

DEPARTAMENT DE GENÈTICA

ESTUDIO EN *DROSOPHILA MELANOGASTER* DEL EFECTO  
DE LA REDUCCIÓN Y LA SOBREEXPRESIÓN DE LA  
PROTEÍNA DEFICITARIA EN LA ATAXIA DE  
FRIEDREICH.

JOSE VICENTE LLORENS LLORENS

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 12 de juny de 2009 davant un tribunal format per:

- Dra. Rosa de Frutos Illán
- Dr. Francesc Palau Martínez
- Dr. Víctor Volpini Bertrán
- Dr. José Antonio Botella Muñoz
- Dr. Rafael Artuch Iriberry

Va ser dirigida per:

Dra. María Dolores Moltó Ruiz

Dra. María José Martínez Sebastián

Dr. Luís Francisco Pascual Calforra

©Copyright: Servei de Publicacions  
Jose Vicente Llorens Llorens

---

Dipòsit legal: V-4150-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7637-9

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Departament de Genètica

Facultat de Ciències Biològiques



Estudio en *Drosophila melanogaster* del efecto de la reducción y la sobreexpresión de la proteína deficitaria en la ataxia de Friedreich

Memoria presentada por

Jose Vicente Llorens Llorens

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Valencia, 2009

D<sup>o</sup> Lluís Francesc Pascual Calaforra, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> José Martínez Sebastián, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València y D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Dolores Moltó Ruiz, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "Estudio en *Drosophila melanogaster* del efecto de la reducción y la sobreexpresión de la proteína deficitaria en la ataxia de Friedreich.", ha sido realizada bajo su codirección en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, por Jose Vicente Llorens Llorens, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universitat de València.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado,

Valencia, a 12 de diciembre de 2008.

Dr. Lluís Francesc Pascual Calaforra

Dra. M<sup>a</sup> José Martínez Sebastián

Dra. M<sup>a</sup> Dolores Moltó Ruiz

A mis padres, mi hermana  
y en especial a mi amoret

## ***Agradecimientos***

No me lo puedo creer, estoy sentado en el comedor de mi casa con la compañía de Gato escribiendo las palabras que durante tanto tiempo he estado pensando y que al final van a ser completamente improvisadas. Lo malo de haber estado tantos años haciendo la tesis es que te desesperas porque jamás ves el momento en que puedas llegar a defenderla, lo bueno, la cantidad de personas y "personajes" que comparten tu vida, tu trabajo y tu tiempo y a las cuales van dedicadas estas palabras.

En primer lugar quiero agradecer la oportunidad que me ha dado de realizar este trabajo de tesis doctoral a mi jefa Loli y la paciencia que ha tenido al soportar mis ideas "bomberiles" y mis preocupaciones a lo largo de estos años. También quiero agradecer a M<sup>a</sup> José el huequecito que me ha hecho en su despacho, su ayuda con la tesis y la oportunidad de trabajar con el proyecto del elemento transponible *gypsy*, lo que me permitió adentrarme en una investigación completamente diferente a lo que estaba haciendo y que me ha aportado mucho a nivel científico. Por supuesto quiero agradecer a Lluís la ayuda ofrecida en los comienzos de este largo camino y sus consejos que tanto me han ayudado. Fue él quien allá en el año 1996 me mostró por primera vez, con unas mosquitas, el interesante mundo de la Genética y despertó en mi la curiosidad y las ganas de aprender más al respecto. Agradecer también a Rosa y a Carmen por su ayuda, paciencia e interés prestado en cada una de mis dudas y preguntas seminariles y también a Rosa le quiero agradecer la ayuda prestada con el proyecto referido al elemento *gypsy* que tantos quebraderos de cabeza nos ha dado. Sobre todo quiero hacer hincapié en la amistad que hemos forjado a lo largo de los años y que espero que jamás flaquee aunque nuestros caminos se separen temporalmente.

Cuando entré en el laboratorio, aunque había asistido a todas las prácticas de todas las Genéticas impartidas por la Universidad, estaba completamente perdido. Pero allí estaban ellos para ayudarme. Cómo agradecer con palabras todo lo que han tenido que aguantar en el laboratorio dos de las personas a las que más aprecio. Cuántas cosas hemos vivido juntos, cuántas horas discutiendo por temas científicos (o no), cuántas risas nos hemos echado juntos... Qué tiempos tan preciosos, ojalá pudiese compartir laboratorio con ellos otra vez (¿quién sabe?...). Juan Antonio, Isabel, ¡¡GRACIAS POR TODO!!

Al poco tiempo aumentó la compañía en el laboratorio y llegaron Ivette, Amparo, Olga y después Jose Luís. Tengo que agradecer especialmente el apoyo de Ivette en tiempos tumultuosos, su paciencia y su saber escuchar. Muchas veces hemos hecho bromas y hemos discutido pero siempre con cariño (instauramos la discusión de las 12 muy apreciada por el resto del laboratorio).

A Amparo y a Olga, la pareja más dicharachera y desenfadada del laboratorio. Con sus cánticos, bailes y risas han hecho que los días fueran más amenos, alegres y divertidos aunque científicamente el día hubiese sido un desastre total. A José Luís, que aunque tenga unos pulmones pequeños (;-P), tiene un gran... corazón. Como no, a la última adquisición de la línea de investigación de Ataxia, Laura (y a ti, Sire, ya te cogeré luego...), con su simpatía y sus locuras y su "¡Qué he estado pensando...!" (Nooo, ;-P). Y a Javi por sus idas y venidas, sus subidas y bajadas, por su simpatía y buenos momentos. Por lo que a la gente del laboratorio concierne, quiero agradecer a los múltiples colaboradores que han pasado por mis manos, empezando por José Miguel y María Dolores (que me ayudaron muchísimo en la ardua tarea de secuenciar el elemento *gypsy*), hasta Amparo y Bárbara que me ayudaron en diferentes partes de la investigación. Caso aparte en esta lista, son Mireia y Noelia, mis más recientes colaboradoras. La locuela de Mireia, qué bien nos lo pasábamos juntos haciendo y "deshaciendo" experimentos, eres muy grande, no cambies nunca ese buen humor que te caracteriza. Y Noe, que es la personita más buena que he conocido, siempre preocupada por no molestar y hacer mal las cosas, que nada más lejos de la realidad. Recordar también a Jero el "Ya veo por dónde vas, ya".

Y no me puedo olvidar a los miembros del resto de líneas del departamento de Genética, Genética Molecular del Desarrollo, Genética Bioquímica y Biotecnología, Genética Bioquímica y Molecular y Genética Comparativa. Gracias a todos ellos por la ayuda prestada, ya sea a nivel científico o a nivel personal.

Y, cómo no, gracias a la "incansable" Carmen, a la simpática Nuria, al "despistadete" Javier, al "intratable" Jose Carlos y al "ordenado" Fede. Gracias a todos por vuestros consejos, chistes, y comida de moscas (;-P).

También quiero agradecer a Stephan Schneuwly y a José Antonio Botella la oportunidad que me dieron de poder pasar 6 meses de estancia en su laboratorio, estancia muy productiva y en la que conocí a un montón de gente y encontré a la familia de José que me acogió como si fuera uno más de ellos (Gracias de todo corazón, Suzanne, Jose, Javi, David, Lucas y Anna).

A mis padres y mi hermana a los que quiero un montonazo porque gracias a ellos soy quien soy, a ellos se lo tengo que agradecer todo. Gracias de todo corazón.

Y finalmente a Sirena, que decirte a ti que no sepas ya, lo eres todo para mí, si caigo tu me levantas, si lloro tu me consuelas, y menudas risas nos echamos los dos juntos, muchas gracias por ser como eres NO CAMBIES NUNCA.

# *Índice*



<b>Índice.....</b>	<b>I</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1 La ataxia de Friedreich.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Características generales de la ataxia de Friedreich.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 El gen de la ataxia Friedreich.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 La proteína frataxina.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1 Localización y estructura de frataxina.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2 Función de frataxina.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2.1 Frataxina como chaperona en la formación en la formación de centros FeS y del grupo hemo... 9</b>	
<b>1.3.2.2 Frataxina como proteína de almacenamiento de hierro..... 12</b>	
<b>1.3.2.3 Frataxina como partícipe activo en la fosforilación oxidativa..... 13</b>	
<b>1.3.2.4 Frataxina como factor que controla el estrés oxidativo celular..... 14</b>	
<b>1.3.2.5 Frataxina como chaperona en la reparación y/o protección del centro hierro-azufre de la aconitasa..... 16</b>	
<b>2 Modelos de la ataxia de Friedreich.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Cultivos celulares.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Ratón (<i>Mus musculus</i>).....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Modelos en invertebrados.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1 Gusano (<i>Caenorhabditis elegans</i>).....</b>	<b>21</b>

<b>3 <i>Drosophila</i> como organismo modelo para el estudio de enfermedades humanas.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Aspectos básicos de <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Métodos experimentales para la obtención, en <i>Drosophila</i>, de modelos de enfermedad.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Modelo de la ataxia de Friedreich en <i>Drosophila</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>33</b>
<b>1 Material biológico.....</b>	<b>35</b>
<b>1.1 Cepa bacteriana.....</b>	<b>35</b>
<b>1.2 Líneas celulares de eucariotas.....</b>	<b>35</b>
<b>1.3 Cepas de <i>Drosophila</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>2 Oligonucleótidos, vectores y construcciones.....</b>	<b>36</b>
<b>3 Enzimas, marcadores y sondas.....</b>	<b>38</b>
<b>4 Anticuerpos.....</b>	<b>39</b>
<b>5 Medios, aditivos, tampones y disoluciones.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Medios y aditivos para el cultivo bacteriano.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 Medios, tampones y aditivos para el cultivo de células eucariotas.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3 Tampones y disoluciones para la electroforesis en geles de agarosa.....</b>	<b>42</b>

<b>5.4 Tampones y disoluciones para geles SDS-PAGE y Western blot.....</b>	<b>42</b>
<b>5.5 Tampones para inmunofluorescencia.....</b>	<b>44</b>
<b>5.6 Tampones para el análisis de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH).....</b>	<b>44</b>
<b>5.6.1 Criosecciones.....</b>	<b>44</b>
<b>5.6.2 Espectrofotometría.....</b>	<b>45</b>
<b>5.7 Tampones para el análisis de la actividad hidratasa de la aconitasa.....</b>	<b>45</b>
<b>5.7.1 Tampones para el aislamiento de las proteínas mitocondriales.....</b>	<b>45</b>
<b>5.7.2 Análisis cuantitativo.....</b>	<b>46</b>
<b>5.7.3 Análisis en geles de acrilamida.....</b>	<b>46</b>
<b>5.8 Tampones para la medida del consumo de oxígeno de las mitocondrias.....</b>	<b>47</b>
<b>5.9 Tampones para la hibridación in situ y la detección inmunohistoquímica en embriones de D. melanogaster.....</b>	<b>48</b>
<b>6 Métodos moleculares.....</b>	<b>50</b>
<b>6.1 Determinación de la localización subcelular de la proteína frataxina.....</b>	<b>50</b>
<b>6.1.1 Obtención de la pauta de lectura del gen fh (ORF-fh).....</b>	<b>50</b>
<b>6.1.2 Clonación de la ORF-fh en el vector pCR2.1®-TOPO.....</b>	<b>51</b>
<b>6.1.2.1 Transformación.....</b>	<b>52</b>
<b>6.1.2.2 Cultivo de bacterias y extracción del ADN plasmídico.....</b>	<b>52</b>
<b>6.1.2.3 Secuenciación y análisis de secuencias.....</b>	<b>53</b>

