

DEPARTAMENTO DE GENÓMICA Y PROTEÓMICA

ANÁLISIS GENÉTICO Y FUNCIONAL DE LA FRATAXINA
Y OTRAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES
RELACIONADAS CON ATAXIAS CEREBELOSAS

PILAR GONZÁLEZ CABO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 8 de Novembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Julio Montoya Villarroja
- D. Joaquín Arenas Barbero
- D^a. María Dolores Moltó Ruiz
- D. Juan Carlos Rodríguez Aguilera
- D. Francisco Estruch Ros

Va ser dirigida per:

D. Francesc Palau Martínez

©Copyright: Servei de Publicacions
Pilar González Cabo

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6482-1

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Análisis genético y funcional de la frataxina y
otras proteínas mitocondriales relacionadas
con ataxias cerebelosas**



**INSTITUTO DE
BIOMEDICINA
DE VALENCIA**

Memoria presentada por
Pilar González Cabo
para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas

Valencia, 2005



**INSTITUTO DE
BIOMEDICINA
DE VALENCIA**

D. **Francesc Palau Martínez**, Doctor en Medicina e Investigador Científico del Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA: que **Pilar González Cabo**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado el trabajo titulado "Análisis genético y funcional de la frataxina y otras proteínas mitocondriales relacionadas con ataxias cerebelosas", bajo su dirección, para optar al grado de doctora en Ciencias Biológicas.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación, firmo el presente certificado en:

Valencia a 20 de Julio de 2005

Francesc Palau Martínez

A Lolo

AGRADECIMIENTOS

Tengo la suerte de ser una de esas personas que trabaja en algo que le gusta y le motiva. La causa principal de que se produzca esta situación es gracias a la gente que trabaja conmigo, capaz todos los días de crear un ambiente de trabajo agradable e incluso divertido. Y no sólo me refiero a mi laboratorio, que por supuesto son con quien más tiempo comparto, sino que lo hago extensible a todos los laboratorios del instituto. Siempre que he necesitado algo, han perdido parte de su tiempo para atenderme con una sonrisa. Gracias a todos de corazón.

Al primero que tengo que dar las gracias de manera individual es a Paco, mi director de tesis y un amigo. Primera y principal por darme la oportunidad de trabajar con él. Pero sobre todo, gracias por tener siempre en cuenta mi opinión. No deja de sorprenderme tú capacidad para emocionarte por el trabajo después de tantos años. Ojala yo pueda decir dentro de 20 años que sigo trabajando en ciencia y además con ese grado de emoción.

El laboratorio, que aunque ha cambiado por el paso de los años (inevitable), sigue estando formado por gente maravillosa. Empezaré por los que ya no están, aunque tengo la suerte de seguir en contacto con ellos. Javi, que gracias a su previa experiencia me sirvió para machacarle a preguntas. Ana, a la que estimo y echo de menos con locura. Ojala podamos trabajar de nuevo juntas. Y Rafa, con el que he pasado horas y horas en el laboratorio intentando poner a punto todas las cosas que se nos ocurría probar (sobre todo a él). Creo que es a la persona que más hay que agradecerle el buen ambiente de trabajo que estaba presente en el laboratorio. Siempre había una broma o una sonrisa, incluso cuando la hora era intempestiva. Me lo he pasado genial contigo!!! Gracias por ser mi gran amigo. De la gente que continúa tengo que destacar a Laia. Ella apareció justo cuando nos instalamos en el instituto, así que prácticamente ha compartido conmigo todos estos años de tesis, y aunque al principio le costo soltarse y parecía modosita, ahora es todo un terremoto (me encanta!!). Creo que con el tiempo hemos creado una gran amistad y me resultará muy triste si tenemos que dejar de trabajar juntas, porque es una gozada hacerlo. Luego está Sheila, quien ha tenido que soportarme más, ya que es con la que trabajo directamente. Sólo espero no haber sido muy mala profesora. Creo que hasta la fecha hemos llevado bastante

bien la cuestión, pero estoy segura que a medida que pase el tiempo todavía será mejor. Gracias mil por tú comprensión y paciencia. Y Amalia, con la que me rió constantemente por su desparpajo. Las cuatro formamos el pasillo de las chicas (o las marus!!). Reyes, incansable y siempre dulce. Carmina, con la que por fin llego el orden al laboratorio, entre otras cosas. Benito, gracias por ayudarme en la recta final. Toni, discreto donde los haya y Vincenzo, nuestra última adquisición... ahora si que somos europeos! En un año todos hablando italiano. En resumen, un placer de laboratorio.

Pero en el instituto hay un segundo laboratorio que me adoptó, durante bastante tiempo y sin protestar, en mis comienzos con la levadura. Me refiero al laboratorio de Pascual. Empezando por su jefe, Pascual, del que sobre todo espero haber aprendido su capacidad de organización. Pascual junto con Ada han sido mis grandes maestros en el mundo de la levadura, y me enseñaron tan bien, que he quedado encantada con la experiencia. Gracias a los dos, así como al resto del laboratorio: Jose, que ha subsanado mis dudas cuando no estaban Pascual o Ada, Lidia, Leda, MC, Mari Carmen y Rosa. "Holapili" os da las gracias.

Y mucha más gente que ha ayudado, bien resolviendo dudas de trabajo o simplemente con su compañía. MariPaz (siempre encantadora), Bea y Cintia, mis vecinas de laboratorio y compañeras del gimnasio. Al final conseguimos ir!!! Silvia, Carmen, Enric, Mariló y resto de su laboratorio. Paula, que parece casi de nuestro laboratorio. Me encantan tus entradas!!! Marta y su laboratorio del cual me gustaría destacar a dos personas: Santi, gracias por darme tu amistad y por suministrarme todas mis necesidades de RNA de humanos; y especialmente a Belén, amiga de toda la vida. No tienes ni idea de la alegría que me diste cuando te metiste de lleno en este mundillo. Es estupendo que fuera del trabajo haya alguien que sepa de que hablo y entienda mis penas y alegrías. Pero sobre todo es estupendo tenerte como amiga. Soy consciente que me dejo a mucha gente del instituto, a la que quiero, con esta frase, agradecerle todo lo que han hecho por mí. Espero haber sido una buena compañera de trabajo.

También quisiera recordar brevemente a mis compañeros de genética, porque aunque no han estado presentes durante la realización de esta tesis, si que estuvieron en mis comienzos en el laboratorio y por lo tanto, tengo muy grato recuerdo de todos ellos: Juanan, Salva, Alicia, Miguel, Isabel, Sara, Joel, Jose, Manoli, Zaida y muchos más. Gracias por seguir manteniendo la amistad.

A mis amigos de toda la vida, por estar siempre ahí, y porque seguro que más de uno viene a ver el acto social (y eso sí que tiene mérito!!).

A mi familia, mis padres y hermanos, los cuales me han apoyado desde el principio. Espero que podáis estar siempre orgullosos de mí.

Y finalmente a mi marido, al que le tengo que agradecer todo y más. Por soportar mis lloros de desesperación y mis momentos de máxima euforia (seguramente sin comprender de que estaba hablando). Pero especialmente, gracias por formar una familia conmigo. Te quiero.

GLOSARIO

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
αBoc	<i>Anterior body muscle contraction</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CAP	Estructura presente en el extremo 5' de los mRNAs
CAT	Cloranfenicol acetil-transferasa
cDNA	DNA complementario
CSPD	<i>Disodium 3-(4-methoxyispiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate</i>
DCPIP	<i>2, 6- dicholophenolindophenol</i>
DMP	<i>Defecation motor program</i>
dsRNA	RNA de doble cadena
EMC	<i>Expulsión muscle contraction</i>
ETF	<i>Electron transfer flavoprotein</i>
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FRDA	Ataxia de Friedreich
FuDR	<i>5-Fluoro-2'-deoxyuridine</i>
IPTG	<i>Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i>
MPP beta	<i>Mitochondrial processing peptidase beta</i>
mRNA	RNA mensajero
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NBDs	<i>Nucleotide binding domain</i>
OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation</i>
pBoc	<i>Posterior body muscle contraction</i>
RACE	Amplificació rápida de extremos de cDNA
RNAi	Interferencia por RNA
RT-PCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
SL-RNA	<i>Splicing-Leader RNA</i>
TMDs	<i>Transmembrane domain</i>
UTR	Región terminal no traducida
XLSA/A	Anemia sideroblástica ligada al X con ataxia

ÍNDICE

Índice

1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 El gen de la ataxia de Friedreich y su patología molecular	3
1.2 Patrón de expresión del gen <i>FRDA</i>	6
1.3 Frataxina: localización y maduración.....	7
1.4 Modelos animales de la ataxia de Friedreich	7
1.5 Estructura de la frataxina.....	9
1.6 Función de la frataxina	10
1.6.1 Frataxina y homeostasis del hierro	10
1.6.2 Frataxina como reguladora de la fosforilación oxidativa	11
1.6.3 Frataxina como proteína de almacenaje del hierro.....	12
1.6.4 Frataxina como proteína chaperona del hierro en procesos biológicos mitocondriales.....	13
1.7 Proteínas mitocondriales relacionadas con ataxias cerebelosas	14
1.7.1 Anemia sideroblástica ligada al X con ataxia espinocerebelosa (XLSA/A)	15
1.8 Organismos modelos	17
1.9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.10 <i>Caenorhabditis elegans</i>	18
1.10.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo: ventajas y características	21
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
2.1 Hipótesis de trabajo.....	27
2.2 Objetivos.....	27
3 MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1 Material biológico.....	31
3.1.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> . Genotipo	31
3.1.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Genotipo	31
3.1.2 Cepa de <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
3.2 Cebadores	32
3.2.1 Cebadores empleados en el trabajo con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32

Índice

3.2.2 Cebadores empleados en el trabajo con el gusano <i>Caenorhabditis elegans</i>	34
3.2.3 Cebadores empleados en el trabajo con DNA de <i>Homo sapiens</i>	35
3.3 Tampones y medios de cultivo	35
3.3.1 Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.3.2 Nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	36
3.4 Plásmidos y construcciones	36
3.4.1 Experimentos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.4.2 Experimentos en <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
3.5 Métodos.....	41
3.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.5.1.1 Interacción de proteínas por doble híbrido	41
3.5.1.2 Coimmunoprecipitaciones	41
3.5.1.3 Creación de cepas mutantes por recombinación homóloga	42
3.5.1.4 Crecimiento celular por goteos.....	43
3.5.1.5 Medición de actividades enzimáticas	43
3.5.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>	44
3.5.2.1 Extracción de RNA de <i>C. elegans</i>	44
3.5.2.2 3'RACE y 5'RACE	44
3.5.2.3 Análisis de DNA por hibridación	44
3.5.2.4 Análisis de RNA por hibridación	45
3.5.2.5 RNAi feeding.....	45
3.5.2.6 Transcripción <i>in vitro</i> y producción de dsRNA	47
3.5.2.7 Microinyección de gusanos y análisis de fenotipos.....	47
4 RESULTADOS Capítulo I	51
4.1 Rastreo por doble híbrido.....	51
4.1.1 Construcción del cebo	51
4.1.2 Comprobación e identificación de las interacciones.....	52
4.1.3 Comprobación e identificación de la interacción entre Yfh1p e Yhb1p	53
4.2 Interacción de Yfh1p con otras flavoproteínas mitocondriales	55

4.2.1 Elección de flavoproteínas candidatas	55
4.2.2 Yfh1p interacciona con succinato deshidrogenasa.....	56
4.2.3 Yfh1p interacciona con Etf (<i>Electron transfer flavoprotein</i>).....	59
4.3 Interacciones sintéticas	60
4.3.1 Generación de mutantes.....	61
4.3.2 Crecimiento celular por goteos de los mutantes en diferentes medios	62
4.4 Alteración de la actividad enzimática succinato deshidrogenasa en el mutante <i>yfh1D</i>	65
4.5 Interacciones de frataxina con proteínas humanas.....	66
4.6 La flavina adenina dinucleótido (FAD) mejora el crecimiento de las cepas mutantes de levadura	68
5 DISCUSIÓN Capítulo I	73
6 RESULTADOS Capítulo II	87
6.1 Elección de genes candidatos humanos	87
6.2 Caracterización de gen ortólogo del ABC7 en <i>Caenorhabditis elegans</i>	88
6.2.1 El gen W09D6.6	88
6.2.1.1 Obtención del mensajero del gen W09D6.6	88
6.2.2 El gen Y74C10AM.1	94
6.2.2.1 Obtención del mensajero del gen Y74C10AM.1	95
6.2.3 Análisis comparativo del transportador ABC7 humano y su ortólogo en <i>C. elegans</i>	98
6.2.4 Análisis comparativo del transportador ABCB6 humano y su ortólogo en <i>C. elegans</i>	100
6.3 Obtención de mutantes del gen Y74C10AM.1 por interferencia de RNA	102
6.3.1 Mutagénesis por RNAi <i>feeding</i>	103
6.3.2 RNAi mediante inyección de dsRNA.....	104
6.3.2.1 Defecación.....	108
6.3.2.2 Supervivencia.....	111

Índice

7 DISCUSIÓN Capítulo II.....	115
8 CONCLUSIONES	127
9 BIBLIOGRAFÍA	131

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. INTRODUCCIÓN.

En 1863, Nicholas Friedreich describió una nueva enfermedad del sistema nervioso en tres familias a la que, posteriormente, se le daría el nombre de ataxia de Friedreich (FRDA, OMIM 229300) **(1, 2)**. FRDA es la forma más frecuente de ataxias hereditarias en la población caucasiana. En concreto, la prevalencia en España es del orden de 4,7 casos por cada 100.000 habitantes **(4, 5)**. La ataxia de Friedreich clásica se reconoce por la presencia de una ataxia troncal y apendicular, disartria, arreflexia osteotendinosa, especialmente de las extremidades inferiores, reflejo de Babinski y la presencia de una neuropatía axonal sensitiva con velocidades de conducción motora mayores de 40 m/s. Además está asociada a una miocardiopatía, defectos esqueléticos y diabetes mellitus o intolerancia a la glucosa.

1.1 El gen de la ataxia de Friedreich y su patología molecular.

La ataxia de Friedreich es una ataxia espinocerebelosa de inicio precoz con herencia autosómica recesiva. En 1988, el gen *FRDA* responsable de producir dicha enfermedad, fue localizado en el cromosoma 9q13 **(6)**. La enfermedad presenta homogeneidad genética, aunque en años más recientes se han descrito varias familias con un fenotipo Friedreich cuyo gen mutante no estaba en 9q13 **(7, 8)** por lo que se propuso un segundo locus, *FRDA2*; este locus está localizado en el brazo corto del cromosoma 9, en la región p23-p11 **(9)**. El gen *FRDA*, inicialmente denominado X25, se extiende a lo largo de 80 Kb y consta de siete exones, de los cuales los cinco primeros codifican para una proteína denominada frataxina **(figura 1) (10)**.

La ataxia de Friedreich se incluye en un grupo de enfermedades hereditarias causadas por la expansión de repeticiones de un trinucleótido. El 98% de los cromosomas *FRDA* presentan una expansión anormal de repeticiones GAA **(10)** localizada en el primer intrón del gen de la frataxina, situada en el seno de una secuencia *Alu* de la subfamilia *Sx* **(11)**. El motivo GAA es polimórfico con una distribución bimodal en la población normal, teniendo un 83% de los alelos

Introducción

normales entre 6-12 repeticiones y un 17% entre 13-36 repeticiones. Sin embargo, el número de repeticiones puede llegar a ser amplificado hasta más de 1000 veces en pacientes FRDA **(10, 12, 13)**. Los alelos FRDA presentan una inestabilidad meiótica y mitótica. Esta inestabilidad en el número de repeticiones GAA en los cromosomas heredados depende del sexo del progenitor: los alelos transmitidos paternalmente tienden a decrecer de manera lineal dependiendo del tamaño de la expansión, mientras que los alelos maternos pueden tanto incrementar como decrecer **(14, 15)**. Varios grupos han establecido una correlación entre el tamaño de la expansión GAA y la aparición de algunas de las características de la enfermedad. La más evidente es la relación inversamente proporcional entre la edad de inicio de la enfermedad y el tamaño del alelo que contenga menor número de repeticiones **(14, 16-19)**. Esta correlación también se observa en líneas celulares de linfoblastos de pacientes FRDA, donde la cantidad de proteína producida es menor cuanto mayor es el tamaño del alelo. Esto se debe a que la expansión del triplete GAA reduce los niveles de mRNA, ya que impide la elongación durante la transcripción del gen **(20-22)**.

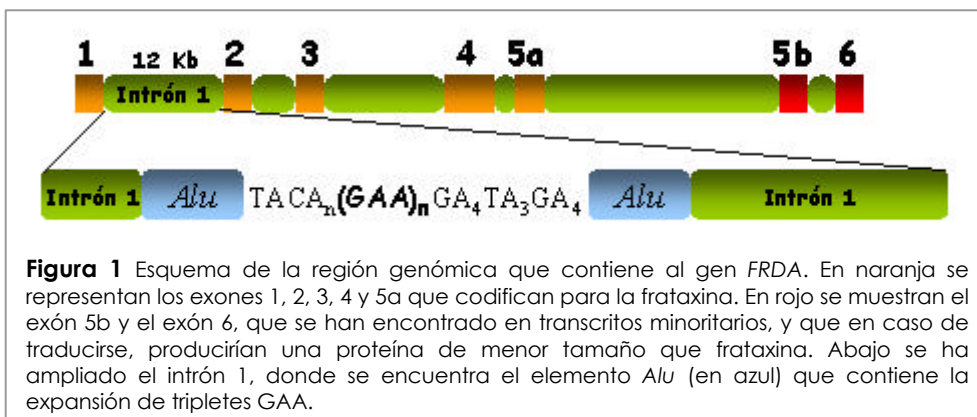


Figura 1 Esquema de la región genómica que contiene al gen *FRDA*. En naranja se representan los exones 1, 2, 3, 4 y 5a que codifican para la frataxina. En rojo se muestran el exón 5b y el exón 6, que se han encontrado en transcritos minoritarios, y que en caso de traducirse, producirían una proteína de menor tamaño que frataxina. Abajo se ha ampliado el intrón 1, donde se encuentra el elemento *Alu* (en azul) que contiene la expansión de tripletes GAA.

La ataxia de Friedreich también es consecuencia de mutaciones puntuales en el gen *FRDA*. Únicamente un 2% de los cromosomas *FRDA* son portadores de un cambio en la secuencia que bien puede provocar una proteína truncada, imposibilitar una correcta expresión, o bien un cambio de aminoácido esencial para la función de la proteína **(tabla 1)(10, 22-35)**.

Cambio nucleotídico	Exón	Efecto sobre la secuencia codificante	Origen geográfico	Referencia
PROTEÍNA TRUNCADA				
c.1A>C	1	M1, incorrecto inicio traducción	USA	(24)
c.2T>C	1	M1, incorrecto inicio traducción	Suiza	(24)
c.2delT	1	M1, incorrecto inicio traducción	Australia	(22)
c.3G>T	1	M1, incorrecto inicio traducción	Alemania	(23)
c.5G>C	Intrón 1	Cambio pauta lectura	USA	(27)
c.118delC	1	Cambio pauta lectura tras R39	España	(26)
c.157delC	1	Cambio pauta lectura tras P52	Francia	(24)
c.157-158insC	1	Cambio pauta lectura tras P52	Polonia, Canadá	(24)
c.202GTCA>TTG	2	Cambio pauta lectura tras H86	Reino Unido	(28)
c.297-298insT	3	Cambio pauta lectura tras E100	Cuba	(26)
c.317delT	3	Cambio pauta lectura tras S105	Reino Unido	(28)
c.317T>G	3	L106X	Francia	(10)
c.340delI3	3	Cambio pauta lectura tras L113	Reino Unido	(28)
c.384+1G>A	Intrón 3	Elimina exón 4	Reino Unido	(33)
c.385-2A>G	Intrón 3	Elimina exón 4	España, Francia	(10, 26)
c.465G>A	4	W155X	España	(26)
c.482+3delA	Intrón 4	Elimina exón 4	Italia	(24)
c.482+2T>G	Intrón 4	Elimina exón 4	Australia	(29)
CAMBIO DE AMINOÁCIDO				
c.317T>C	3	L106S	USA	(30)
c.364G>T	3	D122Y	Alemania	(24)
c.389G>T	4	G130V	Francia, USA	(21, 25)
c.460A>T	4	I154F	Italia	(10)
c.464T>C	4	W155R	USA	(34)
c.467T>C	4	L156P	Suiza	(24)
c.493C>T	5a	R165C	USA, Australia	(27, 29)
c.517T>G	5a	W173G	USA, Italia	(24)
c.544C>T	5a	L182F	Australia	(24, 31)
c.545TC>A	5a	L182H	Francia	(24)
c.548A>G	5a	H183R	Francia	(24)
c.593T>G	5a	L198R	Irlanda	(32)

Tabla 1 Mutaciones puntuales asociadas a FRDA.

1.2 Patrón de expresión del gen *FRDA*.

El gen *FRDA* codifica la frataxina, una proteína de 210 aminoácidos. Frataxina no forma parte de ninguna familia conocida de proteínas. Sin embargo, se ha encontrado una alta homología en organismos tan alejados evolutivamente como las bacterias y el ratón, pasando por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca *Drosophila melanogaster*. La región más conservada reside en la región C-terminal, que corresponde a los exones 3, 4 y 5a **(36, 37)**.

La expresión de la frataxina en humanos es muy alta en tejidos con un gran requerimiento energético, como son el corazón y la médula espinal; expresión media en hígado, músculo esquelético y páncreas; una expresión baja en cerebelo; y mínima en todos los otros tejidos analizados, incluyendo entre ellos curiosamente el cerebro **(10)**. El hecho de que no se exprese mucho en cerebro hace pensar que, a pesar de que se exprese en tejidos con alto consumo energético, debe haber otra razón para este patrón, puesto que el cerebro consume mucha energía. Lo más destacable de este patrón es que coincide con el patrón de tejidos dañados en los pacientes. Llama la atención los órganos como hígado y músculo esquelético, donde la expresión de frataxina es muy alta, pero que, sin embargo, se muestran poco afectados excepto por una debilidad muscular variable. La explicación podría residir en la capacidad de regeneración de estos tejidos, a diferencia de los miocardiocitos, neuronas y células β pancreáticas que no son capaces de regenerar y sí que se ven afectados en pacientes *FRDA* **(38)**.

El estudio de la expresión durante el desarrollo se ha realizado en el ratón **(39)** y en *Drosophila melanogaster* **(36)**. En *Drosophila* el patrón de expresión embrionario es ubicuo y constante durante el desarrollo y posteriormente en la edad adulta. Sin embargo, en el ratón la expresión del gen es variable tanto a lo largo del desarrollo como en los tejidos. La expresión comienza en el neuroepitelio en el día 10 del desarrollo (E10.5), alcanzando su máximo nivel en E14.5 hasta el periodo postnatal. Se expresa en el sistema nervioso central, en células proliferativas y en el neuroepitelio coroideo. Hay expresión máxima en la región toracolumbar de la médula espinal, desde E12.5. Pero, sorprendentemente, se expresa más en las

columnas anteriores que en las posteriores, contrariamente a lo que se esperaría teniendo en cuenta los efectos de la patología en los enfermos FRDA, los cuales tienen deterioradas las columnas posteriores. Coincidiendo con la expresión en humanos, la frataxina se encuentra en los ganglios de las raíces dorsales, así como en corazón, hígado, intestino y músculo esquelético.

1.3 Frataxina: localización y maduración.

Frataxina es una proteína soluble de la matriz mitocondrial, asociada a la membrana interna de la mitocondria. Las primeras observaciones para determinar la localización subcelular de frataxina se llevaron a cabo utilizando la proteína fluorescente verde fusionada a la proteína homóloga de frataxina en levadura (Yfh1p) **(40, 41)**. La localización mitocondrial de la frataxina endógena se demostró posteriormente por inmunocitofluorescencia, análisis por Western blot de las distintas fracciones celulares obtenidas por centrifugación diferencial y por microscopía inmunoelectrónica **(21)**. Tanto frataxina como Yfh1p se sintetizan como una molécula precursora de mayor tamaño y durante su internalización a mitocondria la proteína es objeto de dos cortes proteolíticos produciendo una forma intermedia y por último una forma madura. La proteína responsable de la maduración de la frataxina es la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) **(42, 43)**. Además de la MPP, se requieren dos componentes de la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales, Tim44 y Ssq1, para una correcta producción del intermediario y de la forma madura de Yfh1p **(44-46)**. Posiblemente, Tim44 y Ssq1, intervienen en el correcto plegamiento de la frataxina, haciendo que los sitios de corte sean más accesibles a la MPP.

1.4 Modelos animales de la ataxia de Friedreich.

La utilización del modelo de levadura ha aportado una poderosa herramienta para analizar la función de frataxina ya que ésta podría estar conservada a lo largo de la evolución. Con la delección del gen *YFH1* se obtuvo una cepa mutante, *yfh1D*, incapaz de crecer sobre una fuente no fermentable de carbono sugiriendo que no podía llevar a cabo la fosforilación oxidativa. La cepa presentaba un acúmulo de hierro mitocondrial (hasta 10 veces más que la cepa

Introducción

salvaje) y exhibía, además, una alta sensibilidad al estrés oxidativo inducido por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o el hierro **(38, 41, 47-49)**. Hay múltiples evidencias de que la frataxina de levadura y de mamíferos son verdaderas proteínas ortólogas. La frataxina humana es capaz de complementar el defecto de las células *yfh1D* y esta complementación desaparece cuando se introduce en el gen mutaciones puntuales que causan la enfermedad **(48, 50)**.

Recientemente se ha caracterizado la primera proteína homóloga de frataxina en organismos fotosintéticos, concretamente de *Arabidopsis thaliana*, capaz de restaurar los rangos normales en la respiración y el crecimiento en el mutante *yfh1D* **(51)**.

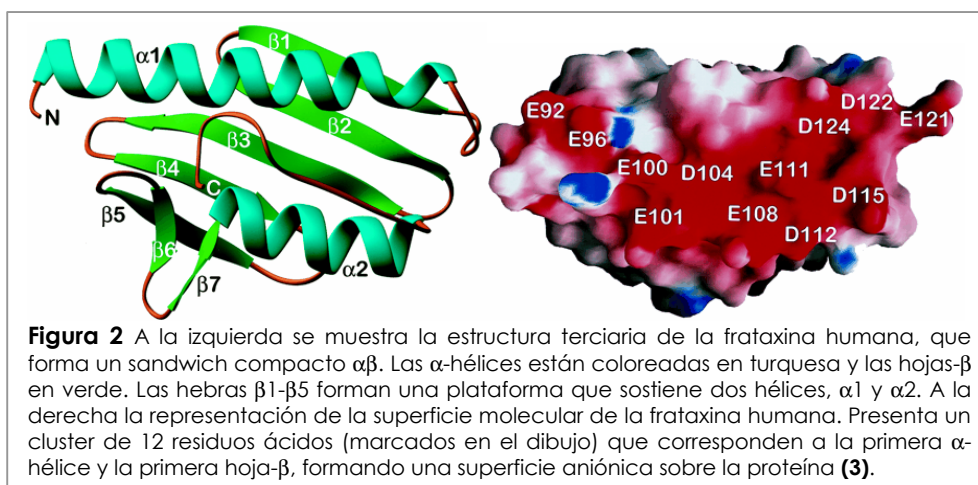
El primer intento para crear un modelo de ratón de ataxia de Friedreich fue con una deleción en homocigosis del exón 4 del gen *Frd1*, lo que lleva a producir una proteína truncada que no contiene el dominio más conservado **(52)**. Esta mutación es embrionariamente letal a los pocos días de implantación, sugiriendo que frataxina es esencial durante el desarrollo. Esto contrasta con la situación que se observa en los pacientes FRDA que parecen tolerar la deficiencia de frataxina durante el desarrollo y sugiere que los humanos han desarrollado mecanismos compensatorios para superar el déficit de frataxina. Una segunda posibilidad vendría de la observación de que la gran mayoría de los pacientes FRDA son homocigotos para la expansión de GAA, y nunca se ha encontrado un homocigoto de mutaciones puntuales. Como ya se ha comentado, la expansión parece bloquear la transcripción y es bastante posible que se produzca suficiente frataxina en los pacientes para permitir un desarrollo normal, con la aparición gradual de la sintomatología de la enfermedad. Cabe destacar que, a diferencia de las observaciones realizadas en levadura, en el *knock-out* de ratón no hay evidencias de una acumulación de hierro en los embriones.

Posteriormente se generaron dos modelos de ratón FRDA condicionales a través de la deleción del exón 4 del gen *Frd1*: el primero en músculo esquelético, bajo el control del promotor creatin kinasa de músculo MCK; y el segundo en tejido neuronal y músculo cardíaco, bajo el control del promotor NSE de la enolasa específica de neuronas. Estos ratones reproducen tanto la fisiopatología como las características bioquímicas más importantes de la enfermedad en humanos. En ellos también se demostró que el acúmulo de hierro intramitocondrial es

dependiente del tiempo, empezando a aparecer los depósitos tras la aparición de la patología y la inactivación de los enzimas dependientes de los clusters hierro-azufre (Fe-S) (53).

1.5 Estructura de la frataxina.

Se ha descrito la estructura cristalina de la frataxina humana y la estructura derivada por RMN de la proteína soluble (3, 54). Todos los estudios están de acuerdo en que la frataxina madura es una proteína compacta y globular que contiene siete hojas- β flanqueadas por dos α -hélices (figura 2). En la parte central de la estructura formada por una hoja- β y una α -hélice se encuentran concentrados aminoácidos hidrofóbicos. Muchos de estos aminoácidos son necesarios para la estabilización de la estructura y no pueden ser reemplazados, como se demuestra por su conservación en diferentes especies y por el efecto que tienen mutaciones puntuales que provocan cambios en estos aminoácidos. Aparentemente, algunas partes de la superficie de la frataxina están también conservadas, como es el caso de un conjunto de residuos ácidos y de un parche aniónico de residuos con carga negativa. El tamaño y naturaleza de la región conservada sugiere que podría interactuar con un ligando o posiblemente con alguna proteína.



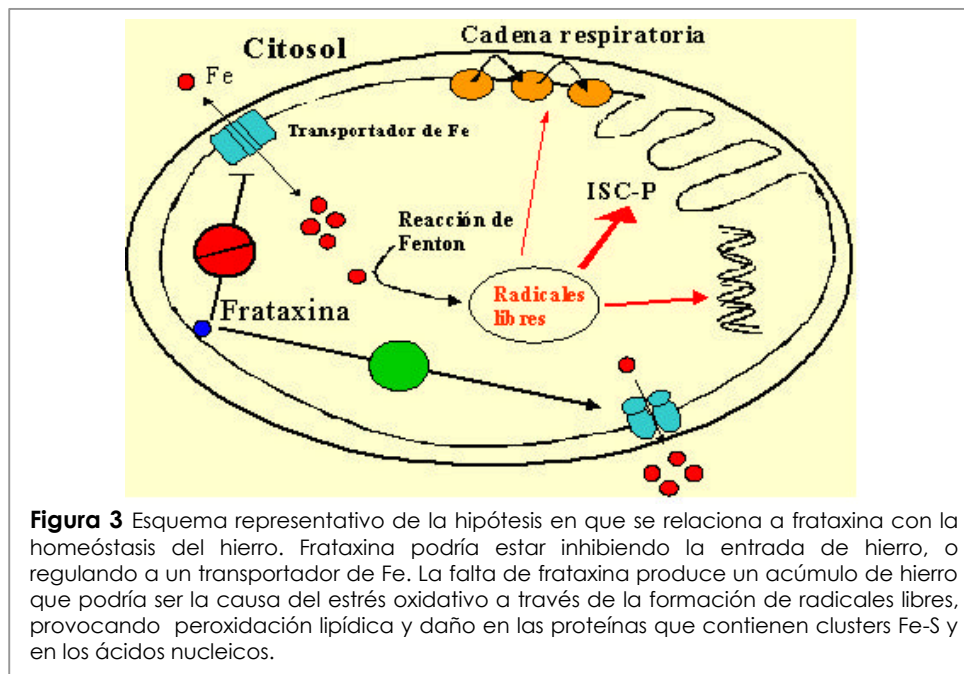
1.6 Función de la frataxina.

Desde que se describió el gen responsable de la enfermedad y sobre todo gracias a la generación de organismos modelos para su estudio, se han postulado diferentes funciones para la frataxina. A medida que han ido surgiendo nuevas hipótesis han ido substituyendo a las anteriores, aunque de alguna manera, todas ellas podrían estar relacionadas ya que una podría ser la consecuencia de la otra, o incluso frataxina podría tener más de una función.

1.6.1 Frataxina y homeostasis del hierro.

La primera hipótesis sobre la función que podría ejercer la frataxina vino dada por las observaciones que se realizaron tanto en pacientes con ataxia de Friedreich como en el mutante de levadura del gen homólogo de frataxina (*YFH1*). En ellos se encontraba alterado el metabolismo del hierro, había un daño producido por radicales libres y una disfunción mitocondrial **(55, 56)**. Por lo tanto, frataxina se relacionó con la homeostasis del hierro. El mutante de levadura presenta una acumulación de hierro en la mitocondria a expensas del hierro citosólico, como consecuencia de la permanente activación del sistema de importación del hierro mitocondrial. Este acúmulo de hierro podría ser la causa del estrés oxidativo, ya que el hierro puede reaccionar con especies reactivas del oxígeno (ROS) que se forman en estos orgánulos, y a través de la reacción de Fenton generar nuevas especies ROS más tóxicas, como el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), que causa peroxidación lipídica y daño en las proteínas y los ácidos nucleicos **(41)**. Algunas de las proteínas que más fácilmente se ven afectadas por los radicales libres son las que contienen clusters Fe-S, tales como los complejos I, II y III de la cadena de transporte electrónico y la aconitasa, que presentan una disminución de la actividad en miocardiocitos humanos y en levadura **(figura 3)(57, 58)**.

Posteriormente, cuando se describió el *knock-out* condicionado de ratón lo primero que llamó la atención es que no se apreciaban depósitos de hierro, por lo que no parecía que éste fuera el defecto primario sino un efecto secundario, eso sí, de gran relevancia patogénica en el proceso de la enfermedad. Así que la primera hipótesis quedó un poco relegada.



1.6.2 Frataxina como reguladora de la fosforilación oxidativa.

La frataxina se ha relacionado desde el principio con la respiración, ya que los mutantes de levadura presentaban una disminución de la fosforilación oxidativa (57). Del mismo modo, utilizando resonancia magnética nuclear, se observó *in vivo* una disminución en la producción de ATP después de realizar ejercicio en músculo esquelético de pacientes FRDA (59).

Ristow y colaboradores sobreexpresaron frataxina humana en adipocitos humanos (60) y observaron un incremento en la actividad del transporte de electrones, un aumento en el potencial de membrana y, por lo tanto, una mayor producción de ATP. Así pues, frataxina podría ser un estimulador de la fosforilación oxidativa.

En líneas de *Arabidopsis thaliana* que presentan una disfunción mitocondrial inducida por la expresión incorrecta de la subunidad 9 de la ATP sintasa, la expresión de frataxina se ve incrementada en las flores, tejido de mayor demanda de energía en las plantas. Este aumento en la expresión podría ser un

Introducción

efecto compensatorio en respuesta a una disminución en la respiración mitocondrial (51).

1.6.3 Frataxina como proteína de almacenaje del hierro.

Una tercera hipótesis se planteó a raíz de los experimentos realizados *in vitro* con la frataxina de levadura y que propone que frataxina podría unir hierro, posiblemente como una proteína de almacenaje (61). En un principio se aislaron monómeros de mYfh1p, que no eran capaces de unir hierro, ni mostraban tendencia a autoasociarse. Pero cuando se añadía hierro ferroso a los monómeros mYfh1p en presencia de oxígeno provocaba la formación de trímeros de frataxina que catalizan la oxidación del hierro (62, 63). Por otro lado, también se vió que altas concentraciones de hierro inducen al ensamblaje de la proteína llegando a secuestrar más de 2000 átomos de hierro (64). El alto peso molecular del complejo recordaba a la estructura de la ferritina, que contiene un gran número de átomos de hierro férrico. Aunque la frataxina humana es incapaz de formar, *in vitro*, estas partículas parecidas a la ferritina, sí que se vió que a concentraciones fisiológicas del hierro en la mitocondria, alrededor de un 10% de la frataxina humana forma un complejo esférico que contiene este metal (65). Las diferencias encontradas entre Yfh1p y frataxina de mamíferos podrían ser debidas a la existencia de una ferritina mitocondrial en eucariotas superiores (MfF) (66). Muy recientemente se ha visto que la expresión de MfF en la levadura deficiente en frataxina rescata la carencia respiratoria permitiendo así el crecimiento de las células en una fuente de carbono no fermentable, y previene la acumulación del hierro mitocondrial protegiendo además la actividad de las enzimas hierro-azufre (67). Estos datos muestran que MfF puede sustituir las funciones de frataxina en la levadura, sugiriendo que frataxina estaría directamente involucrada en la unión del hierro mitocondrial y en la detoxificación.

Una característica común en Yfh1p y la frataxina de mamíferos es que la unión del hierro es fácilmente reversible por la adición de quelantes, indicando que el hierro está probablemente biodisponible. Una posible interpretación que se da a todos estos datos es que frataxina podría ser una chaperona mitocondrial de hierro que previene la reacción de Fenton, escondiendo el hierro de las especies

reactivas de oxígeno, mientras lo reserva para su utilización en otras rutas biosintéticas. Por lo tanto, en el caso de mamíferos donde existe la ferritina mitocondrial, únicamente sería necesaria la función de chaperona y no la de almacenaje. Además la variación en los niveles de hierro intracelular no tienen efecto sobre la expresión de frataxina, y esto no es consistente con el papel de proteína de almacenaje del hierro **(68)**.

1.6.4 Frataxina como proteína chaperona del hierro en procesos biológicos mitocondriales.

Una de las proteínas a las que frataxina podría ceder el hierro ferroso es la ferrocatalasa, una proteína asociada a la membrana mitocondrial que cataliza el último paso de la biosíntesis del grupo hemo. De hecho, se ha demostrado que hay una interacción física entre frataxina y la ferrocatalasa **(63, 69, 70)**.

Una de las observaciones en los mutantes de levadura así como en los pacientes Friedreich es que hay un defecto en las proteínas Fe-S. La causa del fallo en la actividad podría deberse a la alteración en la síntesis de los clusters Fe-S (ISC). Esta ruta se localiza en la mitocondria y se da a través de una maquinaria fuertemente conservada a lo largo de la evolución. Frataxina puede unir seis o siete átomos de hierro que son transferidos a Isu1p, un componente clave en la maquinaria ISC que actúa en las primeras etapas del ensamblaje de los clusters Fe-S **(71)**. Además se ha demostrado la interacción física entre Yfh1p y Isu1p en levadura **(72, 73)**.

Con todos estos datos se ha propuesto una hipótesis en la cual Yfh1p presenta actividad ferroxidasa y propiedades para almacenar hierro. Esto protegería a la mitocondria de la toxicidad del hierro, y a la vez podría actuar como una chaperona donándolo a otras proteínas involucradas en las dos rutas más importantes de utilización de hierro: la síntesis del grupo hemo y la de los clusters Fe-S.

De igual manera, también podría actuar como chaperona facilitando la transferencia de Fe(II) al cluster $[3\text{Fe-4S}]^+$ de la aconitasa mitocondrial, que significaría la reactivación de este enzima. La aconitasa es un enzima del ciclo de Krebs –donde se convierte el citrato en isocitrato- perteneciente a la familia de

Introducción

deshidratadas que contienen hierro-azufre y cuya actividad depende de que el cluster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ esté intacto. Se ha demostrado una interacción entre frataxina y aconitasa, pero siempre en presencia de citrato, que podría estabilizar esta interacción y promover la reactivación del enzima. Un modo de actuación del citrato sería bien como puente entre las dos proteínas, bien como una co-chaperona, orientando el hierro de forma apropiada para la re inserción y estabilización de la estructura de la proteína **(74)**.

En resumen, la ataxia de Friedreich es una enfermedad mitocondrial causada por defectos en la proteína frataxina, la cual podría actuar como una chaperona aportando hierro a otras proteínas para su utilización en diferentes rutas, formación de clusters Fe-S y síntesis del grupo hemo, o bien para la activación de la proteína aceptora del Fe, la aconitasa. A su vez, también podría ser que funcionara como un modulador, por ejemplo, en la cadena de transporte electrónico o en la homeostasis del hierro. Pero, a pesar de todos los estudios realizados, aún no podemos concluir cuál es su función exacta ya que todas las hipótesis planteadas hasta la fecha no explican todos los efectos observados tanto por déficit como por sobreexpresión de la frataxina. Además, hay que tener en cuenta que una forma de actuación de la frataxina no tendría porqué ser excluyente de otra.

1.7 Proteínas mitocondriales relacionadas con ataxias cerebelosas.

Desde el descubrimiento de la frataxina y su localización como molécula de la matriz mitocondrial, la ataxia de Friedreich se ha convertido en el prototipo de enfermedad mitocondrial causada por un gen nuclear. No obstante, no es la única ataxia que se puede considerar como mitocondrial. Otro ejemplo es la anemia sideroblástica ligada al X asociada con ataxia cerebelosa (XLSA/A; OMIM 301310), causada por mutaciones en el gen del transportador mitocondrial ABC7 **(75)**.

Los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) constituyen una de las mayores familias de proteínas conservadas a lo largo de la evolución, con numerosos ejemplos presentes en arqueobacterias, eubacterias y eucariotas. La mayoría de estas proteínas están involucradas en el transporte, dependiente de

energía, de una gran diversidad de sustratos como iones metálicos o péptidos, a través de diferentes membranas celulares. Numerosas enfermedades genéticas resultan de alteraciones en la capacidad de estas proteínas para transportar sustratos, como son el colesterol en la enfermedad de Tangier (76), retinol en la enfermedad de Stargardt (77, 78) y el ión cloro en la fibrosis quística (79).

