A and B. In D, matching between Bodipy signal and protein stain is shown.

using the DNPH derivatization method [17]. Interestingly, we also observed that some of the proteins induced in stationary phase proved to be more resistant to oxidative damage exhibiting a low B/F ratio (never exceeding a value of 0.4 which is very close to basal reference value indicated above). These proteins, shown in Fig. 6E, were identified and summarized (Table 3). Of note, the molecular chaperone Hsp26, Enolase 1 and triose phosphate isomerase showed high resistance to oxidative modification; catalase, important for detoxification in this phase, showed low levels of oxidative damage.

4. Discussion

The presence of carbonyls in proteins is widely used as a marker of oxidative stress in research related to aging [22,23], diseases [19,24,25], and translational errors [26,27], to cite a few. Detecting protein oxidative damage by DNPH derivatization was developed by E. Stadman, R.L Levine and collaborators [13] and has been the method of choice in many laboratories over the last 25 years. Concise protocols to avoid [28] or be aware of DNPH side-reactions [29] have also been published. In 1987, Stadman and collaborators used fluorescein thiosemicarbazide for the same

purpose [30], but the proteins were only analyzed in one-dimensional gels. Given that this compound has net charge, spot shifting in 2D-gels is presumed to occur, impairing the correct matching of spots of interest. More recently, biotin and biocytin hydrazide-derivatives have been introduced to study protein carbonylation in yeast, rats and humans [16]. This approach allows the enrichment of biotin-derivatized proteins by affinity chromatography in a streptavidin column. Although these methods can be used for the identification of carbonylation sites in proteins, they do not allow an accurate quantitative analysis of the degree of carbonylation of the various proteins identified in different samples. This limits the usefulness of carbonylation as a tool for studying changes in the pattern of protein oxidation in different biological conditions.

The method presented in this paper, in which fluorescent hydrazides are used to detect carbonylated proteins, presents many advantages. It saves time, as Western blot protocols are no longer needed to detect protein oxidative damage. The method also provides greater accuracy and reproducibility in two-dimensional gel analysis of carbonylated proteins. Use of Bodipy-Hz has the advantage of being a compound with no net charge and low molecular weight [31], properties that allow the perfect match between the Bodipy-derivatized spot