<b>6.1.3 Subclonación de la ORF-fh en el vector pEGFP-N3.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1.3.1 Digestión.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1.3.2 Ligación.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1.3.3 Transformación, cultivo de bacterias, extracción del ADN plasmídico y secuenciación.....</b>	<b>55</b>
<b>6.1.4 Transfección del clon pEGFP-N3 en células eucariotas.....</b>	<b>55</b>
<b>6.1.5 Inmunofluorescencia.....</b>	<b>56</b>
<b>6.2 Obtención de moscas transgénicas para la mutagénesis estructural de fh por p-homing.....</b>	<b>57</b>
<b>6.2.1 Obtención de la construcción fh-Phoming.....</b>	<b>57</b>
<b>6.2.2 Obtención de individuos transgénicos para la construcción fh-Phoming.....</b>	<b>58</b>
<b>6.2.2.1 Preparación de la mezcla de inyección.....</b>	<b>58</b>
<b>6.2.2.2 Obtención de embriones.....</b>	<b>58</b>
<b>6.2.2.3 Preparación de la aguja y del aceite de microinyección.....</b>	<b>59</b>
<b>6.2.2.4 Montaje de los embriones (18°C).....</b>	<b>59</b>
<b>6.2.2.5 Desecado de los embriones (18°C).....</b>	<b>60</b>
<b>6.2.2.6 Microinyección de los embriones (18°C)...</b>	<b>60</b>
<b>6.2.2.7 Obtención de las líneas transformadas.....</b>	<b>60</b>
<b>6.2.3 Localización de las inserciones.....</b>	<b>61</b>
<b>6.2.3.1 PCR multiplex.....</b>	<b>62</b>
<b>6.2.3.2 PCR inversa.....</b>	<b>62</b>
<b>6.3 Obtención de moscas transgénicas portadoras del gen humano FXN.....</b>	<b>63</b>
<b>6.3.1 Obtención de la construcción FXN-pUAST.....</b>	<b>63</b>

<b>6.3.2 Obtención de individuos transgénicos portadores de la construcción FXN-pUAST.....</b>	<b>64</b>
<b>6.4 Obtención de mutantes funcionales por silenciamiento del gen fh y por sobreexpresión del gen FXN: El sistema UAS-GAL4.....</b>	<b>64</b>
<b>6.5 Análisis de la expresión de los genes fh y FXN.....</b>	<b>66</b>
<b>6.5.1 Western blot.....</b>	<b>66</b>
<b>6.5.1.1 Extracción de proteínas totales.....</b>	<b>66</b>
<b>6.5.1.2 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....</b>	<b>66</b>
<b>6.5.1.3 Revelado de las membranas.....</b>	<b>66</b>
<b>6.5.2 PCR cuantitativa.....</b>	<b>67</b>
<b>6.5.2.1 Obtención de ADNc para PCR cuantitativa.....</b>	<b>67</b>
<b>6.5.2.2 Reacción de PCR.....</b>	<b>67</b>
<b>6.5.3 Análisis de los resultados.....</b>	<b>69</b>

## **7. Métodos bioquímicos**

<b>7.1 Determinación de la actividad enzimática de la aconitasa. 71</b>	<b>71</b>
<b>7.1.1 Ensayo cuantitativo de la actividad hidratasa de la aconitasa.....</b>	<b>72</b>
<b>7.1.2 Ensayo cualitativo de la actividad hidratasa de la aconitasa.....</b>	<b>74</b>
<b>7.2 Determinación de la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa.....</b>	<b>74</b>
<b>7.2.1 Ensayo de la actividad SDH mediante tinción de criosecciones.....</b>	<b>76</b>
<b>7.2.2 Ensayo de la actividad SDH mediante espectrofotometría.....</b>	<b>76</b>
<b>7.3 Análisis de la respiración mitocondrial.....</b>	<b>78</b>

7.3.1 Bases de la medición del consumo de oxígeno.....	78
7.3.2 Obtención de mitocondrias intactas.....	84
7.3.3 Medición de la respiración mitocondrial.....	85
<b>8. Métodos citológicos e histológicos.....</b>	<b>86</b>
<b>8.1 Hibridación in situ con sondas de ARN.....</b>	<b>86</b>
8.1.1 Marcaje de sondas de ARN.....	86
8.1.2 Hibridación in situ en discos imaginales de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	87
<b>8.2 Inmunohistoquímica en embriones de <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>89</b>
8.2.1 Puesta de huevos.....	89
8.1.2 Fijación de los embriones.....	89
8.1.3 Detección inmunohistoquímica en embriones de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	90
<b>9. Métodos fisiológicos.....</b>	<b>90</b>
9.1 Test de supervivencia.....	90
9.2 Test de escalada.....	91
<b>Resultados.....</b>	<b>93</b>
<b>1. Localización subcelular de la proteína frataxina de <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>2. Estudio de la expresión de fh en discos imaginales.....</b>	<b>98</b>

<b>3. Utilización de la técnica P-homing para la mutagénesis del gen fh.....</b>	<b>100</b>
<b>4. Obtención de mutantes funcionales transitorios con reducción sistémica de frataxina.....</b>	<b>103</b>
<b>5. Análisis de la supervivencia y de la capacidad locomotora en los mutantes funcionales transitorios.....</b>	<b>106</b>
<b>5.1 Análisis de la capacidad locomotora.....</b>	<b>106</b>
<b>5.2 Análisis de la supervivencia.....</b>	<b>107</b>
<b>6. Análisis de las actividades de diferentes proteínas ferrosulfuradas en los mutantes funcionales transitorios.....</b>	<b>109</b>
<b>6.1 Análisis de la actividad Succinato deshidrogenasa.....</b>	<b>109</b>
<b>6.1.1 Análisis cualitativo de la actividad SDH.....</b>	<b>109</b>
<b>6.1.2 Análisis cuantitativo de la actividad SDH.....</b>	<b>111</b>
<b>6.1.2.1 Análisis de la actividad SDH en el adulto en condiciones de normoxia.....</b>	<b>111</b>
<b>6.1.2.2 Análisis de la actividad SDH en el adulto en condiciones de hiperoxia.....</b>	<b>115</b>
<b>6.2 Análisis de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa.....</b>	<b>117</b>
<b>6.2.1 Análisis de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa en condiciones de normoxia.....</b>	<b>118</b>
<b>6.2.2 Análisis de la actividad hidratasa de la enzima de la enzima aconitasa en condiciones de hiperoxia.....</b>	<b>121</b>
<b>6.3 Análisis de la respiración mitocondrial.....</b>	<b>123</b>
<b>6.3.1 Análisis de la respiración en condiciones de normoxia.....</b>	<b>124</b>

6.3.1.1	<i>Determinación de la respiración vía el complejo NADH deshidrogenasa o complejo I.....</i>	124
6.3.1.2	<i>Determinación de la respiración vía el complejo SDH o complejo II.....</i>	127
6.3.1.3	<i>Determinación de la respiración vía el ciclo de Krebs.....</i>	129
6.3.2	<i>Análisis de la respiración en condiciones de hiperoxia.....</i>	132
6.3.2.1	<i>Determinación de la respiración vía el complejo NADH deshidrogenasa o complejo I.....</i>	132
6.3.2.2	<i>Determinación de la respiración vía el complejo SDH o complejo II.....</i>	135
6.3.2.3	<i>Determinación de la respiración vía el ciclo de Krebs.....</i>	137
7.	<i>Obtención de mutantes funcionales transitorios por sobreexpresión del gen FXN.....</i>	141
7.1	<i>Obtención de las construcciones UAS del gen FXN.....</i>	141
7.2	<i>Obtención de las líneas transgénicas y localización de los transgenes.....</i>	141
7.3	<i>Comprobación del funcionamiento del sistema de sobreexpresión del gen FXN.....</i>	142
7.3.1	<i>PCR cuantitativa.....</i>	142
7.3.2	<i>Western blot.....</i>	144
7.4	<i>Análisis de los fenotipos obtenidos con la sobreexpresión del gen FXN.....</i>	145
7.4.1	<i>Fenotipos mutantes obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión generalizada.....</i>	146
7.4.1.1	<i>Alteraciones en el Sistema muscular y el corazón.....</i>	147
7.4.1.2	<i>Alteraciones en el Sistema nervioso.....</i>	148



<b>7.4.2 Fenotipos mutantes obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión específica en el sistema muscular y corazón.....</b>	<b>150</b>
<b>7.4.3 Fenotipos mutantes obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión específica en el sistema nervioso... </b>	<b>153</b>
<b>7.4.4 Análisis de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa.....</b>	<b>154</b>

**Discusión..... 157**

<b>1. Obtención de un modelo en Drosophila para el estudio de la ataxia de Friedreich.....</b>	<b>159</b>
<b>1.1 La reducción generalizada de la expresión de fh afecta a la supervivencia y a la capacidad de escalada, especialmente en condiciones de estrés oxidativo.....</b>	<b>161</b>
<b>1.2 La reducción moderada de la expresión de fh no afecta a la actividad de la enzima SDH.....</b>	<b>162</b>
<b>1.3 La reducción moderada de la expresión de fh afecta a la actividad de la aconitasa en condiciones de estrés oxidativo.....</b>	<b>164</b>
<b>1.4 La reducción de la expresión de fh afectaría, en primer lugar, a la actividad de la aconitasa y, posteriormente, a la cadena de transporte de electrones.....</b>	<b>166</b>
<b>1.5 El estrés oxidativo juega un papel clave en el desarrollo de la ataxia de Friedreich.....</b>	<b>167</b>
<b>2. La sobreexpresión del gen FXN produce un fenotipo muy similar al de la sobreexpresión y la interferencia del gen fh.....</b>	<b>169</b>

**Conclusiones..... 175**

**Bibliografía..... 177**

# *Abreviaturas*

## ***Abreviaturas***

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ABC</b>	Complejo avidina-biotina peroxidasa
<b>ADN<sub>c</sub></b>	ADN copia
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AF</b>	Ataxia de Friedreich
<b>Arh1</b>	Ferredoxina reductasa
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARN<sub>i</sub></b>	ARN de interferencia
<b>ARN<sub>m</sub></b>	ARN mensajero
<b>ARN<sub>t</sub></b>	ARN de transferencia
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BACE</b>	Sitio β del enzima de corte APP
<b>Cat</b>	Catalasa
<b>CHO-K1</b>	Células de Ovario de Hámster
<b>Cu-ZnSOD</b>	Superóxido dismutasa de cobre-zinc
<b><i>CyaY</i></b>	Homólogo de la frataxina en <i>Escherichia coli</i>
<b>DA3</b>	Dorsal Agudo 3 de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobencidina
<b>ddNTPs</b>	didesoxinucleótidos
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos
<b>DO3</b>	Dorsal Oblicuo 3 de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>DO4</b>	Dorsal Oblicuo 4 de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FAD</b>	Dinucleótido de la flavina-adenina
<b>FCS</b>	Suero bovino fetal
<b>Fe-S</b>	Hierro-Azufre
<b><i>fh</i></b>	Homólogo de la frataxina en <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>FMR-1</b>	Retraso mental X frágil 1
<b><i>frh-1</i></b>	Homólogo de la frataxina en <i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>GAL4</b>	Factor de transcripción de levadura del sistema UAS-GAL4
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GMC</b>	Células Madre Ganglionares
<b>Grx5</b>	Glutarredoxina monotiol
<b>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>	Agua destilada
<b>Haem 15</b>	Ferroquelatasa de levadura
<b>HDACs</b>	Histonas deacetilasas