La estructura canónica de un transportador funcional incluye dos dominios transmembrana (TMDs: **t**rans**m**embrane **d**omain) y dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs: **n**ucleotide **b**inding **d**omain), localizados estos últimos en el citoplasma (80). Dentro de NBD, existen secuencias altamente conservadas, los motivos Walter A y B que son comunes en muchas ATPasas, y la secuencia *signature*, que es característica de los transportadores ABC (81, 82). Estos elementos conservados son requeridos para la unión y la hidrólisis del ATP (83). Mientras que el TMD determina la especificidad de sustrato, el NBD sirve como motor, acoplado la energía de la hidrólisis del ATP al transporte transmembrana. Los genes ABC están organizados como transportadores completos, conteniendo dos NBD y los dos TMD, que formarían el prototipo de proteína ABC, o como medios transportadores que contienen un dominio de cada, existiendo luego la posibilidad de formar un homodímero o un heterodímero.

1.7.1 Anemia sideroblástica ligada al X con ataxia espinocerebelosa (XLSA/A).

El gen ABC7 está localizado en el brazo largo del cromosoma X, Xq12-q13, y codifica para una proteína que es miembro de la subfamilia MDR/TAP. Las mutaciones en este gen son responsables de la XLSA/A. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de una ataxia cerebelosa no progresiva, disminución de los reflejos osteotendinosos y elevada cantidad de protoporfirina libre en eritrocitos. A diferencia de la anemia sideroblástica hereditaria más común, la anemia sideroblástica ligada al X (XLSA) asociada a mutaciones en el gen 5-aminolevulínico ácido sintasa específica de eritrocito (ALAS2; ONIM 301300), presenta un almacenamiento normal del hierro en el parénquima, y el paciente no mejora suplementando con piridoxina. Esto hizo que se sospechara de la existencia

Introducción

de otro gen, también presente en el cromosoma X, asociado a las anemias sideroblásticas.

Todas las mutaciones descritas hasta la fecha que causan la anemia sideroblástica ligada al X con ataxia (XLSA/A), se encuentran localizadas en la zona de dominios transmembrana (**tabla 2**) (**75, 84-86**).

Cambio nucleotídico	Exón	Efecto sobre la secuencia codificante	Referencia
CAMBIO DE AMINOÁCIDO			
c.1200T>G	10	I400M	(75, 84)
c.1299G>C	10	V411L	(86)
c.1305G>A	10	E433K	(85)

Tabla 2 Mutaciones puntuales asociadas a ABC7

En *S. cerevisiae* el gen ortólogo del ABC7 humano es el gen *ATM1*, demostrado porque el cDNA de hABC7 es capaz de complementar al mutante *atm1D* (**87-89**). La delección del gen *ATM1* resulta en un defecto drástico del crecimiento y una deficiencia en las proteínas que contienen el grupo hemo, tanto fuera como dentro de la mitocondria. Como consecuencia de la falta de Atm1p hay un incremento en los niveles de hierro libre en la mitocondria hasta 30 veces mayor que en una cepa salvaje, pérdida de citocromos mitocondriales, daño oxidativo del DNA mitocondrial y una disminución en los niveles de proteínas citosólicas hemo (**87, 88**). Así pues, en un principio, Atm1p se la relacionó con una correcta homeostasis del hierro mitocondrial. Por otro lado, la delección de *ATM1* provoca una restricción en el hierro citosólico y la pérdida de proteínas citosólicas Fe-S (**90**).

Atm1p está localizada en la membrana interna de la mitocondria con la zona carboxi terminal NBD en la matriz. Basándose en esta orientación se puede predecir que su función es exportar el sustrato desde la matriz al espacio intermembranoso (**87**). La función específica de Atm1p no ha sido identificada, pero basándose en el fenotipo del mutante *atm1D*, se ha propuesto un papel en la exportación del hierro mitocondrial y/o en el ensamblaje y maduración de los

clusters Fe-S de las proteínas citosólicas, concretamente en el transporte de los cluster Fe-S de la matriz mitocondrial al citosol **(90)**.

El transportador mitocondrial Atm1p funciona como un homodímero, siendo la unión del ATP importante para su dimerización, ya que mutaciones en el NBD afectan a la estabilidad del dímero. Además, los residuos conservados en los motivos Walter A y B del NBD, que son requeridos para la unión e hidrólisis del ATP, son esenciales para la función de Atm1p **(91)**.

Por otro lado, se ha propuesto un papel del ABC7 en la biosíntesis del grupo hemo en células de eritrocitos, donde la hemoglobina es el producto predominante que contiene hierro. Esta relación con la biosíntesis del grupo hemo se daría vía la interacción del ABC7 con la ferrocatalasa **(92)**.

1.8 Organismos modelo.

A lo largo del siglo XX, merced a las investigaciones en una variedad de organismos, se ha podido avanzar en el conocimiento de numerosos procesos biológicos. En muchos aspectos la biología de todos los organismos es muy similar, pero habitualmente es mucho más fácil estudiar un aspecto en particular en un organismo que en otros. Estos organismos son a los que comúnmente nos referimos como organismos modelo. Cada uno de estos organismos tiene una o más características que lo hacen idóneo para el estudio en el laboratorio. Los organismos modelo más populares presentan una serie de características como son: un rápido desarrollo con un corto periodo de vida, tamaño del adulto pequeño, fácil manejo y disponibilidad; además, empieza incluso a ser más útil cuanto mayor sea el número de científicos que trabajen con él. Así pues, se puede obtener una gran cantidad de información de estos organismos, proporcionando datos que pueden ser posteriormente extrapolados para el estudio de enfermedades genéticas humanas.

En este trabajo se han utilizado dos organismos modelo: *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans*.

1.9 *Saccharomyces cerevisiae*.

Comúnmente conocida como la levadura del pan o la cerveza, se ha utilizado para estudios de investigación a lo largo de mucho tiempo. La secuencia completa del genoma de la cepa de laboratorio S288C de *S. cerevisiae* se obtuvo en 1996, convirtiendo la levadura en el primer organismo eucariota en completarse su secuenciación (93). Un porcentaje significativo de genes de levadura, alrededor de un 20%, tienen su homólogo en humanos.

La levadura ha aportado una poderosa herramienta bioquímica, genética y genómica. Gracias a los ensayos genéticos clásicos con levadura se han descubierto y caracterizado muchos genes que componen una célula eucariota o que participan en un proceso biológico como es el caso del ciclo celular.

1.10 *Caenorhabditis elegans*.

Caenorhabditis elegans es un pequeño nematodo de vida libre que se encuentra en muchas partes del mundo. Se alimenta principalmente de bacterias, y bajo unas condiciones óptimas en aproximadamente 3 días cierra su ciclo de vida. El tamaño de ambos sexos, hermafroditas y machos, es de aproximadamente 1mm de largo, pero su morfología es diferente en la edad adulta (figura 4).

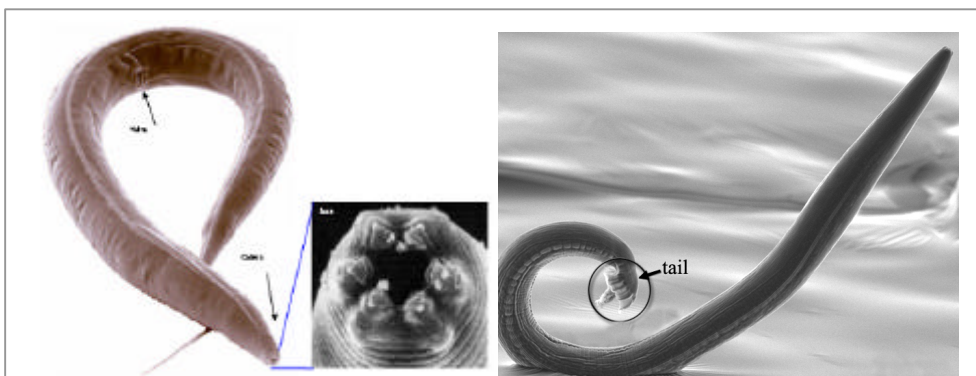


Figura 4 Imagen de microscopía de barrido de dos individuos adultos, hermafrodita (izquierda) y macho (derecha), de la especie *C. elegans*. En el gusano hermafrodita (izquierda), se puede observar la cutícula en anillos y la boca con las terminaciones sensoriales que recogen información química, térmica y mecánica. En el macho adulto (derecha) se puede observar la diferencia en la estructura de la cola respecto al hermafrodita. Obtenido de <http://wormatlas.org>.

C.elegans es un organismo simple, tanto anatómicamente como genéticamente. El hermafrodita adulto tiene 959 células somáticas y el macho adulto tiene 1031. Tanto el número de células como su posición son constantes. El sexo viene determinado por el ratio entre la cantidad de cromosomas sexuales y autosómicos. *C. elegans* tiene 5 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales. Si el sexto par de cromosomas es XX entonces dará lugar a un hermafrodita, mientras que si es X0 se produce un macho. Los hermafroditas producen tanto ovocitos como esperma y pueden reproducirse por autofecundación, pero no pueden fertilizar a otros hermafroditas. Los machos, que

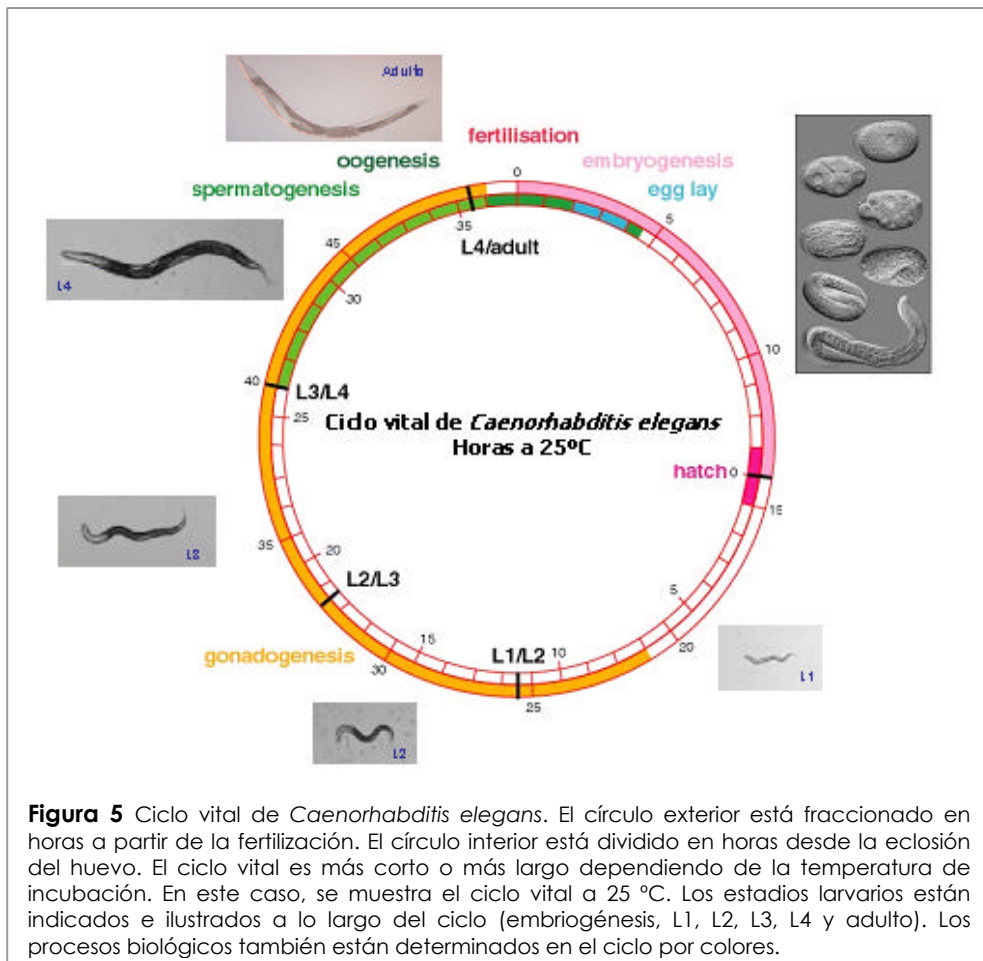


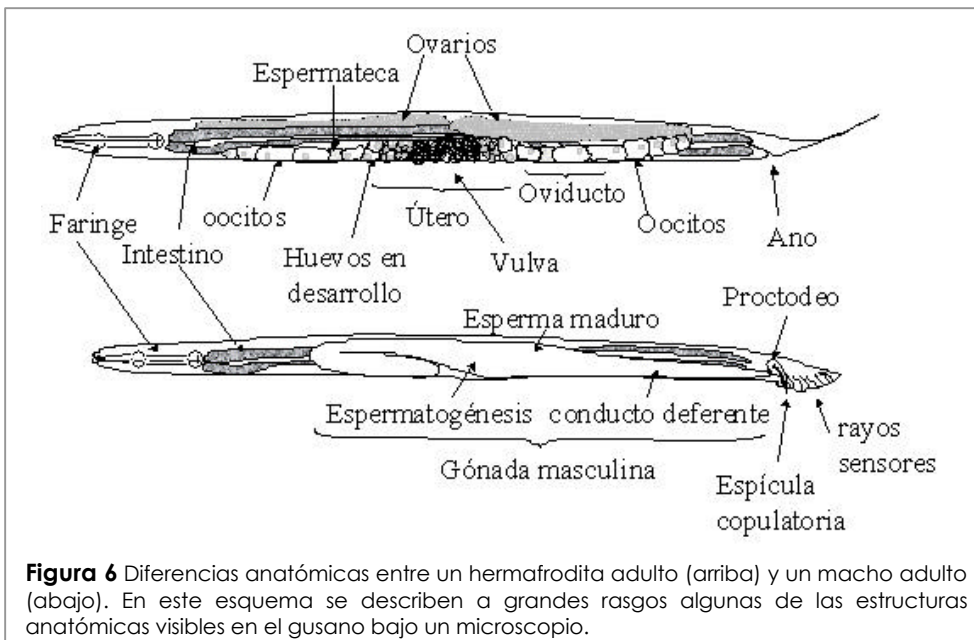
Figura 5 Ciclo vital de *Caenorhabditis elegans*. El círculo exterior está fraccionado en horas a partir de la fertilización. El círculo interior está dividido en horas desde la eclosión del huevo. El ciclo vital es más corto o más largo dependiendo de la temperatura de incubación. En este caso, se muestra el ciclo vital a 25 °C. Los estadios larvarios están indicados e ilustrados a lo largo del ciclo (embriogénesis, L1, L2, L3, L4 y adulto). Los procesos biológicos también están determinados en el ciclo por colores.

Introducción

aparecen de manera espontánea con una frecuencia baja, pueden fertilizar hermafroditas. Un hermafrodita es capaz de poner alrededor de 300 huevos a lo largo de su vida reproductiva. Esta característica facilita la producción de numerosos genotipos y fenotipos para un estudio genético. Una vez huevo eclosiona, el gusano se desarrolla pasando por cuatro estadios larvares, cada uno de ellos interrumpido por un cambio de muda, hasta convertirse en joven adulto. El adulto maduro es fértil durante 4 días y posteriormente es capaz de vivir entre 10 y 15 días (**figura 5**). Comparando esto con otros organismos modelos, como es el ratón, el corto ciclo de vida de *C. elegans* reduce el ciclo experimental y facilita los estudios biológicos.

El mantenimiento de *C. elegans* en el laboratorio es muy sencillo, ya que puede crecer en placas de agar o en medio líquido con *Escherichia coli* como fuente de alimenticia.

Los animales, con la ayuda de una lupa estereoscópica, pueden ser observados y manipulados de forma individual. El gusano es transparente a lo largo de todo su ciclo de vida y, gracias a esta característica, utilizando un microscopio con luz preferiblemente con sistema Nomarski, se puede observar en preparaciones vivas el desarrollo y el linaje celular (**figura 6**).



El tamaño del genoma es de 8×10^7 pares de nucleótidos, alrededor de 8 veces más que la levadura *Saccharomyces* y 1/30 del humano. El genoma de *C. elegans* fue secuenciado completamente en 1998, convirtiéndose así en el primer organismo multicelular del que se disponía la secuencia completa de su genoma (94). Además, el hecho de que su genoma muestre bastante similitud con el genoma humano (un 40% de homología), hace que *C. elegans* sea un organismo muy atractivo para el estudio de enfermedades humanas.

1.10.1 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo: ventajas y características.

Existen trabajos con *C. elegans* previos a la década de los años sesenta del siglo XX. Pero es a partir de entonces cuando Sidney Brenner (95) propuso estudiar el sistema nervioso y el desarrollo de los animales empleando este metazoo que es susceptible de ser manipulado como un microorganismo. Los grandes avances en biología molecular y en genética se habían realizado gracias a la utilización de virus, bacterias y otros microorganismos, que ofrecían la oportunidad de trabajar con grandes cantidades de individuos y con tiempos de generación muy cortos. Hasta entonces existían otros modelos animales bien consolidados, tales como *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, etc. Sin embargo, *C. elegans* ofrecía la posibilidad de trabajar con un modelo que presentaba el equilibrio justo entre lo sencillo y lo complejo.

Cuando *C. elegans* fue propuesto como organismo modelo debido a sus cualidades, no se conocían aún todas las ventajas de trabajar con este gusano. Se han descrito, desde entonces, peculiaridades muy útiles que hacen más sencillo todavía el trabajo con este organismo. En *C. elegans* un DNA exógeno inyectado en el sincitio de la gónada se liga y/o recombina para formar una construcción en tándem, de entre 80 y 300 copias del DNA inyectado (96). Además estas construcciones son heredadas por la progenie del gusano transgénico, sin necesidad de ser integradas en el genoma. Esto permite realizar experimentos de sobreexpresión de proteínas y ácidos nucleicos, expresión de genes *reporter*, etc, en tiempos asombrosamente cortos. Por otro lado se describió en 1998 un proceso fisiológico, que más tarde se comprobaría que estaba conservado en muchos otros

Introducción

organismos, por el cual se puede degradar el mensajero de un gen concreto. Este proceso es la interferencia por RNA o RNAi **(97, 98)**. Con esta técnica se puede hacer genética reversa con una gran facilidad y rapidez. El RNAi es un proceso natural, por el cual se degradan moléculas de RNA de manera muy específica, puesto que se emplea el apareamiento de bases para detectar la molécula de RNA diana **(99)**. Esto es el fundamento de una nueva forma de producción de mutaciones hipomorfas, llamada *knock-down* o reducción transitoria de la expresión de un gen. Introduciendo moléculas de doble cadena de RNA (dsRNA) de un gen concreto, en el ambiente celular de los nematodos (y de otros organismos), se puede obtener una fenocopia de un mutante para el gen en cuestión **(100)**.

Mientras las secuencias de genes y genomas disponibles en las distintas bases de datos aumentan exponencialmente, la comprensión de la función de los genes lo hace linealmente. Una técnica útil, si no imprescindible, para obtener datos sobre la función de un gen es la genética reversa, mediante la construcción de mutantes estructurales. En los modelos animales tradicionales, *Drosophila* y ratón, el tiempo de generación de un mutante estructural es muy largo. Respecto a esto, otra gran ventaja que presenta este nematodo es que es susceptible de ser congelado y recuperado después de largo tiempo, cuando es mantenido a -80° C. Esto permite hacer rastreos de mutantes estructurales en bancos de cepas con inserciones de elementos transponibles **(101)**. Este tipo de rastreos permite obtener mutantes estructurales en un periodo de tiempo de semanas. De esta forma, se puede llevar a cabo la preparación de mutantes en masa, lo que permitirá en breve el estudio de muchos genes. Por otro lado, el hecho de que *C. elegans* sea un animal muy sencillo, evita que el fenotipo resultante de una mutación sea enmascarado por la complejidad del organismo.

Quizás, la prueba más relevante para la importancia del uso de organismos modelos sencillos para el estudio de enfermedades humanas está ejemplarizado por la obtención del premio Nobel en fisiología o medicina del año 2002 y 2001, otorgado a trabajos en que se utilizaron tanto *C. elegans* como en *S. cerevisiae*. En el 2002 el premio fue para tres investigadores, Sydney Brenner, Robert Horvitz y John Sulston quienes utilizaron *C. elegans* para dar un significado a genes que regulan la muerte celular programada o apoptosis. De la misma manera, en el año 2001 el

Introducción

premio Nobel de la misma categoría fue para los investigadores Leland H. Hartwell, Tim Hunt y Paul M. Nurse, por sus aportaciones para descubrir las claves para la regulación del ciclo celular utilizando como herramienta de trabajo la levadura. Así pues, cualquiera de los dos organismos ha recibido el reconocimiento científico a nivel mundial. Pero, además, hoy en día se emplean para el estudio de enfermedades humanas.

Introducción

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y Objetivos

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1 Hipótesis de trabajo.

- La frataxina es una pequeña proteína globular localizada en la matriz mitocondrial. Se ha postulado su participación en la homeostasis del hierro mitocondrial y otras rutas bioquímicas. Nosotros proponemos que la frataxina realiza su función en la mitocondria mediante la interacción con otras proteínas y es posible que participe en diferentes procesos biológicos mitocondriales interactuando con distintas proteínas en cada uno de ellos.
- Los organismos inferiores son buenos modelos para el análisis bioquímico y genético de genes involucrados en enfermedades humanas. En este trabajo utilizaremos *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans* para el estudio de las ataxias cerebelosas que son las que centran nuestro interés.

2.2 Objetivos.

Para investigar tanto la función de la frataxina como la hipótesis que relaciona la alteración de genes involucrados en la homeostasis del hierro mitocondrial y síndromes atáxicos, nos planteamos una aproximación genética a través de dos estrategias: 1) Estudio de nuevas interacciones de otras proteínas con la frataxina; 2) Aislamiento y caracterización de los genes homólogos en *C. elegans* relacionados con la homeostasis del Fe y generación de mutantes transitorios.

Capítulo I. Estudio de nuevas interacciones de otras proteínas con frataxina.

- × **Identificación de proteínas capaces de interactuar con Yfh1p, la frataxina de *Sacchararomyces cerevisiae*.** Rastreo de proteínas mediante doble híbrido y análisis bioquímico y genético de la interacción entre la frataxina y las proteínas candidatas de la levadura *S. Cerevisiae*. Posteriormente, confirmación de la interacción de las proteínas humanas.

Capítulo II. Elección de genes humanos involucrados con la homeostasis del Fe y análisis de los genes homólogos en *Caenorhabditis elegans* y creación de mutantes.

- * Elección de genes candidatos en humanos y búsqueda de homólogos en *C. elegans*.
- * Análisis de la estructura de los genes aislados de *C. elegans*.
- * Generación de mutantes transitorios *knock-down* de *C. elegans*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y Métodos

3 MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Material biológico.

3.1.1 Cepas de *Escherichia coli*. Genotipo

- **DH5a:** F'/endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D(LacIZYA-argF) U169 deoR (Φ80dlac D(lacZ)M15).
- **XL1Blue:** F':Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q D(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) glnV44 relA1 lac.
- **HT115:** F, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::D^rTn10(DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase (te^t)).
- **OP50:** Auxotrofia para uracilo.

3.1.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Genotipo

- **TAT7:** MATa ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 LYS2::lexAop-HIS3 URA3::lexAop-lacZ
- **FY250:** MATa his3 D200 leu2D1 trpD63 ura3-52
- **W303A:** MATa ade2 ura3 his3 trp1 leu3 can1
- **W303B:** MATa ade2 ura3 his3 trp1 leu3 can1
- **yfh1D:** yfh1D::KanMx derivada de W303-A
- **sdh1D:** sdh1D::LEU2 derivada de W303-B
- **sdh2D:** sdh2D::TRP1 derivada de W303-B
- **ypr004cD:** ypr004cD::URA3 derivada de W303
- **yfh1D sdh1D:** yfh1D:: KanMx sdh1D::LEU2 derivada de W303
- **yfh1D sdh2D:** yfh1D:: KanMx sdh2D::TRP1 derivada de W303
- **sdh1D sdh2D:** sdh1D::LEU2 sdh2D::TRP1 derivada de W303
- **yfh1D ypr004cD:** yfh1D:: KanMx ypr004cD::URA3 derivada de W303
- **sdh1D ypr004cD:** sdh1D::LEU2 ypr004cD::URA3 derivada de W303
- **yfh1D sdh1D sdh2D:** yfh1D::KanMx sdh1D::LEU2 sdh2D::TRP1 derivada de W303
- **yfh1D sdh1D ypr004cD:** yfh1D::KanMx sdh1D::LEU2 ypr004cD::URA3 derivada de W303

3.1.3 Cepa de *Caenorhabditis elegans*. Genotipo

- **Cepa N2**

Cepa salvaje arquetipo. Marcador genético: patrón de Tc1 tipo I.

Aislada en Bristol (Reino Unido) **(95)**.

3.2 Cebadores.

3.2.1 Cebadores empleados en el trabajo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Nº Oligo	Gen	Nombre	Secuencia
66	MDH1	Malato2.rev	GGAAGGATCCCCTATTTACTAGCAACAAGTTGACACC
67	MDH1	Malato.rev	GGAAGGATCCCCTATTTACTAGaACAAGTTGACACC
68	MDH1	Malato.dir	GGAAGAATTCATGGGTGCAGGCGGTGGTATTGGAC
69	MDH1	Malato2.dir	GGAACCCGGGGATGGGTGCAGGCGGTGGTATTGGAC
92	SDH1	SDterL.rev	GGAAGGATCCCTTAGTAGGCTCTTACAGTTGGAGG
58	SDH1	YSDH1-Mut.Dir	TTTTGCCACGTCGAGGCGGC
57	SDH1	Ysdh1-Mut2.rev	ACCCTTGACAGCAATTCGC
90	SDH1	SDFADL.rev	GGAAGGATCCCCTAGGATTCTTTACCAAATCAGAAGG
56	SDH1	Ysdh1-Mut2.dir	AGCAAGCGCTGGACCAAGGG
59	SDH1	YSDH1-Mut.Rev	GCAAAATGATAAATGTCTGCC
95	SDH1	SDHlev.dir	GGAAGAATTCATGGGCTCTGTAAACGGTTCCGCG
89	SDH1	SDFADL.dir	GGAAGAATTCATGAGAACTGAAAACGGTAAGATCTACC
109	SDH1	Sdh1lev.dir	GGAACCCGGGGATGGGCTCTGTAAACGGTTCCGCG
108	SDH1	SdterL2.dir	GGAACCCGGGGATGAATATGAAACAACTATGCAAAAGG
60	SDH1/LEU2	DisSDH1-dir	CACTTTCGATATTCTTTTCACTAATCTCCTCCCCAACCCCGAA TTCCCGGGATCCGGTG
61	SDH1/LEU2	DisSDH1.rev	CGCCATATGACTTCTCCTGCTCATTTTTTGTGAGGGCCCCGG TGATTGATTGAGCCTACCC
101	SDH2	SDFe-S.rev	GGAAGGATCCCCTAGGCAAATGCCAAAGATTTC
48	SDH2	Sdh2-1.dir	CACATATGAAAGTATATACCCGC
49	SDH2	Sdh2-1.rev	GAGAGAAGCCAAAAGGCC
100	SDH2	SDFe-S.dir	GGAAGAATTCATGAGATGGAATCCAGACGAGCC

Nº Oligo	Gen	Nombre	Secuencia
53	SDH2/TRP1	DisSDH2.rev	CTATGATGGACATATATACAGACCGGGTCATAGCATTGCCAG CTATGACCATGATTACGCC
52	SDH2/TRP1	DisSDH2.dir	ACCATGCCTTAGAAATATCCGCAGCGCGCAAAAGGCGGCCGG AAGGCGATCGGTGCGG
20	YFH1	YFH1.rev	GGAACTCGAGTAATGGCTTTTAGAAATGGCCTTC
64	YFH1	YFH1dis.dir	CCGGACTTATTGACTTAGGC
65	YFH1	YFH1dis.rev	ACATATTTTCATGCAATCTCGC
19	YFH1	YFH1.dir	GGAAAAGCTTATGATTAAGCGGTCTCTCGC
111	YGR207C	ETFbeta2.rev	GGAAGGATCCCTTAAATGGCTTAACTTCTTTTAAAC
102	YGR207C	ETFbeta2.dir	GGAACCCGGGGATGGGAATCAAATTCAGTATCAACCC
1	YHB1	ScYHB1.dir	GGAACCATGGAGATGCTAGCCGAAAAACCCGTTC
2	YHB1	ScYHB.rev	GGAAGAATTCCTAAACTTGCACGGTTGACATCTTTGG
79	YHB1	pWS93YHB1.rev	GGAAGGATCCCTTAAACTTGCACGGTTGACATCTTTGG
78	YHB1	PWS93-YHB1.dir	GGAAGAATTCATGCTAGCCGAAAAACCCGTTC
105	YOR356W	ETFdh2.dir	GGAACCCGGGGATGTTGTTAAATGAACCAAGGGC
106	YOR356W	ETFdh.rev	GGAAGGATCCCTTAAAGTTAGCGTGTACTTTGGTCC
50	YPR004C	ETFalfa-1.dir	GCCACTTTGATTGAGTTCCG
51	YPR004C	ETFalfa-2.rev	GTCATCCTATAATTGTTCCG
99	YPR004C	ETFalfa.rev	GGAAGGATCCCTTATTTATATTTACCAAGTTTTTCAG
98	YPR004C	ETFalfa.dir	GGAAGAATTCATGAGTTCATCATTGAGTTTATTGGC
54	YPR004C/URA3	DisETFalfa.dir	CCGCCCGTTTATTATGACTTTTCGGTACATTTTTAGGGCCCTG CAAGGCGATTAAGTTGGG
55	YPR004C/URA3	DisETFalfa.rev	CCTTTGCCATTTCTCGTAGTCTTTTATATTTAGTCCGCTACGC AAACCGCCTCTCCCG
96	ADH1	ADH1Term.rev	CACTTTAAAATTTGTATACAC
97	pWS93	pWS93HA.dir	GCTTAGATCTATAATGTACCC
85	pACT	pACT1-ADHter	CTACCAGAATTCGGCATGCCGGTAGACGTGTGGTCA
86	pACT	pACT-2.rev	AAATTCTATAGATCAGAGG

3.2.2 Cebadores empleados en el trabajo con el gusano *Caenorhabditis elegans*.

Nº Oligo	Gen	Nombre	Secuencia
22		SL2	GGTTTAAACCCAGTTACTCAAG
21		SL1	GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG
84	CAT	SP6/T3	ATTAGGTGACACTATAGAATACAATTAACCCCTCACTAAAGGG
198	W09D6.6	CeABC7-5.dir	GATAGGGGAACCAGTTCGG
16	W09D6.6	CeABC7-10.dir	GAGAAAACCTCTCACTGTCCG
211	W09D6.6	W09D6int.6.rev	GTGCTCGGTTGATTACGCC
197	W09D6.6	CeABC7-9.dir	GACAATGCCACGTCCGGCG
199	W09D6.6	CeABC7-6.rev	TTTAGGAAGGCTAGAGAGGC
200	W09D6.6	CeABC7-7.dir	TCCGACTTTTTGAATCTACGG
207	W09D6.6	PrABC7.rev	GGAAGCTAGCATGGGCTTTTCACCATTCTCG
203	W09D6.6	CeABC7-4.rev	TTCGATAGGTTGTTCCAGGC
204	W09D6.6	CeABC7-1.dir	TGTTCTTCTGGATTCTATCGC
210	W09D6.6	W09D6.6.rev	GTGAATTAGAAGAGCTGCCG
205	W09D6.6	CeABC7-2.rev	AAACGACAGTGACAAGTGCC
206	W09D6.6	PrABC7.dir	GGAAGCTAGCATGGGCTTTTCACCATTCTCG
202	W09D6.6	CeABC7-3.dir	ACCCAAAAGTGTGTGCGCC
196	W09D6.6	CeABC7Prot2.rev	GGAAGCGGCCGCCGAAGCTCCTCGCCGAG
209	Y48A6C.1	Y48A6C.1.dir	GTACACCTGGGCAAAGCGC
208	Y48A6C.1	Y48A6C.1rac3'.dir	GCTTCACGTGATCCGCGC
14	Y74C10AM.1	Y74C10AM.dir	GGTTATCAATTAGTACAGCG
13	Y74C10AM.1	Y74C10AM-3.dir	AGTCTTCGCAAAGTCCGCGC
12	Y74C10AM.1	Y74C10AM-2.rev	GAGTGAAATTGAGCAGAGCC
10	Y74C10AM.1	Y74C10AM-4.rev	AATAGTCTGTGAAGGCGTCC
9	Y74C10AM.1	Y74C10Al-7.dir	TAAGCTTGGGATCTACACG
40	Y74C10AM.1	CeABC7pHAB.dir	GGAAGTCGACTCCTGAATACGAGAATCCG
11	Y74C10AM.1	Y74C10AM-5.rev	TCAAGTGAACGAGAGATCC
34	Y74C10AM.1	CeABC7phab2.rev	GGAAGCGGCCGCCATTATCGATCTCTGAAAACCTGGATTCCG

Nº Oligo	Gen	Nombre	Secuencia
35	Y74C10AM.1	CeABC7phab3.rev	GGAAGCGGCCGCTAAAGGTAAGTACTTGACTACTGGCTCCCGG
3	Y74C10AM.1	Y74C10AM10.dir	AGCACACAACCAATCGGAGC
4	Y74C10AM.1	Y74C10AMatg.dir	GGAAGGATCCATGTTACAATTACGACTAATAGC
5	Y74C10AM.1	Y74C10AMstp.rev	GGAAGCGGCCGCGATTGCAGCTGGAAGCTTCC
8	Y74C10AM.1	Y74C10AM-6.dir	TGAGAAATTGAAGCGGATCG
7	Y74C10AM.1	Y74C10AL-9.rev	CAGCATCGACAATGTTCGCC
41	Y74C10AM.1	CeABC7pHAB.rev	GGAAGCGGCCGCTCGATTGCAGCTGGAAGCTTCCGC
6	Y74C10AM.1	Y74C10AL-8.dir	ACGCTTGTCCGGTGAAGAGGGA

3.2.3 Cebadores empleados en el trabajo con DNA de *Homo sapiens*.

Nº Oligo	Gen	Nombre	Secuencia
75	FRDA	FRAT.rev	GGAAGGATCCCTCAAGCATCTTTTCCGGAATAGGC
76	FRDA	FRAT.dir	GGAAGAATTCATGCGCACCGACATCGATGCGACC
43	FRDA	FRAT2.dir	GGAAGAATTCATGTGGACTCTCGGGCCCGC
110	SDHA	Sdh1-Bhum.dir	GGAAGAATTCATGTTTCACTTCACTGTTGATGGG
73	SDHA	SDTerH.dir	GGAAGAATTCATGCGACTCAGCATGCAGAAGTCAATGC
70	SDHA	SDFADh2.rev	GGAAGGATCCCTTAGACAGATTCTTCCCCAGCGTTTGG
74	SDHA	SDTerH.rev	GGAAGGATCCCTCAGTAGGAGCGAATGGCTGGCG
38	SDHB	Sdh2H.dir	GGAAGAATTCATGGACCCAGACAAGGCTGG
39	SDHB	Sdh2H.rev	GGAAGGATCCCTTAAACTGAAGCTTCTTCTCC

3.3 Tampones y medios de cultivo.

3.3.1 Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Los medios de cultivo clásicos utilizados en este trabajo, tanto para crecer la levadura (YPD, SCD y etanol/glicerol) así como para conseguir su esporulación, se encuentran descritos en el libro *Methods in Yeast Genetics* (102).

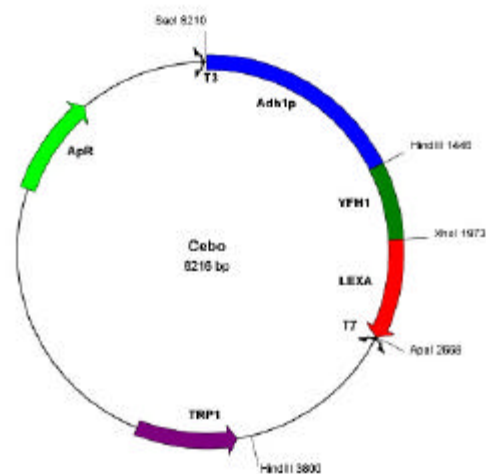
3.3.2 Gusano *Caenorhabditis elegans*.

Todos los tampones y medios utilizados en este trabajo para el cultivo y preparación de muestras del gusano *C. elegans* se pueden consultar en el libro *C. elegans, A Practical Approach* (3).

El resto de medios y tampones son los habituales empleados en un laboratorio de biología molecular, y se puede encontrar su descripción en cualquier manual básico de laboratorio (4).

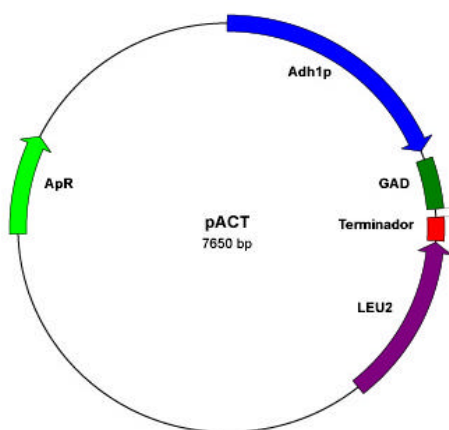
3.4 Plásmidos y construcciones.

3.4.1 Experimentos en *Saccharomyces cerevisiae*.



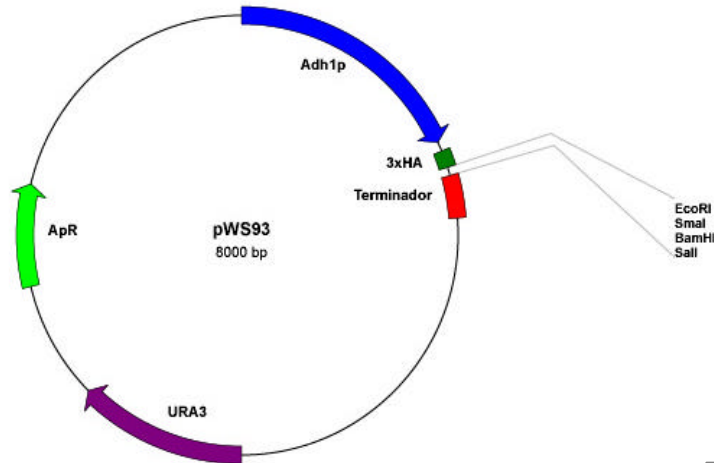
Plásmido cebo: pRS424-Adh1p-YFH1-LEXA.

Adh1p (promotor de la alcohol deshidrogenasa) se introduce con los enzimas SacI/HindIII. LEXA procedente del vector pNLexA se introduce con los enzimas XhoI/ApaI. El gen YFH1 se amplifica con los cebadores número 19 y 20, que contienen secuencias de corte de los enzimas de restricción HindIII y XhoI respectivamente. Toda la construcción se llevo a cabo en el vector pRS425 y posteriormente se digirió con los enzimas SacI y ApaI y se introdujo en el vector pRS424.



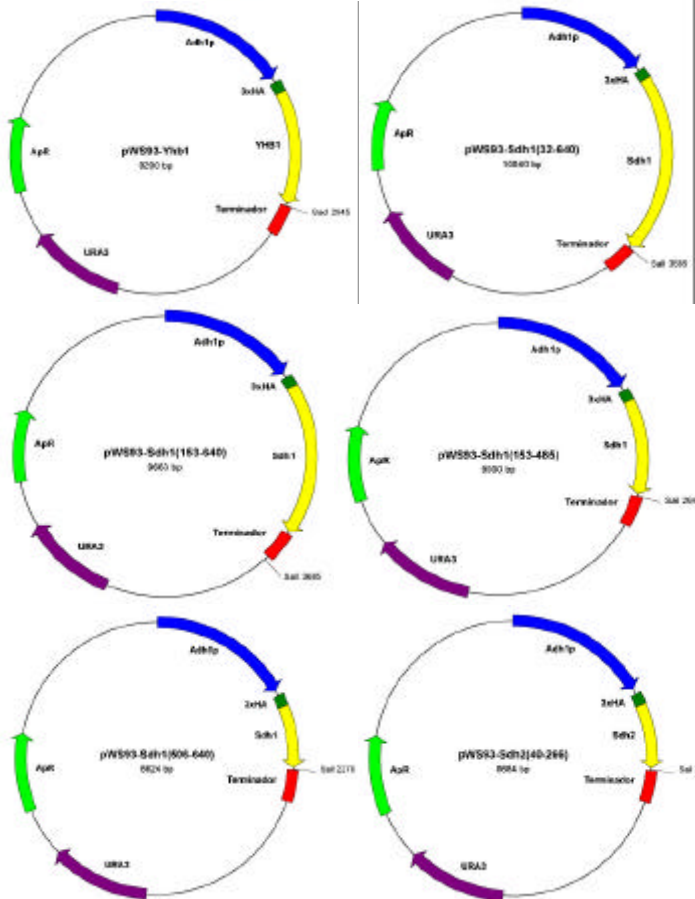
Plásmido pACT:

Plásmido de expresión de los cDNAs de la genoteca de levadura. Los cDNAs se clonaron utilizando el sitio XhoI.



Plásmido pWS93:

Plásmido de expresión en levadura de proteínas de fusión a una etiqueta HA. Esta etiqueta se coloca en el extremo amino terminal de la proteína.



pWS93-Yfh1:

Proteína de fusión HA-Yfh1p. Cebadores utilizados número 78 y 79.

pWS93-Sdh1₃₂₋₆₄₀:

Proteína de fusión HA-Sdh1_{P32-640}. Cebadores utilizados número 109 y 92.

pWS93-Sdh1₁₅₃₋₆₄₀:

Proteína de fusión HA-Sdh1_{P153-640}. Cebadores utilizados número 89 y 92.

pWS93-Sdh1₁₅₃₋₄₈₅:

Proteína de fusión HA-Sdh1_{P153-485}. Cebadores utilizados número 89 y 90.