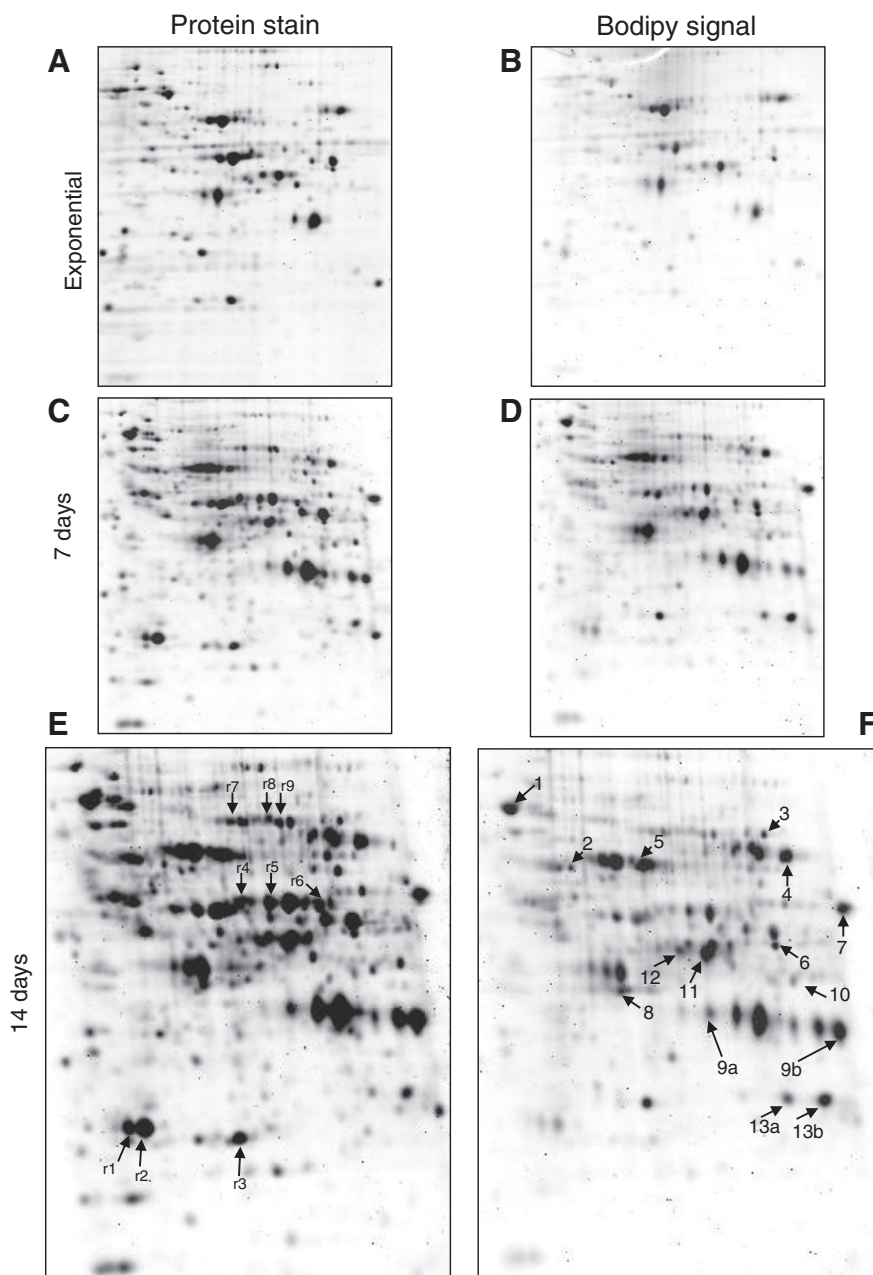


Fig. 6 – Crude extracts obtained from control or aged cultures were derivatized with BodipyFL-Hz and analyzed by 2D-gel electrophoresis. In the first dimension, 11 cm IPG strips were used. In the second dimension, proteins from control and aged cells were run in parallel in the same 24 cm-wide gel. The images shown correspond to total protein stain (Flamingo) in control (A), aged 7 days (C) or aged 14 days (E); corresponding gels for Bodipy signal are B, D and F, respectively. Arrows in F indicate proteins with oxidative damage (high B/F ratios), identified by mass spectrometry and listed in [Table 2](#). Proteins resistant to oxidative damage are shown in E, identified by mass spectrometry and listed in [Table 3](#).

and that of the protein stain. A B/F ratio can be calculated for every spot in the gel, allowing a comparison of the degree of carbonylation at different protein spots. To increase precision, it is desirable to perform simultaneous image acquisition from the gels containing the different samples. We have addressed this problem by running two 11-cm IPG strips in the same 24-cm gel. This provides highly reproducible results, but limits resolution of the analysis because of strip length.

Cyanine hydrazide derivatization (Cy3-Hz and Cy5-Hz) allows for analysis of two samples in the same gel. This is an advantage in terms of reproducibility, allowing multiplexing approaches and higher resolution because 24-cm strips can be used. However, Cy-derivatives cause spot-shifting after 2D-electrophoresis ([Fig. 5C](#)) due to both charge and molecular weight, making it difficult to match a spot with total protein stain.

Table 2 – Oxidatively damaged proteins identified in aged yeast. Spot numbers correspond to Fig. 6E.

Protein	Accession number ^a	Mass (Da)	Spot (s)	Coverage (%)	Matched/unmatched peptides	Score ^b	B/F ratio ^c
SSA2, heat shock protein 72	P10592	69,599	1	17	10/18	87	1.6
SSA1, heat shock protein 71	P10591	69,786	1	16	9/11	87	–
HXKA, Hexokinase-1	P04806	53,738	2	19	7/13	55	1.7
MLS1, malate synthase 1, glyoxysomal	P30952	62,791	3	18	10/15	93	1.1
PYK1, pyruvate kinase 1	P00549	54,544	4	29	17/19	182	0.9
ALDH4, potassium-activated aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P46367	56,973	5	38	18/16	218	1.1
PGK, phosphoglycerate kinase	P00560	44,738	6	28	11/18	118	1.3
EF1A, elongation factor 1-alpha	P02994	50,032	7	22	7/28	55	0.9
TAL1, transaldolase	P15019	37,036	8	32	8/26	68	1.5
G3P3, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	P00539	35,838	9a	21	8/23	86	0.9
			9b	20	7/25	60	0.9
IDH2, isocitrate dehydrogenase subunit 2, mitochondrial	P28241	39,886	10	35	9/21	101	0.9
ADH1, alcohol dehydrogenase 1	P00330	36,849	11	22	5/9	61	1
ADH2, alcohol dehydrogenase 2	P00331	37,165	12	25	7/24	66	1.2
VDAC1, mitochondrial outer membrane porin	P04840	30,524	13a	15	4/3	59	2.6
			13b	47	11/10	156	1.9

^a Accession numbers according to Uniprot.