<b>INT</b>	Sal de tetrazolio
<b>IRP-1</b>	Proteína reguladora del hierro-1
<b>Isa1/2</b>	Proteínas específicas de maduración de centros Fe-S tipo aconitasa
<b>ISC</b>	" <i>Iron-Sulfur Cluster</i> ", centros Fe-S
<b>Isu1/2</b>	Proteína de la maquinaria de la formación de centros Fe-S
<b>Jac1</b>	Chaperona de la formación de centros Fe-S
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>LT1</b>	Músculo Lateral Transversal 1 de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>LT2</b>	Músculo Lateral Transversal 2 de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>LT3</b>	Músculo Lateral Transversal 3 de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>mAb</b>	Anticuerpos monoclonales
<b>Mge1</b>	Chaperona de la formación de centros Fe-S
<b>MnSOD</b>	Superóxido dismutasa de manganeso
<b>MnTBAP</b>	Mn(III)tetra(4-ácido benzoico)porfirina clorhídrico
<b>Mrs 3</b>	Proteína transportadora a la mitocondria 3
<b>Mrs 4</b>	Proteína transportadora a la mitocondria 4
<b>MtF</b>	Ferritina mitcondrial
<b>MTT</b>	Bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NADH</b>	Nicotiamina-Adenina Dinucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotiamida-Adenina Dinucleótido fosfato
<b>Nfs-1</b>	Cisteína desulfurasa
<b>Nitro-BT</b>	Nitro azul de tetrazolio
<b>OMIM</b>	Online Mendelian Inheritance in Man
<b>OXPPOS</b>	Cadena de oxidación-fosforilación
<b>PAR-1</b>	Prader-Willi/Angelman región 1
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>P<sub>i</sub></b>	Fosfato inorgánico
<b>pmf</b>	Potencial de membrana
<b>PMSF</b>	Fenacina metosulfato
<b>PolyQ</b>	Poliglutaminas
<b>PPIX</b>	Protoporfirina IX
<b>Q</b>	Ubiquinona
<b>QH<sub>2</sub></b>	Ubiquinol
<b>ROS</b>	Especies Reactivas del Oxígeno
<b>RT-PCR</b>	PCR de Retrotranscripción
<b>S2</b>	Células Schneider 2 de <i>Drosophila</i>
<b>SCA</b>	Ataxias dominantes espinocerebelares
<b>SDH</b>	Succinato deshidrogenasa
<b>SDS</b>	Sodio dodecilsulfato

<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico
<b>Sod1</b>	Superóxido dismutasa 1
<b>Sod2</b>	Superóxido dismutasa 2
<b>Ssq1</b>	Chaperona de la formación de centros Fe-S
<b>UAS</b>	Upstream Activation Sequence
<b>UAS-GAL4</b>	Sistema de expresión ectópica usado en <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>X-fosfato</b>	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-fosfato
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranoside
<b>Yah1</b>	Ferredoxina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Yfh1</b>	Homólogo de la frataxina en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

# *Introducción*

## **1. La ataxia de Friedreich**

La ataxia de Friedreich (OMIM 229300) es la ataxia hereditaria más común en la población caucásica, con una prevalencia de aproximadamente 1 cada 40.000 individuos. Se trata de un desorden neurodegenerativo con herencia autosómica recesiva. Fue Nicholas Friedreich quién, a mediados del siglo XIX, describió las principales características clínicas y patológicas de la enfermedad, incluyendo la degeneración de los cordones posteriores en la espina dorsal, la cual contiene axones de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (Friedreich, 1863a y b). Más de cien años después, en 1996, se dio un gran paso adelante con la identificación del gen responsable de la enfermedad (el gen *FXN*). En los últimos años se han producido importantes progresos en el esclarecimiento de la función de la frataxina, proteína codificada por *FXN*, que se localiza en la mitocondria y que está involucrada en el metabolismo del hierro.

### **1.1 Características clínicas de la ataxia de Friedreich**

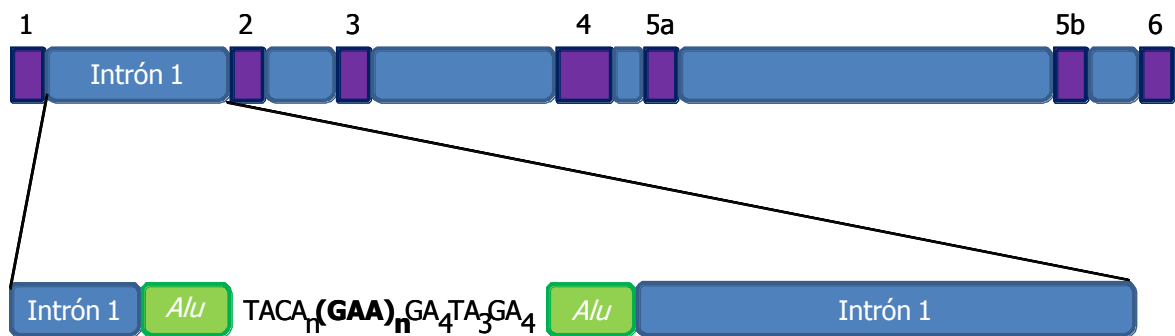
La ataxia de Friedreich (AF) se caracteriza por ataxia progresiva en las extremidades superiores e inferiores, arreflexia en todas las extremidades, pérdida sensorial con evidencia electrofisiológica de neuropatología de axones sensoriales, en los primeros 5 años de la manifestación de la enfermedad y debilidad muscular. Otros síntomas son la disartria y la pérdida del sentido de la posición distal (Harding, 1981). En muchos casos también se manifiestan deformidades esqueléticas y cardiomiopatías, en alrededor del 30% de los afectados se declara intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus y en muy baja frecuencia se produce pérdida de agudeza visual y sordera (Durr *et al.* 1996). La aparición de los síntomas ocurre normalmente en la pubertad y muchos de los enfermos acaban confinados en una silla de ruedas. La causa más frecuente de muerte en enfermos de AF es el fallo miocárdico. Sin embargo, la manifestación clínica de la enfermedad es bastante variable en la edad de aparición y en la gravedad.

A nivel bioquímico, se ha descrito la acumulación de hierro en algunos tejidos, especialmente el corazón de los pacientes con AF (Bradley *et al.* 2000). Además, también se ha encontrado deficiencia en la actividad de las subunidades que contienen los centros hierro-azufre de los complejos respiratorios I, II y III, y en la aconitasa, enzima cuya actividad también recae en un centro hierro-azufre. Estas alteraciones se han relacionado con la acumulación de hierro mitocondrial, lo que ha llevado a sugerir la hipótesis de que la frataxina juega un papel importante en la regulación del metabolismo del hierro en la mitocondria (Rötig *et al.* 1997).

### **1.2 El gen *FXN***

El gen responsable de la ataxia de Friedreich (*FXN*) fue localizado mediante análisis de ligamiento en la región cromosómica 9q13-q21.1 (Chamberlain *et al.* 1988a y b). Su tamaño es de 85 kb y consta de siete

exones, de los cuales los cinco primeros codifican para la proteína frataxina (figura I1) (Campuzano *et al.* 1996).

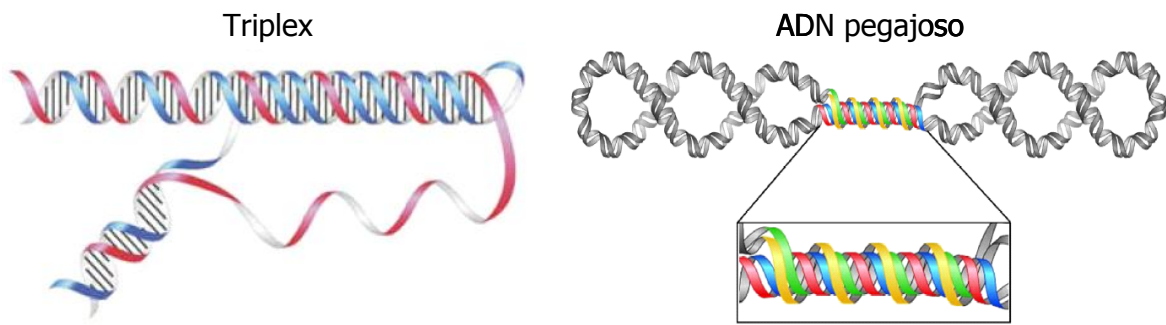


**Figura I1.** Estructura del gen *FXN* y localización de la repetición GAA en la secuencia *Alu* situada en el primer intrón. Los exones aparecen numerados y en color morado. Los intrones se presentan como rectángulos azules.

La mayoría de los alelos mutados contienen una expansión del triplete GAA que se encuentra en medio de una secuencia *Alu* en el primer intrón del gen (Campuzano *et al.* 1996). Los alelos normales tienen alrededor de 5 a 30 repeticiones del triplete GAA, mientras que los alelos mutados pueden contener desde 70 hasta más de 1000 repeticiones (Al-Mahdawi *et al.* 2006). Estas expansiones interfieren con la actividad transcripcional del gen, reduciendo los niveles de ARNm y provocando, por lo tanto, una pérdida de función génica. Se han descrito tres mecanismos que pueden explicar el silenciamiento transcripcional producido por las repeticiones: la formación de estructuras del tipo ADN no-B (triple hélice y ADN pegajoso), la formación de híbridos específicos ADN/ARN del tipo  $d(\text{TTC})_n \cdot r(\text{GAA})_n$  y la formación de heterocromatina.

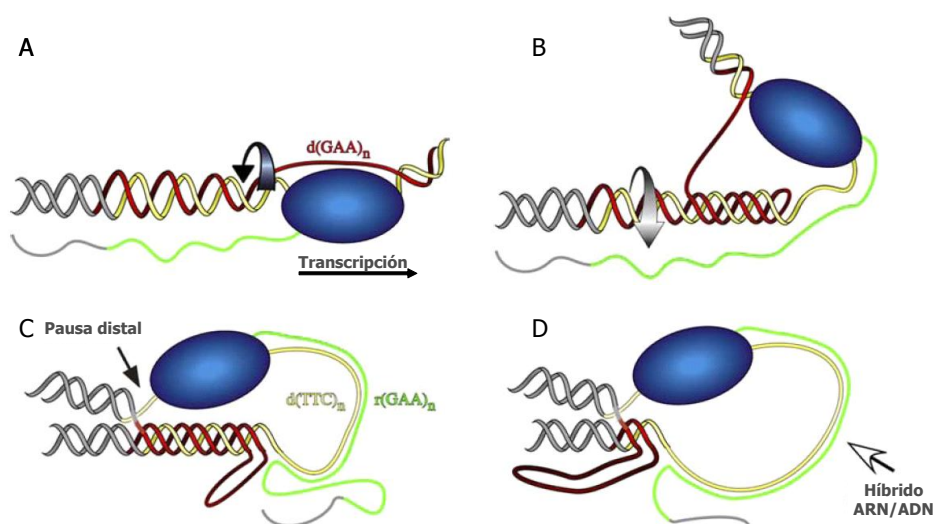
El ADN pegajoso es una triple hélice larga (figura I2), en este caso con la secuencia  $\text{GAA} \cdot \text{GAA} \cdot \text{TTC}$ , que se forma dentro de la molécula de ADN apareándose entre sí parejas de repeticiones  $\text{GAA} \cdot \text{TTC}$  (Son *et al.* 2006). Esta interacción es tan estable que se necesitan altas temperaturas (80°C) y quelantes de iones metálicos divalentes (como el EDTA) para romperla. El efecto de estas interacciones intramoleculares es la inhibición de muchos procesos biológicos como la transcripción, la replicación, la reparación e incluso la recombinación. Estudios realizados *in vitro* sobre el comportamiento de estas estructuras en la transcripción, demostraron su efecto inhibitorio de la síntesis del ARNm, como ya se conocía de otros tripletes (Grabczyk *et al.* 1995, Bidichandani *et al.* 1998, Vasquez *et al.* 1998, Grabczyk *et al.* 2000 y Grabczyk *et al.* 2007). El mecanismo molecular por el que el ADN pegajoso impide la transcripción consiste en el secuestro de las ARN polimerasas por unión directa con el complejo de ADN (Vasquez *et al.* 1998; Sakamoto *et al.* 2001).





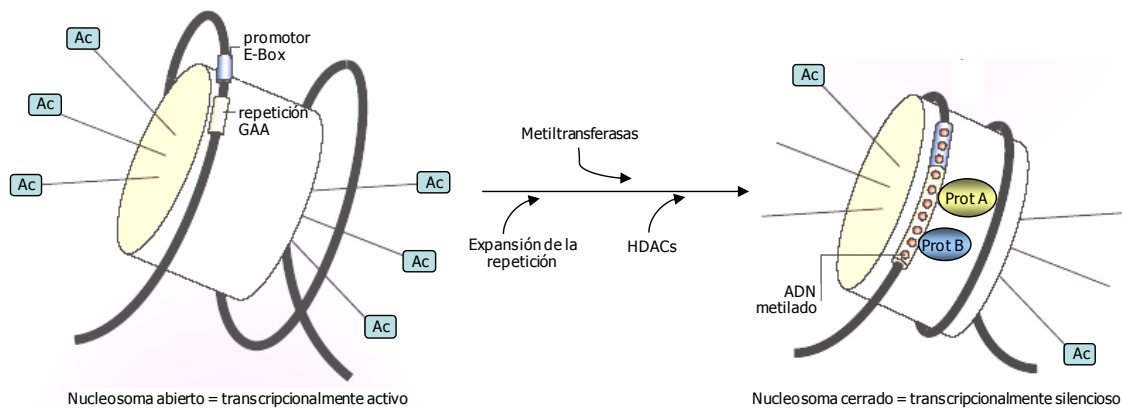
**Figura 12.** Modelos de ADN en triple hélice (triplex) y ADN pegajoso. (Figura adaptada de Wells, 2008).