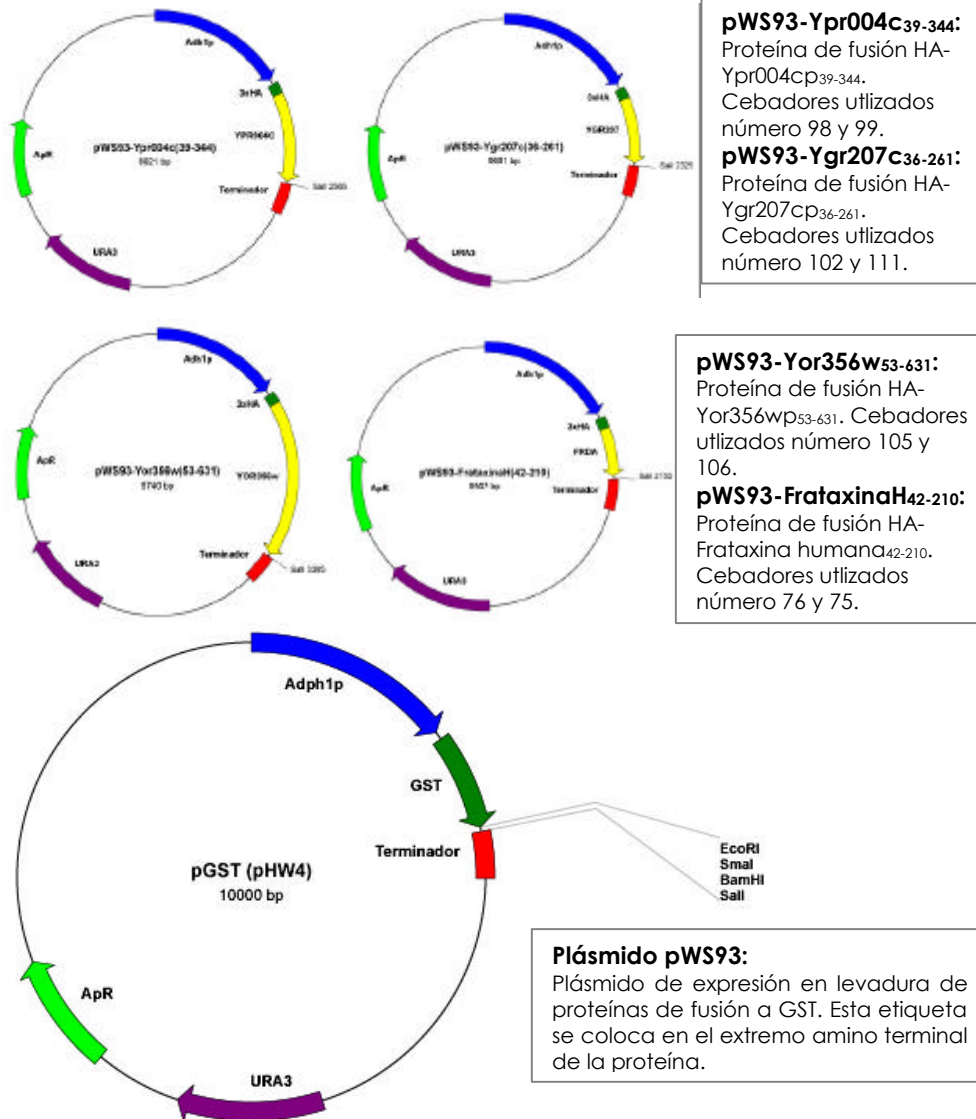
pWS93-Sdh1₅₀₆₋₆₄₀:

Proteína de fusión HA-Sdh1_{P506-640}. Cebadores utilizados número 108 y 92.

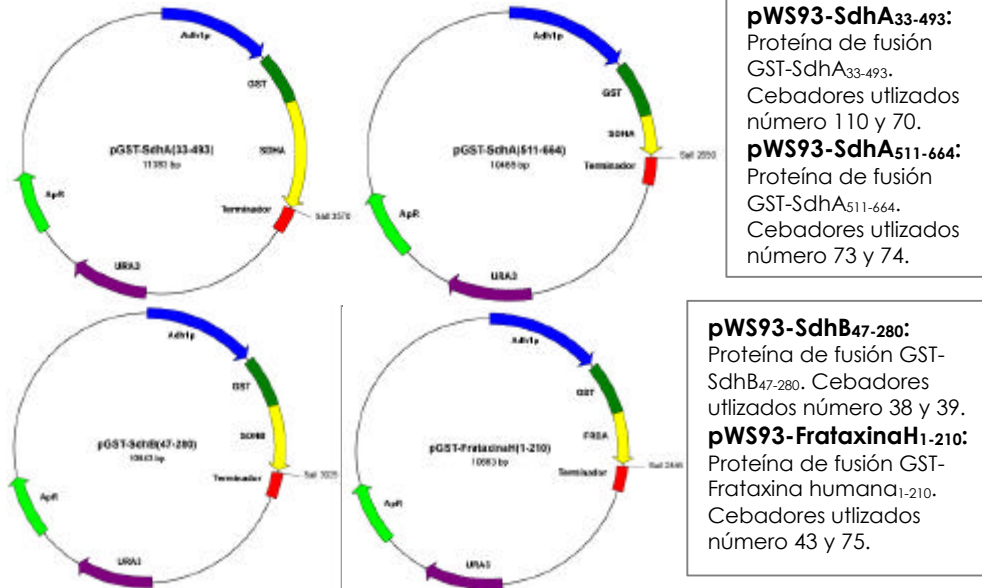
pWS93-Sdh2₁₄₀₋₂₆₆:

Proteína de fusión HA-Sdh2_{P140-266}. Cebadores utilizados número 100 y 101.

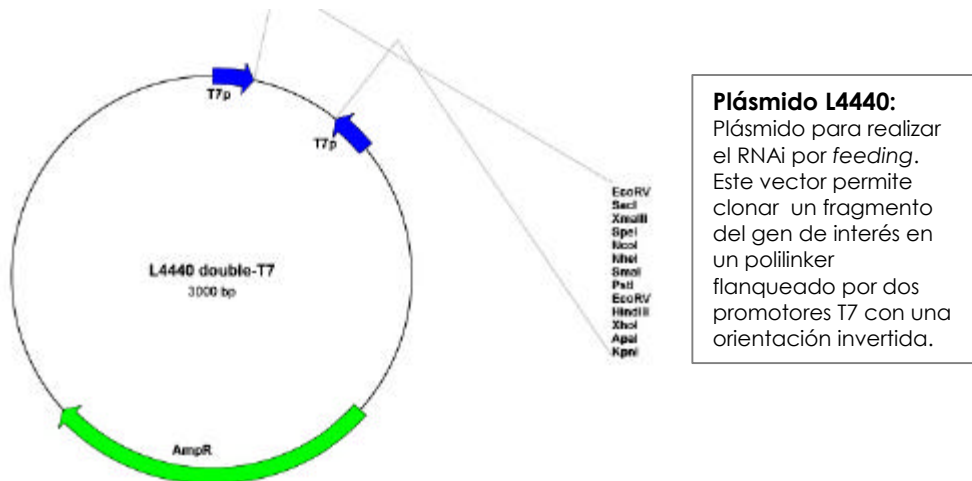
Material y Métodos



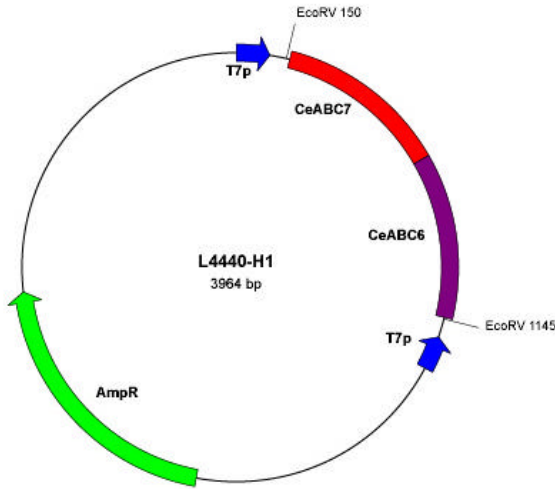
Material y Métodos



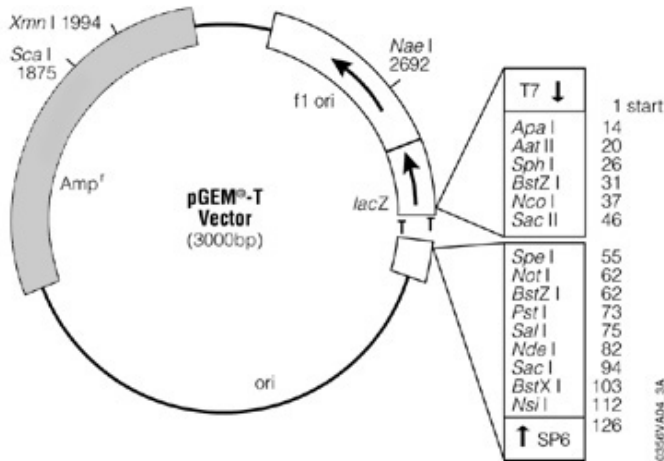
3.4.2 Experimentos en *Caenorhabditis elegans*.



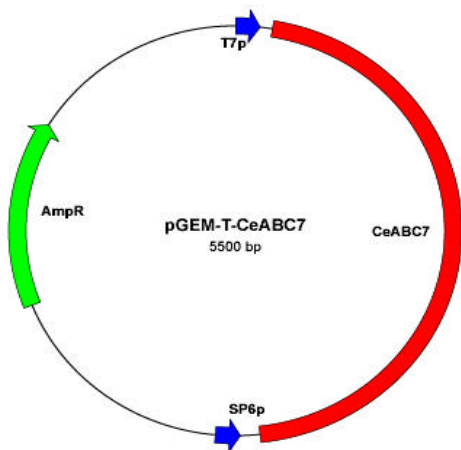
Material y Métodos



Plásmido L4440-H1:
 Plásmido *feeding* que contiene el fragmento H1, un híbrido de los cDNAs de ambos transportadores (CeABC7/CeABC6). Este es un ejemplo representativo de todas las construcciones realizadas para los experimentos de RNAi por *feeding*.



Plásmido pGEM-T:
 Sistema que facilita la clonación directa de fragmentos de PCR. El vector es linealizado y posteriormente se le añaden nucleótidos de timina en sus extremos 3'. Los promotores SP6 y T7 flanquean el polilinker. Estas secuencias nos servirán luego para preparar el RNA_{dc} con las polimerasas SP6 y T7.



Plásmido pGEM-T-CeABC7:
 El fragmento de PCR se clona en el vector utilizando la característica de la Taq polimerasa de añadir nucleótidos de adenina en 3'. Este es un ejemplo representativo de todas las construcciones realizadas para posteriormente secuenciar los fragmentos, así como para experimentos de RNAi.

3.5 Métodos.

Toda la metodología a la que no se haga referencia específicamente a lo largo de la exposición de este apartado puede encontrarse en los siguientes manuales: para la levadura *S. cerevisiae* en el libro *Methods in Yeast Genetics* (102), para el gusano *C. elegans* en el libro *C. elegans. A Practical Approach* (103), y para la metodología clásica de un laboratorio de biología molecular en el libro *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (104).

3.5.1 *Saccharomyces cerevisiae*.

3.5.1.1 Interacción de proteínas por doble híbrido.

Se realizó un rastreo sobre una genoteca de cDNAs de levadura mediante la técnica de dos híbridos (105), utilizando como cebo la frataxina de levadura, Yfh1p (figura 7). Los cDNAs de la genoteca están fusionados al dominio de activación de GAL4 (GAD). La genoteca fue cedida por el Dr. S. Elledge, Baylor University (106). La construcción del cebo consiste en el promotor de la alcohol deshidrogenasa, seguido de Yfh1p en pauta con el dominio de unión a DNA LexA. Todo ello se clonó en el plásmido pRS424 (107) que contiene como gen marcador el gen *TRP1* (pRS424-ADH1p-Yfh1-LexA). El rastreo se realizó en la cepa denominada TAT-7 que contiene dos genes marcadores integrados en el genoma de la levadura, *lexAop-HIS3* y *lexAop-lacZ*. Los transformantes se seleccionaron en medio SC-Leu. Posteriormente a todos los transformantes se les realizó un ensayo en filtro para medir la actividad β -galactosidasa (108), seleccionando aquellos que tenían actividad positiva debido a la regeneración del factor de transcripción, lo que equivale a que Yfh1p era capaz de interactuar con alguna proteína presente en la genoteca.

3.5.1.2 Coimmunoprecipitaciones.

La preparación de los extractos proteicos de levadura y la coimmunoprecipitación se llevó a cabo como describen los autores Sanz et al. 2000 (109). El tampón de extracción (IPB) contiene Tris-HCl 50mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,1% (v/v), glicerol 10% (v/v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM y un combinado de inhibidores de proteasas (Roche). Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se

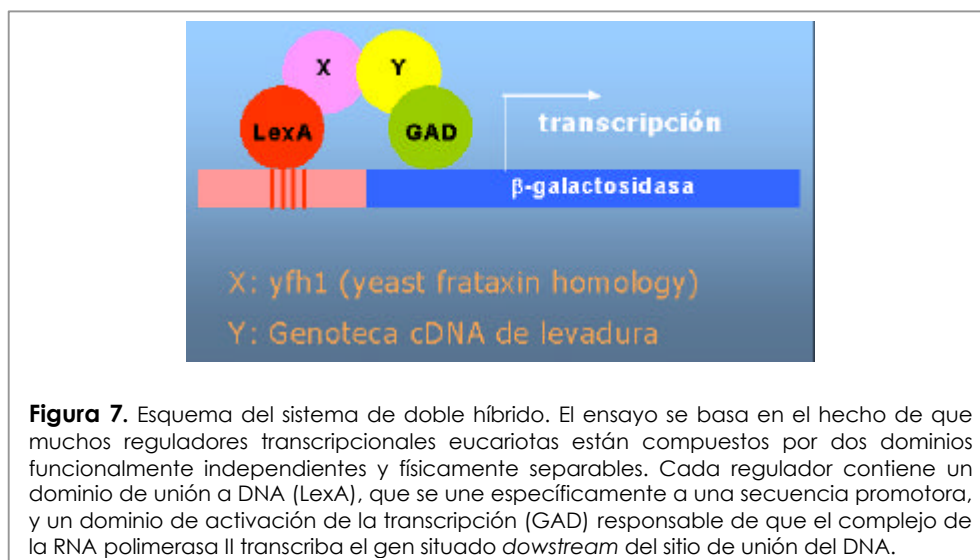
Material y Métodos

utilizó 1µl del anticuerpo monoclonal anti-HA (Sigma). El precipitado se analizó por Western blotting utilizando el anticuerpo policlonal anti-LexA (Invitrogen) para las proteínas de levadura o el policlonal anti-GST (Amersham) para las proteínas humanas. Los anticuerpos se detectaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Roche).

3.5.1.3 Creación de cepas mutantes por recombinación homóloga.

La delección de los genes *SDH1*, *SDH2* y *YPR004C* se llevó a cabo mediante recombinación homóloga **(110)** utilizando los productos de PCR que corresponden a un gen marcador (*LEU2*, *TRP1*, *URA3*) que ha sido amplificado utilizando cebadores que contienen en 3' secuencias específicas del gen marcador y en 5' secuencias homólogas de la zona *upstream* o *downstream* de los genes *SDH1*, *SDH2* o *YPR004C* respectivamente. La cepa haploide salvaje sobre la que se generaron los mutantes fue la W303-1A.

Para deleccionar el gen *SDH1*, el fragmento amplificado por PCR contenía *LEU2*, y se utilizaron los cebadores 60-61 y el plásmido YDp-L **(111)** como molde. Para deleccionar el gen *SDH2*, el fragmento amplificado por PCR contenía *TRP1*, y se utilizaron los cebadores 52-53 y el plásmido YDp-W **(111)** como molde. Para deleccionar el gen *YPR004C*, el fragmento amplificado por PCR contenía *URA3*, y se



utilizaron los cebadores 54-55 y el plásmido YDp-U **(111)** como molde. Todos los mutantes haploides obtenidos se confirmaron por PCR utilizando como cebadores las parejas 58-59, 48-49 y 50-51 para las deleciones de *SDH1*, *SDH2* and *YPR004C* respectivamente. Para comprobar el mutante *yfh1D* se utilizó la pareja de cebadores 64-65.

Los dobles y triples mutantes se generaron por conjugación de los correspondientes simples o dobles mutantes. Posteriormente se realizó la esporulación de los respectivos diploides y la disección de las tetradas. La presencia de las deleciones en las esporas de la progenie se confirmó de nuevo por PCR. También se confirmó el fenotipo de los mutantes mediante el análisis de crecimiento en medios específicos.

3.5.1.4 Crecimiento celular por goteos.

El efecto sobre el crecimiento de los mutantes fue monitorizado en placas mediante una prueba de goteo. Primero las células se crecieron en medio líquido YPD durante toda la noche. Posteriormente se midió la absorbancia a 600 nm y se ajustaron todas las cepas a una densidad óptica de 0,1. Se realizaron entonces diluciones seriadas y se depositaron 3 μ l de cada dilución sobre placas con diferentes medios de cultivo: YPD, SCD y etanol/glicerol.

3.5.1.5 Medición de actividades enzimáticas.

Para determinar la actividad del complejo II de la cadena respiratoria se utilizaron muestras de mitocondrias frescas procedentes de las cepas de levadura. La reacción se llevó a cabo en 1 ml de tampón de ensayo que contenía fosfato sódico 40 mM pH 7.4, cianuro potásico 250 μ M, succinato 40 mM y DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol). La reacción se inició sin succinato y tras 1 min se añadió ésta, y se siguió la reducción del DCPIP mediante la caída de la absorbancia a 600nm. La actividad específica se determinó restando la pendiente del tramo lineal inicial menos la pendiente después de la adición de succinato, utilizando un coeficiente de extinción molar a 600nm de 19 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.5.2 *Caenorhabditis elegans*.

3.5.2.1 Extracción de RNA de *C. elegans*.

Los gusanos cultivados en placas petri NGM-agar en presencia de la cepa bacteriana OP50 se lavaron con medio M9. Posteriormente se lisaron y se trataron con el *Kit RNeasy® Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial para la extracción de RNA desde tejido animal.

3.5.2.2 3'RACE y 5'RACE.

La técnica de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) se emplea para la obtención de las secuencias de los extremos de los mRNAs, por medio de RT-PCR. Normalmente no se conoce la secuencia de estos extremos y, por tanto, no es posible diseñar cebadores específicos para estas regiones.

Para obtener el extremo 3', se realizó 3' RACE empleando el método clásico **(112) (Figura 8A)**.

En *C. elegans* es posible hacer RACE 5' de una manera muy sencilla en la mayoría de genes. Se explota el hecho de que muchos de los genes de este gusano se procesan mediante *transsplicing*, con secuencias siempre invariables, las secuencias SL1 y SL2. Estas secuencias tienen 22 pb, lo que las hace eficaces como cebadores. Por ello sólo hay que emplear, en una reacción de RT-PCR convencional, como cebadores directos estas secuencias y como cebadores reversos secuencias específicas del gen que se quiere amplificar **(Figura 8B)**.

3.5.2.3 Análisis de DNA por hibridación.

El DNA de interés se transfirió desde un gel de agarosa a membranas de nylon, mediante la técnica de *Southern Blot* **(113)**. El DNA se fijó a la membrana con luz ultravioleta. El marcaje de las sondas se hizo con digoxigenina tal y como se describe en el manual "The DIG System User's Guide for Filter Hybridation" de la casa comercial Roche. El método consiste, básicamente, en la polimerización de DNA a través de una PCR con dNTPs que contienen dUTP-digoxigenina. Como molde para esta polimerización se empleó el DNA que se quería utilizar como sonda.

Los lavados se hacían con tampón SSC (concentraciones 0,5x y 0,1x) y SDS 0,1%. Las temperaturas de lavado variaban entre 65° C y temperatura ambiente.

El revelado se hizo con el producto CSPDstar, siguiendo las recomendaciones del manual "The DIG System User's Guide for Filter Hybridation".

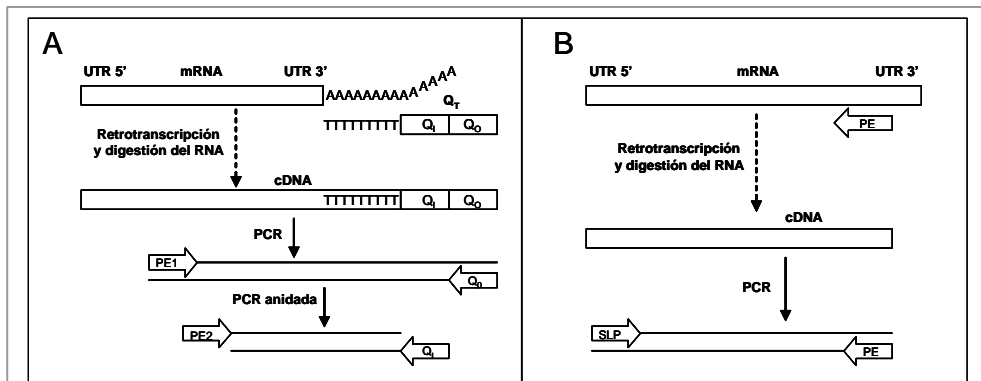


Figura 8 Esquema de la reacción de 3'RACE (A) y 5'RACE (B). En A se muestra la secuencia de reacciones necesarias para obtener el extremo 3' de los mRNAs. Primero se retrotranscribe el RNA total con el cebador Q_r. Luego se digiere el RNA con RNAsas. Sobre el producto se hace PCR empleando primero un cebador específico directo (PE1) y el cebador Q_o como reverso. Posteriormente se realiza una segunda reacción de PCR anidada con otro cebador directo específico (PE2) y con el cebador Q_i y se obtiene el extremo 3'. En B se resume la reacción de RACE 5'. En esta ocasión se aprovecha el hecho de que la mayoría de mensajeros tienen secuencias SL1 o SL2 en sus extremos 5'. Estas secuencias se utilizan como cebadores directos junto con cebadores específicos reversos. En este último caso no hace falta, generalmente, una segunda reacción de PCR anidada.

3.5.2.4 Análisis de RNA por hibridación.

El RNA de interés se transfirió desde un gel de agarosa a membranas de nylon, mediante la técnica de *Northern Blot* (114). Todo el procedimiento se llevó a cabo utilizando el *Kit Northern Max*[®] siguiendo las recomendaciones del fabricante (Ambion). El marcaje de las sondas se hizo con digoxigenina.

3.5.2.5 RNAi feeding.

El RNAi *feeding* consiste en alimentar a los gusanos salvajes con RNA de doble cadena (dsRNA) del gen que se quiere mutar. Para ello se purificaron y clonaron los productos de PCR del gen diana en el vector L4440 (Dr. A. Fire, colección de 1999). Estas construcciones fueron transformadas en la cepa de *E. coli*

Material y Métodos

HT115, la cual posee la maquinaria de expresión del promotor T7 y además es mutante para la RNAsa III, lo cual aumenta la estabilidad de cualquier RNA que sea transcrito. Puesto que el vector L4440 posee dos promotores T7 flanqueando el sitio de clonación múltiple (MCS) en orientación invertida, un DNA insertado en el MCS se transcribirá en ambos sentidos y podrá hibridarse sobre si mismo formando así el dsRNA (**figura 9**).

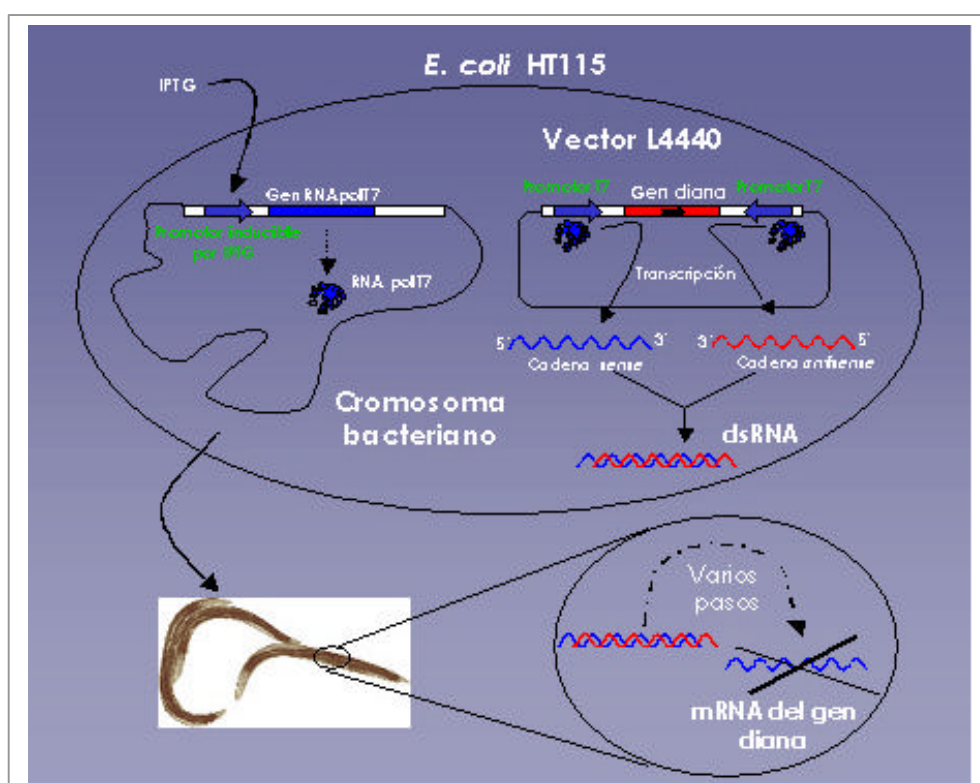


Figura 9 Representación esquemática de la técnica de RNAi feeding. Primero se transforma el vector L4440 con el fragmento del gen que se quiere mutar (gen diana) en la cepa de *E. coli* HT115. Cuando se induce la producción de la RNA polimerasa T7, por la presencia de IPTG, esta es capaz de promover la expresión del fragmento de DNA clonado en el vector L4440 en ambos sentidos, produciendo copias sense y antisense del fragmento. Las hebras de RNA producidas son complementarias y pueden hibridar, produciendo el dsRNA. Cuando los gusanos se alimentan de esta cepa bacteriana, productora del dsRNA, son capaces de llevar hasta el ambiente celular este RNA y desencadenar el efecto RNAi, que degradará el mensajero del gen diana.

3.5.2.6 Transcripción *in vitro* y producción de dsRNA.

Para la obtención de mutantes transitorios por RNAi, bien por *feeding* como hemos comentado anteriormente bien por microinyección, se necesita producir dsRNA. Para el sistema de microinyección realizamos una transcripción *in vitro*.

El fragmento de DNA de interés, previamente clonado en el vector pGEM-T, se utilizó como molde para amplificarlo por PCR utilizando los primers SP6 y T7 que flanquean el *polylinker* del citado vector. Estos productos de PCR se purificaron con el Kit de purificación de productos de PCR (Quiagen), y posteriormente se realizó la transcripción *in vitro* con las RNA polimerasas SP6 y T7 de forma individual, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante (Ambion). Una vez sintetizadas ambas hebras se unen y posteriormente se calientan a 95 °C, dejándolas luego enfriar lentamente en el mismo baño hasta 70 °C. Por último la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Con este procedimiento se consigue que ambas hebras hibriden de forma correcta. Tras una purificación con fenol-cloroformo y posteriormente una precipitación con etanol, el dsRNA está preparado para ser microinyectado.

3.5.2.7 Microinyección de gusanos y análisis de fenotipos

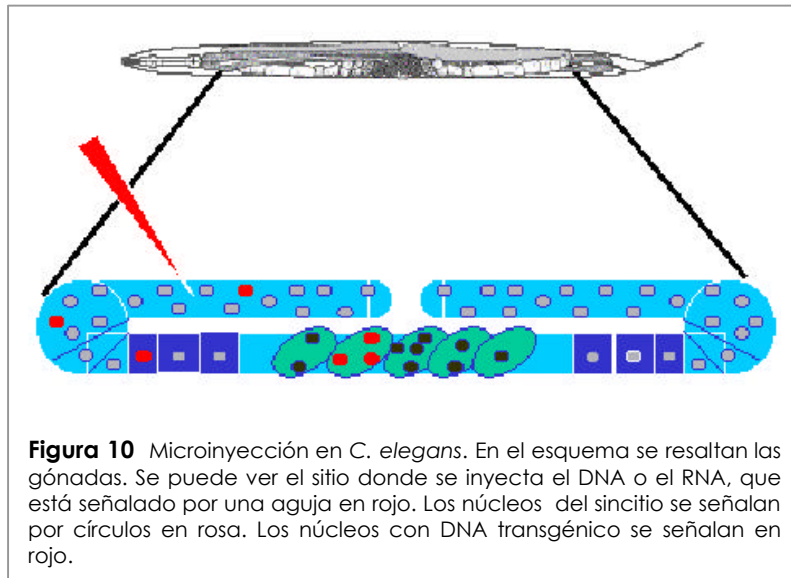
El equipamiento utilizado para llevar a cabo la microinyección ha sido el siguiente:

- Lupa estereoscópica Olympus, modelo U-LS30-4
- Microscopio Leica, modelo DM IRB
- Micromanipulador de la casa comercial Narishige Co, LTD. Modelo MN-151
- Microinyector de la casa comercial Narishige Co, LTD. Modelo IM-26-2

La microinyección de los gusanos se llevó a cabo empleando un microscopio con sistema de Nomarski para poder localizar la posición exacta de las gónadas del nematodo. Los gusanos se inmovilizan en un cubreobjetos que contiene una capa de agarosa 2%. Sobre ellos se deposita una gota de aceite Holocarboil 700 (SIGMA) para evitar una deshidratación excesiva. La mezcla de inyección, cuya composición se describe en cada experimento de esta tesis, se inyecta en la parte distal de la gónada de individuos hermafroditas en estadios L4. Este DNA inyectado puede ser asimilado por los núcleos del sincitio. En el núcleo el

Material y Métodos

DNA recombina y/o se liga inespecíficamente, formando un *array* de copias de ese DNA. Este núcleo, que porta el DNA transgénico, migra hacia la parte proximal de la gónada, donde es envuelto por una membrana y se convierte en un ovocito. Luego es fecundado al pasar por la espermateca y continúa el desarrollo normal (**Figura 10**). El mismo gusano inyectado puede mostrar el fenotipo mutante, pero normalmente es la F1 la que resulta afectada por el RNAi. Se ha descrito que se puede obtener hasta un 100% de descendencia mutante a partir de estos gusanos inyectados. Cuando esto ocurre significa que la técnica es robusta y altamente reproducible.



CAPÍTULO I

RESULTADOS

Capítulo I

4 RESULTADOS. CAPÍTULO I.

4.1 Rastreo por doble híbrido.

El objetivo de esta parte del trabajo es investigar cuál puede ser el mecanismo de acción de la frataxina en la mitocondria. La estructura de frataxina sugiere que se trata de una proteína capaz de interactuar con otras proteínas. Por lo tanto, nos propusimos averiguar posibles interacciones de la frataxina con otras proteínas utilizando la técnica del doble híbrido. El rastreo se realizó sobre una genoteca de cDNAs de la levadura *S.cerevisiae* utilizando como cebo la frataxina de levadura (Yfh1p).

4.1.1 Construcción del cebo.

En la técnica del doble híbrido la interacción entre dos proteínas se detecta gracias a la transcripción de genes *reporter*. Por lo tanto, en primer lugar había que definir la región de Yfh1p incapaz de autoactivar por sí misma la transcripción de estos genes testigo presentes en el genoma de la cepa de levadura que se iba a emplear para el rastreo. Para ello, ensayamos la proteína completa como cebo, fusionando el cDNA completo de YFH1 al dominio de unión a DNA.

La construcción del cebo se realizó sobre el plásmido pRS424, el cual contiene el gen *TRP1* como marcador de selección en levadura. En el sitio de clonación de este vector se insertó el gen *YFH1* en pauta con el dominio de unión a DNA *LEXA*, todo bajo el promotor de la alcohol deshidrogenasa. El cebo se transformó en la cepa TAT7 y se comprobó en un gel SDS-PAGE al 12,5% que se obtenía una buena expresión. Se observaron dos bandas (**figura 13**). Como ya se ha comentado en la introducción, tanto frataxina como Yfh1p se sintetizan como una molécula precursora de mayor tamaño y durante su internalización en la mitocondria la proteína es objeto de dos cortes proteolíticos, produciéndose una forma intermedia y, por último, una forma madura. El tamaño esperado de la proteína de fusión es de 45 kDa, lo cual correspondería con la banda superior que se observa en la figura. Restando a este tamaño los kDa equivalentes al péptido eliminado durante el procesamiento (6 kDa), equivale al tamaño que posee la

Capítulo I

banda inferior y podemos asumir que corresponde a la forma madura de la proteína.

Transformamos la levadura TAT7 con el cebo junto con el plásmido pACTII, que contiene el dominio de activación de *GAL4* y el gen *LEU2* como marcador de selección en levadura, en medio selectivo SC-leu-trp-his y comprobamos que los transformantes eran capaces de crecer en un medio carente de histidina. En un principio el hecho de que obtengamos crecimiento significa que hay una interacción de proteínas. En las mismas condiciones transformamos los vectores control: pBTM116 que contiene el dominio *LEXA* y el gen *TRP1* como marcador de selección en levadura; y el plásmido pACTII, y también observamos crecimiento. El problema radicaba en que la selección por auxotrofia en un medio sin histidina no era completamente eficaz y teníamos crecimiento en ausencia de histidina. Sin embargo, los clones no presentaban actividad β -galactosidasa, por lo que podíamos seguir utilizando el control negativo; se obviaba así el inconveniente de la auxotrofia. Así que, a partir de este momento únicamente designamos como colonias positivas aquellas que presentaban actividad β -galactosidasa. Realizamos el ensayo β -galactosidasa en los transformantes obtenidos en la transformación del cebo y tampoco obtuvimos señal, lo que significaba que nuestra proteína con LexA no era capaz de autoactivar la transcripción. Así pues, en nuestro caso, no existía ningún problema en utilizar la proteína completa para realizar el rastreo de la genoteca por el sistema de doble híbrido.

4.1.2 Comprobación e identificación de las interacciones.

La cepa TAT7 se cotransformó con el plásmido cebo y con la genoteca, y se creció en un medio selectivo SC-leu-trp. Todos los transformantes obtenidos fueron chequeados mediante el ensayo de β -galactosidasa. De este modo, únicamente se seleccionaron 32 clones que presentaban actividad β -galactosidasa. El resto de clones sin actividad β -galactosidasa se descartaron.

Las colonias con actividad β -galactosidasa se cultivaron en un medio selectivo, SC-leu, que propiciara la pérdida del cebo manteniendo el vector de la genoteca. Se hizo una extracción de plásmidos en levadura y se transformaron en *E.coli* para posteriormente ser analizados. Como aún arrastrábamos una gran cantidad de clones, para poder descartar falsos positivos se reconfirmaron todas

las interacciones cotransformando en TAT7 el cebo con cada plásmido rescatado y posteriormente realizando un ensayo de la actividad β -galactosidasa. Tras esta operación únicamente nos quedamos con cuatro clones positivos, que se secuenciaron. Para identificar las secuencias se utilizó programas tipo BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool).

La genoteca utilizada en este trabajo consiste en una genoteca de cDNAs. Estos cDNAs se obtienen por retrotranscripción de una extracción de RNA total de levadura utilizando un cebador poliT. Esto quiere decir que la parte representativa de la genoteca equivale a las regiones carboxi-terminales de las proteínas. Por supuesto, también se comprobó si el inserto estaba en pauta con el dominio de activación *GAL4*. Cuando dispusimos de la secuencia de todos los clones comprobamos que la pauta de lectura era correcta en todos ellos.

Los cuatro resultados positivos codificaban para las siguientes proteínas:

- ✓ La proteína **Ybr162c**: no tiene ninguna función conocida, y no presentaba homología con ningún dominio que pudiera aportarnos alguna información.
- ✓ La proteína **Scw4p**: no nos interesó por su localización ya que es una proteína soluble de la pared celular.
- ✓ La **ubiquitina**: está involucrada en la degradación de proteínas. Además es un falso positivo bastante habitual en la técnica del doble híbrido.
- ✓ Por último obtuvimos una proteína denominada **Yhb1p**, concretamente una flavohemoglobina. Continuamos el trabajo con esta proteína. Como ya se expone más adelante de forma detallada porque, aunque de forma indirecta, se había descrito que frataxina afectaba a otras flavoproteínas.

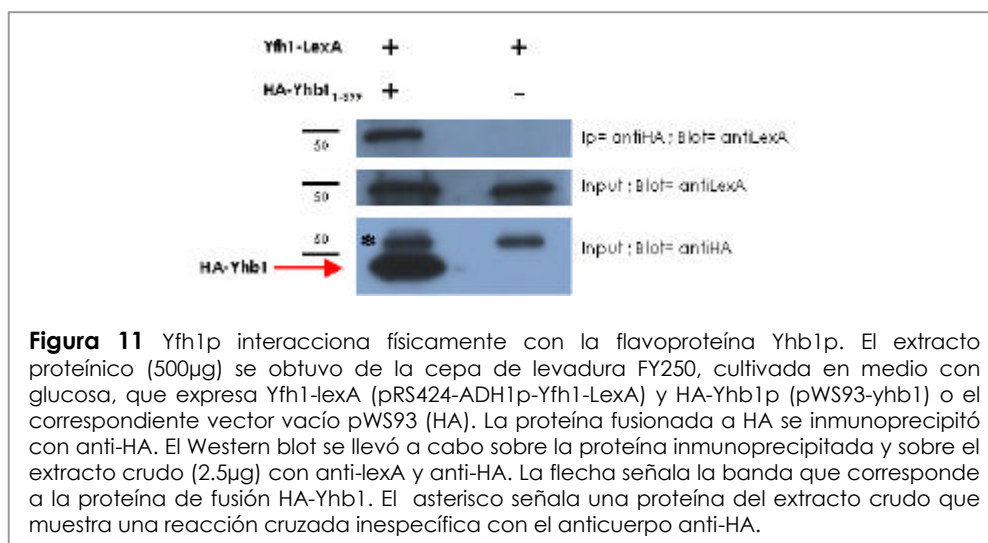
4.1.3 Comprobación e identificación de las interacción entre Yfh1p e Yhb1p.

El gen *YHB1* presenta una expresión elevada bajo condiciones aeróbicas (115). Codifica para una proteína con dos dominios claramente diferenciados: un dominio hemo situado en N-terminal de unión a oxígeno, y un dominio flavo en C-terminal de unión a FAD. La flavoproteína Yhb1p presenta dos localizaciones subcelulares: citosol y matriz mitocondrial. Esta distribución está afectada por la

Capítulo I

anoxia y el genoma mitocondrial (116). La localización de Yhb1p en mitocondria puede ayudar a explicar como actúa esta proteína en el estrés oxidativo (115) y en el estrés nitrosativo (117). Yhb1p protege a la célula del estrés oxidativo principalmente a través del control de los niveles de NO mitocondrial. El NO inhibe la respiración a través de su unión reversible al sitio de unión del oxígeno (O₂) de la citocromo c oxidasa (complejo IV) (118). En ausencia de Yhb1p, los niveles de NO incrementan (117) y se inhibe el citocromo c, lo que conlleva a una producción excesiva de anión superóxido, el cual reacciona con el NO formando peroxidonitrito (119). Por lo tanto, Yhb1p puede reducir los niveles de superóxido pero no disminuyendo en sí el superóxido como, por ejemplo, lo hace la superóxido dismutasa, sino reduciendo su formación vía la cadena respiratoria (116).

Para corroborar que la interacción era correcta nos servimos de la técnica de coimmunoprecipitación. Para ello utilizamos la proteína Yhb1p completa, ya que en el vector de la genoteca únicamente se encontraba representada la zona carboxi-terminal de la proteína (del aminoácido 106 al 399). Clonamos el cDNA del gen *YHB1* en el vector pWS93, que posee como marcador de selección de levadura el gen *URA3*. Este plásmido permite la expresión de una proteína de fusión con una etiqueta HA (pWS93-yhb1). Cotransformamos la cepa de levadura FY250 con pWS93-*YHB1* y el cebo. Gracias a la coimmunoprecipitación (ver material y métodos 3.4.1.2) pudimos confirmar que frataxina es capaz de unirse a la flavohemoglobina Yhb1p (figura 11).



4.2 Interacción de Yfh1p con otras flavoproteínas mitocondriales.

Yhb1p no es un buen candidato para interactuar *in vivo* con frataxina, ya que es una proteína que no se encuentra conservada en organismos superiores. Además, cuando comenzamos este trabajo, únicamente se había descrito su localización citosólica, lo que nos hizo apartarla del objetivo principal del mismo. Sin embargo, nos aportó una pista sobre el tipo de proteína que podría interactuar con frataxina: proteínas con un dominio flavo o hemo.

4.2.1 Elección de flavoproteínas candidatas.

Aunque se ha relacionado frataxina con la síntesis del grupo hemo, incluso se ha descrito que es capaz de unirse a la ferrocatalasa, proteína que cataliza el último paso de la biosíntesis del grupo hemo, no hay descrita ninguna interacción física entre una proteína con dominio hemo y frataxina (69). Una de las observaciones en los mutantes de levadura para el gen de la frataxina así como en los pacientes de ataxia de Friedreich es que hay un defecto en las proteínas que contienen grupos prostéticos Fe-S, tales como los complejos I, II y III de la cadena de transporte electrónico (57, 59). Hasta el momento, la causa que se ha argumentado para explicar el fallo en la actividad es la alteración en la síntesis de los clusters Fe-S (ISC), ya que también se ha demostrado en levadura la interacción física entre Yfh1p e Isp1p, componente central de la maquinaria de ensamblaje de los clusters Fe-S (72). Pero otra característica común entre los complejos I y II es que algunas de las proteínas que los forman son flavoproteínas, y en el caso de los complejos II y III está presente un dominio hemo. Por lo tanto, no podíamos descartar que la causa del defecto en la actividad de estas proteínas se deba a que necesitan directamente la presencia de frataxina para llevar a cabo su función.