^b Score values according to MASCOT.

^c Details about the B/F ratio are explained in the text.

With respect to linearity in the signal intensity, fluorescent hydrazides show a good correlation between amount and signal, similar to that obtained with DNPH derivatization and immunodetection. It is conceivable that for amounts of protein lower than shown in Fig. 2, bands can be detected by increasing exposure time. Nevertheless, if samples show great differences in carbonylation, comparable intensities would be limited to one order of magnitude.

This study used fluorescent hydrazides to explore protein carbonylation in yeast cultures challenged with hydrogen peroxide or in yeast cells in stationary phase. The results for hydrogen peroxide stress were in agreement with those we obtained by DNPH derivatization [32]. In chronologically aged yeast samples, we detected carbonylation in proteins of energy metabolism as well as in molecular chaperones of the Hsp70

family. In contrast, Hsp26, which is induced in stationary phase, is resistant to oxidative damage. Hsp26 was described as a stress-induced protein, highly expressed during the transition from exponential to stationary phase, as well as by heat, chemical, and osmotic stresses or nutrient starvation [33,34]. It is conceivable that preserving its activity under these situations could be of great importance for cell functions and maintaining cell viability. In this particular case, a possible explanation for such resistance to oxidative modification could be that Hsp26 function is ATP-independent, in contrast to that of Hsp70s, which are proteins that use ATP. This is a key point because ATP-binding proteins are more prone to oxidation due to their attraction for iron through nucleotide moiety [35,36]. Another intriguing question is the difference in resistance to damage displayed by enolase isoenzymes 1 and 2. While isoenzyme 2

Table 3 – Proteins identified as resistant to oxidative damage. The spots identified are indicated in Fig. 6E. Spot number preceded by r indicates “resistant protein”.

Protein	Accession number ^a	Mass (Da)	Spot (s)	Coverage (%)	Matched/unmatched peptides	Score ^b	B/F ratio ^c
HSP26, heat shock protein 26	P15992	23,865	r1	50	9/18	122	0.08±0.02
			r2	50	9/17	123	0.11±0.02
TPIS, triose phosphate isomerase	P00942	26,893	r3	39	9/23	121	0.09±0.02
ENO 1, enolase 1	P00924	46,844	r4	37	12/13	149	0.22±0.05
			r5	38	14/8	193	0.31±0.03
			r6	46	16/16	205	0.08±0.02
CATT, catalase	A6ZV70	65,056	r7	14	6/7	53	0.39±0.04
SYDC, aspartyl t-RNA synthetase	P04802	63,647	r8	10	6/5	68	0.38±0.03
ACH1, acetyl-CoA hydrolase	P32316	58,903	r9	27	14/13	156	0.38±0.02

^a Accession numbers according to Uniprot.

^b Score values according to MASCOT.

^c Details about the B/F ratio are explained in the text.

has been described in a large number of publications as a main target of oxidative stress (for a review, see ref [37]), isoenzyme 1 is just the opposite. Although the reasons leading to this difference are not obvious, it could be related to differential structural features that would explain why specific proteins are selective targets under oxidative stress conditions [38].

In conclusion, the method described in this paper is suitable for analyzing protein carbonylation caused by oxidative stress. If the desired goal is a comparative analysis between two situations, then the best choice would be combining Cy3-Hz and Cy-Hz derivatization. In contrast, if the final purpose is to excise the protein from the gel to establish its identification, then BodipyFL-Hz derivatization would be the method of choice because it facilitates tracking oxidatively damaged proteins in the 2D-gel.

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.046>.