También se ha detectado la formación de híbridos de ARN/ADN estables cuando se transcribe la secuencia GAA·TTC del gen *FXN* (Grabczyk *et al.* 2007), de tal forma que dichas estructuras secuestran las ARN polimerasas. La formación de estos híbridos ARN/ADN es una propiedad intrínseca de la transcripción de las repeticiones largas de GAA·TTC. La figura I3 muestra el modelo de actuación de estos híbridos. Inicialmente, la cadena de ADN con la repetición (GAA)<sub>n</sub> sirve como molde para la síntesis del ARN formando así el híbrido de ARN/ADN con una longitud moderada. Debido a la estabilidad del híbrido, el triplete de ADN es desplazado detrás de la horquilla de crecimiento del complejo de transcripción dando mayor longitud al híbrido ARN/ADN. El superenrollamiento negativo detrás de la horquilla de la ARN polimerasa facilita este proceso desde el punto de vista topológico y la secuencia poli R·Y de la repetición permite estas interacciones. La formación de estos híbridos genera un lugar de parada de la transcripción en las secuencias GAA.



**Figura 13.** Formación del híbrido ARN/ADN en la repetición GAA·TTC. La cadena de purinas (GAA o R) de la repetición está en rojo, la cadena de pirimidinas (TTC o Y) está en amarillo, y el ADN flanqueante está en gris. (Figura adaptada de Wells, 2008).

Una tercera alternativa para explicar el silenciamiento transcripcional del gen *FXN* se basa en que las secuencias de ADN repetitivo son más propensas a empaquetarse dando estructuras heterocromáticas inaccesibles para la transcripción, que provocan silenciamiento (Wang *et al.* 1994 y Saveliev *et al.* 2003). Los triplex inhiben el ensamblaje de los nucleosomas, con lo que aumenta la accesibilidad de diferentes maquinarias proteicas a esa zona, como las histonas desacetilasas (HDACs) o las metiltransferasas, produciendo mayor empaquetamiento (figura I4). Con esta observación y los hechos conocidos de que las regiones adyacentes a la región de la expansión, como la zona promotora E-Box, están más metiladas en pacientes que en controles, y la existencia de un nivel más alto de histonas H3 dimetiladas en la lisina 9 (Greene *et al.* 2007) se ha dado una explicación al silenciamiento transcripcional del gen *FXN*.



**Figura I4.** Inactivación del promotor y represión transcripcional del gen *FXN*. La expansión GAA media una hipermetilación de la región que recluta proteínas de unión a ADN metilado. Estas proteínas también reclutan enzimas modificadoras de histonas como las HDACs que reprimen la transcripción. Ac, acetilación. Prot A y B, proteínas de unión a ADN metilado. (Figura adaptada de Di Prospero *et al.* 2005).

## 1.3 La proteína frataxina

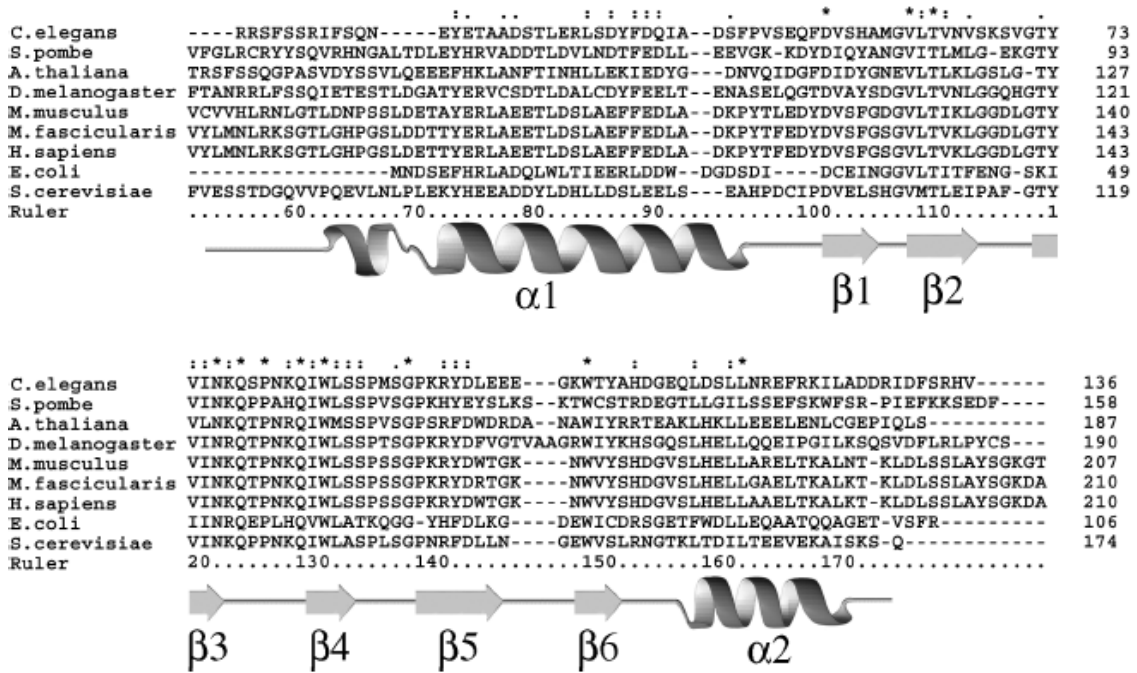
### 1.3.1 Localización y estructura de frataxina

La frataxina es una proteína muy conservada que se encuentra desde procariotas a eucariotas. En humanos, la frataxina es una proteína de 210 aminoácidos codificada en el núcleo, aunque los resultados obtenidos mediante inmunocitofluorescencia muestran que la frataxina se localiza predominantemente dentro de la mitocondria, asociada a la membrana interna, las crestas y a la matriz mitocondrial (Gibson *et al.* 1996, Campuzano *et al.* 1997 y Priller *et al.* 1997).

En eucariotas, se produce un precursor de frataxina que contiene, en la región N-terminal, un péptido señal de importación a la matriz mitocondrial (Babcock *et al.* 1997 y Knight *et al.* 1998). Normalmente, las proteínas que se dirigen a la mitocondria suelen ser procesadas en un solo paso, pero existen algunas proteínas, como las proteínas de Rieske con centros Fe-S, la subunidad 9 de la ATPasa de *Neurospora crassa* (Branda *et al.* 1999a, Cavadini *et al.* 2000 y Gordon *et al.* 2001) y la frataxina (Branda *et al.* 1999b y Gordon *et al.* 2001), donde este procesamiento se lleva a cabo en dos pasos. En el primero, una peptidasa mitocondrial elimina los 20 residuos de la zona N-terminal (dominio I) de la proteína, formando un intermediario. Este intermediario es procesado de nuevo por la peptidasa para eliminar los siguientes 31 aminoácidos (dominio II), formando así la proteína madura. Estos dos dominios son requeridos para el paso de la proteína al interior de la mitocondria. Sin embargo, el procesamiento de la región N-terminal de la frataxina humana continua debatiéndose, ya que mientras el grupo de Cavadini (Cavadini *et al.* 2000) propone que éste se produce en dos pasos, el grupo de Gordon (Gordon *et al.* 2001) sólo ha podido identificar un único paso de procesamiento.

La estructura de frataxina es extremadamente similar desde bacterias a humanos (Cho *et al.* 2000, Dhe-Paganon *et al.* 2000, Lee *et al.* 2000, Musco *et al.* 2000, He *et al.* 2004 y Nair *et al.* 2004). Frataxina tiene un único pliegue que combina dos hélices  $\alpha$  formando un plano, cinco hojas  $\beta$  antiparalelas que constituyen un segundo plano de la proteína y una sexta hoja  $\beta$  (junto con una séptima en humanos) que intersecciona con los dos planos anteriores dando un motivo con estructura planar en sándwich  $\alpha$ - $\beta$ . La topología general de frataxina es  $\alpha_1\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\beta_5\beta_6(\beta_7)\alpha_2$ . La gran similitud estructural entre los diferentes ortólogos de frataxina se debe a que estas proteínas comparten un alto grado de similitud en la secuencia aminoacídica. La identidad de secuencia aminoacídica entre Yfh1 (frataxina de levadura) y CyaY (frataxina de *E. coli*) o HsFtx (frataxina humana) es del 28,1% y 37,8% respectivamente, mientras las respectivas similitudes de secuencia son del 59,8% y 65,0%. Además, existe una gran número de aminoácidos conservados en la zona N-terminal de la proteína (figura I5).

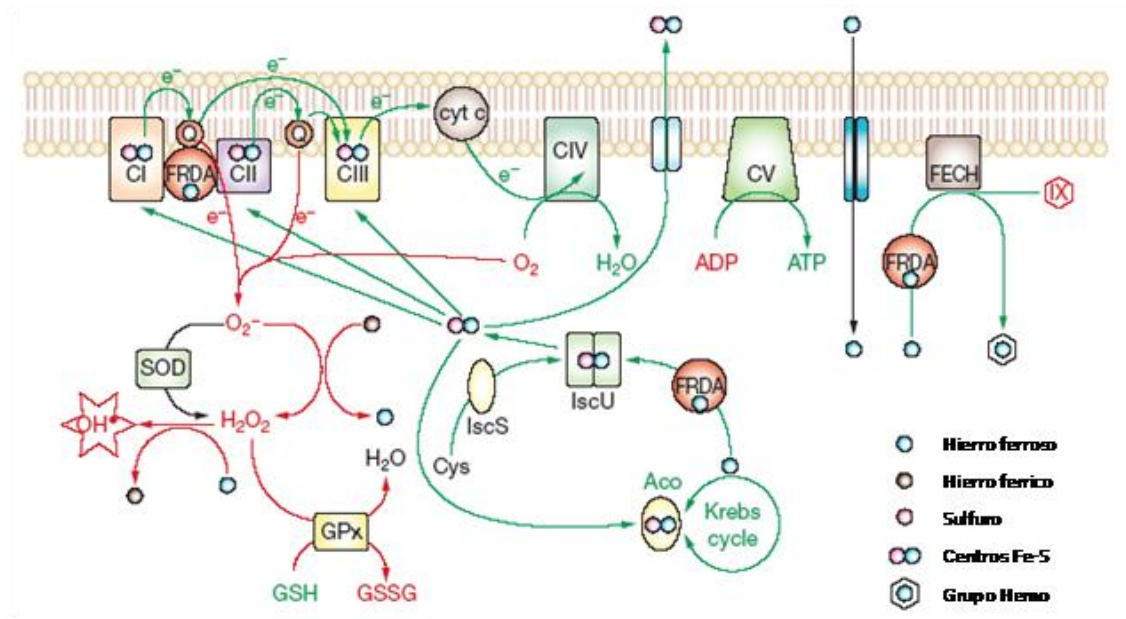
C. elegans	M-----LSTILRNNFV-----	11
S. pombe	-----MQSLRAAFRRRTPIFLKPYEFST-----N	24
A. thaliana	-----MATASRFLLRKLPRFLKLSPTLL-----R	58
D. melanogaster	MFA-GRLMVRIVGRACLATMG-----RWSKPOAHASQVILPSTPAIAAV-----AIQCEE	50
M. musculus	MWAFGGRAAVGLLPR-TASRASAWVGNP-RWREPIVTCGRRGLHVTVNAGAT-RHAHLNLHYL-QILNIKKQS	69
M. fascicularis	MWTFGRRVAVAGLLASPSPAQAQTLTRAP-RLAELAQLCSRRGLRTGINATRTHHTSSNLRGLNQIRNVKRQS	72
H. sapiens	MWTLGRRVAVAGLLASPSPAQAQTLTRVP-RPAELAPLCGRRGLRTDIDATCTPRRASSNQRLNQIWNVKKQS	72
E. coli	-----	
S. cerevisiae	---MIKRSLASLVRVSSVMGRRYMIAAAGGERARFPCAVTNKKNHTVN-----TFQKR	50
Ruler	.....	50



**Figura 15.** Alineamiento con el programa ClustalX de los ortólogos de frataxina caracterizados. En la parte inferior se representa su estructura. (Figura adaptada de Bencze *et al.* 2006). "\*" indica que dicha posición incluye un único residuo conservado. ":" indica sustituciones o reemplazamientos conservativos. "." indica sustituciones o reemplazamientos no conservativos (entre diferentes grupos de aminoácidos).