Por otro lado, Ristow y colaboradores realizaron experimentos de sobreexpresión de frataxina humana en adipocitos humanos, y observaron un incremento en la actividad en el transporte de electrones, un aumento en el potencial de membrana y una mayor producción de ATP, proponiendo que frataxina podría ser un estimulador de la fosforilación oxidativa (60). Esto explicaría

la incapacidad de respirar en los mutantes de levadura **(41)** y el déficit *in vivo* en la síntesis de ATP, después de realizar ejercicio, en músculo esquelético de pacientes FRDA **(59)**. Estos resultados junto con nuestras propias observaciones nos llevó a proponer a las **flavoproteínas de la cadena de transporte electrónico** como posibles candidatas para interactuar con frataxina.

4.2.2 Yfh1p interacciona con succinato deshidrogenasa.

Decidimos comenzar por la succinato deshidrogenasa (Sdh1p), ya que es el complejo más sencillo respecto al número de proteínas que lo forman y, además, está muy conservada a lo largo de la evolución. Sdh1p es un enzima del ciclo del ácido cítrico y forma parte del complejo II de la cadena de transporte electrónico. El complejo II está formado por cuatro subunidades, de las cuales las dos primeras, Sdh1p y Sdh2p, forman un dímero catalítico que contiene un sitio activo, tres clusters Fe-S y un FAD como grupo prostético unido covalentemente. Las subunidades tres y cuatro están integradas en la membrana interna de mitocondria, y contienen un sitio hemo y un sitio de reducción de la ubiquinona **(120)**. La succinato deshidrogenasa oxida el succinato dando fumarato, y transfiere los electrones a la cadena de transporte electrónico vía la ubiquinona.

La subunidad 1 (Sdh1p) es la flavoproteína del complejo II en levadura. Presenta dos dominios: un dominio de unión a FAD en N-terminal y un dominio C-terminal presente en otras flavoproteínas. Se prepararon varias construcciones en el vector pWS93 para obtener la expresión de diferentes partes de la proteína Sdh1p en pauta con el dominio HA: pWS93-sdh1₁₅₃₋₆₄₀ y pWS93-sdh1₃₂₋₆₄₀ **(figura 12A)**. Ambas construcciones tienen eliminado el péptido señal a mitocondria, y la diferencia entre ellas es que la construcción pWS93-sdh1₃₂₋₆₄₀ contiene una histidina en la posición 90 donde se une de forma covalente el FAD **(121)**. Además se prepararon dos construcciones más que corresponden a los dominios: pWS93-sdh1₁₅₃₋₄₈₅ (dominio FAD) y pWS93-sdh1₅₀₆₋₆₄₀ (dominio C-terminal) **(figura 12A)**.

Cotransformamos la combinación de todas ellas junto con el cebo, y realizando la coimmunoprecipitación vimos que todos los constructos fueron capaces de interactuar con Yfh1p excepto el que expresaba el dominio

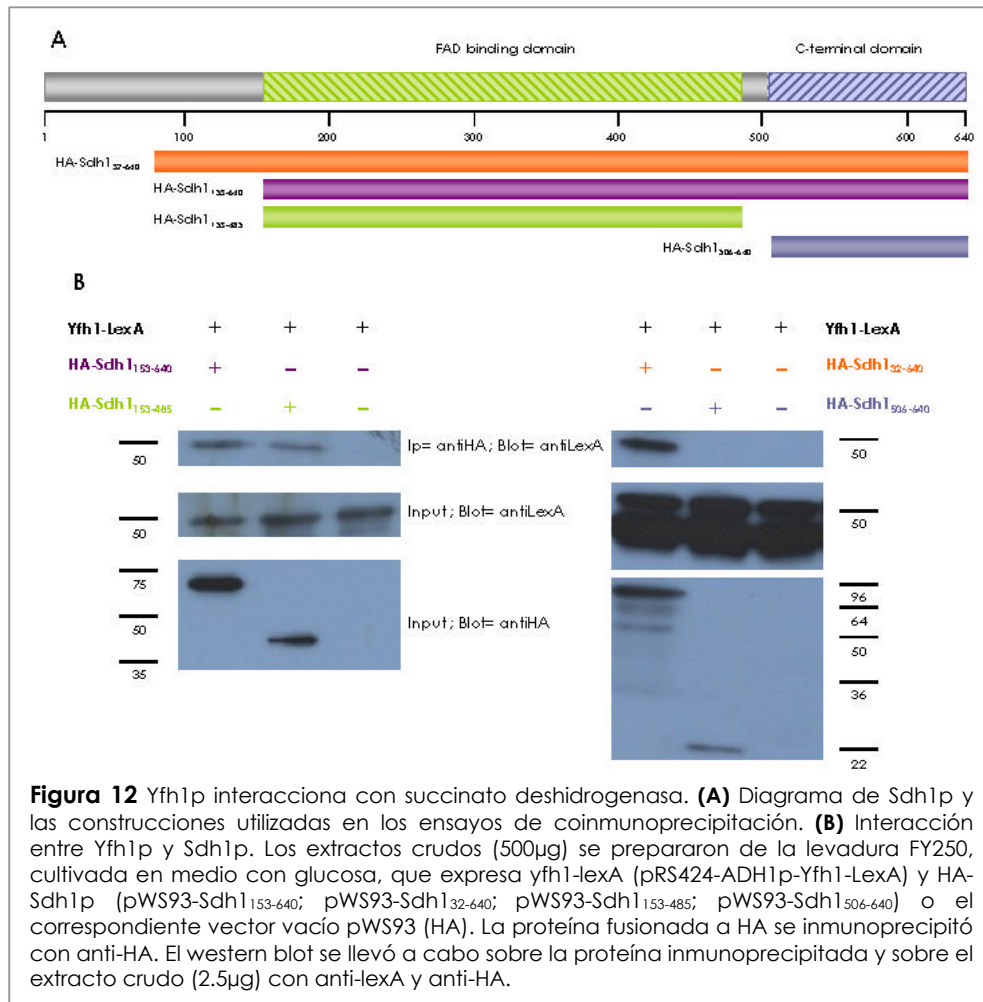
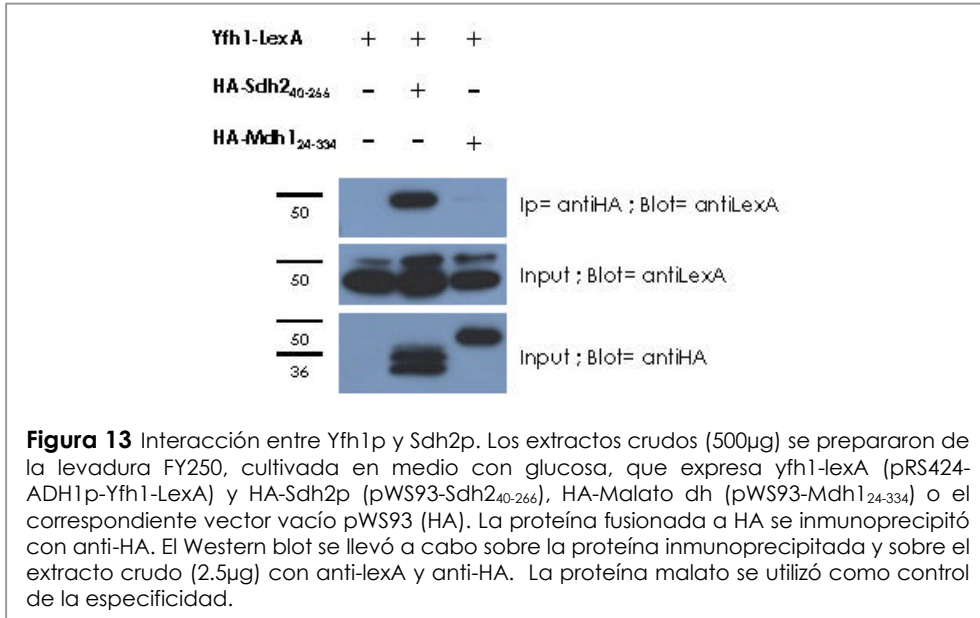


Figura 12 Yfh1p interacciona con succinato deshidrogenasa. **(A)** Diagrama de Sdh1p y las construcciones utilizadas en los ensayos de coimmunoprecipitación. **(B)** Interacción entre Yfh1p y Sdh1p. Los extractos crudos (500µg) se prepararon de la levadura FY250, cultivada en medio con glucosa, que expresa *yfh1-lexA* (pRS424-ADH1p-Yfh1-LexA) y HA-Sdh1p (pWS93-Sdh1₁₅₃₋₆₄₀; pWS93-Sdh1₁₃₂₋₆₄₀; pWS93-Sdh1₁₅₃₋₄₈₅; pWS93-Sdh1₅₀₆₋₆₄₀) o el correspondiente vector vacío pWS93 (HA). La proteína fusionada a HA se inmunoprecipitó con anti-HA. El western blot se llevó a cabo sobre la proteína inmunoprecipitada y sobre el extracto crudo (2.5µg) con anti-lexA y anti-HA.

C-terminal (**figura 12B**). Luego, frataxina es capaz de interactuar con la subunidad 1 de la succinato deshidrogenasa. Además, habíamos acotado la zona de interacción con frataxina al dominio de unión a FAD.

Debido a que Sdh1p y la subunidad que contiene los clusters Fe-S están directamente acopladas en la matriz mitocondrial como parte del complejo II, decidimos llevar a cabo una coimmunoprecipitación similar pero con la subunidad 2 de la succinato deshidrogenasa (Sdh2p). Observamos que también existía una interacción específica entre Yfh1p y Sdh2p (**figura 13**).



Todas las proteínas se clonaron en el vector de expresión pWS93 eliminando el péptido señal que las transporta a mitocondria. Por tanto, las interacciones que observamos deben ocurrir en el citosol. El cebo, al contrario del resto de construcciones, contiene toda la secuencia de frataxina de levadura, por lo que es capaz de internalizarse en mitocondria. Sin embargo, el hecho de que estemos sobreexpresando Yfh1p probablemente conlleva que parte de la proteína se quede en citosol y se dé, por tanto, el encuentro con el resto de proteínas sobreexpresadas. Al utilizar concentraciones del 12.5% en los geles SDS-PAGE fuimos capaces de observar dos bandas, que corresponden a la forma pre-madura y madura de la frataxina, antes y después del procesamiento de la proteína por la peptidasa mitocondrial. Tras la inmunoprecipitación, lo más relevante es que únicamente la forma pre-madura, es decir, la que se encuentra en citosol, es capaz de interactuar con Sdh1p y Sdh2p (**figura 12 y 13**). Por lo tanto, podemos concluir que no es necesario que se produzca la maduración de frataxina para que se dé la interacción física.

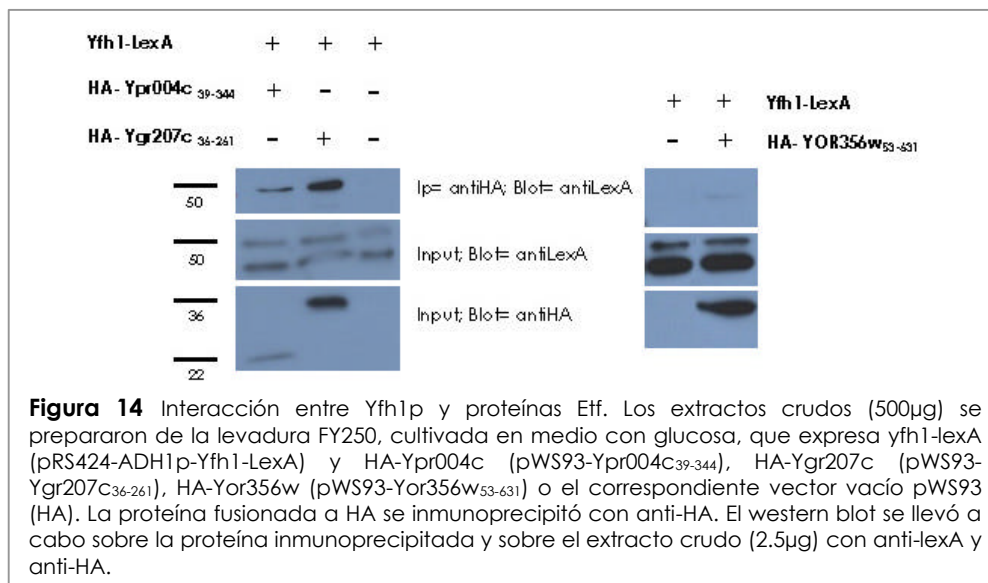
Como control de la especificidad de las interacciones descritas utilizamos la proteína malato deshidrogenasa, Mdh1p, una proteína de la matriz mitocondrial, y no observamos interacción física entre Yfh1p y Mdh1p (**figura 13**).

4.2.3 Yfh1p interacciona con Etf (*Electron transfer flavoprotein*).

Existen diferentes vías de entrada de electrones a la cadena de transporte electrónico cuya finalidad es la reducción de la ubiquinona. Por un lado la succinato deshidrogenasa que gracias a la oxidación del succinato la ubiquinona es reducida. Otra vía de entrada de electrones es a través del complejo I o NADH ubiquinona oxidoreductasa que reduce la ubiquinona con los electrones procedentes del NADH. En células de mamífero se conoce también el complejo ETF (*electron transfer flavoprotein*), un sistema compuesto por la ETF deshidrogenasa (ETF ubiquinona-oxidasa, ETF-dh o ETF-QO) y un heterodímero compuesto por dos subunidades (ETF α y ETF β), que proporciona electrones a la ubiquinona (**122**). El heterodímero ETF α -ETF β es un aceptor de electrones de, al menos, nueve deshidrogenasas de la matriz mitocondrial de la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos y del catabolismo de aminoácidos. Estos electrones son transferidos a la cadena de transporte electrónico vía la ETF dh con destino a la ubiquinona.

En *S. cerevisiae* la β -oxidación ocurre en peroxisomas y no en mitocondrias. A pesar de todo, se han descrito los genes homólogos de las *ETF* en *S. cerevisiae*. La decisión de continuar con las proteínas ETF vino dada por el grado de conservación que existe a nivel de secuencia entre las proteínas humanas y sus homólogos en levadura.

Los genes homólogos de *ETF-a* y *ETF-b* en levadura son respectivamente *YPR004c* y *YGR207c*. Ambos se clonaron en el vector de expresión pWS93 y se cotransformaron por separado con el cebo. La coinmunoprecipitación reveló que Yfh1p es capaz de interaccionar con ambas proteínas (**figura 14**). Hicimos extensivo este estudio a la ETF deshidrogenasa, cuyo homólogo en levadura es el gen *YOR356w*, que es la responsable de introducir los electrones a la cadena de transporte electrónico desde la ETF, y realizamos la coinmunoprecipitación. Pero en este caso no obtuvimos señal, por lo que asumimos que Yfh1p no interacciona con el homólogo de la ETF-dh o, por lo menos, no es capaz de hacerlo en estas condiciones (**figura 14**).



El conjunto de resultados obtenidos mediante el análisis bioquímico empleando la técnica de coimmunoprecipitación nos confirmaba que Yfh1p es capaz de interactuar con diferentes flavoproteínas, tal como habíamos postulado originalmente. El hecho de que Yfh1p no interaccione con la Eff deshidrogenasa nos indica que la interacción es específica dentro de las flavoproteínas. Así pues, el siguiente paso sería alcanzar una aproximación funcional para confirmar las interacciones observadas.

4.3 Interacciones sintéticas.

En levadura, otra forma de confirmar la interacción entre dos genes es gracias a la llamada letalidad sintética. Dos genes muestran una interacción sintético letal si la combinación de mutaciones de ambos, nunca de forma individual, causa muerte celular o afectación en el crecimiento. La relación sintética puede darse entre dos genes que actúan en una única ruta bioquímica, o para genes que actúan en rutas diferentes en los que uno es capaz de compensar funcionalmente los defectos del otro.

Con el fin de confirmar la relación funcional entre *YFH1* y los genes *SDH* estudiamos si ambos genes manifestaban letalidad sintética.

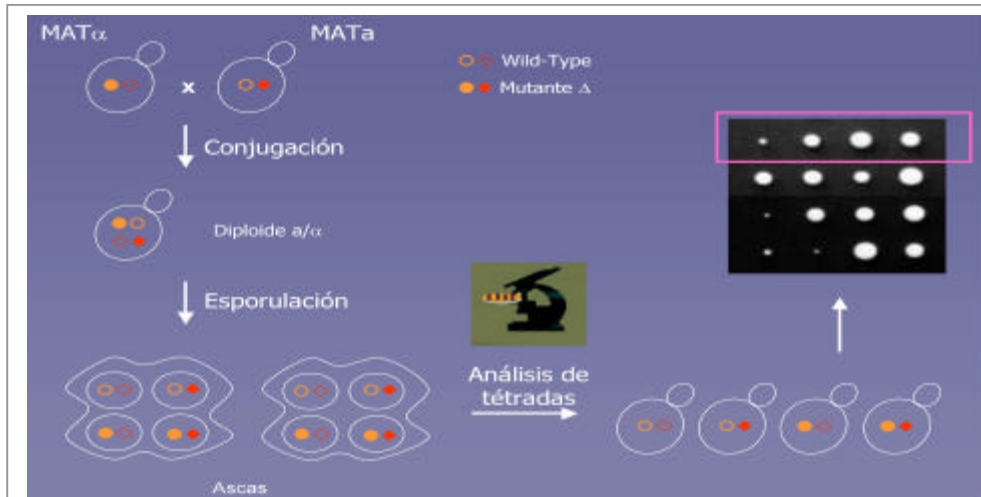


Figura 15 Conjugación y esporulación en *S. cerevisiae*. La levadura posee dos tipos sexuales: a y α . Si se cultiva una mezcla de dos cepas haploides en las que una de las dos cepas sea MAT_a y la otra MAT_{α} , se formarán células diploides MAT_a/MAT_{α} . Los diploides pueden mantenerse como tales o pueden esporular si se cultivan en condiciones de limitación de nutrientes. Durante la esporulación la célula diploide se divide por meiosis dando lugar a cuatro células haploides, las cuales quedan contenidas dentro de un saco denominado asca. Las ascas poseen una pared gruesa que debe ser abierta para que se liberen los productos haploides; esto puede lograrse utilizando un microscopio y un micromanipulador que permiten recuperar de manera independiente cada uno de los cuatro productos haploides contenidos en cada una de las ascas. Cada una de las cuatro esporas se coloca sobre una placa con medio de cultivo, y una vez que crecen y forman una colonia se pueden transferir a placas con medios de cultivo selectivos que permitan determinar el fenotipo de cada una de las esporas, o bien se puede confirmar por PCR.

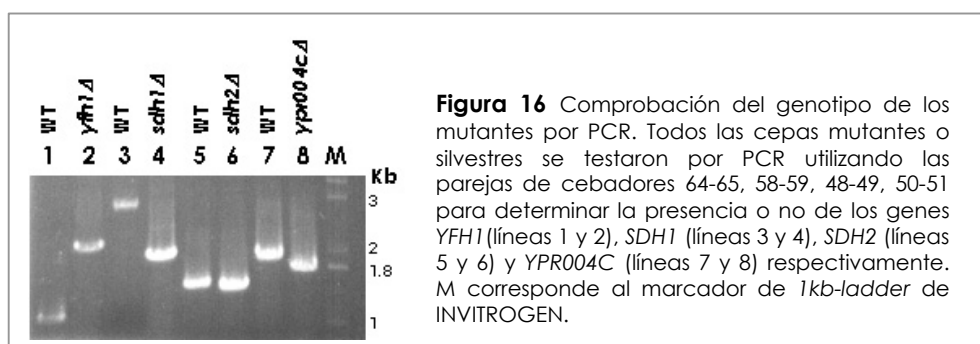
4.3.1 Generación de mutantes

Uno de los métodos más utilizados para caracterizar la función de un gen es la obtención de mutantes. El procedimiento más utilizado para la generación de un mutante es la recombinación homóloga. Este método se basa en el uso de un fragmento lineal de DNA que contiene un marcador genético, por ejemplo, *LEU2*, flanqueado a ambos lados por secuencias del gen que deseamos interrumpir. Se transforma el DNA en una cepa de levadura auxótrofa para el marcador que hemos introducido. Debido a que en *S. cerevisiae* la frecuencia de recombinación homóloga es muy alta, el fragmento lineal de DNA se inserta en medio de nuestro gen resultando en la interrupción y, por lo tanto, en la inactivación del mismo. Todas las cepas que hayan introducido el gen marcador, serán capaces de crecer

Capítulo I

en un medio selectivo, obteniendo mutantes del gen que nos interesa. La delección de los genes *SDH1*, *SDH2* y *YPR004C* se llevó a cabo por este procedimiento, sustituyéndolos por los genes *LEU2*, *TRP1* y *URA3*, respectivamente. El mutante *yfh1D* fue cedido por el Dr. E. Herrero. Los mutantes dobles y triples se obtuvieron por conjugación (**figura 15**).

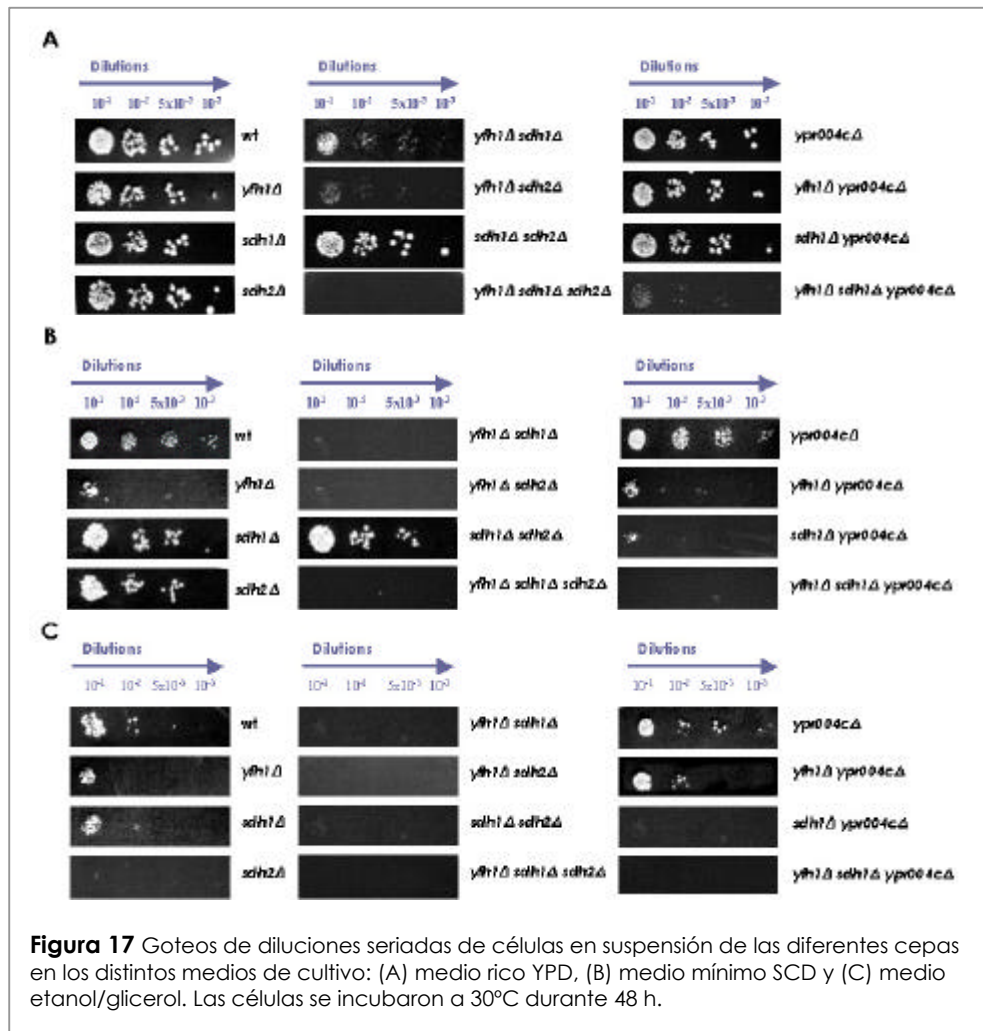
Todos los mutantes se confirmaron tanto por crecimiento en medio selectivo como por PCR (**figura 16**) (ver apartado de material y métodos 3.4.1.3).



4.3.2 Crecimiento celular por goteos de los mutantes en diferentes medios.

Tras obtener los mutantes simples (*yfh1D*, *sdh1D*, *sdh2D*, *ypr004cD*), los dobles mutantes (*yfh1D sdh1D*, *yfh1D sdh2D*, *sdh1D sdh2D*, *sdh1D ypr004cD*, *yfh1D ypr004c*) y los triples mutantes (*yfh1D sdh1D sdh2D*, *yfh1D sdh1D ypr004cD*) observamos su crecimiento tanto en un medio rico (YPD), como en un medio mínimo (SCD) realizando una prueba por goteo (material y metodos 3.5.1.4).

Todos los mutantes fueron capaces de crecer en medio rico, aunque la diferencia de crecimiento entre ellos era ostensible (**figura 17A**). Los mutantes simples no presentan problema en el crecimiento en medio YPD. En las cepas *yfh1D sdh1D*, *yfh1D sdh2D* éste se ve mermado, no siendo así en el doble mutante para las dos subunidades de succinato deshidrogenasa, donde el crecimiento es correcto. La cepa *yfh1D sdh1D sdh2D* presenta un crecimiento inferior al doble mutante. Estos resultados sugieren una interacción sintética entre *yfh1D* y cada uno de los mutantes *sdh1D* o *sdh2D*. En medio mínimo completo el fenotipo presentado por los mutantes que tenían delecionado el gen *YFH1* (*yfh1D*) fue más agresivo (**figura 17B**).



El crecimiento en medio etanol/glicerol, que únicamente permite a la levadura obtener energía a través de la respiración, se agravó aún más (**figura 17C**). Por tanto, podemos afirmar que los genes *YFH1* y *SDH1* y los genes *YFH1* y *SDH2* presentan una interacción sintética. Es muy probable que esta interacción sea en la misma ruta bioquímica, ya que previamente hemos confirmado por coimmunoprecipitación que la proteína Yfh1p es capaz de interactuar físicamente con Sdh1p y Sdh2p.

Capítulo I

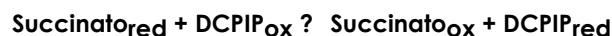
En la observación cuidadosa de los crecimientos de los goteos nos llamó la atención la capacidad de crecer del doble mutante *sdh1D sdh2D* tanto en YPD como en medio mínimo. Una posible explicación de este fenómeno es que la ubiquinona (Q) está correctamente reducida en ausencia de las proteínas Sdh, posiblemente por el hecho de que existen otras formas de reducir a la ubiquinona mediante la entrada de electrones desde rutas alternativas. Pensamos que una de estas rutas alternativas podría ser la de las proteínas Etf o las proteínas homólogas en levadura que previamente habíamos reconocido. Por un lado, la Etf era interesante porque es una proteína que introduce electrones hacia Q y, además, resultaba interesante para nosotros porque habíamos demostrado una interacción de Yfh1p con los homólogos de las subunidades Etf α y Etf β . Para comprobar si el complejo Etf en levadura podría ser una ruta alternativa para la reducción de la ubiquinona generamos la construcción de diferentes combinaciones de mutantes para el gen homólogo de *ETFa*, en levadura el gen *YPR004c*. Como se observa en la **figura 17**, aunque el doble mutante *sdh1D ypr004cD* crece correctamente en medio YPD, muestra un crecimiento pobre en medio SCD, indicando una interacción sintética entre ambos genes bajo estas condiciones. Esto sugiere que la levadura puede utilizar tanto la Sdh como el complejo Etf para introducir electrones hasta la ubiquinona.

Otra valoración que podemos extraer de los goteos es la falta de una interacción sintética entre *YPR004C* y *YFH1*. En medio YPD, *ypr004cD* crece, *yfh1D* crece, y *yfh1D ypr004cD* también es capaz de crecer. A diferencia de *yfh1D sdh1D* que no crece bien, seguramente la falta de Ypr004cp se puede suplir con otra vía que podría incrementarse para ello. Esto haría que *yfh1D ypr004cD* creciera bien. En medio SCD *ypr004cD* crece, pero *yfh1D* no crece bien y esto condiciona que los dobles mutantes como *yfh1D ypr004cD* ya no crezcan bien. Por lo tanto el hecho de que la falta de Yfh1p sea muy agresivo, no permite ver una interacción sintética en medio SCD. Esto podría explicar la falta de interacción sintética.

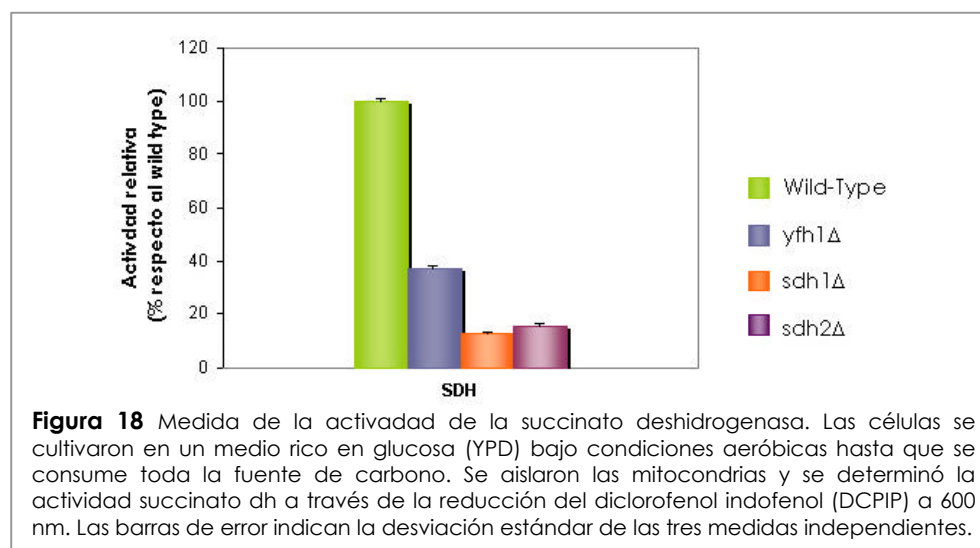
4.4 Alteración de la actividad enzimática succinato deshidrogenasa en el mutante *yfh1D*.

Una vez obtuvimos el mutante *yfh1D* nos interesaba comprobar, por dos motivos principalmente, si la actividad succinato deshidrogenasa se encontraba reducida. Por un lado, porque ya se había descrito anteriormente que la actividad succinato deshidrogenasa estaba disminuida (57, 58), y era interesante comprobar que en nuestro modelo ocurría lo mismo. En segundo lugar, porque después de haber observado la interacción entre frataxina y las subunidades 1 y 2 de la succinato deshidrogenasa era interesante saber si la actividad succinato deshidrogenasa se encontraba afectada por la falta de frataxina.

Para demostrar una relación funcional entre Yfh1p y las subunidades de Sdh que sugerían todos los datos anteriores, medimos la actividad succinato deshidrogenasa en mutantes *yfh1D*, *sdh1D*, *sdh2D* y salvaje. La actividad de la succinato deshidrogenasa se mide mediante la siguiente reacción:

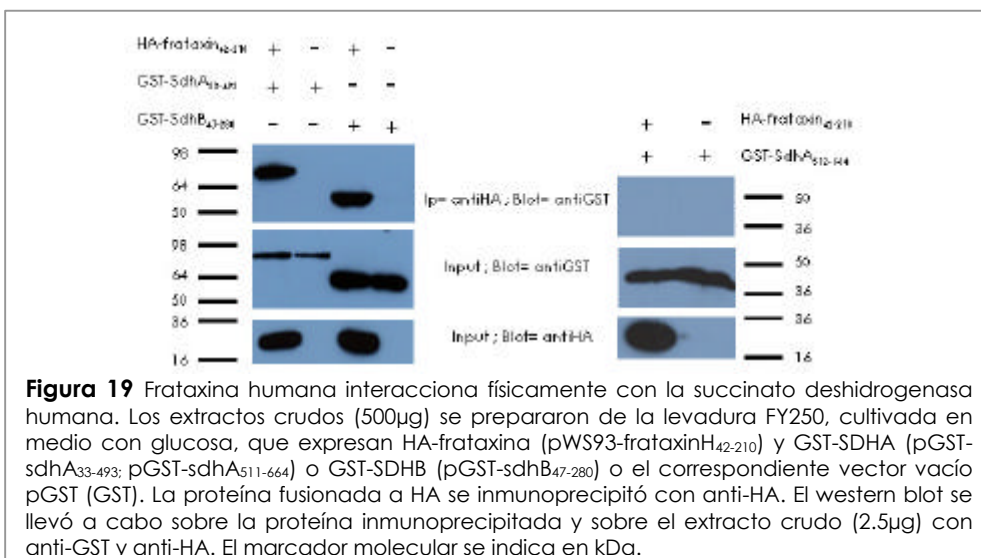


Seguimos la reacción gracias a la capacidad de absorción del DCPIP a 600nm, que a medida que se reduce disminuye la absorbancia. Comprobamos que la actividad succinato deshidrogenasa se encontraba disminuida respecto a la cepa salvaje (figura 18).



4.5 Interacciones de frataxina con proteínas humanas.

Para relacionar estos resultados con la enfermedad humana preparamos nuevas construcciones con el objeto de expresar en levadura la frataxina humana y las proteínas del complejo II humano, SDHA y SDHB. En este caso, utilizamos frataxina humana sin el péptido señal fusionada al dominio HA (pWS93-frataxinH42-210), por lo que sólo podemos apreciar una banda en los geles de acrilamida. Las proteínas SDHA y SDHB se fusionaron a GST utilizando el plásmido pEG-GST: dominio FAD de SDHA (pGST-sdhA33-493); dominio C-terminal de SDHA (pGST-sdhA511-664) y SDHB (pGST-sdhB47-280). Realizamos el análisis por coimmunoprecipitación, comprobando que frataxina humana es capaz de interactuar físicamente con el dominio FAD de SDHA pero no con el dominio C-terminal de esta proteína. Frataxina también interactúa con la proteína SDHB (**figura 19**). Volvimos pues, a obtener los mismos resultados que en levadura. Estos resultados sugieren que la interacción de frataxina con succinato deshidrogenasa se encuentra conservada desde levaduras hasta humanos.



Algunos autores han sugerido que frataxina puede formar complejos cuando une hierro. Como teníamos la técnica puesta a punto, decidimos comprobar si en nuestro sistema éramos capaces de observar una interacción

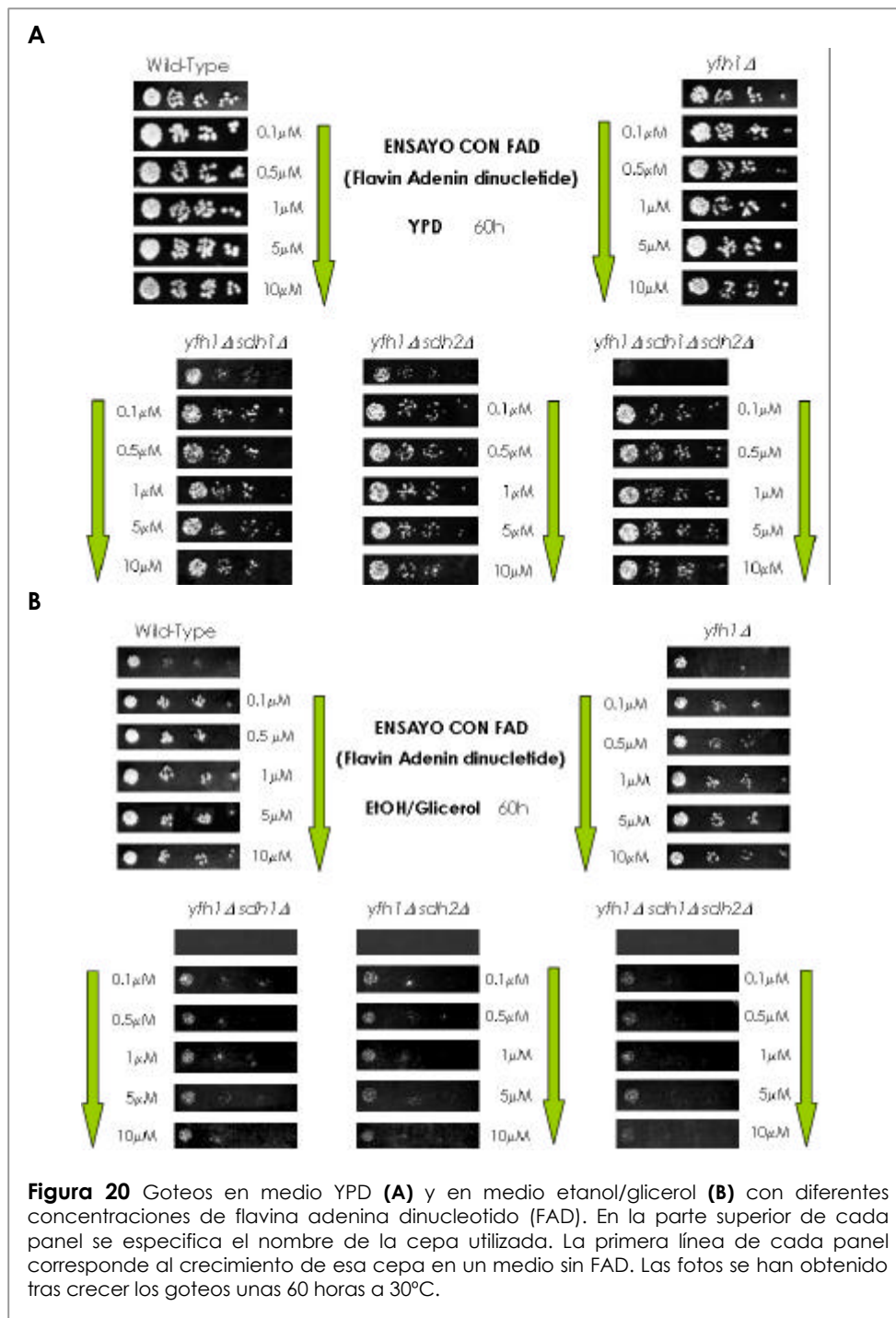
frataxina-frataxina. Para ello transformamos las levaduras con dos plásmidos que contenían frataxina humana. El primero pWS93-frataxinHA₄₂₋₂₁₀, que expresa frataxina sin el péptido señal y fusionada al dominio HA. El segundo pGST-frataxinaHA₁₋₂₁₀ que contiene la frataxina completa fusionada a la proteína GST. Aunque una de ellas contenga el péptido señal, en ambos casos sólo apreciamos una banda en los geles de acrilamida, lo cual era de esperar, ya que la frataxina humana no es capaz de intermedializarse en la mitocondria de levadura. Cuando realizamos la coimmunoprecipitación no observamos banda alguna, lo que indicaba que frataxina no era capaz de interactuar consigo misma en estas condiciones.

La hipótesis donde se plantea que Yfh1p puede unir hierro, afirma que es la adición de hierro ferroso la que provoca la formación de trímeros de frataxina que catalizan la oxidación del hierro **(62, 63)**. Por otro lado, los mismos autores han observado que las altas concentraciones de hierro inducen el ensamblaje de la proteína llegando a secuestrar más de 2000 átomos de hierro **(64)**. A diferencia de estos experimentos, en nuestro caso, hemos utilizado la proteína humana y no la de levadura, y en ningún caso hemos forzado la situación con la adición de hierro. De todas formas, también se ha observado el fenómeno de ensamblaje con la frataxina humana, afirmándose que alrededor de un 10% de la frataxina humana forma un complejo esférico que contiene este metal **(65)**. El hecho de que no se observe, en nuestras condiciones, una interacción de frataxina humana consigo misma no significa que esta unión no se pueda dar. Nosotros sólo podemos compararlo con las interacciones mostradas en este trabajo, las cuales se han dado sin forzar el crecimiento de las células mediante algún tipo de estrés, o añadiendo alguna sustancia para aumentar su concentración final. Por lo tanto, pensamos que si frataxina está ejerciendo alguna función relacionada con la cadena de transporte electrónico, no necesita formar dímeros o complejos con ella misma, y por lo menos para interactuar con estas proteínas no precisa una concentración determinada de hierro.