Acknowledgments

This work was supported by Grants BFU2010-19193 and CSD2007-00020 from the Ministerio de Ciencia e Innovacion, and SGR0677 from the Generalitat de Catalunya and Fundacio La Marato de TV3 (Spain). We are indebted to Isabel Sanchez and Alba Sorolla from the “Servei de Genòmica i Proteomica. UdL” for helping on peptide mass fingerprinting, Enric Ros and Aida Giner for technical support and to Elaine M. Lilly for editorial assistance.

REFERENCES

- [1] Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989;58:79–110.
- [2] Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990;9:315–25.
- [3] Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1997;272:19095–8.
- [4] Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19633–6.
- [5] Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963–6.
- [6] Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001;36:1495–502.
- [7] Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257:1220–4.
- [8] Chevalier M, Lin EC, Levine RL. Hydrogen peroxide mediates the oxidative inactivation of enzymes following the switch from anaerobic to aerobic metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 1990;265:42–6.
- [9] Cabiscol E, Aguilar J, Ros J. Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ dehydrogenases. Consensus target sequence between propanediol oxidoreductase of *Escherichia coli* and alcohol dehydrogenase II of *Zymomonas mobilis*. *J Biol Chem* 1994;269:6592–7.
- [10] Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 1998;30:225–43.
- [11] Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol* 2000;99:15–24.
- [12] Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313–6.
- [13] Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 1994;17:429–37.
- [14] Irazusta V, Moreno-Cermeño A, Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Proteomic strategies for the analysis of carbonyl groups on proteins. *Curr Protein Pept Sci* 2010;11:652–8.
- [15] Yoo BS, Regnier FE. Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. *Electrophoresis* 2004;25:1334–41.
- [16] Madian AG, Regnier FE. Profiling carbonylated proteins in human plasma. *J Proteome Res* 2010;9:1330–43.
- [17] Reverter-Branchat G, Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J Biol Chem* 2004;279:31983–9.
- [18] Irazusta V, Obis E, Moreno-Cermeño A, Cabiscol E, Ros J, Tamarit J. Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2010;48:411–20.
- [19] Sorolla MA, Rodríguez-Colman MJ, Tamarit J, Ortega Z, Lucas JJ, Ferrer I, et al. Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism. *Free Radic Biol Med* 2010;49:612–21.
- [20] Herman PK. Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:602–7.
- [21] Sinclair DA. Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mech Ageing Dev* 2002;123:857–67.
- [22] Stadtman ER. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 2002;33:597–604.
- [23] Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32:790–6.
- [24] Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10:389–406.
- [25] Sultana R, Butterfield DA. Proteomics identification of carbonylated and HNE-bound brain proteins in Alzheimer's disease. *Methods Mol Biol* 2009;566:123–35.
- [26] Ballesteros M, Fredriksson A, Henriksson J, Nyström T. Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J* 2001;20:5280–9.
- [27] Nyström T. Translational fidelity, protein oxidation, and senescence: lessons from bacteria. *Ageing Res Rev* 2002;1:693–703.
- [28] Luo S, Wehr NB. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Rep* 2009;14:159–66.
- [29] Dalle-Donne I, Carini M, Orioli M, Vistoli G, Regazzoni L, Colombo G, et al. Protein carbonylation: 2, 4-dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ketones and sulfenic acids. *Free Radic Biol Med* 2009;46:1411–9.
- [30] Ahn B, Rhee SG, Stadtman ER. Use of fluorescein hydrazide and fluorescein thiosemicarbazide reagents for the fluorometric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1987;161:245–57.
- [31] Fukushima T, Usui N, Santa T, Imai K. Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2003;30:1655–87.
- [32] Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2000;275:27393–8.

- [33] Petko L, Lindquist S. Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell* 1986;45:885–94.
- [34] Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* 1996;7:25–42.
- [35] Irazusta V, Moreno-Cermeño 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;44:1712–23.
- [36] Belogrudov GI. Mitochondrial ATP synthase: Fe²⁺-catalyzed fragmentation of the soluble F1-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 1996;335:131–8.
- [37] Cabisco E, Ros J. Oxidative damage to proteins: structural modifications and consequences in cell function. In: Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA, editors. *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*. Hoboken, NJ, USA.: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 399–471.
- [38] Maisonneuve E, Ducret A, Khoeiry P, Lignon S, Longhi S, Talla E, et al. Rules governing selective protein carbonylation. *PLoS One* 2009;4:e7269.