### 1.3.2 Función de frataxina

Se ha propuesto que frataxina puede participar en al menos cinco funciones diferentes (figura I6): (1) como chaperona en la formación del grupo hemo celular y de centros hierro-azufre, (2) como proteína de almacenaje de hierro en condiciones de gran cantidad de hierro en la célula, (3) como chaperona que repara y/o protege del daño oxidativo al centro hierro-azufre de la aconitasa, (4) como factor que controla el estrés oxidativo celular moderando la concentración de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y finalmente, (5) como partícipe activo en la vía de conversión de la energía y la fosforilación oxidativa. Estas funciones no son necesariamente excluyentes, pero resulta llamativo que una única proteína pueda controlar directamente tantas vías biológicas dentro de la célula.



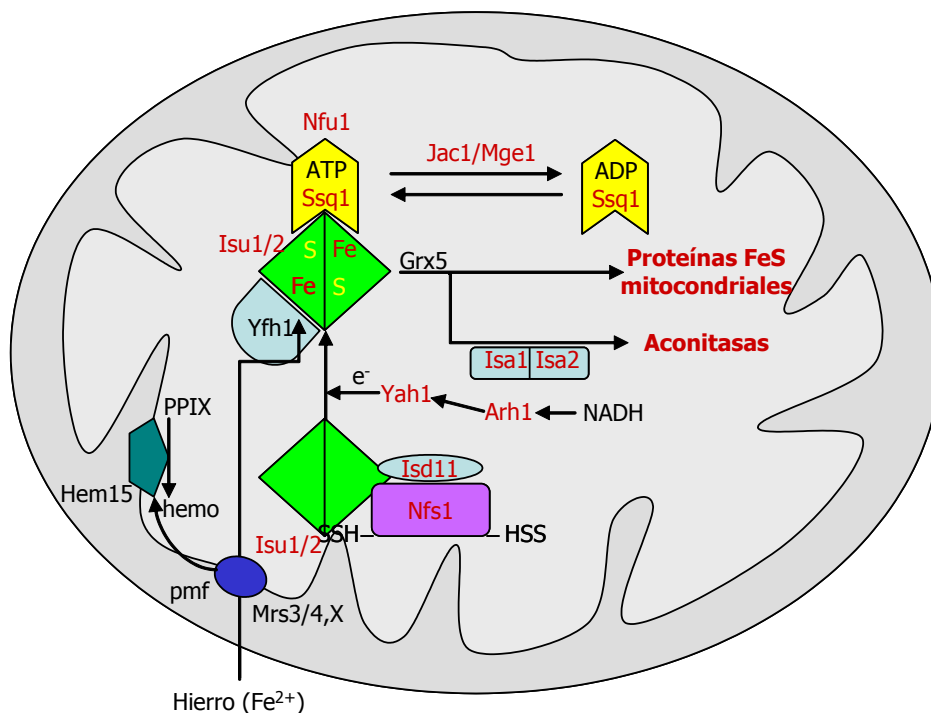
**Figura I6.** Funciones postuladas para la frataxina y producción de estrés oxidativo en la ataxia de Friedreich. Las flechas verdes indican moléculas y rutas con actividad reducida mientras que las flechas rojas indican moléculas y rutas con actividad aumentada en condiciones de deficiencia de frataxina. (Figura adaptada de Pandolfo 2008)

### 1.3.2.1 Frataxina como chaperona en la formación de centros FeS y del grupo hemo

Los centros hierro-azufre (Fe-S) son los grupos prostéticos más antiguos y complejos descritos en biología. Sus funciones abarcan desde el transporte de electrones, pasando por la catálisis, la regulación génica y el almacenamiento de hierro (Chen *et al.* 2004). En procariontes existen tres vías diferentes e intercambiables para producir estos centros, siendo la más importante la que usa la maquinaria de ensamblaje ISC ("iron-sulfur cluster").

La mitocondria de eucariotas, centro principal de producción de centros Fe-S, tan sólo utiliza la vía ortóloga de la maquinaria ISC para el ensamblaje de dichos centros. Esta vía está muy bien caracterizada en levadura (figura I7). En este organismo, la formación de centros Fe-S comienza con la liberación de sulfuro por la cisteína desulfurasa (Nfs1) (Kispal *et al.* 1999). El sulfuro se libera de una molécula de cisteína libre, que se convierte en alanina, para generar un enlace persulfito (-SSH) en un residuo de cisteína muy conservado en la proteína Nfs1. Ésta forma un complejo con la proteína Isd11, de la cual no se conoce su función exacta, pero parece ser que da estabilidad a la proteína Nfs1 ya que en su ausencia Nfs1 es degradada (Adam *et al.* 2006 y Wiedemann *et al.* 2006). Se cree que la frataxina actúa en la producción de centros Fe-S, jugando un papel directo en su ensamblaje. Esta función para la frataxina fue sugerida al determinarse que los pacientes con ataxia de Friedreich mostraban deficiencia en estos centros (Rötig *et al.* 1997), y fue respaldada por los resultados obtenidos con un ratón "knockout" que mostraba un fenotipo

compatible con la enfermedad (Puccio *et al.* 2001). Recientemente se ha demostrado para la proteína CyaY en bacterias (Vivas *et al.* 2006). Pero las pruebas más directas que apoyan esta idea vienen de los estudios con *Saccharomyces cerevisiae*. En la levadura, la supresión de Yfh1 da como resultado deficiencia en la respiración, acumulación de hierro mitocondrial y reducción de la actividad de los enzimas con centros Fe-S (Chen *et al.* 2002). Además, se ha demostrado una interacción directa entre la frataxina y las proteínas del sistema de ensamblaje (Muhlenhoff *et al.* 2003 y Ramazzotti *et al.* 2004) dependiente de hierro (Gerber *et al.* 2003). Todo esto apoya la idea del papel directo de frataxina en la formación de centros Fe-S.



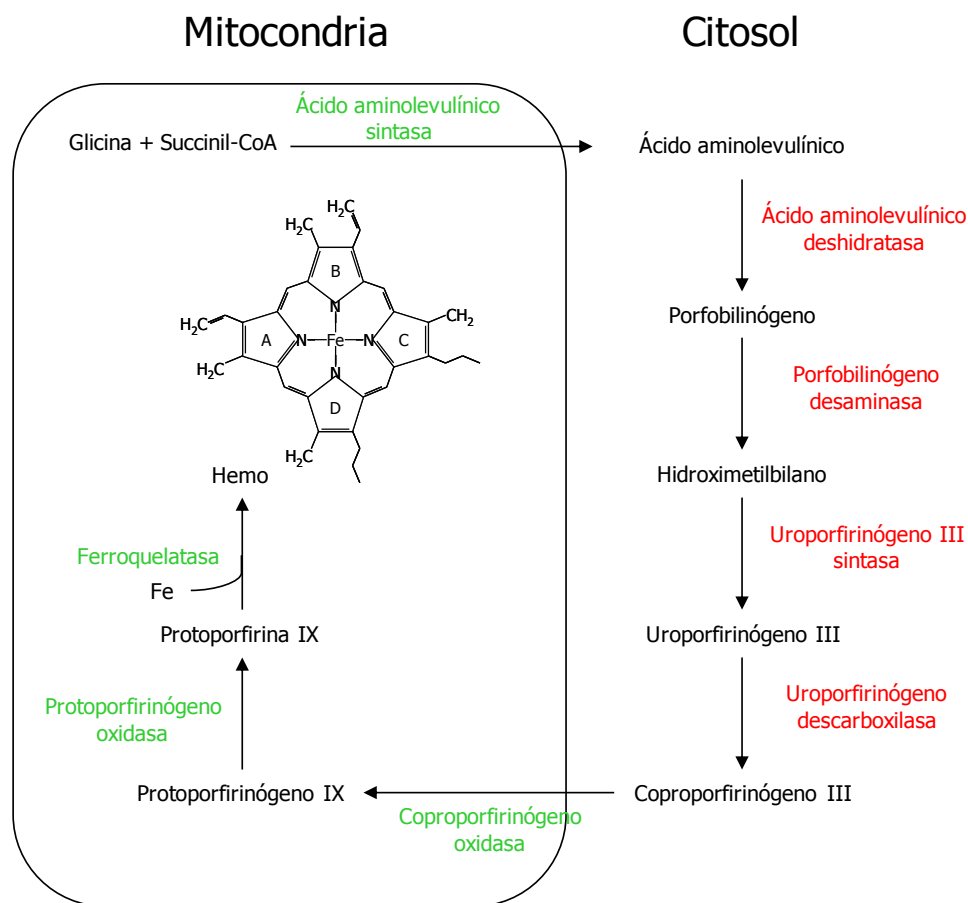
**Figura 17.** Esquema de un modelo de la producción de centros hierro-azufre en la mitocondria de levaduras. La introducción de hierro ferroso se realiza mediante el potencial de membrana (pmf) facilitada por proteínas transportadoras (Mrs3 y 4) y otras no conocidas (X). Este hierro ferroso es usado para la síntesis de grupos hemo a partir de protoporfirina IX (PPIX) y mediante la ferroquelatasa (Hem15) y para la biogénesis de los centros Fe/S de las diferentes proteínas ferrosulfuradas. Complejo cisteína desulfurasa (Nfs1/Isd11), proteína de soporte (Isu1/2), ferredoxina reductasa (Arh1), ferredoxina (Yah1), frataxina (Yfh1), diferentes chaperonas (Ssq1, Jac1 y Mge1), glutarredoxina monotiol (Grx5), proteínas específicas para la maduración de centros Fe/S tipo aconitasa (Isa1/2), otro tipo cisteína desulfurasa (Nfs1) y Nfu1 (función relacionada con la formación de centros Fe/S pero desconocida). (Figura adaptada de Lill *et al.* 2006).

Sin embargo, otros estudios proponen que la frataxina no es tan esencial para la formación de centros Fe-S, sino que tan sólo mejora la eficiencia del ensamblaje de dichos centros. Estudios recientes en levadura y humanos muestran que la frataxina se une con una gran afinidad a la proteína Isu1/2 y estimula la producción de centros Fe-S (Muhlenhoff *et al.* 2002, Yoon *et al.*

2003). El hecho de que la frataxina sea una proteína de unión a hierro, que se une fuertemente al complejo ISU y que estimule el ensamblaje de los centros Fe-S, hace más que probable que la frataxina pueda actuar como chaperona que aporta el hierro necesario para el ensamblaje.

Por lo que respecta a la ruta de la biosíntesis del grupo hemo (figura I8), diferentes autores indican que la frataxina actuaría como una chaperona que aportaría el hierro ferroso a la ferroquelatasa, promoviendo así la biosíntesis del grupo hemo de forma indirecta.

Así, en un principio, se vio que en los mutantes de levadura nulos para la frataxina, existía una deficiencia en la actividad de la citocromo *c* oxidasa, así como una deficiencia importante en los citocromos *b*, *c* y (*a+a<sub>3</sub>*) (Foury *et al.* 1997 y Lesuisse *et al.* 2003) y que al añadir una copia del gen de la frataxina de levaduras (Yfh1) se recuperaba la actividad del citocromo (Lesuisse *et al.* 2003). Además, se comprobó que en estas células los niveles de ferroquelatasa eran menores que en células normales, y que no se corregía este defecto aún añadiendo más copias del gen de la ferroquelatasa, probando así que el hierro no se encontraba disponible para la formación del grupo hemo, en las células con falta de frataxina.