4.6 La flavina adenina dinucleótido (FAD) mejora el crecimiento de las cepas mutantes de levadura.

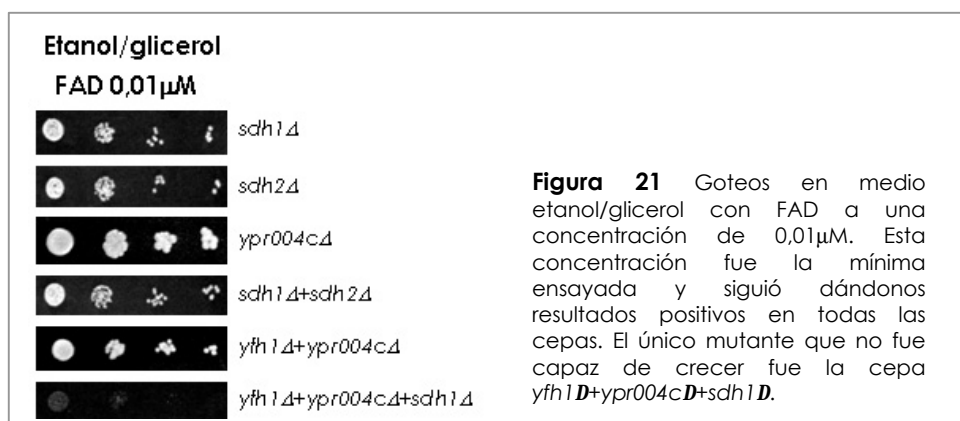
El trabajo experimental nos había conducido a observar una interacción entre la frataxina y proteínas del complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El complejo II constituye la segunda reacción de oxidación-reducción esencial de la cadena y, para ello, emplea un FAD como aceptor de electrones. La succinato deshidrogenasa es una de las cinco flavoproteínas que juegan un papel esencial en el metabolismo energético de las mitocondrias. De hecho, participa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos oxidando el succinato a fumarato y convirtiendo FAD en FADH₂. FAD se une covalentemente a un residuo de histidina de la subunidad SDHA que es la flavoproteína del complejo II. Posteriormente, FADH₂ es oxidado de nuevo a FAD por la ubiquinona o coenzima Q localizada en la membrana interna de la mitocondria que transfiere electrones desde los complejos I y II al complejo III. FAD es un cofactor derivado de la riboflavina o vitamina B₂. La riboflavina se ha empleado como tratamiento en algunos pacientes con una enfermedad OXPHOS, como es el caso de un enfermo con una miopatía mitocondrial debida a una disfunción del complejo I y que mejoró su capacidad de ejercicio tras la administración de 100 mg/día de riboflavina (123). También se ha informado de una paciente con una mutación mitocondrial en el gen tRNA^{Leu}T3250C que mejoró de su miopatía con el tratamiento (124).

El conjunto de datos experimentales y clínicos nos llevó a plantearnos que la presencia de FAD podría mejorar los fenotipos de las distintas cepas mutantes *yfh1D*, *sdh1D* y *sdh2D*. Diseñamos cultivos en medio rico YPD y en medio etanol/glicerol para estudiar el efecto del FAD tanto en condiciones fermentativas como en condiciones donde se fuerza a respirar a las levaduras. Medimos el crecimiento celular en experimentos de goteo para distintas dosis de FAD que variaban entre 0,01 μM y 10 μM. En la **figura 20A** se muestra los resultados en medio YPD. Como ya habíamos observado, tanto los mutantes sencillos como los mutantes dobles crecieron bien en ausencia de FAD, por lo que no se observó diferencias de crecimiento en presencia de FAD. Sin embargo, el triple mutante *yfh1Dsdh1Dsdh2D* creció mal sin FAD pero el crecimiento se rescató cuando FAD



Capítulo I

estaba presente en cualquiera de las dosis aplicadas. Este hallazgo sugería que FAD podría tener un efecto en el rescate de un fenotipo que tiene dificultades en crecer a pesar de poder fermentar. ¿Qué pasaría si realizáramos el mismo experimento en condiciones donde la levadura se ve forzada a respirar? En estas condiciones crecen mal todos los mutantes sencillos y, por supuesto, los dobles mutantes. Nuestra sorpresa fue que en presencia de FAD, ya desde la dosis de 0,1 μM , las cepas mutantes sencillas y las dobles mutantes mejoraban ostensiblemente su crecimiento. Incluso el triple mutante mostraba algo de crecimiento aunque menor (**figura 20B**). Siguiendo el argumento de la hipótesis que planteamos sobre el papel de Yfh1p en la correcta modulación de la transferencia de electrones desde el cofactor FAD unido a la subunidad Sdh1p hacia la coenzima Q, se puede postular que la presencia en el medio de FAD podría corregir parcialmente la ausencia de frataxina mejorando la eficacia de la transferencia de electrones en el complejo II.



FAD también participa en la transferencia de electrones desde el complejo Etf y Etf deshidrogenasa. Tanto el mutante sencillo *ypr004cD* (homólogo de la ETFa humana) como el doble mutante *yfh1D ypr004cD* crecen bien en un medio con FAD, pero no así el triple mutante *yfh1D sdh1D ypr004cD* (**figura 21**). En este caso la entrada de electrones hacia la coenzima Q estaría afectada en las dos vías dependientes de FAD, complejo II y complejo Etf. Cabría interpretar este hallazgo como que al menos una de las dos vías debería estar funcional para que el FAD exógeno pueda mejorar la transferencia de electrones.

CAPÍTULO I

DISCUSIÓN

Capítulo I

5 CAPÍTULO I. DISCUSIÓN.

En este trabajo hemos definido una nueva interacción de la frataxina con proteínas involucradas en la respiración mitocondrial, ubicando así a la frataxina en una nueva ruta metabólica, la cadena de transporte electrónico.

Los inicios de este trabajo se remontan al diseño de la búsqueda de nuevas interacciones de frataxina con otras proteínas utilizando la técnica del doble híbrido. No era la primera vez que se realizaba un estudio por doble híbrido. En 1998 se publicó un trabajo donde se realizaba un rastreo sobre una genoteca de cDNAs de embrión de ratón (9.5 y 12.5 días de estadio embrionario) utilizando como cebo la frataxina de ratón **(43)**. El resultado obtenido fue una peptidasa de procesamiento mitocondrial beta (MPP beta). Esta peptidasa es necesaria para la maduración de la frataxina (ver introducción). Cuando nosotros nos decidimos a realizar el doble híbrido, pensamos en cambiar algunas de las características del anterior experimento, con la esperanza de obtener algún resultado más. La diferencia más obvia fue que nosotros nos decidimos por utilizar como cebo la frataxina de levadura y una genoteca de cDNAs de levadura. Lo que lográbamos con esta aproximación era que en principio no habría problema de plegamientos o expresión de las proteínas, ya que todo el experimento se realiza en la propia levadura y, por lo tanto las interacciones que pudiesen darse se realizarían en su propio entorno. Nuestros resultados no se pueden comparar con los obtenidos anteriormente. En nuestro caso no obtuvimos ningún clon que se correspondiese con la MPPbeta. Esto tampoco nos preocupó, ya que el problema podría residir en la genoteca, que no era la más adecuada para obtener todos los resultados esperados. Esta genoteca se había obtenido de levaduras crecidas en un medio rico como es el medio YPD, por lo que no se está obligando a la levadura a respirar, es decir, la cantidad de mitocondrias era inferior a la deseada para nuestro estudio. Pero como sólo disponíamos de esta genoteca decidimos probar, ya que siempre estaríamos a tiempo de preparar otra en mejores condiciones si de verdad valía la pena. De todas formas, lo más interesante es que nuestro resultado fue diferente al obtenido anteriormente por otros laboratorios. Nosotros fuimos capaces de detectar una interacción entre Yfh1p y Yhb1p.

La proteína Yhb1 es una flavoproteína que se localiza tanto en citosol como en la matriz mitocondrial. Esta distribución está afectada por la anoxia que

Capítulo I

puedan sufrir las células y por la presencia del genoma mitocondrial. Cuando obtuvimos el resultado de la interacción entre Yfh1p y Yhb1p todavía no había sido descrita esta segunda localización en mitocondria. El hecho de que Yhb1p sea capaz de posicionarse en mitocondria hace que nos tengamos que volver a replantear esta interacción para futuros estudios. Yhb1p se requiere para el correcto metabolismo del óxido nítrico (NO) **(116)**. Se ha descrito que este metabolito actúa como regulador de la respiración mitocondrial y ejerce su función reguladora a distintos niveles. El NO se une al sitio de unión del oxígeno de la citocromo c oxidasa e inhibe a la enzima de manera reversible y competitiva con el oxígeno. De igual manera, el NO también es capaz de inhibir la transferencia de electrones entre el citocromo **b** y **c** e incrementar la producción de anión superóxido O_2^- . El NO inhibe la transferencia de electrones y la función de la NADH-deshidrogenasa en el complejo I. Así pues, el nexo de unión entre ambas proteínas podría ser la cadena de transporte electrónico. La cuestión es que la falta de una o de otra proteína acaba provocando un estrés oxidativo generado por la acumulación de radicales libres en la mitocondria. Estos radicales podrían generarse de la misma manera, es decir, por un funcionamiento incorrecto de la cadena de transporte electrónico. Obviamente todas estas observaciones sólo pueden resolverse por experimentos futuros, pero lo que está claro es que esta proteína no puede descartarse ya que quizás es clave a la hora de especificar la función de la frataxina.

Como ya hemos comentado, en el momento de obtener este resultado únicamente estaba descrita la localización citosólica de la proteína Yhb1, y además prácticamente no se sabía nada de ella. Esto, unido a que no presenta una homología conservada en organismos superiores, hizo que nos olvidásemos provisionalmente de esta proteína. Pero nos sirvió para dirigir el camino hacia el estudio de otras flavoproteínas o bien proteínas que contuviesen un dominio hemo mitocondriales. Por los motivos enumerados en resultados nos decidimos por continuar el estudio con flavoproteínas. Yhb1p nos aporta más de lo que podíamos imaginar, y de nuevo para estudios posteriores deberíamos replantearnos como de importante puede ser la presencia del dominio hemo en la interacción de frataxina con otras proteínas. De hecho, revisando de nuevo la bibliografía encontramos una relación de la frataxina con la síntesis del grupo hemo. La interacción descrita es de

frataxina con la proteína ferrocatalasa (**69**) que cataliza el último paso de la biosíntesis del grupo hemo. La ferrocatalasa contiene dos clusters Fe-S y aunque no presenta directamente un dominio hemo (como es el caso de la proteína Yhb1) si que está relacionada con su síntesis. Esto es lo que hace que nos planteemos hasta que punto es prudente descartar este dominio o no como un dominio potencial para interactuar con frataxina.

En este trabajo, utilizando tanto técnicas bioquímicas como genéticas, hemos demostrado en levadura que Yfh1p es capaz de interactuar tanto física como funcionalmente con la enzima succinato deshidrogenasa.

Yfh1p es capaz de interactuar físicamente con la subunidad 1 (Sdh1p) de la succinato deshidrogenasa. Realizamos varias construcciones para expresar diferentes fragmentos de la proteína sdh1 en pauta con la etiqueta HA (ver **figura 12**). De esta manera intentamos acotar la zona necesaria para interactuar con frataxina. La construcción pWS93-sdh1₃₂₋₆₄₀ incluía toda la proteína excepto el péptido señal a mitocondria. En la proteína expresada se encuentra la His 90, aminoácido responsable de la unión, de forma covalente, del cofactor FAD a la proteína. Vimos que Yfh1p era capaz de interactuar con esta proteína de fusión. Cuando realizamos la construcción pWS93-sdh1₁₅₃₋₆₄₀ que corresponde al dominio FAD y no incluye la zona donde se encuentra la His90, observamos de nuevo interacción con frataxina. Claramente, esto indica que la presencia del cofactor FAD no es un requerimiento para que se produzca la interacción con Yfh1p. Así pues, esto viene a descartar que frataxina pueda estar involucrada en la unión de este cofactor a la proteína Sdh1p.

Cuando hicimos extensible este trabajo a la subunidad 2 de la succinato deshidrogenasa (Sdh2p) comprobamos que también era capaz de interactuar con Yfh1p. Esto puede llevar a pensar que frataxina no interactúa por medio del dominio FAD, sino que tiene que existir otro motivo de unión. Esta hipótesis no puede ser concluida del todo por una razón. Como ya hemos comentado en resultados, las construcciones se prepararon para que la localización de las proteínas se diese en el citosol. Únicamente el cebo, es decir, Yfh1p presentaba el péptido señal responsable de la internalización a mitocondria. Pero como se está produciendo una sobreexpresión obtenemos localización mitocondrial y citosólica ya que, de alguna manera, se está saturando la maquinaria de entrada a la

Capítulo I

mitocondria lo cual hace que parte de la proteína se quede en el citosol. Así pues, las interacciones se dan en el citosol. Aun así, no podemos descartar que la interacción de Sdh2p no sea a través de la subunidad 1, Sdh1p, y concretamente a través del dominio FAD. Para poder descartar esta posibilidad deberíamos realizar la coimmunoprecipitación en un fondo genético mutante para el gen *SDH1*.

Por lo tanto, a fecha de hoy solamente podemos concluir que Yfh1p es capaz de interactuar con Sdh1p y Sdh2p, pero no sabemos nada de cómo y a nivel de qué estructuras se da esta interacción.

Cuando construimos los mutantes de levadura, presentamos evidencias de que el gen de la frataxina de levadura manifiesta una interacción sintética con *SDH1* y *SDH2*. El hecho de que la falta de frataxina, *yfh1D*, muestre un crecimiento correcto en medio rico, que se afecta únicamente si se deletan los genes *SDH1* o *SDH2*, indica un efecto directo de frataxina sobre la actividad enzimática del complejo succinato deshidrogenasa. Esto lo confirmamos midiendo la actividad de la succinato deshidrogenasa y comprobando que está gravemente afectada en los mutantes de levadura para el gen de la frataxina. En artículos previos, la reducción de la actividad de la succinato deshidrogenasa en mutantes *yfh1D* se explicaba como un efecto secundario. Los autores sugerían que el defecto primario provocado por el déficit de frataxina se encontraba en la biogénesis de los clusters Fe-S, que directamente afectan a una síntesis incorrecta de las proteínas que contienen estos clusters, como es el caso de la proteína Sdh2 de la succinato deshidrogenasa. Así es como se ha explicado el hecho de que en todos los organismos modelos deficientes en frataxina estudiados hasta la fecha se haya observado una respiración anormal. Pero hay trabajos que apuntan hacia una causa diferente de este fenotipo, involucrando directamente a la frataxina con la respiración. El experimento que más apoyó esta teoría fue llevado a cabo por Ristow y colaboradores, que sobreexpresaron frataxina humana en adipocitos humanos, y observaron un incremento en la actividad en el transporte de electrones, un aumento en el potencial de membrana y, por lo tanto, una mayor producción de ATP, proponiendo que la frataxina podría ser un estimulador de la fosforilación oxidativa (60). Esto, a su vez, explicaría el déficit *in vivo* en la síntesis de ATP después de realizar ejercicio en músculo esquelético de pacientes FRDA (59). Por otro lado, en líneas de *Arabidopsis thaliana* que presentan una disfunción

mitocondrial inducida por la expresión incorrecta de la subunidad 9 de la ATP sintasa, la expresión de frataxina se ve incrementada en las flores, tejido de mayor demanda de energía en las plantas. Este aumento en la expresión podría ser un efecto compensatorio en respuesta a una disminución en la respiración mitocondrial. Todos estos datos apoyan una relación directa entre frataxina y la respiración mitocondrial y concretamente nuestros resultados indican una interacción física de frataxina con succinato deshidrogenasa, subunidades 1 y 2, y además, proponen a la frataxina como un componente esencial de la cadena de transporte electrónico. Esta relación funcional entre la frataxina de levadura y la succinato deshidrogenasa sugiere un papel directo de la frataxina regulando la cadena de transporte electrónico, al menos vía el complejo II. Alternativamente, la frataxina podría también afectar la estabilidad o el ensamblaje de la succinato deshidrogenasa, regulando en este paso su actividad.

Al realizar los goteos con las cepas mutantes, lo que más llama la atención es que el doble mutante *sdh1D sdh2D* es capaz de crecer en medio mínimo (ver **figura 17**). Por lo tanto, hay otras vías de entrada de electrones a la cadena de transporte electrónico que son capaces de compensar el correcto funcionamiento del complejo II. Nuestro estudio se centró en las flavoproteínas ETF (flavoproteína transferidora de electrones)ceptoras de electrones. Los electrones que aceptan son transferidos a la cadena de transporte electrónico vía la ETF deshidrogenasa con destino a la ubiquinona. Cuando realizamos el mutante de levadura del gen *YPR004C*, que supuestamente se corresponde con la subunidad α de la ETF, comprobamos que el crecimiento de este mutante tanto en medio YPD como en medio SCD es normal. Pero al realizar el doble mutante *sdh1D ypr004cD* comprobamos que en medio mínimo SCD el crecimiento se veía afectado. Así, pues, como era de esperar, los genes *SDH1* y *YPR004c* presentan una interacción sintética. Lo más importante que se puede apreciar es que la falta de frataxina afecta al crecimiento de la misma manera que el doble mutante *sdh1D ypr004cD*, por lo que podemos pensar que la falta de *YFH1* afecta de la misma manera a la célula que lo hacen la falta de los genes *SDH1* y *YPR004C*. Por lo tanto, si *Sdh1p* y *Ypr004cp* mantienen, por dos vías diferentes, la entrada de electrones a la cadena de transporte electrónico, pensamos que la frataxina podría estar relacionada con dicha actividad, facilitando, estimulando o generando una correcta entrada de

Capítulo I

estos electrones a la cadena de transporte electrónico. Confirmamos que frataxina estaba presente en la entrada de electrones a través de las Etf mediante la técnica de coinmunoprecipitación.

La cadena de transporte electrónico es una fuente importante de especies reactivas del oxígeno (ROS), término con el que se designan a los productos derivados de las reducciones parciales de moléculas de oxígeno y que comprenden tanto radicales libres (anión superóxido O_2^- ; radical hidroxilo $HO\cdot$) como especies moleculares neutras (peróxido de hidrógeno H_2O_2). Las especies ROS producidas durante la respiración aeróbica causan un daño oxidativo acumulado que resulta en un envejecimiento celular y en enfermedades degenerativas relacionadas con la edad. Ya se conocía desde hacía tiempo que los complejos I y III eran los responsables de la formación de las especies ROS **(125-127)**, pero gracias a estudios con un mutante de *C. elegans* para una de las subunidades del complejo II (*mev-1*) se comprobó que el complejo II también era capaz de producir cantidades significativas de anión superóxido **(128)**. En levadura se confirmó esta observación, donde un intermediario, la ubisemiquinona, forma parte del mecanismo catalítico de la succinato deshidrogenasa. Un único electrón se transfiere desde el FAD de la Sdh1p, pasa por los clusters Fe-S de la subunidad sdh2p hasta llegar a la ubiquinona. Hasta que llegue un segundo electrón que reduzca completamente al intermediario, la enzima tiene que ser capaz de estabilizar el radical ubisemiquinona y prevenir que este electrón se escape o se dé una re-oxidación inapropiada **(129)**.

Entonces, ¿cómo ejerce frataxina su efecto en la cadena de transporte electrónico? Si nosotros asumimos que la frataxina podría estar relacionada con la entrada de electrones a la cadena de transporte electrónico, la falta de frataxina podría entonces impedir un uso correcto de los electrones por el complejo II o por las Etf. Si los electrones no fueran incorporados correctamente a la cadena respiratoria, la ubiquinona (Q) no podría ser completamente reducida a ubiquinol (QH_2) y se acumularía un exceso del intermediario, la forma semiquinona ($Q\cdot^-$). La generación de este radical semiquinona está asociado con un efecto prooxidante a través de la interacción con moléculas de oxígeno y produciendo radicales superóxido, lo cual genera un estrés oxidativo en la mitocondria. Por lo tanto, la frataxina podría prevenir la acumulación de la forma semiquinona y jugar un papel

positivo en la respuesta a estrés oxidativo. Esto podría explicar el estrés oxidativo que está asociado a la falta de frataxina **(41,48,49)**. A su vez la generación de estas especies ROS, como el radical hidroxilo (OH^{*}), son las que causarían la disminución en la actividad de proteínas que contienen clusters Fe-S, como la aconitasa, fenotipo que se ha observado en fibroblastos humanos deficientes en frataxina y mutantes *yfh1D* de levadura **(57, 58)**.

Otro de los fenotipos clásicos de un mutante de frataxina es la presencia de acúmulos de hierro en la mitocondria **(41)**. Hasta la fecha, acerca del transporte del Fe a la mitocondria, no se conoce demasiado. En levadura, la importación del Fe a la mitocondria esta mediado, al menos en parte, por dos transportadores: MRS3 y MRS4 (*mitochondrial solute carrier protein*) **(130-132)**. Mrs3p y Mrs4p están conservados a lo largo de la evolución, y sus homólogos en humanos son capaces de rescatar el defecto de crecimiento del doble mutante *mrs3D mrs4D* **(133)**. Hay un candidato para ser el responsable de exportar el Fe libre desde la mitocondria hacia el citosol, el transportador de la familia de los ABC denominado MTABC3 **(134)**. Lo que tampoco sabemos como podría actuar la frataxina sobre este transporte. De todas formas, aunque al principio se pensó que esta era la causa principal de la patología, posteriormente cuando se describió el *knock-out* de ratón **(52)** lo primero que llamó la atención es que no se apreciaban depósitos de hierro, por lo que no parecía que éste fuera el defecto primario sino un efecto secundario, eso sí, de gran relevancia patogénica en el proceso de la enfermedad. Así pues, *a priori* no tendría que estar actuando directamente la frataxina sobre este transporte de Fe a la mitocondria o estar relacionada con la homeostasis del Fe, sino más bien sería una consecuencia secundaria la que llevaría a esta situación.

Otra de las hipótesis que se han propuesto es que la frataxina podría ser una proteína de almacenaje, uniendo hierro, posiblemente de una forma parecida a la ferritina. La incubación de Yfh1p con hierro ferroso induce la formación de oligómeros que conllevan 49 subunidades de Yfh1p que unen más de 2000 átomos de hierro **(61, 63)**. Esta hipótesis está bastante discutida, ya que hay observaciones que no son fáciles de explicar. Por ejemplo, la variación en los niveles de hierro intracelular no tiene efecto sobre la expresión de frataxina, y esto no es consistente con el papel de proteína de almacenaje del hierro. Posteriormente se comprobó que esta oligomerización de Yfh1p no era relevante *in vivo* ya que un mutante

Capítulo I

yfh1D incapaz de oligomerizar rescata el fenotipo de la cepa delecionada para el gen *YFH1* tan bien como una proteína salvaje **(135)**. En nuestro caso, comprobamos que la frataxina humana no era capaz de interaccionar con ella misma, aunque únicamente probamos en las mismas condiciones que se habían producido el resto de interacciones, nunca forzando la situación con hierro.

Por último, también sugerimos que esta nueva función que proponemos para la frataxina, actuando como un regulador en la entrada de electrones a la cadena de transporte electrónico, podría estar conservada de levaduras a humanos, porque la frataxina humana también fue capaz de interaccionar físicamente con las subunidades SDHA y SDHB de la succinato deshidrogenasa. Este hallazgo podría explicar algunos de los fenotipos observados en células deficientes en frataxina y en pacientes, como son la reducción en la producción de ATP, función anormal de la cadena respiratoria y la producción de radicales libres de especies del oxígeno que provocan un incremento del estrés oxidativo. Así pues, la ataxia de Friedreich podría ser considerada como una enfermedad OXPHOS causada por mutaciones en un gen nuclear.

Debido a la naturaleza ubicua de la fosforilación oxidativa, un defecto en la cadena respiratoria mitocondrial podría presentarse en los pacientes como una inexplicable combinación de síntomas neuromusculares o no neuromusculares, que progresivamente afectarían a órganos y tejidos aparentemente no relacionados entre sí. Las deficiencias mitocondriales derivadas de la falta o disminución de la actividad de alguna proteína perteneciente a la cadena respiratoria, causa una gran variedad de enfermedades humanas: enfermedades neurodegenerativas, neuropatías, ataxias, enfermedades neuro-oftalmológicas, etc **(136-138)**. A diferencia de lo bien definidas que están las patologías producidas por deficiencias en los complejos I, III y IV, las consecuencias de defectos en el complejo II en humanos no están totalmente precisadas **(139-146)**. Las deficiencias en el complejo II están asociadas con una enfermedad mitocondrial denominada síndrome de Leigh que conlleva cambios en el metabolismo provocando una acidosis láctica **(142, 144)**. Se ha descrito, en dos hermanas, una mutación en heterocigosis en la subunidad que corresponde a la flavoproteína de 70 kDa del complejo II (SDHA). Presentan un cuadro clínico de inicio tardío con atrofia óptica, miopatía y ataxia **(158, 159)**. Es interesante reseñar aquí que también se ha descrito un trastorno en el

que hay déficit asociado de succinato deshidrogenasa y aconitasa (OMIM 255125), dos enzimas cuya actividad está reducida en mutantes de levadura *yfh1D* y en células de pacientes con ataxia de Friedreich. Estos pacientes muestran una marcada intolerancia al ejercicio con fatiga prematura, disnea y palpitaciones **(141, 143)**. Por otra parte, no nos pasa desapercibido que el cuadro clínico sistémico de la ataxia de Friedreich, con ataxia, neuropatía sensitiva, miocardiopatía hipertrófica, diabetes mellitus y defectos sensoriales como atrofia óptica o pérdida de audición, es compatible con las diversas formas de presentación de los trastornos OXPHOS **(147)**.

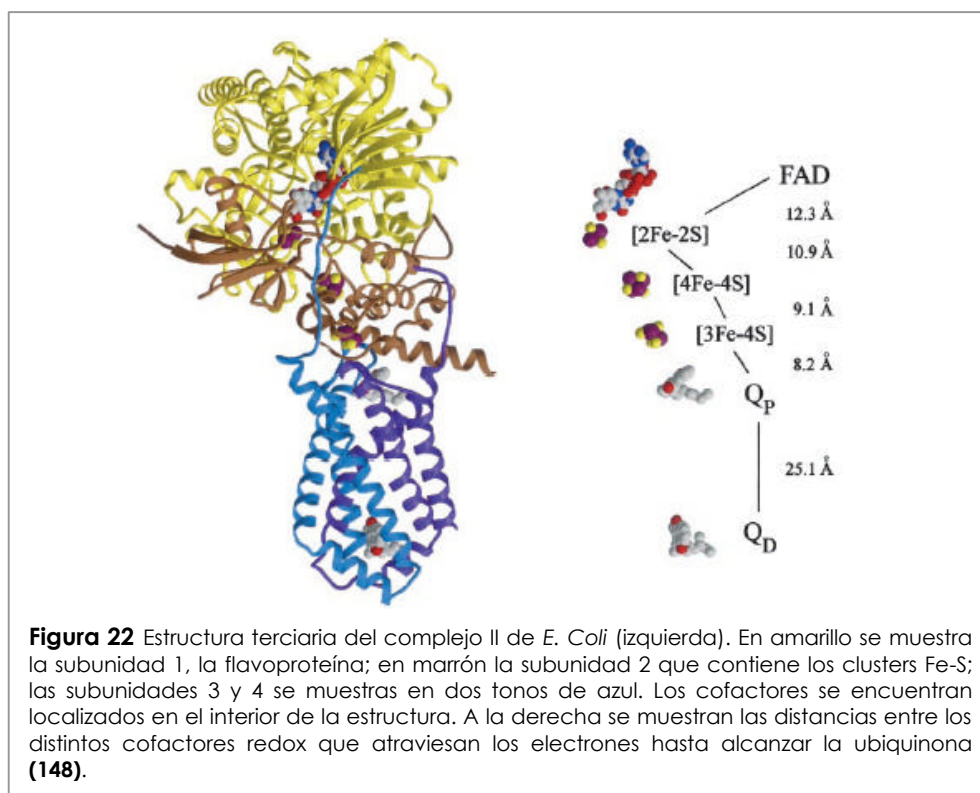
Como ya se ha explicado en la introducción, la frataxina es capaz de interaccionar con otras proteínas involucradas en diferentes rutas bioquímicas. Una de ellas es la ferrocatalasa **(69, 63, 70)**, proteína que cataliza el último paso de la biosíntesis del grupo hemo. Una segunda interacción se ha observado entre *Yfh1p* y el complejo *Isu1p/Nfs1p* **(72, 73)**, componentes clave en la maquinaria ISC que actúan en las primeras etapas del ensamblaje de los clusters Fe-S. Por último se ha demostrado una interacción entre frataxina y aconitasa, pero siempre en presencia de citrato que podría estabilizar esta interacción y promover la reactivación de la enzima **(74)**. A todo esto tenemos que sumarle las interacciones que hemos descrito en este trabajo: interacciones entre frataxina y succinato deshidrogenasa, conservándose tanto en levadura como en humanos, y con el complejo Etf. Lo que nos queda por averiguar ahora es qué tienen en común estas rutas bioquímicas, y qué es lo que aporta frataxina a cada una de ellas. Nosotros proponemos que su función radicaría en facilitar la entrada de electrones o modular la transferencia de éstos en las distintas funciones o reacciones que se han propuesto para la frataxina. Otra alternativa es que la frataxina estabilizara los complejos de manera que la transferencia de electrones fuera correcta.

Todos estos resultados, junto con nuestros datos sobre la interacción funcional de frataxina con el complejo II, sugieren que frataxina no tiene una única función, sino que más bien podría tener un amplio y dinámico papel en la fisiología de la mitocondria y, por ende, en la fisiopatología celular de la ataxia de Friedreich.

¿Qué nos aportan los datos obtenidos y la ubicación de la frataxina en la cadena respiratoria en relación con posibles terapias farmacológicas? El complejo II oxida el succinato a fumarato y transfiere los electrones a la coenzima Q. La enzima

Capítulo I

está compuesta por cuatro subunidades: una flavoproteína (SDHA, Sdh1p), una proteína Fe-S (SDHB, Sdh2p) y dos polipéptidos de membrana (SDHC y SDHD, Sdh3p y Sdh4p). La flavoproteína contiene el sitio de unión a succinato y se le une covalentemente el cofactor FAD; la proteína Fe-S contiene tres clusters Fe-S (centro 1 [2Fe-2S]^{2+,1+}, centro 2 [4Fe-4S]^{2+,1+} y centro 3 [3Fe-4S]^{1+,0+}), los cuales transportan electrones hasta la coenzima Q. Es posible que la coenzima Q lipofílica se encuentre unida a las subunidades de membrana SDHC y SDHD **(148) (figura 22)**. Asociado a SDHC hay un citocromo b₅₆₀ de función desconocida. Sin embargo, el mutante *mev-1* de *C. elegans* es consecuencia de una mutación de SDHC y tiene reducida la longevidad e incrementado las especies reactivas del oxígeno, lo que sugiere que esta subunidad y el citocromo pueden funcionar estabilizando la forma ubisemiquinona **(149)**. La transferencia de electrones que entran a través del cofactor FAD hacia la ubiquinona requiere de un correcto funcionamiento del conjunto de proteínas y clusters del complejo II.



En base a la interacción de la frataxina con la flavoproteína y la proteína Fe-S de la succinato deshidrogenasa, y la hipótesis que hemos propuesto sobre su papel en la transferencia de electrones en el complejo II, pensamos que la presencia de FAD exógeno podría mejorar el crecimiento de los mutantes, tal vez porque los electrones se transfieran mejor. De hecho, comprobamos que FAD rescataba el crecimiento del mutante sencillo *yfh1D*, de los dobles mutantes *yfh1D sdh1D* y *yfh1D sdh2D* y del triple mutante *yfh1D sdh1D sdh2D*, tanto en condiciones de fermentación como en condiciones de respiración. Este fenómeno podría explicarse porque los electrones pueden alcanzar la coenzima Q desde el complejo Etf, manteniendo su capacidad de reacción de reducción completa a ubiquinol. A favor de esta explicación, todavía especulativa, iría el hecho de que el triple mutante *yfh1D sdh1D ypr004cD* no mejore en presencia de FAD, tal vez porque no sea posible la correcta reducción de la ubiquinona. No se nos escapa que la confirmación de estos resultados, midiendo no sólo el crecimiento celular sino también actividades mitocondriales fundamentales, daría pie a plantear un tratamiento para la ataxia de Friedreich con la vitamina natural, la riboflavina, a dosis terapéuticas tal como se utiliza en algunas enfermedades mitocondriales.

Capítulo I

CAPÍTULO II

RESULTADOS

Capítulo II

6 RESULTADOS. CAPÍTULO II.

6.1 Elección de genes candidatos humanos.

Las cepas de levadura mutantes para el gen *YFH1*, homólogo del gen *FRDA* de humanos, presenta un fenotipo muy similar al causado por la delección del gen *ATM1*. Estos resultados llevaron a relacionar ambas proteínas, y se propuso que *Yfh1p* podría regular la homeostasis del hierro posiblemente a través de un transportador de hierro, en concreto, a través del transportador *Atm1p*. *Atm1p* está localizado en la membrana interna de la mitocondria con el dominio C-terminal de la proteína orientada hacia la matriz mitocondrial. Basándose en esta orientación se puede predecir que el transportador exporta el sustrato desde la matriz al espacio intermembranoso. Estudios previos han eliminado como posibles funciones del *Atm1p* tanto la exportación del grupo hemo **(87)** como la importación de hierro **(88)**. En cambio, sí que había indicios que apoyaban la hipótesis de que podría tener como función la exportación de hierro. En primer lugar, existía una acumulación de hierro mitocondrial en las células de la médula espinal de pacientes con la mutación I400M en el gen *ABC7*, y en las cepas de levadura *atm1D* también estaba presente este acúmulo de Fe **(84,88,150)**. En segundo lugar, tanto *Atm1p* como *ABC7* muestran un alto grado de similitud a nivel de secuencia con un transportador de metales pesados de la levadura *S. pombe*, *Hmt1p* **(151)**.

Así pues pensamos que el gen *ABC7*, responsable de la anemia sideroblástica ligada al X con ataxia, podría ser un buen candidato para estudiar, y así obtener más información sobre la regulación del hierro en la mitocondria. Y si éramos capaces de entender mejor qué genes y de qué manera afectaban a la homeostasis del hierro, podríamos abrir nuevos caminos para descifrar que procesos fallan realmente en la mitocondria de los enfermos de ataxia de Friedreich. Previamente, habíamos caracterizado el gen ortólogo de *FRDA* en *C. elegans* y habíamos desarrollado un modelo transitorio de gusano mutante **(152, 153)**. Nos planteamos, pues, abordar el análisis de este gen *ABC7* en *C. elegans*.

6.2 Caracterización del gen ortólogo del *ABC7* en *Caenorhabditis elegans*.

6.2.1 El gen W09D6.6.

Actualmente se posee la secuencia de un gran número de organismos con los que se trabaja en investigación. Pero cuando se inició este trabajo el hecho de contar con la secuencia del genoma de *C. elegans* era una gran ventaja. Además, *C. elegans* dispone de una página web que facilita la búsqueda y el trabajo con las secuencias (www.wormbase.org).

En primer lugar realizamos una búsqueda del gen ortólogo mediante programas de tipo BLAST, utilizando como sonda virtual la secuencia proteica del gen *ABC7* humano y del gen *ATM1* de levadura. El programa BLAST que utilizamos está localizado en el centro de investigación The Wellcome Trust Sanger Center. La dirección es http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/c_elegans.

Así obtuvimos la secuencia del gen *W09D6.6* localizado en el cromosoma III. Este gen estaba anotado en función de la predicción del programa *Genefinder* y en base a esto se auguraron los puntos de corte y empalme y su secuencia codificante.

6.2.1.1 Obtención del mensajero del gen W09D6.6.

Una vez comprobamos que el gen *W09D6.6* presentaba el mayor grado de similitud de secuencia tanto con *ABC7* como con *ATM1* de entre todos los genes descritos por caracterización molecular o por caracterización *in silico* en *C. elegans*, nuestro primer paso fue confirmar que la predicción realizada en la base de datos sobre la estructura del gen era correcta.

Basándonos en la secuencia descrita en la base de datos, diseñamos un par de cebadores para obtener el extremo 3' UTR utilizando la técnica de 3' RACE descrita en material y métodos (apartado 3.4.2.2). Los cebadores utilizados fueron el número 198, para la primera reacción, y el número 200 para la segunda reacción de PCR. Así obtuvimos un fragmento de PCR que se clonó en el vector pGEM-T (PROMEGA) y se secuenció.

Para el extremo 5' nos servimos de una de las características de la biología molecular del gusano, el proceso de *transsplicing*. Este fenómeno consiste en una variedad del *splicing* o eliminación de intrones, que implica a transcritos codificados en puntos distantes del genoma. En esta reacción un mensajero aporta el sitio de *splicing* 5' y otro mensajero el sitio 3'. La secuencia que queda escindida en esa región se denomina *outrón*, por contraposición a intrón. En la **figura 23** se compara, mediante un esquema, un procesado de mensajeros en *cis* con uno en *trans*.

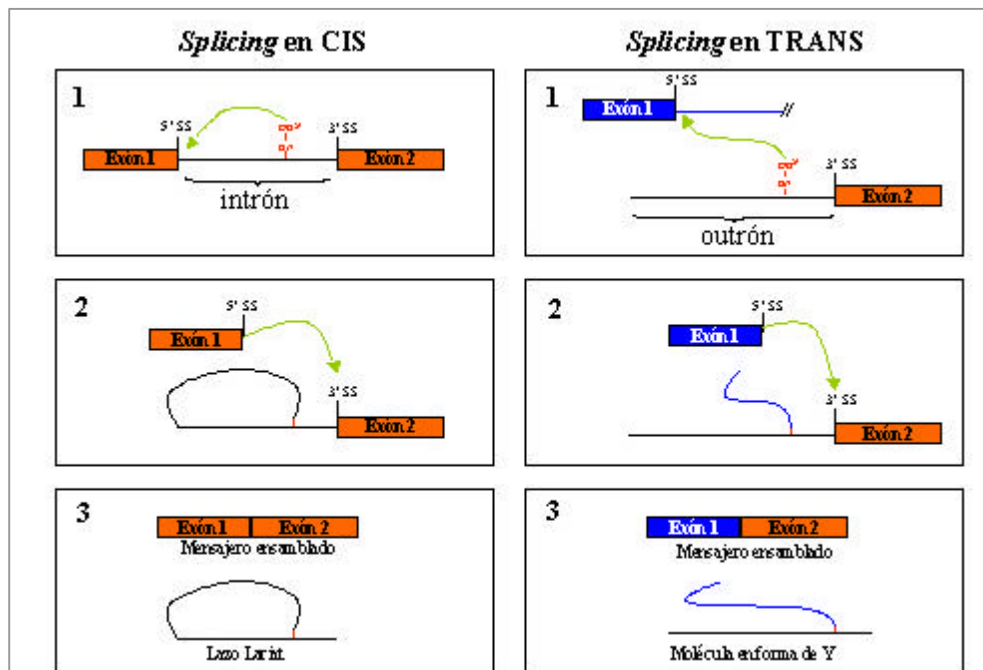


Figura 23 Diferencias entre el *splicing* en *cis* y en *trans*. En el esquema de la izquierda se pueden ver las reacciones de un *splicing* típico de intrones de tipo II. En el paso 1 se produce una transesterificación entre una base nitrogenada (BN) del intrón del mensajero y el sitio de *splicing* (SS) 5' del mismo mensajero. En el paso 2 el sitio de *splicing* 5' ataca al sitio 3' y los exones quedan ensamblados. El resultado son dos exones del mismo gen fusionados y una molécula de RNA llamada lazo Lariat. En un *splicing* en *trans* la base nitrogenada la aporta el outrón de un primer mensajero. Esta ataca al sitio de *splicing* 5' de un segundo mensajero (paso 1). El paso 2 es idéntico a un *splicing* en *cis*. Sin embargo, el resultado es la unión de dos exones codificados en regiones alejadas del genoma y la formación de una estructura en forma de Y.

Capítulo II

En el nematodo el proceso de *transsplicing* ocurre entre un pre-mRNA y un RNA llamado SL-RNA (**S**plicing **L**eaders RNA). Esta secuencia tiene alrededor de 100 pb, de los cuales cede 22 pb al premensajero, y además aporta la guanosina metilada (CAP) en su extremo 5' (**154**). Existen varios tipos de secuencias SL-RNA. La primera que se describió fue el SL1-RNA, que es añadido a la mayoría de genes procesados por *splicing* en *trans* en *C. elegans* (**154**). Pero también se sabe de la existencia de otros genes que codifican para una molécula de SL-RNA, llamada SL2-RNA (**155**). Además existen secuencias afines, o secuencias tipo SL2 (**156**).

Otra singularidad del nematodo *C. elegans* es la presencia de operones. En bacterias y arqueobacterias es muy común encontrar grupos de genes relacionados con un mismo proceso fisiológico organizados en operones. La existencia de operones en *C. elegans* está íntimamente relacionada con el evento de *transsplicing*. El operón se expresa como una unidad de transcripción policistrónica, pero los genes son procesados en *trans* produciéndose transcritos maduros monocistrónicos que son traducidos independientemente (**157**). Se ha descrito que las secuencias SL2 intervienen en el procesado en *trans* de los genes de la región 3' del operón (**158**). Por el contrario, las secuencias SL1 intervienen en el procesado de los genes monocistrónicos y en los genes líderes de los operones (**figura 24**).

Gracias a esta peculiaridad, para conseguir la secuencia 5' no traducida del gen se hizo una RT-PCR (ver apartado 3.4.2.2 de Material y Métodos) empleando como cebador directo la secuencia SL1 ó SL2 combinada con el cebador reverso número 210, específico del gen W09D6.6, para la primera reacción de PCR y el cebador número 211 para una segunda reacción de PCR anidada. No pudimos amplificar el fragmento previsto en suficiente cantidad para poder clonar y secuenciar. Lo que conseguimos fue detectar los productos de la PCR 5' RACE por Southern blot, lo que permite amplificar la señal y confirmar la especificidad de las bandas que se observaban en el gel de agarosa. La hibridación se realizó con una sonda marcada con digoxigenina que abarcaba desde el exón 1 al 4 del cDNA del gen W09D6.6. Los cebadores utilizados para la obtención de la sonda fueron el 205 y el 206.

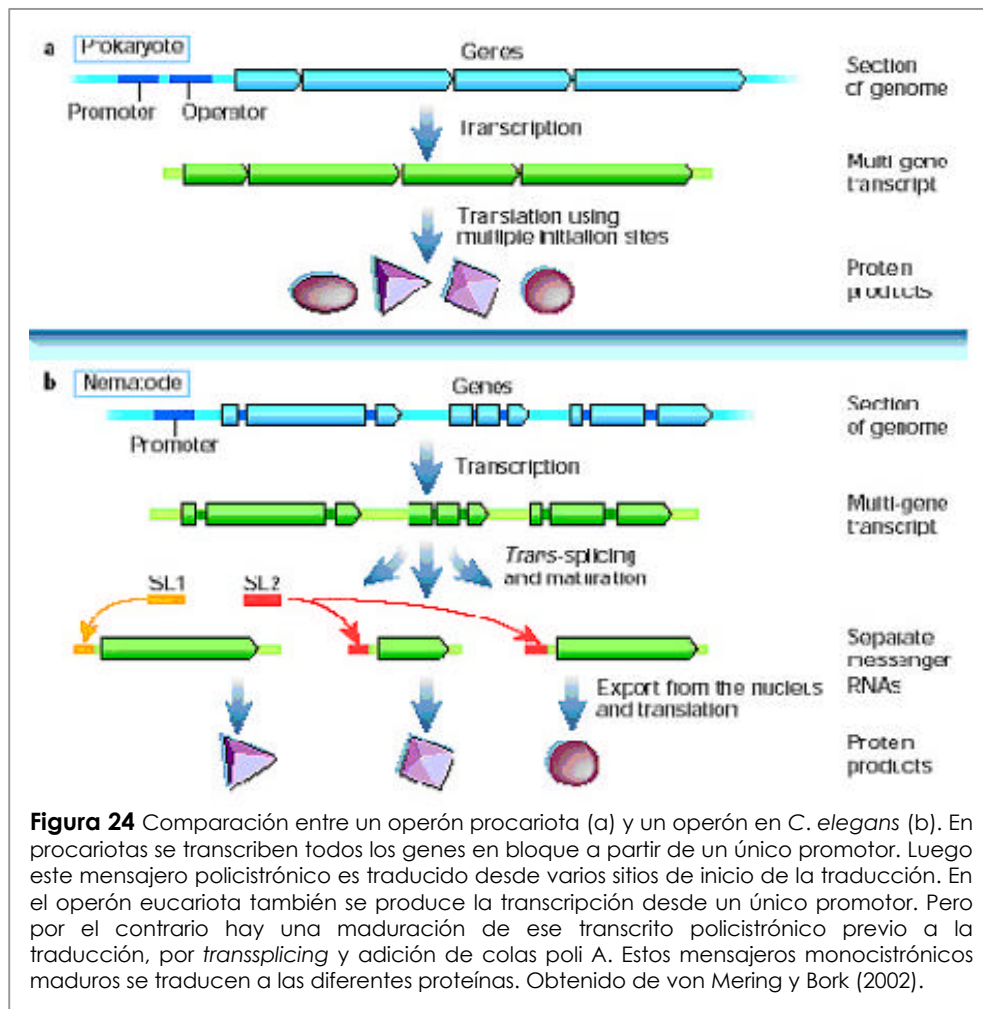
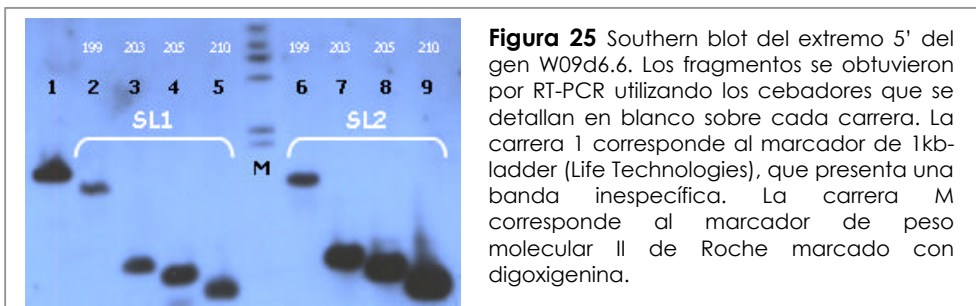


Figura 24 Comparación entre un operón procariota (a) y un operón en *C. elegans* (b). En procariotas se transcriben todos los genes en bloque a partir de un único promotor. Luego este mensajero policistrónico es traducido desde varios sitios de inicio de la traducción. En el operón eucariota también se produce la transcripción desde un único promotor. Pero por el contrario hay una maduración de ese transcrito policistrónico previo a la traducción, por *transplicing* y adición de colas poli A. Estos mensajeros monocistrónicos maduros se traducen a las diferentes proteínas. Obtenido de von Mering y Bork (2002).

Tras realizar el Southern lo que observamos es que predominantemente obteníamos señal con SL2, pero también éramos capaces de observar señal con SL1 (**figura 25**). El hecho de que se exprese mediante la secuencia líder SL2 es una buena evidencia de que el gen se está expresando en el contexto de un transcrito policistrónico junto a otros genes. Pero, ¿por qué es capaz de expresarse también con SL1? Anteriormente ya se había descrito que algunos genes encontrados en la región 3' de un operón pueden recibir tanto la secuencia SL1 como la secuencia SL2 (**157, 158**). Blumenthal y Steward (1997) proponen dos posibles explicaciones: una que el evento de poliadenilación no sea completamente eficiente y, cuando



falla el procesado de la región 3' del gen anterior se produce un rescate del gen siguiente por procesado en *trans* por SL1; y una segunda en la que se propone la existencia de promotores internos entre los genes de un operón capaces de producir mensajeros monocistrónicos (159).

Observando el tamaño de las bandas decidimos dar por válida la situación del codón ATG descrito en la base de datos. Así pues una vez establecidos ambos extremos del gen se utilizaron dos cebadores (206 y 207) para conseguir un fragmento de PCR que abarcase desde el codón de inicio de la transcripción hasta el codón de parada de la proteína W09D6.6p. De igual manera el fragmento obtenido se clonó en pGEM-T y se secuenció.

Reuniendo todas las secuencias pudimos caracterizar el gen W09D6.6 (figura 26). Consta de 12 exones que se expanden a lo largo de una región genómica de 8,24 Kb. Esta secuencia está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso AF490977. El cDNA consta de 2571 pb que codifican para una proteína de 801 aas.

Al caracterizar el gen confirmamos que la secuencia predicha en la base de datos no era correcta, ya que los exones 6 y 7 no estaban descritos y, por tanto, la proteína pronosticada también era de menor tamaño, concretamente de 704 aas (figura 27).

Como parte de la caracterización del gen incluimos la posibilidad de obtener la expresión del RNA mensajero gracias a la técnica de Northern. Para ello realizamos una extracción de RNA total de gusanos N2 cultivados en placas con medio NGM. Para obtener el molde para la sonda se realizó una PCR con

```

ATGGGCTTTTCACCATTCTCGACGAATGTCGAGCCGAAGGACTATGGCCAATGGGCCATCTGTAAATAAGATAATATCATT
GGAGTCTACACATTCTTCATCGTCGTCATTTTATAGTTTTATGTATTCCAAATTCAAATTCGGCAAAATAAATATTCGGCGA
ATGACAGATGACGACGCCTCCAGCACCTCAAAGCTGACAATCTCGAAAATCTATCGATTGCACAATTTTGGCGTTATTTGC
CAATCGATTTTCTACTTTTGTCTTACTTTTTATTTTCATCCGTATACACATTTGCTCCTAGCATTGTGTGTTTCAAATTTGTC
TTCTGGATTCTATCGCTGTGCTCTTTTTGAAATGGCGTAATCAACCGAGCACCCCAATTCACCTGGCTTTTGGCTTCTCGGCA
GCTCTTCTAATTCACGTGCAATCCACTGACCGACTGGAAAAAGTATTTGAGCCAACGTCAAAAAATCGCGGAGATTGACATTT
TATATATCGAGCTGGCACTTGTCACTGTCGTTTTCTTTTTCACAATTGTCACCGGATTATCAATTTTCCGGATGTTCTAGT
CGAGAATCTGCTTGGAAACAACCTATCGAAAAAGTGGTGACCGTGGCGCCGTACATTTGGCCGACAAAATCAATTTCCCTCCAA
CTTCGCGTGTGTTTTTGTCTATTTCTTCTCATCGGACGCCTCATCAATGTTTCTTGGCGATTCTTAGCAAAATGGATTGTC
GACGAGCTCGCCACACCGGACACTTCCAGTACTCCCTCCTGTTTTTGGCCACATTTTGAATTTCTGCAAGGAAACCGGAGCG
ATGGGCGGTTTTCTTGAACACGGTTCGCACGTATTTATGGATTCCGATTCAACAATACACGACCCGAGAGCTTGAAGTGGAACTA
TTCAAACATTTACACTCATTGTCACTCAGATGGCATTATCACGGAAGACTGGACAAGTTCTGCGTGTATGGATAGGGGAACC
AGTTCGTTAATAATATTTAAATTCACATCTGTTCAACGTGGTCCGACGATGGCCGACATCGTGATTGGCCGCTATTTCTTC
TTTTCCGCAATTAATGCATATTTCCGACTTATCGTATTTCCGACGATGGCTCTTTACTTGAATGTAACCATCTCCATCACCGAA
TGGCGTACCCCAATACATTTCGCGAGGCCAACGAAAAAGACAATGCCACGTCCGCGATCGCAACGGATTCCCTGATTAATTACGAA
ACTGTAATAATATATGGAACGAGGAATTCGAAGTGAATCGATTCAAAAATGCTATTGAGAGCTACCAAGTGACAGAATGGAAG
ACACAAGCCTCTTAGCCTTCCATAATTCGCTTCAAACCGCAATATCGGAATCGGAATGATCGGAGGATCGGTGTTCTGTTGTC
TATATGATTGTTTACGAGAAAATCTCACTGTCGGAGATTATGTGCTCTTCACTACGTACCTACTCCAATCTACACACCGCTC
AACTTTTTTGGAACTATTTATAGAGTAATCCAAAAAGCGTTTTGTCGATATGGAGAACATGTTTCGATTTGATGAACGACGAAGTC
GAGGTCAAAGATCTACCACACGCACTACCGTACACGGATCCACGTGGCACAATTTCACTCAAAAACTGACATTCGAGTATAAC
ACCGGACTGCCTGTTATCAAAAATATTAGCTTTGAAATTTGAAATTTGGAAATGGACAGACTGTGCAATTCGTCGGCTCATCGGGATCCGGA
AAAAGCACACTAATTCGACTACTATTCGACTTTTTGAATCTACGGAAGGAAGTATTGAATTCGATGGAATGATGTTGCAAAAC
TATACAATGCACACTCACTGCGGCAACAAATGGAATTTGACCACAAGATACTGTACTCTTCAACGACACAATATGTATAATATC
AGATTCGGACGACCCGATGCTTTCAGATGAAGAGGTTATTGAGGCGCGAAGGCAGCAATGATTCATGAAAAGATTACCTCACTG
CCTGAAGGATACGCGACAATGTTGGAGAACGTTGGGCTGAAGCTTAGTGGAGGGGAGAAGCAACGTGTCGCAATGCCCAGAACT
ATTTCAAGAAGCCGAGTTCATTTCTTGGATGAAGCCACGTCCGCGTTGGATACACCGACAGAACGGGGCGATTCAAAGTGT
TTGGAGAAGCTTTGCAAAATCACGTACCGGAGTTGTGTTGGCTATCGATTGAGCACGGTTGCAATGTGACCTTATTTCTTGT
CTGTAAAGGCGATCATTTGAGAGGGGAAAATCACAAGGAGCTTCTGCAACAACAGGCAGTATGCCTCAATGTGGGAAGCA
CAAAATCGCCGAGCAACGTGCCAAATTCGATTGAACCTCGGCGAGGAGCTTCCGTAGATCTGATGCCCCGATTTTCCAATCCC
ATTTTCAGTACTAAATGTTTGTGTTTTCGCTGTTTTTGGGATCTCTTTCGTAATTTTTCGATTTTTCATGTTTCGAATTGATT
TATTATCTTTTTTTGTATTGCTAGAAAAAATTAATAAAATTTTTGAAAAAGA
    
```

Figura 26 RNA mensajero del gen W09D6.6. El gen consta de 12 exones los cuales se han separado por cambios de color. Los exones 6 y 7 descritos en este trabajo se marcan subrayándolos. El codón de parada se ha indicado con un aumento del tamaño de la letra. En color azul se muestra la zona 3' UTR, que incluye la secuencia de poliadenilación "AATAAAA" resaltada con fondo oscuro y letras en blanco. Esta secuencia coincide con la secuencia consenso. De la misma manera la distancia existente entre esta secuencia hasta la zona de adición de la cola poli A, que consiste en 13 pb, es la más habitual en los mRNAs del gusano.

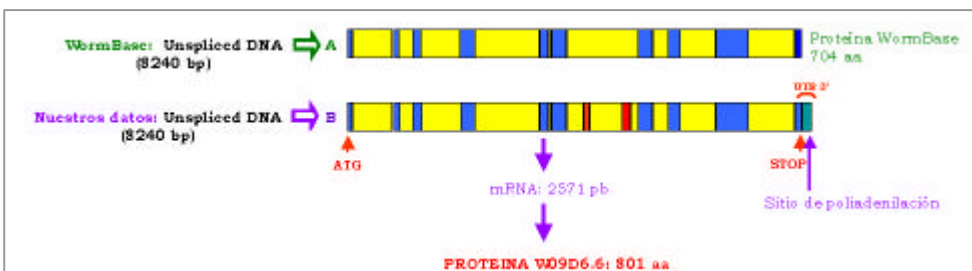
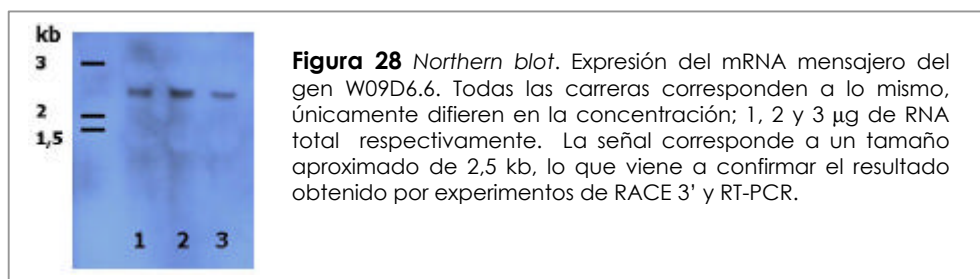


Figura 27 Esquema del gen W09D6.6. Comparación de la predicción realizada por la Wormbase (parte superior, A) respecto a los datos obtenidos en este trabajo por experimentos de RACE y RT-PCR (parte inferior, B). Los exones marcados en rojo corresponden a los descritos en el presente trabajo. Con flechas se marcan tanto el codon ATG, el codón stop y el sitio de poliadenilación. La zona 3' UTR se presenta en color verde azulado.

Capítulo II

los cebadores 199 y 204 utilizando como molde el cDNA del gen. El fragmento obtenido de un tamaño de 1039 pb y que correspondía a los exones del 4 al 9, se marcó por PCR con digoxigenina utilizando en este caso únicamente el cebador reverso (199) obteniendo así la secuencia antisentido del RNA mensajero. En el *northern blot* detectamos una banda de aproximadamente 2,6 kb (**figura 28**), lo que nos viene a confirmar que los exones 6 y 7 estaban bien caracterizados, ya que la diferencia en el tamaño del mRNA sin su presencia sería de aproximadamente 2 kb.



6.2.2 El gen Y74C10AM.1.

El hecho de que al caracterizar el gen W09D6.6 evidenciásemos que habían dos exones que no estaban descritos en la base de datos, nos hizo plantearnos la posibilidad de que W09D6.6 no fuese realmente el ortólogo del ABC7. La causa por la cual al hacer un BLAST, utilizando como sonda virtual la secuencia de la proteína ABC7, apareciera como primer candidato W09D6.6p, pudiera ser debido a una mala predicción del *Genefinder* sobre otras zonas genómicas. Por este motivo revisamos con más detenimiento todos los resultados del BLAST, comprobando si de todas las proteínas resultantes estaba confirmado el cDNA. De todas ellas nos llamó especialmente la atención una proteína pequeña pero que poseía una homología de secuencia muy alta que correspondía principalmente a la primera mitad de la proteína. El gen se denominaba Y74C10AM.1 y está localizado en el cromosoma I. Sin embargo, al realizar un BLAST, esta nueva proteína finalizaba antes de llegar a la parte carboxi-terminal del ABC7 donde se encuentran ubicados los dominios conservados que caracterizan a esta familia. Esto nos hizo sospechar que parte de esta proteína no se encontraba descrita.

6.2.2.1 Obtención del mensajero del gen Y74C10AM.1.

Antes de iniciar una caracterización molecular del gen Y74C10AM.1 *in vitro*, pensamos que sería mejor realizar una aproximación *in silico* para determinar su secuencia. A partir de la secuencia que estaba descrita en la *Wormbase* realizamos traducciones del entorno genómico de dicha proteína en las seis posibles pautas de lectura utilizando el programa *Translator*, <http://www.justbio.com/translator/index.php>. Esto se pudo realizar gracias a que disponíamos de la secuencia de la proteína ABC7, lo que nos permitía efectuar continuos BLAST de los péptidos obtenidos tras la traducción del material genómico. Se fueron seleccionando aquellos péptidos que presentaban una homología alta y, a modo de puzzle pudimos reconstruir la hipotética secuencia del cDNA del gen Y74C10AM.1. Lo único que nos quedaba era confirmar por RT-PCR que nuestra predicción era correcta. Para ello trabajamos de igual manera que lo habíamos hecho con el gen W09D6.6.

El extremo 3' UTR se confirmó por 3' RACE utilizando el cebador específico número 14 para la primera reacción de PCR y el número 13 para la PCR anidada. Se obtuvieron dos fragmentos, por lo que se purificaron ambos y se clonaron en el vector pGEM-T. La secuenciación de ambos productos nos llevó a caracterizar dos sitios de adición de la cola poli A.

Para obtener el extremo 5' UTR volvimos a hacer uso de la particularidad del gusano referente al *transsplicing*. Los cebadores utilizados para la RT-PCR fueron SL1 y el reverso específico con el número 12. Obtuvimos una banda que clonamos de nuevo en pGEM-T y secuenciamos. Esta secuencia nos reveló la posición donde se une el SL1-RNA.

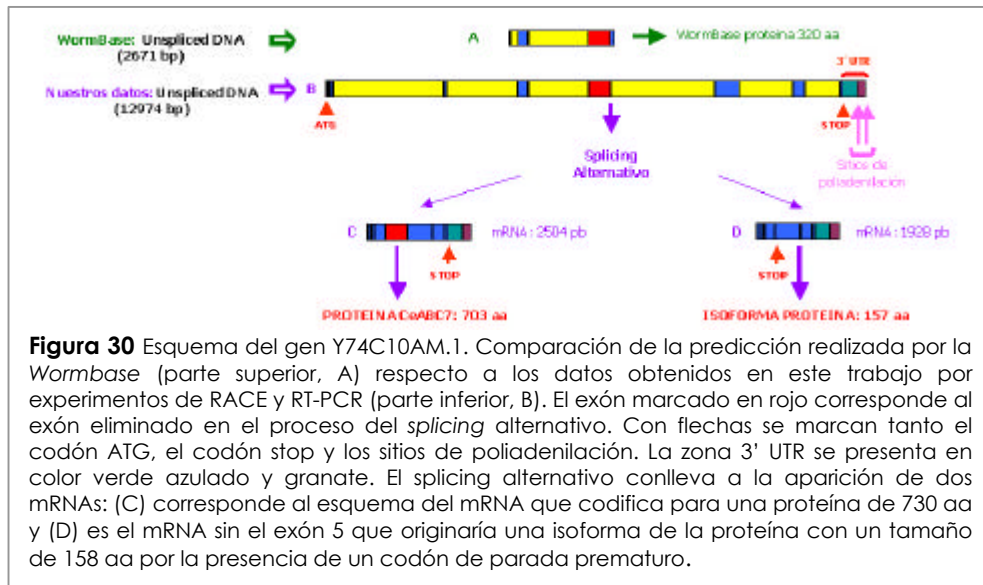
Y por último, para conseguir toda la secuencia del cDNA diseñamos dos cebadores para amplificar toda la ORF (nº 4 y 5), clonando el producto en pGEM-T y secuenciándolo. Así pudimos concluir que este gen consta de 8 exones y se extiende a lo largo de 13346 pb. El mRNA de 2504 pb presenta dos sitios de poliadenilación, y un *transplicing* con SL1 (**figura 29**). Este mRNA codifica para una proteína de 703 aminoácidos. Esta secuencia está depositada en la base de datos GenBank con el número de acceso AF490975. En la amplificación de la ORF obtuvimos otra banda de un tamaño inferior al esperado. Al clonarlo y secuenciarlo pudimos comprobar que consistía en un *splicing* alternativo del gen Y74C10AM.1.



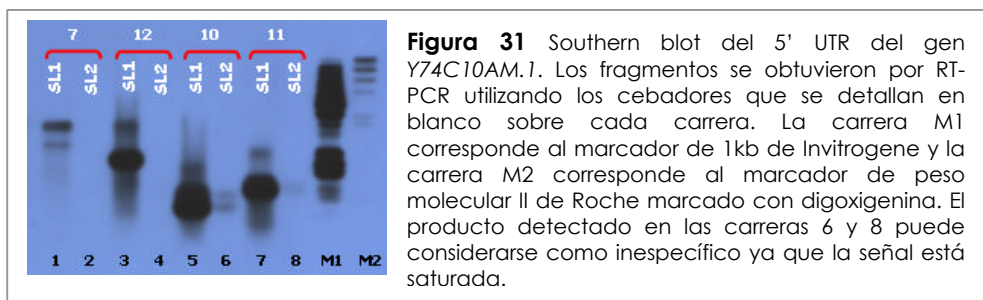
Figura 29 RNA mensajero del gen Y74C10AM.1. El gen consta de 8 exones los cuales se han separado por colores. Todos los exones descritos en este trabajo se marcan subrayándolos. El codón de parada y el ATG se han diferenciado con un aumento del tamaño de la letra. En color azul se muestra la zona 5' UTR y 3' UTR. Con los símbolos * y ¶ se señalan los dos puntos alternativos donde se sitúa la cola poli A. No se han encontrado secuencias de poliadenilación conservadas.

En este caso el exón 5 era eliminado, lo que provocaba la aparición de un codón stop prematuro tras realizar la traducción del RNA. Esta secuencia está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso AF490976.

Así pues, podemos concluir que el gen Y74C10AM.1 se encontraba descrito erróneamente en la Wormbase (**figura 30**) y en este trabajo lo hemos caracterizado correctamente.



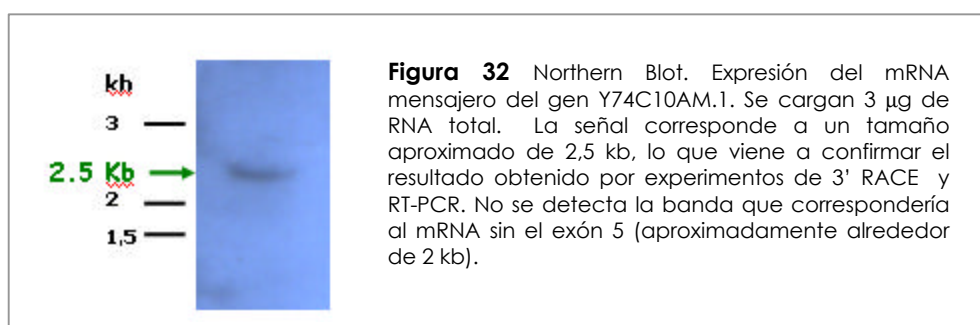
Para una mejor caracterización del gen, nos interesamos por la posibilidad de que el SL2-RNA también fuese capaz de realizar el *transsplicing* en este gen. Con este fin se volvió a repetir el experimento de 5' RACE y posteriormente detección por Southern blot, pero combinando esta vez tanto cebadores SL1 y SL2 junto con una variedad de cebadores reversos específicos del gen Y74C10AM.1. La sonda utilizada consistía en el cDNA completo y se marcó por PCR con digoxigenina, haciendo uso de los cebadores número 4 y 5. A diferencia del gen W09D6.6, en este caso, es el *transsplicing* con SL1 el que muestra señal (**figura 31**).



De nuevo, como parte de la caracterización del gen, incluimos la expresión del RNA mensajero gracias a la técnica de Northern a partir de una extracción de RNA total de gusanos N2. El molde para preparar la sonda se obtuvo de la

Capítulo II

purificación de una PCR realizada con los cebadores número 12 y 13 y posteriormente, se marcó por PCR pero utilizando exclusivamente el primer reverso (nº 12) para lograr la cadena antisentido. Únicamente detectamos una banda de aproximadamente 2,5 kb (**figura 32**), lo que nos corrobora la correcta caracterización del gen Y74C10AM.1. Lo que no pudimos observar fue una banda de 1928 pb, correspondiente al mRNA procedente de un *splicing* alternativo. Esta isoforma de la proteína consta únicamente de la zona amino terminal de la proteína completa y haciendo un breve recordatorio sobre la estructura de las proteínas ABC, la parte implicada en la función de la proteína es la zona carboxi terminal donde se encuentran localizadas los dominios conservados de esta gran familia, por lo que lo más correcto es pensar que seguramente esta isoforma no sea funcional. Desde luego, lo que sí que podemos concluir es que si hay expresión de este mRNA alternativo, es en mucha menor proporción que el mRNA responsable de la proteína Y74C10AM.1, o incluso podría ser un artefacto puntual hallado en el gusano.



6.2.3 Análisis comparativo del transportador ABC7 humano y su ortólogo en *C. elegans*.

La información más inmediata que podemos obtener de la secuencia de una proteína son las características físico-químicas de sus residuos: identidad de

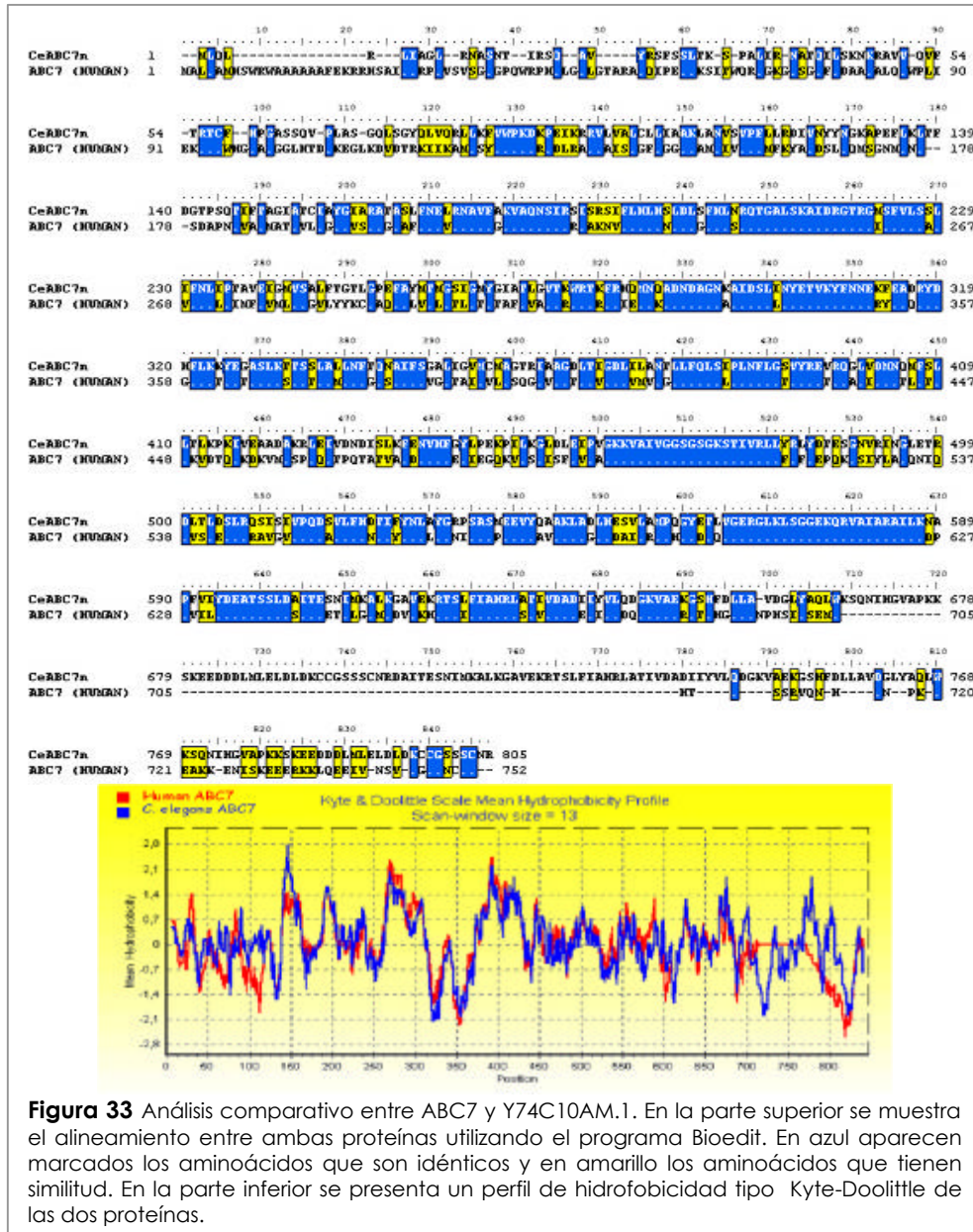


Figura 33 Análisis comparativo entre ABC7 y Y74C10AM.1. En la parte superior se muestra el alineamiento entre ambas proteínas utilizando el programa Bioedit. En azul aparecen marcados los aminoácidos que son idénticos y en amarillo los aminoácidos que tienen similitud. En la parte inferior se presenta un perfil de hidrofobicidad tipo Kyte-Doolittle de las dos proteínas.

secuencia, hidrofobicidad, polaridad, etc. Con ésto podemos generar representaciones de, por ejemplo, cómo varía la hidrofobicidad a lo largo de la secuencia de la proteína para tener información de zonas muy hidrofóbicas que puedan luego ayudarnos a confirmar que ambas proteínas son ortólogas y

Capítulo II

desempeñan una misma función. Hay muchas herramientas que calculan este tipo de parámetros a partir de la secuencia.

Para confirmar que el gen Y74C10AM.1 es el ortólogo del gen ABC7 nos servimos de estudios bioinformáticos. Utilizamos un programa de análisis de secuencia denominado BIOEDIT que se encuentra disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> y comparamos las dos secuencias aminoacídicas de las proteínas Y74C10AM.1 y ABC7. Estas proteínas poseen una identidad del 52% y una homología del 73% (**figura 33 superior**). Por otro lado, obtuvimos el perfil de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (**160**). El índice de hidrofobicidad pone de manifiesto la distribución de residuos polares y apolares a lo largo de la secuencia. Este análisis tiene la finalidad de predecir los segmentos transmembrana (altamente hidrofóbicos) o regiones que están expuestas en la superficie de las proteínas (dominios hidrofílicos). Comparando los perfiles de las dos proteínas, Y74C10AM.1 y ABC7, vimos que eran prácticamente idénticos (**figura 33 inferior**). Además, utilizando el programa TMHMM disponible en la página web <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, que predice posibles hélices transmembrana de proteínas, comprobamos que a ambas proteínas se les predecía un número de 5 hélices, lo cual viene de nuevo a confirmar que ambas proteínas son muy parecidas y lo que es más importante, que el gen Y74C10AM.1 es probablemente el ortólogo del ABC7 humano. A partir de ahora cuando hagamos referencia al gen Y74C10AM.1, se denominará CeABC7.

6.2.4 Análisis comparativo del transportador ABCB6 humano y su ortólogo en *C. elegans*.

Hasta la fecha se han descrito cinco posibles transportadores ABC humanos mitocondriales. Del trabajo realizado nos quedaba por averiguar cual era el ortólogo el gen W09D6.6. Realizando un BLAST entre la proteína W09D6.6 y el resto de transportadores comprobamos que la que presentaba mayor homología era el transportador ABCB6 (MTABC3). Esta proteína es miembro de la subfamilia MDR/TAP, al igual que el transportador ABC7. El gen está localizado en el cromosoma 2q26. En un principio se le consideró como candidato a producir el síndrome neonatal metabólico (OMIM 603358), un trastorno de la función

mitocondrial ya que éste estaba localizado en la región donde ha sido posicionado el locus GRACILE (144).

Actualmente se ha comprobado por búsqueda de mutaciones y análisis de haplotipos que el gen *ABCB6* no es la causa del síndrome de GRACILE (161).

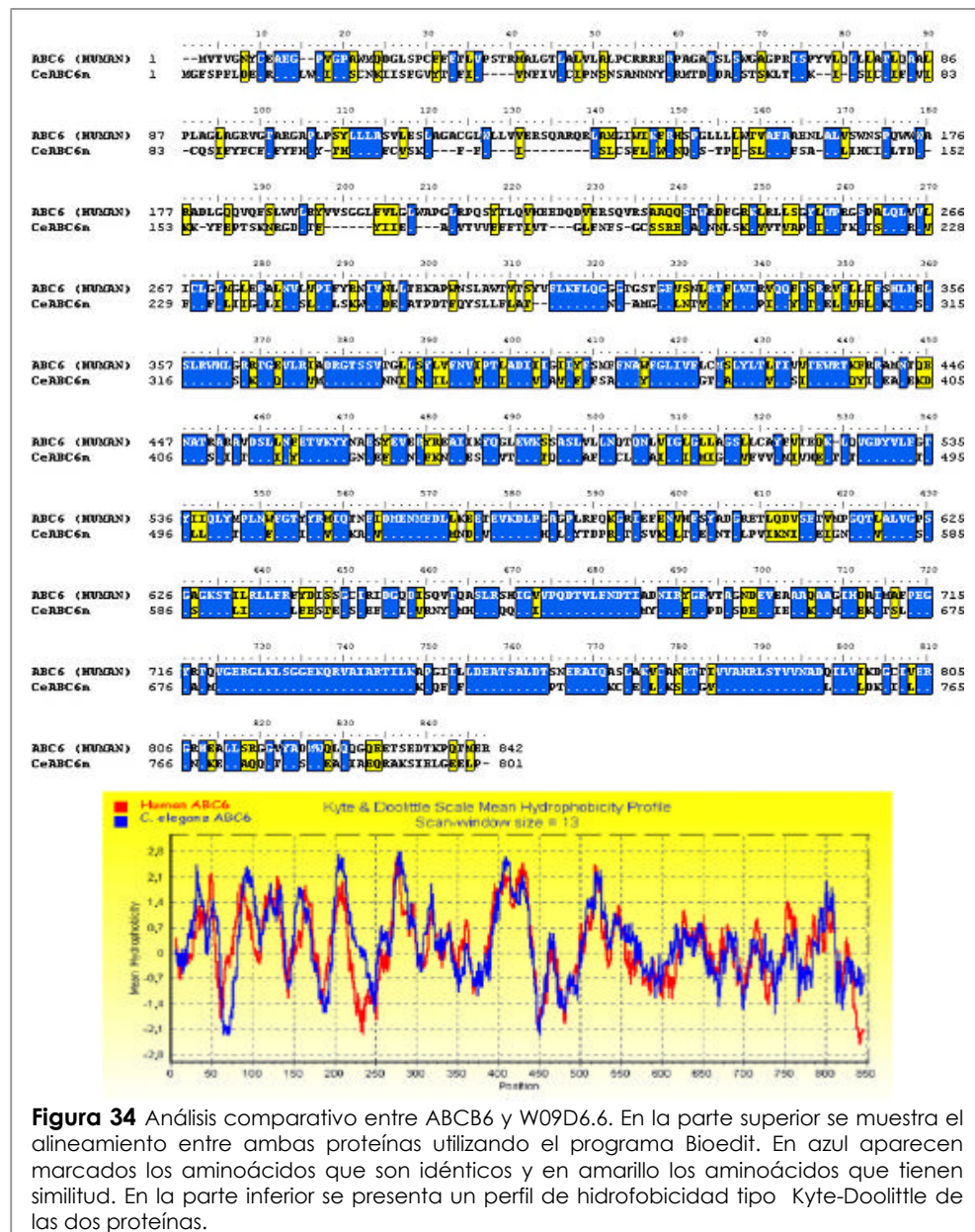


Figura 34 Análisis comparativo entre *ABCB6* y W09D6.6. En la parte superior se muestra el alineamiento entre ambas proteínas utilizando el programa Bioedit. En azul aparecen marcados los aminoácidos que son idénticos y en amarillo los aminoácidos que tienen similitud. En la parte inferior se presenta un perfil de hidrofobicidad tipo Kyte-Doolittle de las dos proteínas.

Capítulo II

Estudios de complementación de la cepa de levadura mutante del gen *ATM1* demostraron que la expresión del gen *ABCB6* humano es capaz de revertir el fenotipo de las cepas mutantes: acúmulo de hierro libre en mitocondrias, inestabilidad del DNA mitocondrial y pérdida de la función respiratoria mitocondrial **(144)**. Y aunque con estos datos se puede relacionar al *ABCB6* con la homeostasis del hierro y la función respiratoria mitocondrial, el papel concreto que juega en la función mitocondrial este medio transportador, todavía es desconocida.

Utilizando de nuevo el programa Bioedit, realizamos un alineamiento entre las secuencias proteicas del *ABCB6* y *W09D6.6* **(figura 34 superior)**, y comprobamos que tienen un 46% de identidad y un 67% de similitud. Obtuvimos el perfil de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle y comparando los perfiles de las dos proteínas (*W09D6.6* y *ABCB6*) vimos que eran muy parecidos **(figura 34 inferior)**.

6.3 Obtención de mutantes del gen *Y74C10AM.1* por interferencia de RNA.

La interferencia mediada por RNA (RNAi) es un proceso natural que se desencadena en la célula ante la presencia de moléculas de doble cadena de RNA (dsRNA) y que produce una potente y específica inactivación del correspondiente gen a través de la degradación del mRNA endógeno **(100)**. Esta técnica rápidamente produce una pérdida de función del gen específico y el efecto también se observa en la progenie del animal afectado. Así pues, el RNAi se ha establecido como un buen instrumento de la genética reversa para la determinación de la función de genes específicos, gracias a que resulta ser una herramienta robusta, específica y de efectos duraderos y también porque el RNAi es un método eficaz y sencillo para la inactivación de genes en *C. elegans*.

Nuestro objetivo al hacer los mutantes por RNAi es obtener un modelo que nos permita recavar información sobre la posible función del transportador *ABC7*, así como poder observar los tejidos afectados por la falta del mismo. Para ello, no sólo es importante ser capaces de obtener fenotipos mutantes a través de esta tecnología, sino también conseguir suficiente número de individuos mutantes para llevar a cabo estudios bioquímicos y fisiológicos necesarios para comparar con la

patología humana. En el presente trabajo se emplearon dos aproximaciones para la aplicación de esta tecnología: RNA *feeding* y microinyección del dsRNA.

6.3.1 Mutagénesis por RNAi *feeding*.

El RNAi *feeding* consiste en alimentar al gusano con una cepa de *E. Coli* que expresa el dsRNA del gen diana. El RNA se introduce a través de la faringe y se distribuye a los tejidos somáticos y a la línea germinal (162). El RNAi *feeding* presenta una serie de ventajas sobre la microinyección. El sistema por *feeding* es menos laborioso que la microinyección, resulta más económico y se pueden obtener un gran número de gusanos mutantes con relativa facilidad. Por estas razones, preparamos las construcciones para generar RNA de interferencia mediante la alimentación.

Se amplificaron por PCR dos fragmentos del gen Y74C10AM.1 utilizando los cebadores 4 y 10 para el denominado fragmento A y la pareja de cebadores 13 y 12 para el fragmento B. El molde de la reacción fue el plásmido pGEM-T-CeABC7, que contiene el cDNA completo del gen. El fragmento A contiene los cuatro primeros exones del cDNA íntegros y parte del exón 5. El fragmento B únicamente corresponde al exón 5. Ambos fragmentos se clonaron en el vector L4440 que contiene dos promotores T7 con orientación invertida flanqueando el sitio de clonación múltiple. Los plásmidos L4440-fragmentoA y L4440-fragmentoB se transformaron en la cepa HT115, una cepa de *E.coli* deficiente para la RNAsa III y que expresa la T7 polimerasa cuando es inducida por IPTG.

Sobre placas Petri con medio NGM+IPTG+ampicilina, sembradas con las cepas productoras del dsRNA, se depositaron larvas L4 de gusanos de la cepa N2. También se prepararon cultivos control consistentes en cepas HT115 transformadas con el vector L4440 en el cual se clonó un fragmento del gen *gfp*. Los cultivos se crecieron a 20°C durante 24 horas y posteriormente se traspasó cada gusano a una placa fresca. A partir de aquí se siguió la evolución de la morfología de los gusanos F1. Después de 3 días de experimento no se apreció ninguna diferencia en la F1 entre los gusanos control y aquellos gusanos que habían ingerido dsRNA del fragmento A o del fragmento B. Concluimos que el RNAi *feeding* no daba resultados relevantes.

Capítulo II

Está descrito que la expresión del transportador humano ABCB6 (MTABC3) en la cepa de levadura *atm1D* es capaz de revertir el fenotipo mutante, aunque no son genes homólogos (144). Así que nos planteamos que la falta de fenotipo mutante en los gusanos tratados por RNAi *feeding* podría deberse a un efecto compensatorio. Es decir, la función del transportador CeABC7 podría suplirse de alguna manera por el transportador CeABC6, lo cual no nos permitiría apreciar ningún fenotipo. Decidimos preparar una construcción que expresase un dsRNA que integrase tanto parte del mRNA del transportador CeABC7 como del CeABC6. Para ello partimos del plásmido pGEM-T-CeABC6, el cual lo digerimos con la enzima de restricción EcoRI. Esta enzima no corta en el vector, pero corta en el cDNA en las posiciones 1285 pb y 1822 pb a partir del codón ATG. El fragmento del CeABC6 se clonó en el plásmido pGEM-T-CeABC7 digerido previamente con EcoRI, que presenta un único punto de corte en posición 765 pb desde el ATG del cDNA CeABC7. Una vez determinada la orientación con la que se había introducido el fragmento del CeABC6 se realizó una PCR con los cebadores 14 y 16, obteniéndose una banda de 934 pb que correspondía a un híbrido del cDNA de cada uno de los transportadores (CeABC7/CeABC6). A este nuevo fragmento lo denominamos H1. El fragmento H1 se clonó en el vector de expresión L4440. El plásmido L4440-H1 se transformó en la cepa HT115 y se repitió de nuevo el RNAi *feeding*, obteniendo los mismo resultados previos. Por lo tanto, el problema residía en la técnica. Se había descrito que la eficacia del RNAi *feeding* era menor de la obtenida por microinyección (163), por lo que cabía la posibilidad de que se estuviese produciendo un efecto RNAi muy suave que permite la producción de CeABC7 en cantidad suficiente para que ejerciera su función.