**Figura I8.** Esquema de la ruta biosintética del grupo hemo. Las enzimas mitocondriales están indicadas en color verde y las citosólicas en rojo.



Por otra parte, se ha comprobado que la frataxina interacciona con la ferroquelatasa en una proporción de un monómero de frataxina frente a un dímero de ferroquelatasa (Yoon *et al.* 2004). En levadura, Yfh1 interacciona con el dímero de ferroquelatasa de levadura a través de las hélices  $\alpha_1\alpha_2$  altamente conservadas, y el centro de unión al hierro de la ferroquelatasa (Bencze *et al.* 2006).

### **1.3.2.2 Frataxina como proteína de almacenamiento de hierro**

La primera aproximación realizada al hecho de que la frataxina era una proteína de unión de hierro, se llevó a cabo en levadura, donde se pudo identificar que frataxina unía hierro directamente (Adamec *et al.* 2000). Esto fue confirmado posteriormente en los ortólogos de humanos y bacterias (Adinolfi *et al.* 2002, Cavadini *et al.* 2002, Yoon *et al.* 2003, Bou-Abdallah *et al.* 2004, Yoon *et al.* 2004 y Cook *et al.* 2006). Tanto Yfh1 (Gakh *et al.* 2002), como CyaY (Adinolfi *et al.* 2002) y HsFtx expresadas en *E. coli* (Cavadini *et al.* 2002), forman homooligómeros en condiciones aeróbicas, a baja concentración de sales y en presencia de hierro. En levadura, la estequiometría entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y la frataxina determina que ésta forma progresivamente mayores homooligómeros, empezando por la unidad básica que es el trímero de frataxina, formando posteriormente hexámeros, dodecámeros, 24-meros y finalmente un agregado esférico de proteínas de 48-meros muy parecido a la ferritina (proteína principal de almacenamiento de hierro de la célula). Esta capacidad de homooligomerización de la frataxina se la confieren diferentes residuos ácidos de las regiones  $\alpha_1\beta_1$ . La mutación de dichos residuos conlleva una falta de homooligomerización en la frataxina de levadura (Adinolfi *et al.* 2002). En la frataxina de humanos, gran parte de su longitud total (del residuo 56 al 210) tiene capacidad de auto-ensamblarse en ausencia de hierro; sin embargo, al eliminar los 22 residuos finales de la región  $N_t$  se elimina esta capacidad.

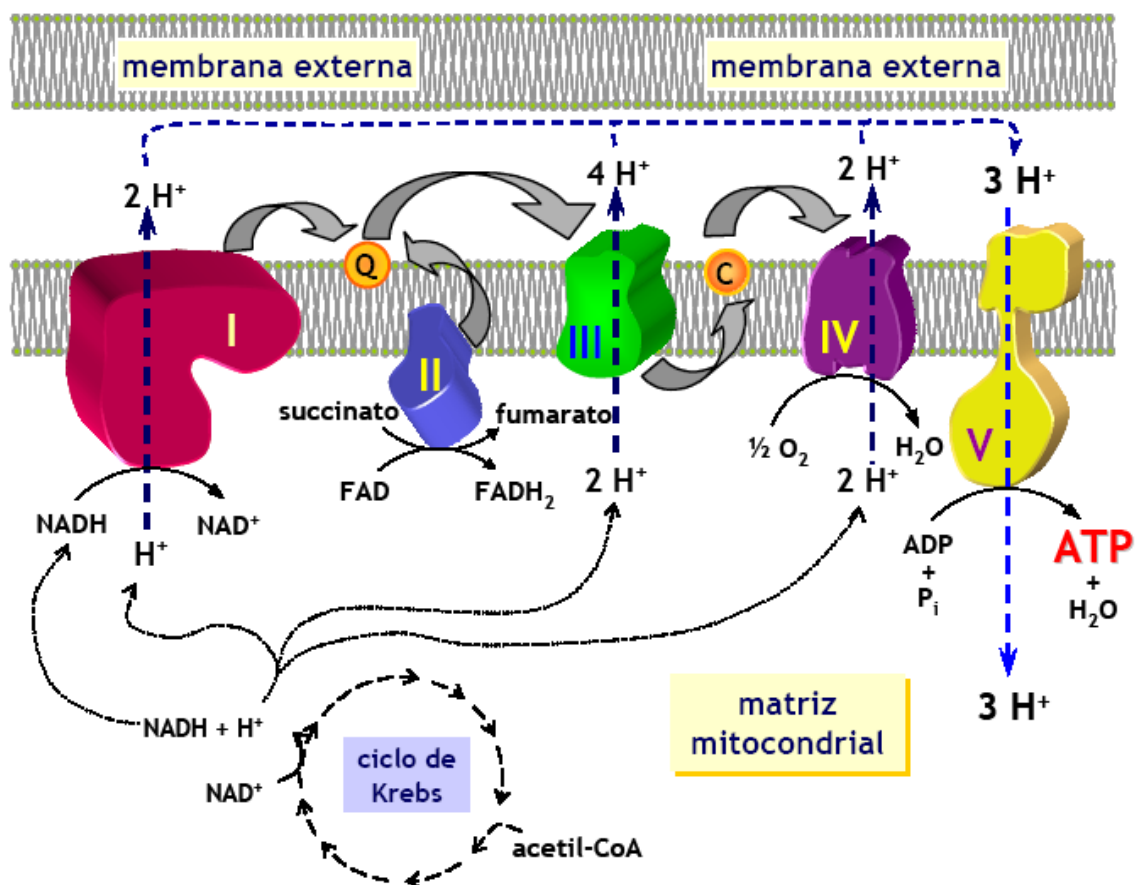
Existen similitudes funcionales entre los oligómeros de frataxina y los formados por la ferritina mitocondrial (MtF). Ésta es una proteína de almacenamiento de hierro en eucariotas. En humanos, esta proteína de 22 kDa, está codificada por un gen sin intrones, situado en la región 5q23.1. Su expresión está restringida a los tejidos con gran número de mitocondrias, a diferencia de la frataxina cuya expresión es ubicua. Existen datos que apoyan que la inducción de la expresión de MtF en ciertos tejidos se da sólo bajo condiciones de estrés (Levi *et al.* 2004). De hecho, su sobreexpresión en células normales da como resultado la privación de hierro citosólico y mitocondrial, y una reducción de la actividad enzimática de enzimas que contienen centros hierro-azufre (Levi *et al.* 2004). Relacionando estos hechos con la capacidad de unión de hierro de la frataxina, es posible que la frataxina actúe almacenando el hierro bajo condiciones de baja concentración de hierro, mientras que, tanto la frataxina como la ferritina mitocondrial, recogerían el hierro para proteger a



la célula del daño oxidativo en condiciones de alta concentración de hierro. Así, se ha sugerido que la frataxina podría actuar como una proteína de almacenamiento de hierro.

### 1.3.2.3 Frataxina como partícipe activo en la fosforilación oxidativa

Otra de las funciones que ha sido atribuida a la frataxina es la de participar de forma directa en la actividad de la cadena de transporte de electrones. En la figura I9 se muestra un esquema del sistema de fosforilación oxidativa.



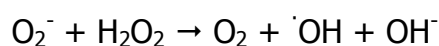
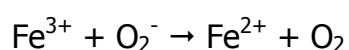
**Figura I9.** Esquema del sistema de fosforilación oxidativa.

Se ha visto que la sobreexpresión de frataxina en fibroblastos o en líneas de células cancerígenas promueve el metabolismo oxidativo (Schulz *et al.* 2006) y la síntesis de ATP (Ristow *et al.* 2000). Se ha demostrado *in vivo*, en células de pacientes con AF, una disfunción de la respiración mitocondrial que reduce la producción de ATP, existiendo una razón inversamente proporcional entre el número de repeticiones GAA y la máxima razón de producción de ATP (Lodi *et al.* 1999). Además de interactuar con proteínas involucradas con la formación

de centros hierro-azufre (Gerber *et al.* 2003 y Yoon *et al.* 2003), con la aconitasa (Bulteau *et al.* 2004 y Bulteau *et al.* 2005), y con la ferroquelatasa (Lesuisse *et al.* 2003 y Yoon *et al.* 2004), Yfh1 interacciona directamente con dos subunidades de la succinato deshidrogenasa (SDH o complejo II): la subunidad que contiene el grupo FAD (dinucleótido de flavina-adenina) y la subunidad que contiene el centro hierro-azufre. Por otra parte, mutaciones en los genes que codifican para la frataxina de levadura y para dichas subunidades de la SDH, muestran interacciones sintéticas cuando se combinan en la misma cepa (González-Cabo *et al.* 2005). Yfh1 también interacciona directamente con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo de transferencia de electrones de la flavoproteína, aunque no con la flavoproteína deshidrogenasa (González-Cabo *et al.* 2005). Estos resultados indican que la frataxina participa directamente en la actividad de la cadena de transporte de electrones. Otro punto a favor de esta idea, es el hecho de que la estructura tridimensional de la subunidad Nqo15 del complejo I de la cadena de transporte de electrones, en la bacteria termofílica *Thermus thermophilus*, encaja perfectamente con la frataxina, sugiriendo que Nqo15 podría actuar manteniendo juntos los centros hierro-azufre N1a y/o N3 en el complejo I (Sazanov *et al.* 2006). No está del todo claro que ocurra de igual forma en células de mamífero.

#### **1.3.2.4 Frataxina como factor que controla el estrés oxidativo celular**

La función básica de la mitocondria es la producción de energía en forma de ATP durante el metabolismo aerobio. Como consecuencia es una fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la cadena de transporte de electrones, jugando un papel muy importante en el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades. El término ROS describe una variedad de moléculas y de radicales libres derivados del oxígeno molecular; el anión superóxido ( $O_2^-$ ) es el producto de la captación de un electrón por el oxígeno, el precursor de muchas ROS y un mediador en reacciones en cadena de carácter oxidativo. La dismutación del anión superóxido, que puede ser espontánea o por una reacción enzimática catalizada por la superóxido dismutasa, produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que a su vez puede ser totalmente reducido a agua o parcialmente reducido al radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza. El radical hidroxilo es tan reactivo que puede reaccionar con casi todas las moléculas biológicas; la formación del radical hidroxilo está catalizada por metales de transición reducidos, mediante la reacción de Fenton (o Haber-Weiss). A continuación se muestra una reacción típica tomando como ejemplo el hierro como metal reducido:



La cadena de transporte de electrones mitocondrial contiene muchos centros redox que pueden ceder electrones al oxígeno, constituyendo la principal fuente de anión superóxido en muchos tejidos. En el interior de la mitocondria existe un ambiente altamente reductor, por lo que varios componentes de la cadena respiratoria, incluyendo las flavoproteínas, los centros hierro-azufre y las ubisemiquinonas, son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno. La velocidad de formación de aniones superóxido, por la cadena de transporte de electrones, puede aumentar cuando el flujo de electrones decrece, aumentando así la concentración de donantes de electrones, y cuando la concentración de oxígeno aumenta (Turrens, 1982a y b). El complejo III de la cadena de transporte de electrones parece ser el responsable de la mayoría de aniones superóxido producidos en las mitocondrias de corazón y pulmones (Turrens, 1980 y 1982a y b), mientras que la formación de aniones superóxido en el cerebro, en condiciones normales, parece ser producida por el complejo I (Barja, 1999).

Aunque en condiciones normales existe un equilibrio entre la formación y la destrucción de ROS, por acción de las defensas antioxidantes, se postula que en muchas patologías las defensas antioxidantes pueden resultar insuficientes y se puede producir una situación de estrés oxidativo que podría desembocar en apoptosis y muerte celular (Kroemer, 1998a y b). Esto sucede porque al incrementar las ROS, aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, mediante la apertura de los poros de transición. Esta apertura se produce por la oxidación del glutatión intracelular y otros grupos sulfhidrilo (Chernyak, 1997). Como resultado de este proceso el citocromo *c* pasa del espacio intermembrana al citoplasma, donde se une al factor Apaf-1. En presencia de ATP este complejo polimeriza con un oligómero conocido con el nombre de apoptosoma, que activa una cascada de reacciones proteolíticas donde están involucradas diversas caspasas. Esta cascada, a su vez, activa diferentes ADNasas, dando como resultado final la muerte de la célula (Li, 1997).

El hierro es extremadamente reactivo debido a su afinidad por el oxígeno, creando radicales libres mediante la reacción de Fenton. Por lo tanto, una desregulación de la homeostasis del hierro celular, provocada por la falta de frataxina, causaría un aumento del estrés oxidativo en las células. Controlando esta reactividad del hierro, la frataxina podría estar participando directamente en el control del estrés oxidativo, reduciendo la producción de especies reactivas del oxígeno. Diversos trabajos indican que el déficit de frataxina desencadena la producción de daño oxidativo en distintos organismos como *Caenorhabditis elegans* (Vázquez-Manrique *et al.* 2006), *Drosophila melanogaster* (Llorens *et al.* 2007 y Anderson *et al.* 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Karthikeyan *et al.* 2003), *Mus musculus* (Ristow *et al.* 2003 y Thierbach *et al.* 2005) y humanos (Emond *et al.* 2000 y Schulz *et al.* 2000). La acumulación de hierro mitocondrial, resultado de la deficiencia de frataxina, provoca daño oxidativo en el ADN mitocondrial y nuclear, así como en los centros hierro-azufre de la aconitasa mitocondrial y otros enzimas respiratorios (Babcock *et al.* 1997, Foury *et al.* 1999, Cavadini *et al.* 2000 y Karthikeyan *et al.*

2002), probablemente por el ataque de ROS. La frataxina es capaz de controlar la oxidación del hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Park *et al.* 2002). Al igual que otras proteínas involucradas en el metabolismo de este metal, la frataxina uniría hierro  $\text{Fe}^{2+}$  oxidándolo y almacenándolo en forma de hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). En levadura, en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , éste reacciona con la proteína Yfh1 atenuando la reacción de Fenton; se ha visto que a altas concentraciones de hierro se produce el ensamblaje progresivo de Yfh1 y se inicia así el control de la oxidación del hierro, reteniendo una porción en la forma bioaccesible o almacenándolo en una forma menos accesible (Park *et al.* 2002 y 2003). Esta característica ha sido identificada también para la frataxina de humanos y de bacterias (O'Neill *et al.* 2005) y esto supone una protección del ADN frente al estrés oxidativo en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero no en presencia de  $\text{O}_2$  (Bou-Abdallah *et al.* 2004).

Por otra parte, una de las primeras respuestas de la célula al estrés oxidativo es el incremento de la expresión de los genes que codifican la superóxido dismutasa de Manganese (MnSOD) y la superóxido dismutasa de cobre-zinc (Cu-ZnSOD). En los pacientes de ataxia de Friedreich no existe inducción de la expresión de MnSOD, necesaria para una posible detoxificación; de alguna forma, en las células con falta de frataxina existe una ruptura de la vía de la MnSOD en la regulación del estrés oxidativo. Sin embargo, cuando hay una reducción en la expresión de la frataxina, se produce una activación de mecanismos de detoxificación de radicales libres, basada en la ruta de la glutatión peroxidasa (Shoichet *et al.* 2002) y la ruta de JNK (c-Jun N-terminal kinases), también implicada en la respuesta al estrés oxidativo (Pianese *et al.* 2002).

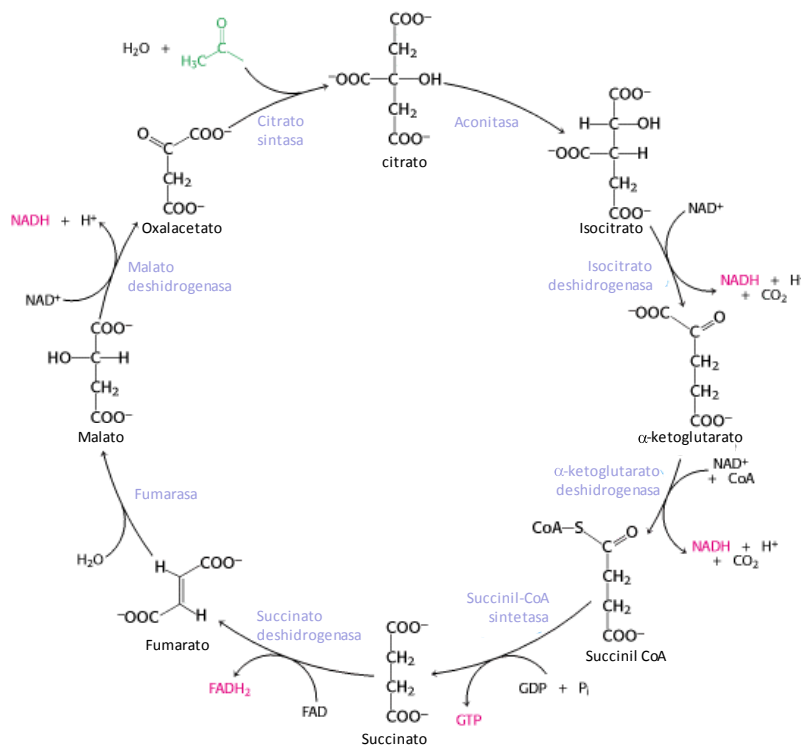
### ***1.3.2.5 Frataxina como chaperona en la reparación y/o protección del centro hierro-azufre de la aconitasa***

El hecho de que la falta de frataxina produzca una reducción en la actividad de la aconitasa ha sido descrito en numerosos trabajos (Rötig *et al.* 1997, Foury *et al.* 1999, Chen *et al.* 2002, Bulteau *et al.* 2004 y Llorens *et al.* 2007). Otros autores añaden que la frataxina podría ceder hierro a la aconitasa para reparar el daño oxidativo de su centro  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ , convertido en su forma inactiva  $[\text{3Fe-4S}]^+$  (Bulteau *et al.* 2004). De hecho, la reducción de la actividad de la aconitasa puede ser usada como marcador del daño oxidativo celular (Bulteau *et al.* 2003). La reducción de la actividad aconitasa determina el incremento de la transcripción de los genes implicados en el mecanismo de importación de hierro, lo que a su vez llevaría a la posterior acumulación de hierro en las mitocondrias de los pacientes de ataxia de Friedreich (Chen *et al.* 2004).

La aconitasa (también denominada aconitato hidratasa) es una enzima del ciclo de Krebs (figura I10) que cataliza la transformación reversible del citrato en isocitrato, a través de la formación de ácido tricarbóxico cis-

aconitato, que normalmente no se disocia del centro activo de la aconitasa (Beinert *et al.* 1996). La aconitasa puede promover la adición reversible de H<sub>2</sub>O al enlace doble del cis-aconitato que lleva unido, mediante dos caminos diferentes, de los que uno conduce a citrato y el otro a isocitrato. La aconitasa contiene un centro hierro-azufre que actúa tanto en la fijación del sustrato en su centro activo como en la catálisis de la adición o eliminación de H<sub>2</sub>O. Tres residuos de cisteína del enzima se unen a tres átomos de hierro del centro Fe-S, mientras el cuarto átomo de hierro se une a uno de los grupos carboxilo del sustrato. Además, hay un residuo básico del enzima que colabora en el posicionamiento del citrato en el centro activo.

La frataxina interacciona con el citrato de forma dependiente de la aconitasa dañada por el estrés oxidativo, promoviendo la reactivación de la enzima (Bulteau *et al.* 2004). De estos resultados, los autores han sugerido que la frataxina cedería el hierro requerido para reactivar el centro Fe-S dañado de la aconitasa. Al mismo tiempo, la aconitasa parece estar directamente asociada con la frataxina bajo condiciones de alta concentración de ROS, posiblemente como medida de protección de la disociación, la inactivación irreversible y/o la degradación del centro hierro-azufre [4Fe-4S]<sup>+</sup> de la aconitasa (Bulteau *et al.* 2005). Como ya hemos explicado anteriormente, las células de levadura deficientes en frataxina, tienen una baja actividad MnSOD, que puede recuperarse añadiendo manganeso o limitando el hierro en el medio. Estos resultados han permitido relacionar la acumulación de hierro en la mitocondria y la disminución de la actividad SOD, como causa del estrés oxidativo, en las células de los pacientes con AF (Irazusta *et al.* 2006).



**Figura I10.** Esquema del Ciclo del ácido cítrico

Finalmente, la sobreexpresión de frataxina en líneas celulares humanas, provoca el incremento del metabolismo oxidativo de la mitocondria, la actividad de la aconitasa, el potencial intermembrana, la respiración celular y el contenido de ATP (Schulz *et al.* 2006). Estos datos sugieren que la frataxina proporciona una línea directa de defensa contra el estrés oxidativo de la célula, por medio del control de la actividad aconitasa y la importación de hierro, así como su posible relación indirecta con la regulación parcial de la actividad enzimática de otras proteínas que controlan la actividad de sustancias ROS.

## ***2. Modelos de la ataxia de Friedreich***

**En los últimos años se han usado un gran número de organismos modelo para intentar reproducir las principales características de la enfermedad y poder entender los mecanismos fisiopatológicos subyacentes así como buscar posibles terapias. Los modelos desarrollados van desde el cultivo celular, pasando por levadura, el gusano nematodo y la mosca de la fruta hasta ratón.**

### ***2.1 Cultivos celulares***

El uso de células de pacientes mostró que éstas eran muy sensibles a la acción de los agentes oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre otros, probablemente debido a la formación del radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>) (Wong *et al.* 1999). La formación de radicales libres fue demostrada más tarde con el cultivo de células de ratón, con niveles reducidos de frataxina (Santos *et al.* 2001). El hecho de que las células en cultivo mostraran activadas las vías de defensa frente al estrés oxidativo apoyó que éste jugaba un papel importante en la AF. En células de rata que podían diferenciarse en neuronas (células PC12) y con reducción de frataxina, se vió activada la vía de acción de la MAP quinasa 4 que suele activarse en respuesta contra el estrés oxidativo. En cuanto a los modelos de AF desarrollados en cultivo celular, se ha intentado producir uno, en una línea de células de neuroblastoma (SH-SY5Y) usando lentivirus que codifican una pequeña horquilla de ARN complementario (ARNsh) al gen *FXN* (Giménez-Cassina *et al.* 2006). Estos ARNsh fueron suficientes para inducir una bajada en la expresión del gen *FXN* hasta niveles casi indetectables, provocando retracción de las neuritas, atrofia y muerte en células neuronales ya diferenciadas, mientras que los neuroblastos fueron menos sensibles a la deficiencia de frataxina. Este modelo puede proporcionar una herramienta muy poderosa para estudiar las consecuencias moleculares de la falta de frataxina en las neuronas.

Para estudiar el papel de la frataxina durante la diferenciación celular y el desarrollo, se realizó un modelo en cultivo celular con células embrionarias de carcinoma de ratón con la capacidad de diferenciarse en derivados de endodermo, mesodermo y ectodermo (Santos *et al.* 2001). En este cultivo se realizaron diferentes tratamientos para inducir la diferenciación de las células.

Las células fueron tratadas con ácido retinoico para inducir la diferenciación a neuronas, astroglia y microglia, y con dimetil sulfóxido para inducir la diferenciación en derivados del endodermo y del mesodermo, incluyendo músculo cardíaco y esquelético. Durante la diferenciación neuronal de las células, los niveles de frataxina aumentaron 2-3 veces, entre el 2º y 3º día, al igual que en cardiomiocitos y endodermo. En experimentos de interferencia y sobreexpresión con estos cultivos celulares se comprobó que con la interferencia se reducía la viabilidad celular, mientras que con la sobreexpresión sí se aumentaba la viabilidad de estas células. También se realizaron experimentos con los que se mostraba que la deficiencia de frataxina no afectaba a la capacidad de división de las células precursoras neurales. Aún así, se detectaron mayores niveles de apoptosis en la línea de diferenciación neuronal durante la interferencia, además de una mayor expresión del gen MnSOD, gen clave para proteger a las células frente a la apoptosis. Por otra parte, se utilizaron diferentes compuestos (vitamina E, idebenona, deferoxamina y N-acetil-cisteína) para intentar rescatar el crecimiento de las células neuronales deficientes en frataxina y sólo la N-acetil-cisteína produjo una recuperación del crecimiento celular. En el caso de la diferenciación en cardiomiocitos, no se ve afectada por la deficiencia en frataxina. Sin embargo, la deficiencia de frataxina llevaría a una muerte celular más que a la inhibición de la división celular de los precursores.