6.3.2 RNAi mediante inyección de dsRNA.

La técnica consiste en introducir en las gónadas de gusanos hermafroditas el dsRNA producido *in vitro* por medio de la microinyección. La producción del dsRNA se llevó a cabo como se explica en material y métodos (apartado 3.5.2.5), y se realizó utilizando como molde el fragmento A del gen CeABC7. Como control se utilizó el gen CAT (cloranfenicol acetil-transferasa) de *E. coli*. Una vez obtenidas las distintas construcciones las inyectamos en larvas de *C.elegans* en estadio L4. Al pinchar en este estadio, puesto que aún no han formado huevos, nos aseguramos

de que la mayoría de la descendencia adquiriera el dsRNA. De todas formas, todos los gusanos microinyectados se dejan en placas NGM frescas a 20°C durante toda la noche. Al día siguiente se transfieren a placas frescas y es a partir de este momento cuando se observa el efecto sobre parentales y su F1. Así eliminamos los primeros gusanos F1 que podrían no expresar el efecto RNAi. Otro problema de esta técnica es que el fenotipo mutante se pierde con la siguiente generación. Apenas algunos gusanos de la F2 muestran un fenotipo muy suave respecto a la F1. Por tanto, realizamos el experimento en numerosas ocasiones para poder seguir el efecto del RNAi sobre el gen Y74C10AM.1. Las repeticiones se realizaron microinyectando dsRNA fresco en cada una de ellas. En todas las ocasiones se obtenía el mismo fenotipo mutante.

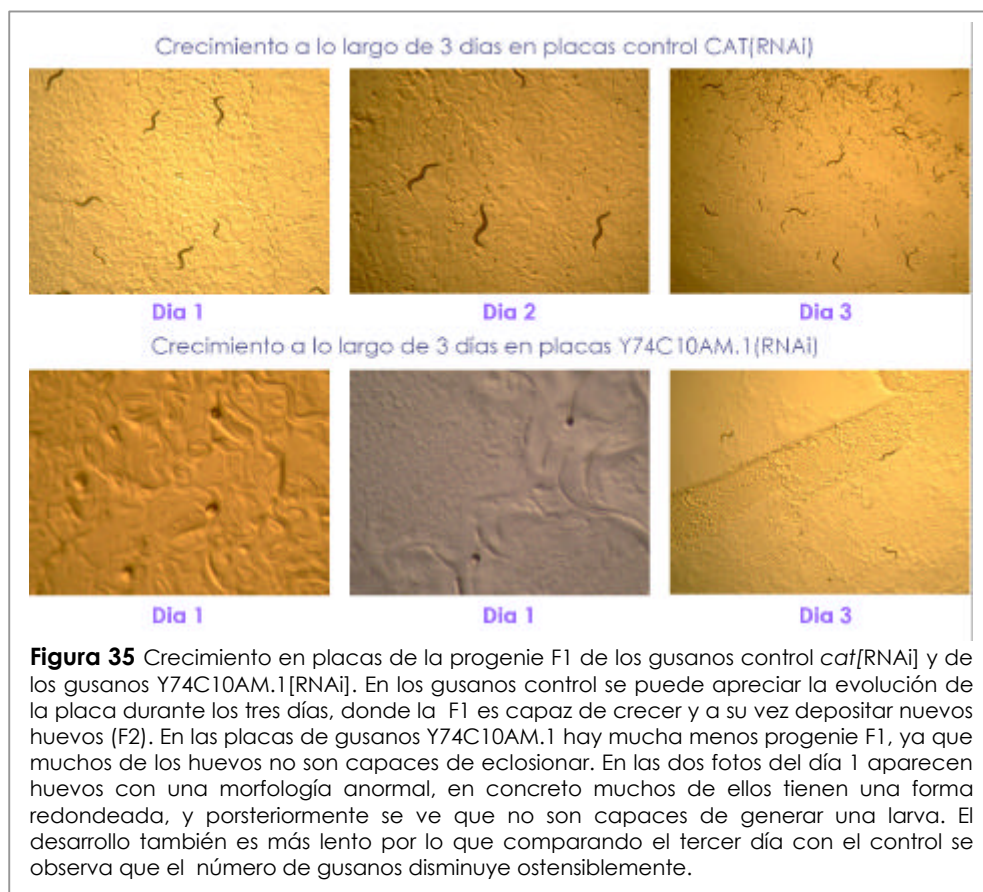


Figura 35 Crecimiento en placas de la progenie F1 de los gusanos control *cat*[RNAi] y de los gusanos Y74C10AM.1[RNAi]. En los gusanos control se puede apreciar la evolución de la placa durante los tres días, donde la F1 es capaz de crecer y a su vez depositar nuevos huevos (F2). En las placas de gusanos Y74C10AM.1 hay mucha menos progenie F1, ya que muchos de los huevos no son capaces de eclosionar. En las dos fotos del día 1 aparecen huevos con una morfología anormal, en concreto muchos de ellos tienen una forma redondeada, y posteriormente se ve que no son capaces de generar una larva. El desarrollo también es más lento por lo que comparando el tercer día con el control se observa que el número de gusanos disminuye ostensiblemente.

Capítulo II

La primera impresión al observar las placas donde se cultivan los nematodos Y74C10AM.1[RNAi] es que hay un número más reducido de gusanos F1 respecto a las placas control. El motivo podría deberse a una afectación en la viabilidad de los embriones, lo cual nos pareció bastante evidente cuando observamos huevos con una morfología anormal (**figura 35**).

Para cuantificar la letalidad embrionaria colocamos 10 gusanos microinyectados, Y74C10AM.1[RNAi], en placas frescas realizando cambios cada 8-12 horas. De esta manera podíamos hacer un recuento de la descendencia, observando cuántos huevos eran capaces de eclosionar. El mismo experimento se realizó con gusanos control *cat*[RNAi] y con la cepa salvaje N2. El porcentaje de letalidad embrionaria era del 45,8% en gusanos Y74C10AM.1[RNAi]. Por lo tanto, este resultado hizo pensar que la falta del transportador CeABC7 afecta directamente al desarrollo del embrión (**figura 36**), mostrando un fenotipo **emb** (*embriogenesis abnormal*).

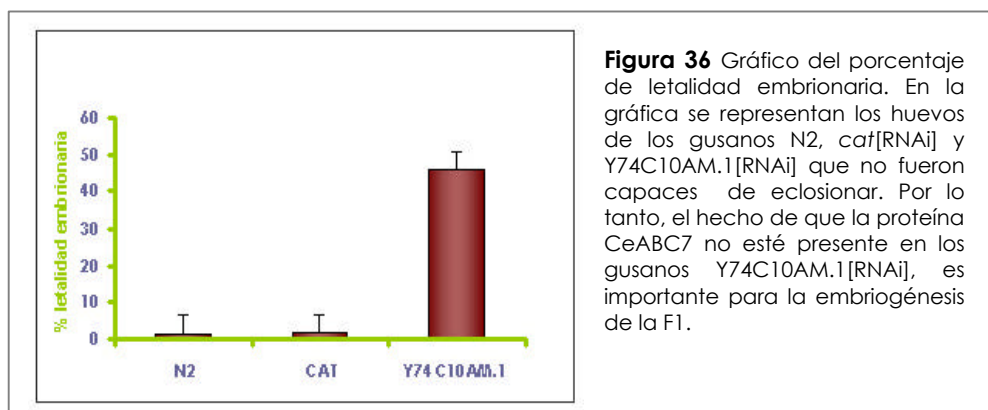
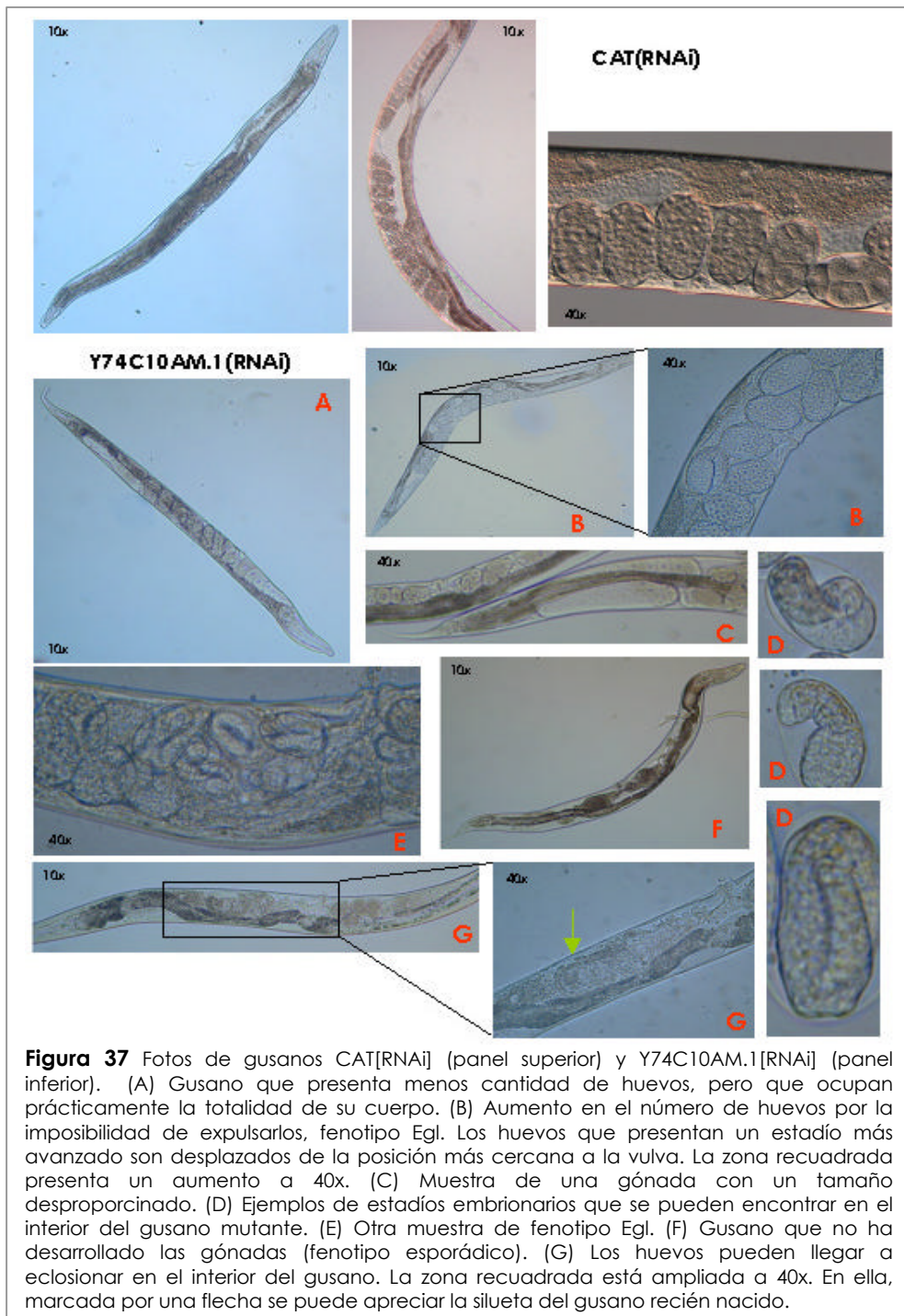


Figura 36 Gráfico del porcentaje de letalidad embrionaria. En la gráfica se representan los huevos de los gusanos N2, *cat*[RNAi] y Y74C10AM.1[RNAi] que no fueron capaces de eclosionar. Por lo tanto, el hecho de que la proteína CeABC7 no esté presente en los gusanos Y74C10AM.1[RNAi], es importante para la embriogénesis de la F1.

Otra cosa que se pudo apreciar es que hay un retraso en el crecimiento en la generación F1 de los gusanos Y74C10AM.1[RNAi], que puede llegar a ser de 36-48 horas comparado con los gusanos control *cat*[RNAi] y los N2. Este es el llamado fenotipo **gro** (*growth rate abnormal*).



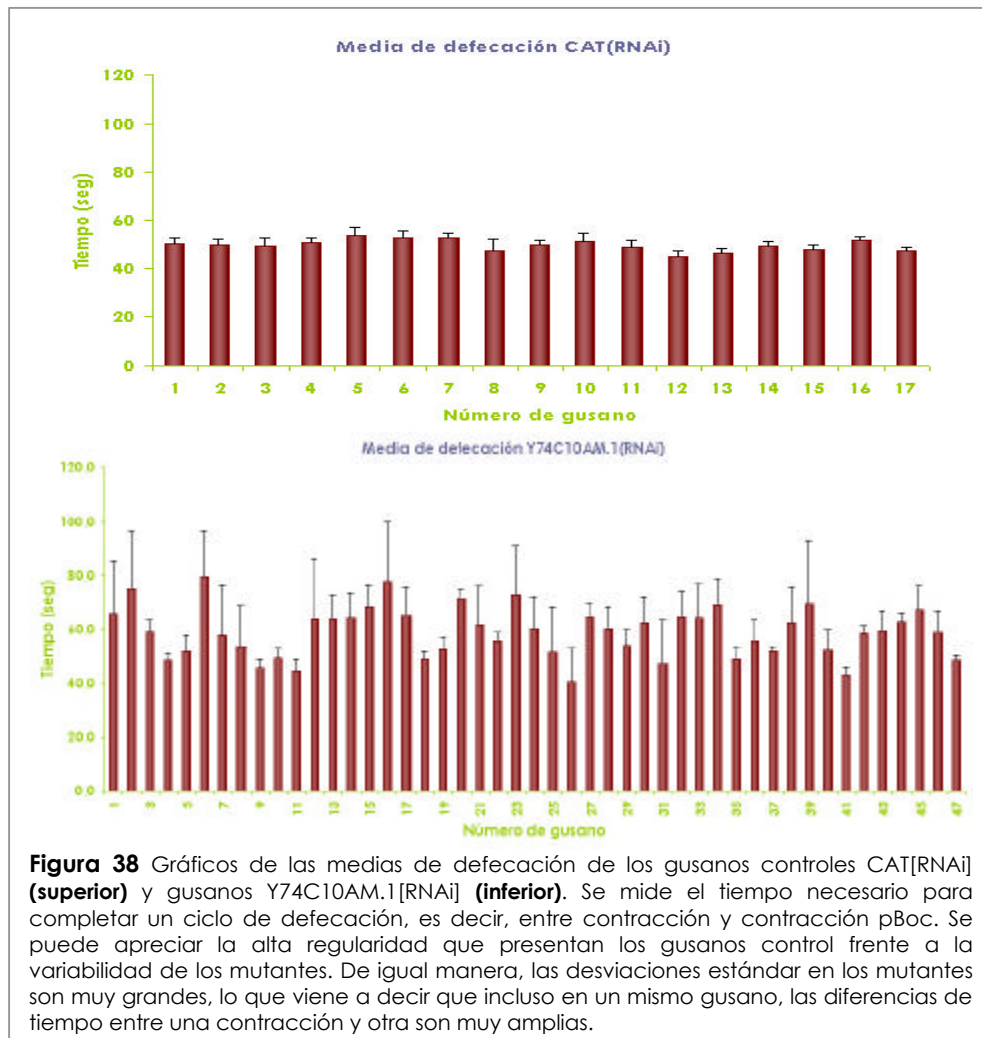
Capítulo II

Respecto al fenotipo, estos gusanos muestran en su interior una cantidad inferior de huevos a la habitual, siendo más delgados y, por lo tanto, prácticamente los huevos ocupan todo el cuerpo (**figura 37A**). La cuestión es que estos gusanos tienen un problema en la puesta de huevos por lo que, en ocasiones, en vez de expulsarlos se van quedando en el interior del cuerpo y son acumulados. Esto corresponde al denominado fenotipo **egl** (**egg-laying abnormal**). Así pues, si observamos gusanos cuando son más viejos comprobamos que empiezan a tener más huevos de lo habitual en las gónadas y en estadios tardíos que tendrían que haber sido expulsados por la vulva hacía tiempo (**figura 37B,D, E**). Incluso, en ocasiones, se produce la eclosión del huevo en el interior del gusano (**figura 37G**). Otra de las características que hemos observado es que en ocasiones se observa un gran tamaño de la gónada, concretamente la región más distal (**figura 37C**). En ocasiones podíamos observar fenotipos más agresivos, que suponemos corresponderían a los huevos que presentan un desarrollo muy alterado pero que son capaces de sobrevivir. En estos casos, la mayoría de veces la larva no era capaz de llegar a la edad adulta. En una ocasión, encontramos un gusano que no había desarrollado las gónadas, lo cual no le impidió llegar a adulto (**figura 37F**).

6.3.2.1 Defecación.

La defecación en *C. elegans* es un proceso rítmico y regular que ocurre cada 45 segundos a 20°C, con una desviación estándar de menos de 3 segundos (**164, 165**). En los hermafroditas, la defecación se produce en tres pasos, cada uno de los cuales supone la contracción de un músculo diferente: el músculo depresor o pBoc (**posterior body muscle contraction**), los músculos intestinales o aBoc (**anterior body muscle contraction**) y el músculo del esfínter anal o EMC (**expulsion muscle contraction**). Juntos, estos tres pasos constituyen el programa motor de la defecación o DMP (**defecation motor program**) y finaliza con la expulsión del contenido intestinal.

La medición del período de defecación se realizó sobre una muestra de gusanos Y74C10AM.1[RNAi] (n=47) y gusanos control *cat*[RNAi] (n=17) en placas de NGM con comida (cepa OP50). El ciclo de defecación se cuantifica midiendo la duración desde una contracción del músculo depresor (pBoc) hasta la siguiente contracción pBoc. Los gusanos Y74C10AM.1[RNAi] presentaban una media de

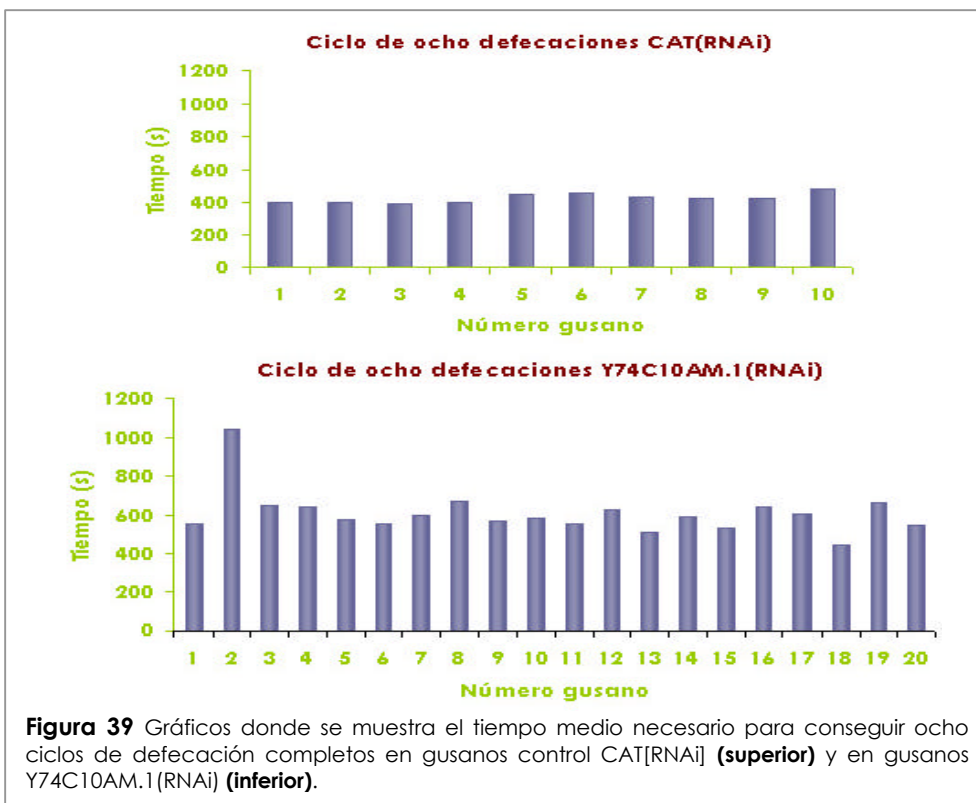


defecación de $59,1 \pm 9,7$ segundos. En el control *cat*[RNAi] la media fue de $49,6 \pm 2,5$ segundos (**figura 38**). Realizando un test Wilcoxon-Mann-Whitney, con el que se pueden comparar dos grupos con distinto número de individuos comparando las medias, podemos apreciar si hay una diferencia en el tiempo necesario para realizar un ciclo entre los dos grupos, es decir, si hay un retardo o un adelanto. El resultado mostró un incremento significativo del tiempo necesario para completar un ciclo ($p < 0,0005$). Realizando el mismo test pero en esta caso utilizando las desviaciones estándar podemos constatar si hay irregularidades entre los dos

Capítulo II

grupos. Así pues, se observó un incremento en la variabilidad del tiempo necesario para realizar este ciclo ($p < 0.0005$). En algunos casos incluso fallaba la defecación, es decir, se daba la contracción pero no la expulsión del contenido intestinal. Intentando comprobar cuánto podía afectar a la defecación la falta de este transportador, se nos ocurrió preguntarnos cuánto tardaban estos gusanos en completar ocho ciclos, o sea, defecar ocho veces. Los gusanos Y74C10AM.1 [RNAi] necesitaban una media de 606 segundos para completar ocho ciclos de defecación frente a los 424 segundos que necesitaban los controles *cat*[RNAi] (**Figura 39**). Aplicando de nuevo el test de Wilcoxon-Mann-Whitney pudimos confirmar que esta diferencia era significativa ($p < 0,00003$).

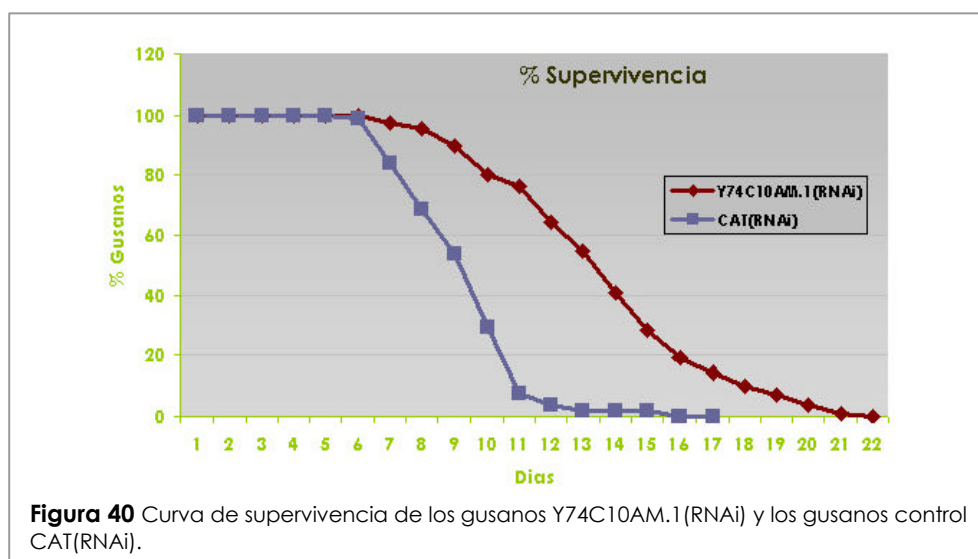
Por lo tanto, la falta de la proteína CeABC7 supone una alteración en la defecación: aumenta el tiempo requerido para completar un ciclo de defecación, afecta al ritmo de defecación por lo que se observa una arritmia en los ciclos, e incluso puede perturbar la fase final del ciclo y no se produce la expulsión del contenido intestinal obteniendo así gusanos estreñidos.



6.3.2.2 Supervivencia.

El envejecimiento es el resultado de un inevitable proceso de decadencia y degeneración. Sin embargo, hay razones para creer que el proceso de envejecimiento está activamente regulado. En el gusano, el proceso completo de desarrollo y senescencia se completa en un corto periodo de tiempo, unas dos semanas. Por este motivo, *C. elegans* es un buen modelo para poder realizar estudios genéticos relacionados con el envejecimiento. En nuestro caso, quisimos saber como podía afectar la falta de la proteína CeABC7 a la supervivencia del gusano.

Realizamos el estudio sobre una muestra de 110 gusanos Y74C10AM.1[RNAi] y 106 gusanos *cat*[RNAi]. El ensayo se realizó a 20°C sobre placas de NGM con 0,1g/ml de 5-fluorodeoxyuridine (FUdR). Esta droga impide la aparición de la siguiente generación, lo cual facilita el seguimiento del gusano a estudiar. El tiempo de supervivencia se define como el tiempo transcurrido desde que los gusanos, en estadio L4, se traspasan a placas con FUdR (*lifespan*=0) hasta que mueren. Nuestro resultados fueron que los gusanos Y74C10AM.1[RNAi] eran capaces de vivir una media de $13 \pm 3,4$ días frente a los $9 \pm 1,8$ días de los gusanos control *cat*[RNAi]. Aplicando el test de Mantel-Cox, esta diferencia es significativa ($p < 0,001$) (figura 40).



Capítulo II

CAPÍTULO II

DISCUSIÓN

Capítulo II

7 DISCUSIÓN. CAPÍTULO II.

El objetivo de este capítulo era caracterizar y definir correctamente genes que pudiesen estar relacionados con la función de frataxina utilizando como medio de trabajo el gusano *Caenorhabditis elegans*, un modelo de organismo inferior multicelular de amplio uso en el análisis genético, neurobiológico y del desarrollo. Cuando nos planteamos el estudio se conocía el fenotipo del mutante de la frataxina de *S. cerevisiae* como la presencia de depósitos de Fe, el aumento del estrés oxidativo y los problemas en la cadena respiratoria, y se habían propuesto varias hipótesis para la función de la misma, tanto en levadura como en células humanas. Sin embargo, no se había descrito aún ninguna interacción con ninguna proteína ni su participación en ninguna ruta bioquímica mitocondrial. En el laboratorio se venía trabajando en el desarrollo de un modelo en *C. elegans* de déficit de frataxina y, por ende, de la ataxia de Friedreich (**152, 153**). Nos interesamos, pues, en utilizar el mismo modelo para analizar otras ataxias hereditarias cuyo gen mutante se expresara en mitocondria y que el fenotipo mutante de levadura se asemejara al del déficit de frataxina (ej., depósitos de Fe). En 1999 se había descrito que la anemia sideroblástica ligada al X con ataxia (XLSA/A) estaba causada por mutaciones en el gen *ABC7* (**75**), un transportador de membrana localizado en la membrana mitocondrial. Las mutaciones en el gen *ATM1*, el gen ortólogo en *S. cerevisiae*, produce acumulación de Fe en la mitocondria, al igual que el mutante de frataxina *yfh1*?. *Atm1p* juega probablemente un papel en la exportación de los clusters Fe-S desde la mitocondria hacia el citosol (**166**), aunque este proceso todavía no se comprende bien.

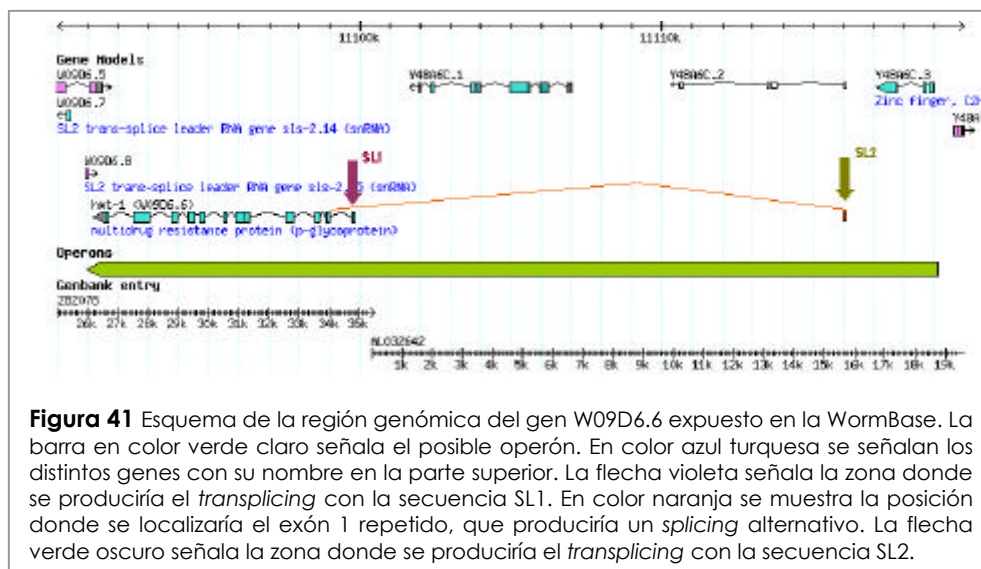
En este capítulo mostramos, pues, la caracterización genómica y genética del gen homólogo de *ABC7* y *ATM1* en *C. elegans*. Para ello, ha habido que caracterizar dos genes del gusano: el gen *Y74C10AM.1*, que es el homólogo real del gen *ABC7* humano, y el gen *W09D6.6*, homólogo del gen *ABCB6* humano pero originariamente propuesto como homólogo de *ABC7* en el proyecto genoma de *C. elegans*.

El gen *W09D6.6* localizado en el cromosoma III consta de 12 exones que se expanden a lo largo de una región genómica de 8,24 Kb. El cDNA consta de 2571 pb que codifican para una proteína de 801 aas y se encuentra disponible en la

Capítulo II

base de datos GenBank con el número de acceso AF490977. Los exones 6 y 7 se han descrito en este trabajo por primera vez. Contiene un único sitio donde se adiciona la cola poli-A en el mensajero, y la secuencia de poliadenilación corresponde a la secuencia consenso. Fuimos capaces de amplificar el RNA mensajero tanto con la secuencia SL1 como con SL2. Esto nos sugirió que el gen probablemente estaba incluido en el seno de un operón típico de *C. elegans*, puesto que se ha propuesto en numerosas ocasiones que el hecho de expresarse un gen mediante la secuencia líder SL2 implica tal hecho **(157, 159)**. Si nos ceñimos a lo que hay descrito en la base de datos, lo normal es que este gen se procesase con la secuencia SL1. El gen que se encuentra en posición 5' respecto del ATG, es Y48A6C.1 y está orientado en la misma dirección, pero se encuentra separado a una distancia muy alejada (aproximadamente 2 kb) para poder considerarse como parte de un operón. Entonces, ¿cómo se podía explicar la presencia de la secuencia líder SL2? Existe una repetición del exón 1 del gen W09D6.6 localizada en posición 5' del ATG, entre el gen Y48A6C.1 y el gen Y48A6C.3 **(figura 41)**. En la base de datos han asignado a esta secuencia como parte de un pseudogen. La cuestión es que este exón 1 repetido se encuentra a menos de 1 kb del final del gen Y48A6C.3. Nuestra hipótesis es que el gen W09D6.6 sufre un *splicing* alternativo. Cuando utiliza el exón 1 repetido, situado más cerca del gen Y48A6C.3, es porque el RNA mensajero se ha transcrito como parte de un operón que incluye los genes Y48A6C.3, Y48A6C.1, W09D6.6, y es la secuencia SL2 la que entra para procesar el RNA mensajero sobre el gen W09D6.6. En el caso en que el gen W09D6.6 se exprese como un gen unitario, el RNA mensajero contendrá el exón 1 normal. La diferencia entre que se transcriba de una manera u otra puede ser cuestión de regulación. La ventaja de la expresión en forma de operón es que dos o más genes comparten promotor y secuencias reguladoras. De esta manera, el gen W09D6.6 podría controlar su expresión en un tejido y en un momento concreto transcribirse en forma de operón o como gen monocistrónico **(152)**.

Como posteriormente pusimos nuestro interés en el gen Y74C10AM.1, por ser realmente el gen homólogo del ABC7 humano que era nuestro objetivo, no realizamos experimentos para poder aclarar esta circunstancia.



El gen Y74C10AM.1, localizado en el cromosoma I, consta de 8 exones que se expanden a lo largo de una región genómica de 13,4 Kb. El cDNA consta de 2504 pb que codifican para una proteína de 801 aminoácidos y se encuentra disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso AF490975. El gen Y74C10AM.1 sufre un *splicing* alternativo en el que el exón 5 es eliminado, lo que provoca la aparición de un codón stop prematuro tras realizar la traducción del mRNA. Esta secuencia está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso AF490976. Este gen únicamente utiliza la secuencia SL1 para realizar el *transsplicing*, por lo que se transcribe en un principio como un gen monocistrónico.

A partir de la secuencia de ambos genes obtuvimos datos que reforzaran la idea de que los genes Y74C10AM.1 y W09D6.6 eran homólogos de los genes humanos ABC7 y ABCB6, respectivamente: porcentajes de identidad y similitud, perfil de hidrofobicidad y predicción de segmentos transmembrana. La proteína Y74C10AM.1 presenta una identidad del 52% y una homología del 73% respecto al transportador ABC7. Su perfil hidrofóbico es prácticamente idéntico y ambas proteínas coinciden en el número de segmentos transmembrana predichos. En relación con el gen W09D6.6 se obtuvieron valores del 46% de identidad y un 67% de similitud, y los perfiles hidrofóbicos de ambas proteínas también coincidieron.

Capítulo II

Sin pretender profundizar en el tema, sí que nos pareció oportuno realizar un análisis filogenético tentativo para comprobar si la asignación de homólogos había sido correcta. Para este estudio utilizamos tres genes ABC mitocondriales humanos: ABC7, ABCB6 y el M-ABC1, éste último por pertenecer a la misma subfamilia NDR/TAP que los dos primeros; los ortólogos de los transportadores ABC humanos en ratón (*Abc7*, *Abc6* y *Abc1*, respectivamente); el ortólogo del ABC7 humano en levadura (*ATM1*); y los dos genes descritos en este trabajo (Y74C10AM.1 o CeABC7 y W09D6.6 o CeABCB6) (**figura 42**). Este estudio preliminar nos sugería que la asignación de genes homólogos entre humanos y *C.elegans* había sido correcta.

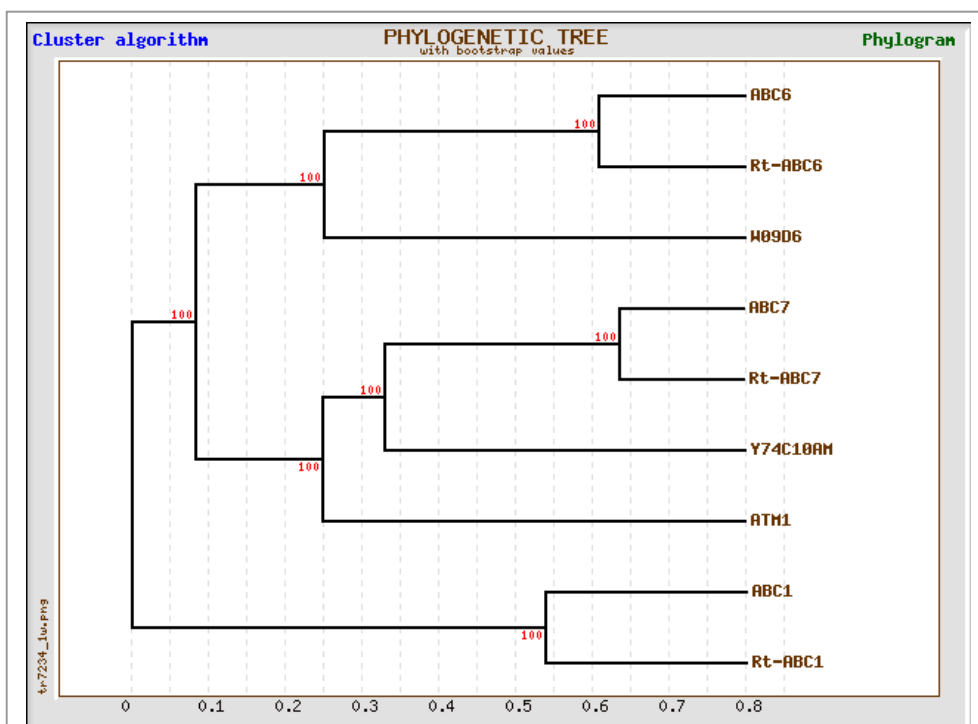


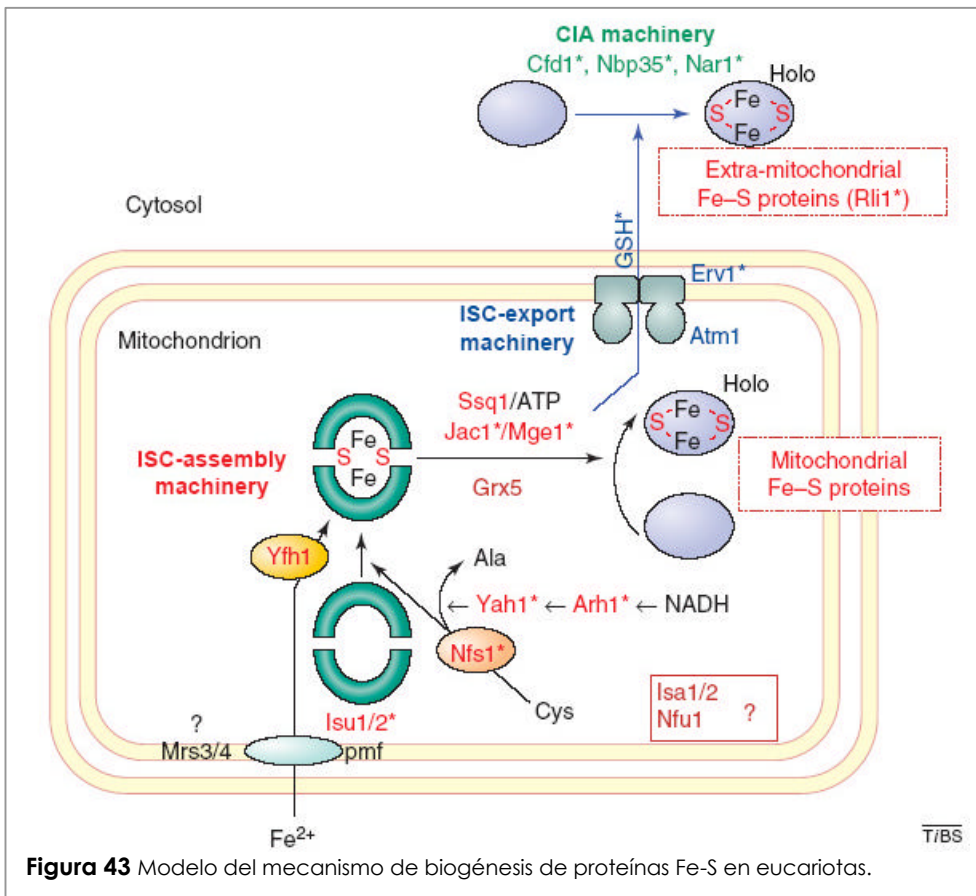
Figura 42 Árbol filogenético de transportadores ABC mitocondriales. El algoritmo utilizado para la construcción del árbol filogenético es del tipo cluster, donde la noción de distancia entre grupos de secuencias se utiliza para establecer el orden de las ramas. Los valores *bootstrap* se expresan en porcentajes y están anotados en los nudos de las secuencias. Los valores *bootstrap* significa que se ha realizado 100 veces el alineamiento y, por lo tanto, generado 100 árboles. En nuestro caso, cada vez que se generó un árbol, todas las bifurcaciones se han organizado de la misma manera.

La principal fuente de información sobre la función de una proteína suele ser la que se obtiene de la mutagénesis y del análisis de los mutantes. Se elimina la proteína del ambiente celular y se observa qué diferencia hay respecto de los individuos salvajes o respecto de los controles. Si hay tal diferencia podemos especular sobre la participación directa o indirecta de la proteína en la función que ha dejado de realizarse en la célula en los individuos mutantes. Con los datos que se presentan en este trabajo no podemos aportar información sobre la función de la proteína; únicamente hemos querido dar una visión descriptiva acerca del fenotipo del gusano *C. elegans* deficiente en la proteína homóloga del ABC7 humano, Y74C10AM.1, responsable de la ataxia sideroblástica ligada al X con ataxia.

Los resultados más notables se obtuvieron mediante la microinyección de dsRNA. Los gusanos presentaban un fenotipo con las siguientes características: letalidad embrionaria (emb) del 45.8%, retraso en el crecimiento (gro), siendo éste de aproximadamente 36-48 horas respecto al control, y fallo en la puesta de huevos (egl) llegando incluso a eclosionar las larvas en el interior de las madres.

El transportador Atm1p, homólogo en levadura del ABC7, está asignado como parte de la maquinaria de formación de los clusters Fe-S (ISCs). Una compleja maquinaria celular es la responsable de la síntesis de los ISCs y de su anclaje en las apoproteínas. En eucariotas, la maquinaria mitocondrial de formación de los ISCs es la responsable de la maduración de todas las proteínas celulares que contienen estos clusters. En la maduración de proteínas nucleares y citosólicas con clusters Fe-S participa una maquinaria de exportación y un sistema específico de ensamblaje citosólico. Se asume que unas 20 proteínas están relacionadas con la biogénesis de los ISCs (**figura 43**).

La biogénesis de las proteínas con Fe-S require, en primer lugar, la importación de hierro reducido (Fe^{++}) gracias a transportadores dependientes del potencial de membrana, como pueden ser las proteínas Mrs3 o Mrs4 o incluso otros transportadores desconocidos hasta la fecha (**167, 132**). El metal se une al complejo Isu1/Isu2 que sirve como proteína de anclaje para la síntesis de los ISCs (**168**). Parece que la frataxina (Yfh1p) participa en el aporte del hierro al complejo Isu1/Isu2 porque se une directamente a las proteínas Isu (**72, 73**). Además, la



síntesis de los ISCs requiere la participación de la cisteína desulfurasa (Nfs1), que aporta el azufre proveniente de una cisteína (166, 169, 170). La ferredoxina reductasa (Arh1) y la ferredoxina (Yah1) podrían reducir el azufre (S^0) formado por la cisteína desulfurasa a sulfito (S^{-2}), utilizando los electrones procedentes del NADH (171, 172). Un sistema de chaperonas, que consiste en Ssq1, Jac1 y Meg1 y la glutaredoxina Grx5 son necesarias después para que se produzca el ensamblaje de estos clusters en las apoproteínas (173-176). El transportador Atm1 es el encargado de exportar un componente desconocido derivado de la maquinaria de ensamblaje de los ISCs al citosol (166, 85). Otro componente de este sistema de exportación es la sulfidril oxidasa Erv1 localizada en el espacio intermembranoso (177). La maduración de las apoproteínas citosólicas y nucleares está facilitada por las proteínas identificadas recientemente: Nar1, Cfd1, Nbdp35 y Rli1 (177-181).

La mayoría de estos genes presentan homólogos en *C. elegans*. Existen diferentes trabajos en los cuales se ha realizado un cribado masivo de genes para la obtención de fenotipos mutantes por RNAi. Revisando la bibliografía pudimos comprobar que muchos de los genes involucrados en la síntesis, ensamblaje y exportación de los clusters Fe-S comparten fenotipos presentes en nuestro modelo para el gen Y74C10AM.1 (**tabla 3**).

Gen <i>S. cerevisiae</i>	Gen <i>C. elegans</i>	Fenotipo	Bibliografía
Isu 1/Isu2	Y45F10D.4	Emb, Lva	(182, 183)
Isa1	Y39B6A.3	Emb, Lva, Gro	(184, 185)
Nfs1	B0205.6	Emb, Lva	(186)
Nfu1	R10H10.1	Emb, Sck, Lva, Lpd, Pch	(182, 184, 185)
Arh1	Y62E10A.6	WT	(183, 185, 186)
Yah1	Y73F8A.27	Lva	(182)
Evr1	F56C11.3	WT	(183, 186)
Nar1	Y54H5A.4	WT	(183, 186)
Nbp35	F10G8.6	Gro, Stp	(182)
Rli1	Y39E4B.1	Emb, Gro, Stp, Lva, Dpy	(182, 185, 186)
Grx5	Y49E10.2	Emb, Gro, Clr, Lon	(182, 185)
Ssq1	C37H5.8	Emb, Stp, Lva	(182, 185)
Jac1	K08D10.2	WT	(183, 185, 186)
Mge1	C34C12.8	Emb, Lva, Gro	(182, 185)
Atm1	Y74C10AM.1	Emb, Gro, Egl	

Tabla 3 Fenotipos obtenidos por RNAi *feeding* en *C.elegans*. El único que se ha obtenido por microinyección del dsRNA es el fenotipo del gen Y74C10AM.1, resultado de este trabajo. Emb, *embryonic lethal*; Lva, *larval arrest*; Gro, *slow growth*; Sck, *sick*; Lpd, *lipid depleted*; Pch, *patchy coloration*; Stp, *sterile progeny*; Dpy, *adult phenotype dumpy*; Clr, *clear*; Lon, *long body*.

En la mayoría de los casos el fenotipo de letalidad embrionaria está presente. En el caso de los genes en que el tratamiento por RNAi no presenta ningún cambio aparente, hay que tener en cuenta que la metodología por RNAi *feeding* no siempre funciona, y por propia experiencia en el laboratorio, hemos

Capítulo II

comprobado que en un mismo gen la microinyección del dsRNA es mucho más eficaz y es capaz de incrementar los efectos respecto al RNAi *feeding* (Ros, S. comunicación oral). Por lo tanto, estos genes donde el fenotipo se asigna como salvaje o WT, quizás repitiendo el experimento microinyectando el dsRNA encontraríamos nuevos fenotipos como el de letalidad embrionaria. De igual manera el fenotipo Gro también está presente en otros genes. No es de extrañar que estos fenotipos estén presentes en todos estos genes, ya que la formación de estas proteínas es ciertamente importante para un correcto desarrollo del gusano. El ejemplo de proteínas que contienen cluster Fe-S es variado: en mitocondria existen proteínas de la cadena respiratoria, la aconitasa del ciclo de Krebs, la ferrocatalasa de la biosíntesis del grupo hemo, etc; en citosol encontramos la isopropilmalato isomerasa de la biosíntesis de leucina, la glutamato deshidrogenasa de la biosíntesis del glutamato; y en el núcleo la DNA glicosilasa involucrada en la reparación del DNA. Por lo tanto, pensamos que nuestro modelo es bueno para el estudio de este gen y de su función, ya que otras proteínas involucradas en el metabolismo de los clusters Fe-S parecen compartir fenotipos mutantes.

En este trabajo hemos intentado profundizar más en el estudio del mutante, analizando la defecación y la supervivencia como parámetros fisiológicos del gusano. Respecto a la defecación comprobamos que estaba afectada en los mutantes Y74C10AM.1[RNAi], produciéndose un incremento de unos 10 segundos respecto al control para que se complete el programa motor de la defecación (DMP). La defecación es un proceso altamente controlado por el sistema nervioso **(187)**. Se ha descrito que el DMP puede ponerse a cero, como un reloj rozando ligeramente la cabeza del gusano, lo que implica que las neuronas sensitivas actúan sobre el programa. Recordemos que mutaciones en el transportador ABC7 en humanos provoca una enfermedad en la que una de sus manifestaciones es una ataxia; tal vez, los defectos del DMP se deban a alteraciones en algunas neuronas específicas del gusano que intervienen en su regulación.

Normalmente, los mutantes Dec (*defecation*) no se han descrito con patrones arrítmicos, sino que simplemente presentan alteraciones en el tiempo del DMP, pudiendo alargarlo (mutantes Dec-1) o acortarlo (Dec-s) **(188)**. En nuestro caso, los mutantes transitorios Y74C10AM.1[RNAi] presentan una arritmia muy marcada (ver **figura 38**) no sólo entre diferentes individuos, sino incluso en un mismo

gusano existen diferencias entre un DMP y otro DMP. Como también hemos observado en algunos casos que la expulsión del contenido intestinal no se efectuaba, pensamos que el músculo del esfínter anal, responsable de la expulsión, también puede estar afectado. Por lo tanto, no podemos asignar el fallo en la defecación únicamente a un motivo neuronal, sino más bien a un conjunto de fallos a nivel neuronal y muscular.

Finalmente, realizamos el estudio de la supervivencia. Comprobamos que los mutantes Y74C10AM.1[RNAi] eran capaces de vivir una media de 4 días más que los controles. Hay que tener en cuenta que nuestro estudio se realiza contando los días a partir de que el gusano está en el periodo larvario L4. Como estos mutantes presentan un fenotipo Gro, donde en este caso significa un retraso en el crecimiento entre 36-48 horas, podemos añadirsele a los 4 días obtenidos en el experimento de supervivencia. Resumiendo, podemos afirmar que el mutante Y74C10AM.1[RNAi] es capaz de alargar su vida en casi un 50% respecto al control. Este resultado podría confundir, ya que el mutante en levadura *atm1D* muestra un acúmulo de hierro mitocondrial, lo que supondría un aumento de especies ROS y del estrés oxidativo. Concretamente, el acortamiento observado en nuestro laboratorio con el mutante homólogo de frataxina, *frh-1*[RNAi], sugiere que éste debería ser el fenotipo vital observado **(153)**. Esto es motivo para que pensemos que la vida del mutante Y74C10AM.1[RNAi] *a priori* tendría que disminuir. Sin embargo, lejos de este resultado, hay un aumento importante del período vital. Según trabajos anteriores, se le ha asignado un papel crítico a la mitocondria respecto a la supervivencia en *C. elegans*, promoviendo la longevidad en muchos casos, como por ejemplo mutantes de proteínas del complejo I, III, IV y V. El proceso de envejecimiento es, no obstante, muy complejo y la longevidad no se puede asignar únicamente a una baja producción de radicales libres, sino que va más allá planteándose que hay una compleja relación entre metabolismo y longevidad **(189)**.

Así pues, hemos caracterizado un mutante transitorio para el gen Y74C10AM.1 en el modelo *C. elegans*. El gen Y74C10AM.1 es homólogo del gen ABC7 humano, responsable de la anemia sideroblástica ligada al X con ataxia. Por lo tanto, pensamos que este modelo puede ser un buen sistema de trabajo para

Capítulo II

posteriores estudios de esta enfermedad, incluyendo su valor para el cribado de fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

9 BIBLIOGRAFÍA.

1. Friedreich, N. (1863) **Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge.** *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, **26**.
2. Friedreich, N. (1863) **Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge.** *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, **27**, 1-26.
3. Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.L., Ristow, M. and Shoelson, S.E. (2000) **Crystal structure of human frataxin.** *J Biol Chem*, **275**, 30753-30756.
4. Lopez-Arlandis, J.M., Vilchez, J.J., Palau, F. and Sevilla, T. (1995) **Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis.** *Neuroepidemiology*, **14**, 14-19.
5. Polo, J.M., Calleja, J., Combarros, O. and Berciano, J. (1991) **Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study.** *Brain*, **114 (Pt 2)**, 855-866.
6. Chamberlain, S., Shaw, J., Rowland, A., Wallis, J., South, S., Nakamura, Y., von Gabain, A., Farrall, M. and Williamson, R. (1988) **Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9.** *Nature*, **334**, 248-250.
7. Kostrzewa, M., Klockgether, T., Damian, M.S. and Muller, U. (1997) **Locus heterogeneity in Friedreich ataxia.** *Neurogenetics*, **1**, 43-47.
8. Smeyers, P., Monros, E., Vilchez, J., Lopez-Arlandis, J., Prieto, F. and Palau, F. (1996) **A family segregating a Friedreich ataxia phenotype that is not linked to the FRDA locus.** *Hum Genet*, **97**, 824-828.
9. Christodoulou, K., Deymeer, F., Serdaroglu, P., Ozdemir, C., Poda, M., Georgiou, D.M., Ioannou, P., Tsingis, M., Zamba, E. and Middleton, L.T. (2001) **Mapping of the second Friedreich's ataxia (FRDA2) locus to chromosome 9p23-p11: evidence for further locus heterogeneity.** *Neurogenetics*, **3**, 127-132.
10. Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A. *et al.* (1996) **Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion.** *Science*, **271**, 1423-1427.
11. Gonzalez-Cabo, P., Sanchez, M.I., Canizares, J., Blanca, J.M., Martinez-Arias, R., De Castro, M., Bertranpetit, J., Palau, F., Molto, M.D. and de Frutos, R. (1999) **Incipient GAA repeats in the primate Friedreich ataxia homologous genes.** *Mol Biol Evol*, **16**, 880-883.
12. Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., Cavalcanti, F., Pianese, L., Iodice, L., Farina, G., Monticelli, A. *et al.* (1997) **The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles.** *Hum Mol Genet*, **6**, 1261-1266.
13. Cossee, M., Campuzano, V., Koutnikova, H., Fischbeck, K., Mandel, J.L., Koenig, M., Bidichandani, S.I., Patel, P.I., Molte, M.D., Canizares, J. *et al.* (1997) **Frataxin fracas.** *Nat Genet*, **15**, 337-338.
14. Monros, E., Molto, M.D., Martinez, F., Canizares, J., Blanca, J., Vilchez, J.J., Prieto, F., de Frutos, R. and Palau, F. (1997) **Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat.** *Am J Hum Genet*, **61**, 101-110.
15. Pianese, L., Cavalcanti, F., De Michele, G., Filla, A., Campanella, G., Calabrese, O., Castaldo, I., Monticelli, A. and Coccozza, S. (1997) **The effect**

Bibliografia

- of parental gender on the GAA dynamic mutation in the FRDA gene. *Am J Hum Genet*, **60**, 460-463.
16. Durr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J.L., Brice, A. and Koenig, M. (1996) **Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia**. *N Engl J Med*, **335**, 1169-1175.
 17. Filla, A., De Michele, G., Coppola, G., Federico, A., Vita, G., Toscano, A., Uncini, A., Pisanelli, P., Barone, P., Scarano, V. *et al.* (2000) **Accuracy of clinical diagnostic criteria for Friedreich's ataxia**. *Mov Disord*, **15**, 1255-1258.
 18. Montermini, L., Richter, A., Morgan, K., Justice, C.M., Julien, D., Castellotti, B., Mercier, J., Poirier, J., Capozzoli, F., Bouchard, J.P. *et al.* (1997) **Phenotypic variability in Friedreich ataxia: role of the associated GAA triplet repeat expansion**. *Ann Neurol*, **41**, 675-682.
 19. Schols, L., Amoiridis, G., Przuntek, H., Frank, G., Epplen, J.T. and Epplen, C. (1997) **Friedreich's ataxia. Revision of the phenotype according to molecular genetics**. *Brain*, **120 (Pt 12)**, 2131-2140.
 20. Grabczyk, E. and 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 Res*, **28**, 2815-2822.
 21. Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Faucheux, B., Trouillas, P. *et al.* (1997) **Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes**. *Hum Mol Genet*, **6**, 1771-1780.
 22. Bidichandani, S.I., Ashizawa, T. and Patel, P.I. (1997) **Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion**. *Am J Hum Genet*, **60**, 1251-1256.
 23. Zhu, D., Burke, C., Leslie, A. and Nicholson, G.A. (2002) **Friedreich's ataxia with chorea and myoclonus caused by a compound heterozygosity for a novel deletion and the trinucleotide GAA expansion**. *Mov Disord*, **17**, 585-589.
 24. Zuhlke, C., Laccone, F., Cossee, M., Kohlschutter, A., Koenig, M. and Schwinger, E. (1998) **Mutation of the start codon in the FRDA1 gene: linkage analysis of three pedigrees with the ATG to ATT transversion points to a unique common ancestor**. *Hum Genet*, **103**, 102-105.
 25. Cossee, M., Durr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschutter, A. *et al.* (1999) **Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes**. *Ann Neurol*, **45**, 200-206.
 26. Cossee, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J.L. and Koenig, M. (1997) **Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7452-7457.
 27. De Castro, M., Garcia-Planells, J., Monros, E., Canizares, J., Vazquez-Manrique, R., Vilchez, J.J., Urtasun, M., Lucas, M., Navarro, G., Izquierdo, G. *et al.* (2000) **Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients**. *Hum Genet*, **106**, 86-92.
 28. McCormack, M.L., Guttman, R.P., Schumann, M., Farmer, J.M., Stolle, C.A., Campuzano, V., Koenig, M. and Lynch, D.R. (2000) **Frataxin point mutations**

- in two patients with Friedreich's ataxia and unusual clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **68**, 661-664.
29. Pook, M.A., Al-Mahdawi, S.A., Thomas, N.H., Appleton, R., Norman, A., Mountford, R. and Chamberlain, S. (2000) **Identification of three novel frameshift mutations in patients with Friedreich's ataxia.** *J Med Genet*, **37**, E38.
30. Forrest, S.M., Knight, M., Delatycki, M.B., Paris, D., Williamson, R., King, J., Yeung, L., Nassif, N. and Nicholson, G.A. (1998) **The correlation of clinical phenotype in Friedreich ataxia with the site of point mutations in the FRDA gene.** *Neurogenetics*, **1**, 253-257.
31. Bartolo, C., Mendell, J.R. and Prior, T.W. (1998) **Identification of a missense mutation in a Friedreich's ataxia patient: implications for diagnosis and carrier studies.** *Am J Med Genet*, **79**, 396-399.
32. De Michele, G., Filla, A., Cavalcanti, F., Tammaro, A., Monticelli, A., Pianese, L., Di Salle, F., Perreti, A., Santoro, L., Caruso, G. et al. (2000) **Atypical Friedreich ataxia phenotype associated with a novel missense mutation in the X25 gene.** *Neurology*, **54**, 496-499.
33. Al-Mahdawi, S., Pook, M. and Chamberlain, S. (2000) **A novel missense mutation (L198R) in the Friedreich's ataxia gene.** *Hum Mutat*, **16**, 95.
34. Doudney K, P.M., Al-Mahdawi S, Carvajal J, Hillerman R, Chamberlain S. (1997) **A novel site mutation (384+1G-A) in the Friedreich's ataxia gene.** *Hum Mutat*, **11**, 415.
35. Labuda M, P.J.a.P.M. (1999) **A missense mutation (W155R) in an American patients with Friedreich ataxia.** *Hum Mutat*, **13**, 506-507.
36. Canizares, J., Blanca, J.M., Navarro, J.A., Monros, E., Palau, F. and Molto, M.D. (2000) **dfh is a Drosophila homolog of the Friedreich's ataxia disease gene.** *Gene*, **256**, 35-42.
37. Gibson, T.J., Koonin, E.V., Musco, G., Pastore, A. and Bork, P. (1996) **Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction.** *Trends Neurosci*, **19**, 465-468.
38. Pandolfo, M.K., M. (1998) **Friedreich's Ataxia.** In Warren, S.W., R.D. (ed.), *Genetic instabilities and Hereditary Neurological Diseases*. Academic Press, pp. 373-398.
39. Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dolle, P., Cazzalini, O. and Koenig, M. (1997) **Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin.** *Nat Genet*, **16**, 345-351.
40. Priller, J., Scherzer, C.R., Faber, P.W., MacDonald, M.E. and Young, A.B. (1997) **Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria.** *Ann Neurol*, **42**, 265-269.
41. Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M. and Kaplan, J. (1997) **Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin.** *Science*, **276**, 1709-1712.
42. Branda, S.S., Cavadini, P., Adamec, J., Kalousek, F., Taroni, F. and Isaya, G. (1999) **Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase.** *J Biol Chem*, **274**, 22763-22769.

Bibliografia

43. Koutnikova, H., Campuzano, V. and Koenig, M. (1998) **Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase.** *Hum Mol Genet*, **7**, 1485-1489.
44. Knight, S.A., Sepuri, N.B., Pain, D. and Dancis, A. (1998) **Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis.** *J Biol Chem*, **273**, 18389-18393.
45. Geissler, A., Krimmer, T., Schonfisch, B., Meijer, M. and Rassow, J. (2000) **Biogenesis of the yeast frataxin homolog Yfh1p. Tim44-dependent transfer to mtHsp70 facilitates folding of newly imported proteins in mitochondria.** *Eur J Biochem*, **267**, 3167-3180.
46. Voisine, C., Schilke, B., Ohlson, M., Beinert, H., Marszalek, J. and Craig, E.A. (2000) **Role of the mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1.** *Mol Cell Biol*, **20**, 3677-3684.
47. Radisky, D.C., Babcock, M.C. and Kaplan, J. (1999) **The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle.** *J Biol Chem*, **274**, 4497-4499.
48. Wilson, R.B. and Roof, D.M. (1997) **Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue.** *Nat Genet*, **16**, 352-357.
49. Foury, F. and Cazzalini, O. (1997) **Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria.** *FEBS Lett*, **411**, 373-377.
50. Cavadini, P., Gellera, C., Patel, P.I. and Isaya, G. (2000) **Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Hum Mol Genet*, **9**, 2523-2530.
51. Busi, M.V., Zabaleta, E.J., Araya, A. and Gomez-Casati, D.F. (2004) **Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*.** *FEBS Lett*, **576**, 141-144.
52. Cossee, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dolle, P. and Koenig, M. (2000) **Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation.** *Hum Mol Genet*, **9**, 1219-1226.
53. Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. and Koenig, M. (2001) **Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits.** *Nat Genet*, **27**, 181-186.
54. Musco, G., Stier, G., Kolmerer, B., Adinolfi, S., Martin, S., Frenkiel, T., Gibson, T. and Pastore, A. (2000) **Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin.** *Structure Fold Des*, **8**, 695-707.
55. Lamarche, J.B., Cote, M. and Lemieux, B. (1980) **The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases.** *Can J Neurol Sci*, **7**, 389-396.
56. Waldvogel, D., van Gelderen, P. and Hallett, M. (1999) **Increased iron in the dentate nucleus of patients with Friedreich's ataxia.** *Ann Neurol*, **46**, 123-125.
57. Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. and Rustin, P. (1997) **Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia.** *Nat Genet*, **17**, 215-217.

58. Foury, F. (1999) **Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain.** *FEBS Lett*, **456**, 281-284.
59. Lodi, R., Cooper, J.M., Bradley, J.L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D.J. and Schapira, A.H. (1999) **Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11492-11495.
60. Ristow, M., Pfister, M.F., Yee, A.J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C.Y., Ueki, K., Michael, M.D., 2nd, Lowell, B.B. and Kahn, C.R. (2000) **Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12239-12243.
61. Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W.G., Naylor, S., Benson, L.M., Gacy, A.M. and Isaya, G. (2000) **Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia.** *Am J Hum Genet*, **67**, 549-562.
62. Park, S., Gakh, O., Mooney, S.M. and Isaya, G. (2002) **The ferroxidase activity of yeast frataxin.** *J Biol Chem*, **277**, 38589-38595.
63. Park, S., Gakh, O., O'Neill, H.A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G.C. and Isaya, G. (2003) **Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation.** *J Biol Chem*, **278**, 31340-31351.
64. Nichol, H., Gakh, O., O'Neill, H.A., Pickering, I.J., Isaya, G. and George, G.N. (2003) **Structure of frataxin iron cores: an X-ray absorption spectroscopic study.** *Biochemistry*, **42**, 5971-5976.
65. Cavadini, P., O'Neill, H.A., Benada, O. and Isaya, G. (2002) **Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia.** *Hum Mol Genet*, **11**, 217-227.
66. Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P. and Drysdale, J. (2001) **A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene.** *J Biol Chem*, **276**, 24437-24440.
67. Campanella, A., Isaya, G., O'Neill, H.A., Santambrogio, P., Cozzi, A., Arosio, P. and Levi, S. (2004) **The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast.** *Hum Mol Genet*, **13**, 2279-2288.
68. Becker, E.M., Greer, J.M., Ponka, P. and Richardson, D.R. (2002) **Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization.** *Blood*, **99**, 3813-3822.
69. Yoon, T. and Cowan, J.A. (2004) **Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis.** *J Biol Chem*, **279**, 25943-25946.
70. Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B.F., Knight, S.A., Camadro, J.M. and Dancis, A. (2003) **Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1).** *Hum Mol Genet*, **12**, 879-889.
71. Yoon, T. and Cowan, J.A. (2003) **Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins.** *J Am Chem Soc*, **125**, 6078-6084.
72. Gerber, J., Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2003) **An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1.** *EMBO Rep*, **4**, 906-911.

Bibliografia

73. Ramazzotti, A., Vanmansart, V. and Foury, F. (2004) **Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae***. *FEBS Lett*, **557**, 215-220.
74. Bulteau, A.L., O'Neill, H.A., Kennedy, M.C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. and Szweda, L.I. (2004) **Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity**. *Science*, **305**, 242-245.
75. Allikmets, R., Raskind, W.H., Hutchinson, A., Schueck, N.D., Dean, M. and Koeller, D.M. (1999) **Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A)**. *Hum Mol Genet*, **8**, 743-749.
76. Young, S.G. and Fielding, C.J. (1999) **The ABCs of cholesterol efflux**. *Nat Genet*, **22**, 316-318.
77. Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N.F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A. et al. (1997) **A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy**. *Nat Genet*, **15**, 236-246.
78. Sun, H., Molday, R.S. and Nathans, J. (1999) **Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease**. *J Biol Chem*, **274**, 8269-8281.
79. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. et al. (1989) **Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA**. *Science*, **245**, 1066-1073.
80. Dean, M., Hamon, Y. and Chimini, G. (2001) **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily**. *J Lipid Res*, **42**, 1007-1017.
81. Higgins, C.F. (1992) **ABC transporters: from microorganisms to man**. *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 67-113.
82. Dean, M. and Allikmets, R. (1995) **Evolution of ATP-binding cassette transporter genes**. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 779-785.
83. Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J.F. and Thomas, P.J. (2002) **Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters**. *J Biol Chem*, **277**, 21111-21114.
84. Pagon, R.A., Bird, T.D., Detter, J.C. and Pierce, I. (1985) **Hereditary sideroblastic anaemia and ataxia: an X linked recessive disorder**. *J Med Genet*, **22**, 267-273.
85. Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R. and Bishop, D.F. (2000) **Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation**. *Blood*, **96**, 3256-3264.
86. Maguire, A., Hellier, K., Hammans, S. and May, A. (2001) **X-linked cerebellar ataxia and sideroblastic anaemia associated with a missense mutation in the ABC7 gene predicting V411L**. *Br J Haematol*, **115**, 910-917.
87. Leighton, J. and Schatz, G. (1995) **An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast**. *Embo J*, **14**, 188-195.
88. Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. and Lill, R. (1997) **The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis**. *FEBS Lett*, **418**, 346-350.

89. Csere, P., Lill, R. and Kispal, G. (1998) **Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p.** *FEBS Lett*, **441**, 266-270.
90. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. and Lill, R. (1999) **The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins.** *Embo J*, **18**, 3981-3989.
91. Chloupkova, M., Reaves, S.K., LeBard, L.M. and Koeller, D.M. (2004) **The mitochondrial ABC transporter Atm1p functions as a homodimer.** *FEBS Lett*, **569**, 65-69.
92. Taketani, S., Kakimoto, K., Ueta, H., Masaki, R. and Furukawa, T. (2003) **Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase.** *Blood*, **101**, 3274-3280.
93. Mewes, H.W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maiert, A., Oliver, S.G. et al. (1997) **Overview of the yeast genome.** *Nature*, **387**, 7-65.
94. Consortium, C.e.S. (1998) **Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology.** *Science*, **282**, 2012-2018.
95. Brenner, S. (1974) **The genetics of Caenorhabditis elegans.** *Genetics*, **77**, 71-94.
96. Stinchcomb, D.T., Shaw, J.E., Carr, S.H. and Hirsh, D. (1985) **Extrachromosomal DNA transformation of Caenorhabditis elegans.** *Mol Cell Biol*, **5**, 3484-3496.
97. Rocheleau, C.E., Downs, W.D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y.H., Ali, M., Priess, J.R. and Mello, C.C. (1997) **Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early C. elegans embryos.** *Cell*, **90**, 707-716.
98. Guo, S. and Kemphues, K.J. (1995) **par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed.** *Cell*, **81**, 611-620.
99. Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002) **A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex.** *Science*, **297**, 2056-2060.
100. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.** *Nature*, **391**, 806-811.
101. Zwaal, R.R., Broeks, A., van Meurs, J., Groenen, J.T. and Plasterk, R.H. (1993) **Target-selected gene inactivation in Caenorhabditis elegans by using a frozen transposon insertion mutant bank.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7431-7435.
102. Burke, D., Dawson, D. and Stearns, T. (2000) **Methods in Yeast Genetics.** 2000 Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
103. Hope, I.A. (1999) **C. elegans. A Practical Approach.** Oxford University Press, Oxford.
104. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) **Molecular Cloning A Laboratory Manual.** New York.
105. Fields, S. and Song, O. (1989) **A novel genetic system to detect protein-protein interactions.** *Nature*, **340**, 245-246.
106. Elledge, S.J., Mulligan, J.T., Ramer, S.W., Spottswood, M. and Davis, R.W. (1991) **Lambda YES: a multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and Escherichia coli mutations.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1731-1735.

Bibliografía

107. Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. and Hieter, P. (1992) **Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors**. *Gene*, **110**, 119-122.
108. Yang, X., Hubbard, E.J. and Carlson, M. (1992) **A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system**. *Science*, **257**, 680-682.
109. Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A. and Carlson, M. (2000) **Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase**. *Mol Cell Biol*, **20**, 1321-1328.
110. Rothstein, R.J. (1983) **One-step gene disruption in yeast**. *Methods Enzymol*, **101**, 202-211.
111. Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P.A. and Hilger, F. (1991) **The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae***. *Yeast*, **7**, 475-477.
112. Frohman, M.A.I.D., C.W. y Dveksler, G.S. (eds.) (1995) **Rapid Amplification of cDNA Ends**. In Press, C.s.H.L. (ed.), *PCR Primer: A Laboratory Manual.*, New York, pp. 381-410.
113. Southern, E.M. (1975) **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis**. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
114. Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. (1977) **Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5350-5354.
115. Zhao, X.J., Raitt, D., P, V.B., Clewell, A.S., Kwast, K.E. and Poyton, R.O. (1996) **Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a role in the oxidative stress response**. *J Biol Chem*, **271**, 25131-25138.
116. Cassanova, N., O'Brien, K.M., Stahl, B.T., McClure, T. and 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**. *J Biol Chem*, **280**, 7645-7653.
117. Liu, L., Zeng, M., Hausladen, A., Heitman, J. and Stamler, J.S. (2000) **Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4672-4676.
118. Boveris, A., Costa, L.E., Poderoso, J.J., Carreras, M.C. and Cadenas, E. (2000) **Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide**. *Ann N Y Acad Sci*, **899**, 121-135.
119. Cadenas, E., Poderoso, J.J., Antunes, F. and Boveris, A. (2001) **Analysis of the Pathways of Nitric Oxide Utilization in Mitochondria**. *Free Radic Res*, **33**, 747-756.
120. Lemire, B.D. and Oyedotun, K.S. (2002) **The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase**. *Biochim Biophys Acta*, **1553**, 102-116.
121. Robinson, K.M. and Lemire, B.D. (1992) **Isolation and nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit**. *J Biol Chem*, **267**, 10101-10107.
122. Eaton, S. (2002) **Control of mitochondrial beta-oxidation flux**. *Prog Lipid Res*, **41**, 197-239.
123. Arts, W.F., Scholte, H.R., Bogaard, J.M., Kerrebijn, K.F. and Luyt-Houwen, I.E. (1983) **NADH-CoQ reductase deficient myopathy: successful treatment with riboflavin**. *Lancet*, **2**, 581-582.

124. Ogle, R.F., Christodoulou, J., Fagan, E., Blok, R.B., Kirby, D.M., Seller, K.L., Dahl, H.H. and Thorburn, D.R. (1997) **Mitochondrial myopathy with tRNA(Leu(UUR)) mutation and complex I deficiency responsive to riboflavin.** *J Pediatr*, **130**, 138-145.
125. Lenaz, G. (1998) **Role of mitochondria in oxidative stress and ageing.** *Biochim Biophys Acta*, **1366**, 53-67.
126. Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature*, **408**, 239-247.
127. Raha, S. and Robinson, B.H. (2000) **Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing.** *Trends Biochem Sci*, **25**, 502-508.
128. Senoo-Matsuda, N., Yasuda, K., Tsuda, M., Ohkubo, T., Yoshimura, S., Nakazawa, H., Hartman, P.S. and Ishii, N. (2001) **A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*.** *J Biol Chem*, **276**, 41553-41558.
129. Guo, J. and Lemire, B.D. (2003) **The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide.** *J Biol Chem*, **278**, 47629-47635.
130. Wiesenberger, G., Link, T.A., von Ahsen, U., Waldherr, M. and Schweyen, R.J. (1991) **MRS3 and MRS4, two suppressors of mtRNA splicing defects in yeast, are new members of the mitochondrial carrier family.** *J Mol Biol*, **217**, 23-37.
131. Foury, F. and Roganti, T. (2002) **Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain.** *J Biol Chem*, **277**, 24475-24483.
132. Muhlenhoff, U., Stadler, J.A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R.J., Lill, R. and Wiesenberger, G. (2003) **A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions.** *J Biol Chem*, **278**, 40612-40620.
133. Li, F.Y., Nikali, K., Gregan, J., Leibiger, I., Leibiger, B., Schweyen, R., Larsson, C. and Suomalainen, A. (2001) **Characterization of a novel human putative mitochondrial transporter homologous to the yeast mitochondrial RNA splicing proteins 3 and 4.** *FEBS Lett*, **494**, 79-84.
134. Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yokoyama, Y., Shibata, T. *et al.* (2000) **MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis.** *J Biol Chem*, **275**, 17536-17540.
135. Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A. and Craig, E.A. (2004) **Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo.** *EMBO Rep*, **5**, 1096-1101.
136. DiMauro, S., Bonilla, E., Davidson, M., Hirano, M. and Schon, E.A. (1998) **Mitochondria in neuromuscular disorders.** *Biochim Biophys Acta*, **1366**, 199-210.
137. Howell, N. (1999) **Human mitochondrial diseases: answering questions and questioning answers.** *Int Rev Cytol*, **186**, 49-116.
138. Wallace, D.C. (1999) **Mitochondrial diseases in man and mouse.** *Science*, **283**, 1482-1488.
139. Riggs, J.E., Schochet, S.S., Jr., Fakadej, A.V., Papadimitriou, A., DiMauro, S., Crosby, T.W., Gutmann, L. and Moxley, R.T. (1984) **Mitochondrial**

Bibliografía

- encephalomyopathy with decreased succinate-cytochrome c reductase activity.** *Neurology*, **34**, 48-53.
140. Rivner, M.H., Shamsnia, M., Swift, T.R., Trefz, J., Roesel, R.A., Carter, A.L., Yanamura, W. and Hommes, F.A. (1989) **Kearns-Sayre syndrome and complex II deficiency.** *Neurology*, **39**, 693-696.
141. Haller, R.G., Henriksson, K.G., Jorfeldt, L., Hultman, E., Wibom, R., Sahlin, K., Areskog, N.H., Gunder, M., Ayyad, K., Blomqvist, C.G. *et al.* (1991) **Deficiency of skeletal muscle succinate dehydrogenase and aconitase. Pathophysiology of exercise in a novel human muscle oxidative defect.** *J Clin Invest*, **88**, 1197-1206.
142. Burgeois, M., Goutieres, F., Chretien, D., Rustin, P., Munnich, A. and Aicardi, J. (1992) **Deficiency in complex II of the respiratory chain, presenting as a leukodystrophy in two sisters with Leigh syndrome.** *Brain Dev*, **14**, 404-408.
143. Hall, R.E., Henriksson, K.G., Lewis, S.F., Haller, R.G. and Kennaway, N.G. (1993) **Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins.** *J Clin Invest*, **92**, 2660-2666.
144. Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A. and Rotig, A. (1995) **Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency.** *Nat Genet*, **11**, 144-149.
145. Taylor, R.W., Birch-Machin, M.A., Schaefer, J., Taylor, L., Shakir, R., Ackrell, B.A., Cochran, B., Bindoff, L.A., Jackson, M.J., Griffiths, P. *et al.* (1996) **Deficiency of complex II of the mitochondrial respiratory chain in late-onset optic atrophy and ataxia.** *Ann Neurol*, **39**, 224-232.
146. Birch-Machin, M.A., Taylor, R.W., Cochran, B., Ackrell, B.A. and Turnbull, D.M. (2000) **Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene.** *Ann Neurol*, **48**, 330-335.
147. Munnich, A., Rotig, A., Cormier-Daire, V. and Rustin, P. (2001) **Clinical Presentation of Respiratory Chain Deficiency.** In Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. and Valle, D. (eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^o ed. ed, New York, Vol. Chapter 99, pp. 2261-2274.
148. Cecchini, G. (2003) **Function and structure of complex II of the respiratory chain.** *Annu Rev Biochem*, **72**, 77-109.
149. Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P.S., Tsuda, M., Yasuda, K., Senoo-Matsuda, N., Yanase, S., Ayusawa, D. and Suzuki, K. (1998) **A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes.** *Nature*, **394**, 694-697.
150. Raskind, W.H., Wijsman, E., Pagon, R.A., Cox, T.C., Bawden, M.J., May, B.K. and Bird, T.D. (1991) **X-linked sideroblastic anemia and ataxia: linkage to phosphoglycerate kinase at Xq13.** *Am J Hum Genet*, **48**, 335-341.
151. Savary, S., Allikmets, R., Denizot, F., Luciani, M.F., Mattei, M.G., Dean, M. and Chimini, G. (1997) **Isolation and chromosomal mapping of a novel ATP-binding cassette transporter conserved in mouse and human.** *Genomics*, **41**, 275-278.
152. Vázquez-Manrique, R. (2003) **Expresión génica y biología celular de la frataxina en *Caenorhabditis elegans*.** Instituto de Biomedicina de Valencia. Universidad de Valencia, Valencia.

153. Vázquez-Manrique, R., González-Cabo, P., Ros, S., Aziz, H., Baylis, H.A. and Palau, F. (2005) **Reduction of frataxin function in *Caenorhabditis elegans* increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan and is lethal when the function of mitochondrial complex II is also reduced.** *Faseb Journal*, en prensa.
154. Krause, M. and Hirsh, D. (1987) **A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*.** *Cell*, **49**, 753-761.
155. Huang, X.Y. and Hirsh, D. (1989) **A second trans-spliced RNA leader sequence in the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8640-8644.
156. Ross, L.H., Freedman, J.H. and Rubin, C.S. (1995) **Structure and expression of novel spliced leader RNA genes in *Caenorhabditis elegans*.** *J Biol Chem*, **270**, 22066-22075.
157. Spieth, J., Brooke, G., Kuersten, S., Lea, K. and Blumenthal, T. (1993) **Operons in *C. elegans*: polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions.** *Cell*, **73**, 521-532.
158. Zorio, D.A., Cheng, N.N., Blumenthal, T. and Spieth, J. (1994) **Operons as a common form of chromosomal organization in *C. elegans*.** *Nature*, **372**, 270-272.
159. Blumenthal, T. and Steward, K. (1997) **RNA Processing and Gene Structure.** In Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. and Priess, J.R. (eds.), *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 117-145.
160. Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) **A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein.** *J Mol Biol*, **157**, 105-132.
161. Visapaa, I., Fellman, V., Lanyi, L. and Peltonen, L. (2002) **ABC6 (MTABC3) excluded as the causative gene for the growth retardation syndrome with aminoaciduria, cholestasis, iron overload, and lactacidosis.** *Am J Med Genet*, **109**, 202-205.
162. Timmons, L. and Fire, A. (1998) **Specific interference by ingested dsRNA.** *Nature*, **395**, 854.
163. Hunter, C.P. (1999) **Genetics: a touch of elegance with RNAi.** *Curr Biol*, **9**, R440-442.
164. Liu, D.W. and Thomas, J.H. (1994) **Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*.** *J Neurosci*, **14**, 1953-1962.
165. Iwasaki, K., Liu, D.W. and Thomas, J.H. (1995) **Genes that control a temperature-compensated ultradian clock in *Caenorhabditis elegans*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10317-10321.
166. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. and Lill, R. (1999) **The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins.** *Embo J*, **18**, 3981-3989.
167. Lange, H., Kispal, G. and Lill, R. (1999) **Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria.** *J Biol Chem*, **274**, 18989-18996.
168. Garland, S.A., Hoff, K., Vickery, L.E. and Culotta, V.C. (1999) ***Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly.** *J Mol Biol*, **294**, 897-907.
169. Zheng, L. and Dean, D.R. (1994) **Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster.** *J Biol Chem*, **269**, 18723-18726.

Bibliografia

170. Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L. and Dean, D.R. (1994) **Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product.** *Biochemistry*, 33, 4714-4720.
171. Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J. and Lill, R. (2002) **Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron.** *J Biol Chem*, 277, 29810-29816.
172. Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. and Lill, R. (2003) **Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p.** *Embo J*, 22, 4815-4825.
173. Hoff, K.G., Silberg, J.J. and Vickery, L.E. (2000) **Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7790-7795.
174. Craig, E.A. and Marszalek, J. (2002) **A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers.** *Cell Mol Life Sci*, 59, 1658-1665.
175. Dutkiewicz, R., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E.A. and Marszalek, J. (2003) **Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart.** *J Biol Chem*, 278, 29719-29727.
176. Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E.A. and Marszalek, J. (2004) **Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function.** *J Biol Chem*, 279, 29167-29174.
177. Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G. and Lill, R. (2001) **An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins.** *EMBO Rep*, 2, 715-720.
178. Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W. and Walden, W.E. (2003) **A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly.** *Embo J*, 22, 4826-4835.
179. Balk, J., Pierik, A.J., Netz, D.J., Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2004) **The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins.** *Embo J*, 23, 2105-2115.
180. Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janaky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Rotte, C. *et al.* (2005) **Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria.** *Embo J*, 24, 589-598.
181. Yarunin, A., Panse, V.G., Petfalski, E., Dez, C., Tollervey, D. and Hurt, E.C. (2005) **Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins.** *Embo J*, 24, 580-588.
182. Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A.M., Kuijk, E., van den Berghe, P.V., Kamath, R.S., Fraser, A.G., Ahringer, J. and Plasterk, R.H. (2003) **Genome-wide RNAi of C. elegans using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions.** *PLoS Biol*, 1, E12.
183. Sonnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E. *et al.* (2005) **Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in Caenorhabditis elegans.** *Nature*, 434, 462-469.

184. Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. and Sugimoto, A. (2001) **Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi.** *Curr Biol*, 11, 171-176.
185. Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M. *et al.* (2003) **Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi.** *Nature*, 421, 231-237.
186. Rual, J.F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A.S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S.H., Hill, D.E., van den Heuvel, S. *et al.* (2004) **Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library.** *Genome Res*, 14, 2162-2168.
187. Avery, L. and Thomas, J.H. (1997) **Feeding and Defecation.** In Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. and Priess, J.R. (eds.), *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 679-716.
188. Thomas, J.H. (1990) **Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*.** *Genetics*, 124, 855-872.
189. Lee, S.S., Lee, R.Y., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Ruvkun, G. (2003) **A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity.** *Nat Genet*, 33, 40-48.

Bibliografia

ANOTACIONES

Anotaciones

Anotaciones

Anotaciones