## **2.2 Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Los modelos de levadura están siendo muy importantes para identificar nuevas vías en las que puede estar implicada la proteína frataxina. Se han intentado realizar estudios de genómica comparativa, usando cepas mutantes nulas, y "knockdowns" para la frataxina (Haugen *et al.* 2006). Con esto se pretendía identificar interacciones reguladoras a partir de las diferencias en la expresión de ciertos genes, encontrar la disfunción en una serie de proteínas como pueden ser los citocromos, o la aconitasa, en la síntesis de proteínas mitocondriales, y en el ensamblaje de grupos hemo y de centros hierro-azufre. Muchas de las funciones propuestas para la frataxina han sido formuladas por grupos de investigación que utilizan la levadura como organismo modelo. Los primeros artículos relacionaban la frataxina con la homeostasis del hierro mitocondrial y la respuesta al estrés oxidativo (Babcock *et al.* 1997, Wilson *et al.* 1997, Foury *et al.* 1997 y Rotig *et al.* 1997). También se ha usado este organismo modelo para probar que la frataxina podría actuar como proteína de almacenaje de hierro, manteniéndolo de forma biodisponible (Adamec *et al.* 2000 y Park *et al.* 2003). Además, en diferentes artículos se muestra a la frataxina como una proteína involucrada en la maduración de diferentes procesos biológicos que utilizan el hierro. Estos incluyen la biogénesis de los centros Fe-S (Chen *et al.* 2002, Muhlenhoff *et al.* 2002, Gerber *et al.* 2003, Yoon *et al.* 2003 y Ramazzotti *et al.* 2004), la maduración del grupo hemo de diferentes proteínas (Park *et al.* 2003, Lesuisse *et al.* 2003 y Yoon *et al.* 2004) así como la activación del centro Fe-S de la aconitasa (Bulteau *et al.* 2004). Por

último, también se sugiere la relación directa de frataxina con la producción de ATP (Ristow *et al.* 2000), confirmada mediante interacción directa con el complejo II de la cadena de transporte de electrones (González-Cabo *et al.* 2005).

### **2.3 Ratón (*Mus musculus*)**

El ratón ha sido el modelo utilizado clásicamente para reproducir y estudiar las enfermedades humanas. Los motivos hay que buscarlos en la proximidad filogenética de este organismo con los humanos y en la posibilidad de criarlos en el laboratorio. Con respecto a la AF, el primer modelo obtenido fue el ratón “*knockout*” homocigoto para la frataxina (Cossee *et al.* 2000). Este ratón “*knockout*” se obtuvo por recombinación homóloga delecionando el exón 4 del gen ortólogo. Con esto se obtenía la ausencia completa de frataxina conduciendo a letalidad temprana durante la embriogénesis. Este primer modelo demostró la importancia de la frataxina en el desarrollo embrionario, y que los pacientes sobrevivían porque siempre tienen una expresión residual de frataxina. De hecho, no se han detectado pacientes homocigotos para mutaciones puntuales que eliminan totalmente la síntesis de frataxina activa. Posteriormente se creó un mutante condicional en el que la síntesis de frataxina se reducía en el músculo estriado y el tejido cardiaco y otro en el que esta reducción se limitaba a las neuronas (Puccio *et al.* 2001). En el “*knockout*” de neuronas se observó que también se encontraban afectados otros tejidos como el corazón y el hígado. Además se observó que la conducción en el nervio caudal (compuesto principalmente de axones sensitivos de diámetro estrecho) y los potenciales motores fueron normales. Por el contrario, la excitación del nervio ciático (neuronas sensitivas de la propiocepción, de diámetro mayor) son funcionalmente defectivas. Estos resultados concuerdan con el hecho de que en la AF existe una afectación selectiva de las grandes neuronas sensoriales mielinizadas. En el modelo de músculo estriado y tejido cardiaco se encontraron depósitos de hierro en muestras de corazón, pero dicha acumulación dependía del tiempo. Esto demostraba que la acumulación de hierro era un hecho posterior y no la causa primaria de la patología en este órgano. En ambos modelos, se presentaron las características bioquímicas y fisiopatológicas de la ataxia de Friedreich, viéndose reducidas las actividades de los enzimas con centros hierro-azufre de la cadena de transporte de electrones así como de las aconitasas. Además, mostraron una gran disminución de la supervivencia y el desarrollo de miopatías mitocondriales. Todo esto sugirió a los autores que la acumulación de hierro en los modelos condicionales era posterior a la inactivación de las enzimas con centros Fe-S. Diferentes experimentos realizados no indicaron que el estrés oxidativo se viese incrementado respecto de los controles (Seznec *et al.* 2005) cuestionándose por primera vez el papel central del estrés oxidativo en la AF.

En paralelo, se han creado diferentes modelos de ratón que introducen expansiones inestables de las repeticiones GAA en el gen *Fxn* de ratón (ratones



*knockin*), en concreto [GAA·TTC]<sub>230</sub> (Miranda *et al.* 2002). Los ratones homocigotos para las repeticiones (230/230GAA) presentaron niveles de frataxina del 75% respecto del nivel normal en todos los tejidos examinados presentando un fenotipo normal. Al cruzar ratones *knockin* heterocigotos (+/230GAA) con ratones *knockout* heterocigotos (+/-) se generaron individuos *knockout/knockin* (-/230GAA) cuyos niveles de frataxina eran del 25 al 36% respecto del normal. Estos últimos ratones eran viables y no desarrollaron ninguna anomalía en la coordinación motora durante un año de seguimiento, ni tampoco mostraron acumulación de hierro, ni siquiera en el corazón. Estos modelos presentan reducción del ARNm y de la proteína frataxina pero no muestran los mismos fenotipos que los pacientes como se esperaba. El siguiente modelo se obtuvo al insertar una copia del propio gen humano *FXN* con repeticiones GAA. Los individuos homocigotos para 190 repeticiones (190/190GAA) y los heterocigotos para diferentes expansiones (190/90 GAA) (Al-Mahdawi *et al.* 2006 y Clark *et al.* 2007) mostraron inestabilidad en el número de repeticiones a través de las diferentes generaciones. Los descendientes del cruce entre estos individuos con los individuos *knockout* obtenidos por el grupo de Puccio (Cossee *et al.* 2000), recuperan el fenotipo de letalidad y muestran neurodegeneración progresiva, con deficiencia en la actividad locomotora, y sin reducción de la vida media. Estos ratones también muestran anomalías histológicas como la presencia de vacuolas en los ganglios del tallo dorsal y depósitos de hierro en los cardiomiocitos, sin signos de hipertrofia cardíaca. Además, la actividad aconitasa está reducida en las células del corazón y hay signos de estrés oxidativo en diferentes tejidos. Por último, existe un cuarto modelo en ratón portador de la construcción *FXN-GFP* (Green Fluorescent Protein), pero con un número normal de tripletes GAA. Este modelo ha permitido la identificación de moléculas que actúan en el promotor del gen *Fxn* (Sarsero *et al.* 2003, 2005).

## **2.4 Modelos en invertebrados**

En los últimos años, se ha propuesto la utilización de organismos inferiores como modelos de estudio de las enfermedades humanas; es el caso de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*. Frente a levadura se trata de organismos pluricelulares que permiten el análisis a lo largo de las distintas etapas del desarrollo y en distintos tejidos. Frente al ratón, las ventajas que ofrecen son las de un cultivo, mantenimiento y manipulación mucho más fácil, ciclo vital corto, abundante descendencia y menor redundancia genética.

### **2.4.1 Gusano (*Caenorhabditis elegans*)**

Con respecto al gusano *Caenorhabditis elegans*, su uso como modelo de la AF es un poco controvertido por los resultados tan dispares que se han obtenido, pero, no obstante, ha abierto un marco de discusión muy interesante.

En este organismo se ha conseguido reducir la síntesis de frataxina mediante interferencia del ARN del gen homólogo *frh-1* (Ventura *et al.* 2005). En estos individuos se ve reducido el tamaño del cuerpo, muestran menor fertilidad así como una alteración de la respuesta al estrés oxidativo. Sin embargo, esta supresión produce una extensión de la vida media de los gusanos, que los autores refieren a otros estudios en *C. elegans* en los que defectos en la cadena de transporte de electrones producen el mismo fenotipo. Por el contrario, en otro modelo con una mayor disminución de la cantidad de frataxina, sí se produce una bajada en la supervivencia entre otros fenotipos, como la disfunción en el bombeo faríngeo debido a problemas en el sistema nervioso, y problemas en la defecación también relacionada con el sistema nervioso (neuronas sensoriales) (Vázquez-Manrique *et al.* 2006). Estos mismos resultados se han obtenido en otro modelo de *C. elegans* (Zarse *et al.* 2007). No obstante, recientemente se ha vuelto a publicar que la disfunción de *frh-1*, y de otros genes relacionados con la cadena de transporte de electrones, produce una extensión en la vida media de los individuos (Rea *et al.* 2007).

Siendo *Drosophila melanogaster* el organismo modelo con el cual se ha realizado este trabajo de tesis, se considerará este organismo en un apartado aparte.

### ***3. Drosophila como organismo modelo para el estudio de enfermedades humanas***

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es hoy por hoy, un potente organismo modelo en el estudio de problemas biológicos complejos dada la experiencia acumulada en su utilización, desde principios del siglo pasado. En la última década, muchos investigadores han centrado su atención en entender las enfermedades neurodegenerativas usando este organismo como modelo. Se han obtenido numerosos mutantes de *Drosophila* que afectan a la viabilidad neuronal y a la integridad del sistema nervioso, y se han generado muchas cepas transgénicas para abordar el estudio de enfermedades humanas neurodegenerativas. Todo ello sitúa actualmente a *Drosophila* entre los organismos más usados e importantes en este campo.

#### ***3.1 Aspectos básicos de Drosophila melanogaster como organismo modelo***

La primera y más importante razón por la que *Drosophila* ha sido utilizada como modelo de las enfermedades humanas, es la presunción de que los aspectos fundamentales de su biología celular se han conservado a lo largo de la evolución, por lo que puede ser comparada con organismos superiores como los humanos. Aproximadamente el 75% de los loci involucrados en enfermedades humanas tienen un homólogo en *Drosophila*, lo que indica el alto grado de conservación existente (Reiter *et al.* 2001). Además, estudios realizados sobre el desarrollo en la mosca, y estudios similares realizados en

animales superiores, han revelado un elevado nivel de conservación funcional de los genes (Rubin *et al.* 2000). Estos estudios indican que no sólo la biología celular básica está conservada, sino también procesos más complejos como la formación y función de los órganos.

La segunda razón para usar *Drosophila* es su sistema nervioso central (SNC). El cerebro de la mosca se estima que tiene, aproximadamente, un número superior a 300.000 neuronas y, al igual que en mamíferos, el cerebro está organizado en áreas con funciones separadas y especializadas como el aprendizaje, memoria, olfacción y visión.

En tercer lugar, existe la ventaja de poder llevar a cabo rastreos genéticos a gran escala de forma rápida y relativamente barata, utilizando la gran colección de cepas mutantes y la enorme batería de herramientas genéticas desarrolladas en *Drosophila*. Entre éstas, destacar los métodos basados en transposones para la manipulación génica y los sistemas que permiten controlar la expresión ectópica de genes. Caso especial son los cromosomas equilibradores, cromosomas portadores de múltiples segmentos invertidos que evitan la recombinación y marcadores moleculares visibles fenotípicamente, que permiten estudiar la letalidad provocada por ciertas mutaciones génicas o la presencia de delecciones. Todas estas características combinadas con el corto periodo de generación, la forma de cultivo sencilla y el gran número de individuos obtenido en cada generación, hacen de *Drosophila* uno de los organismos modelo más útiles.

**Tabla I3.** Modelo en *Drosophila* de enfermedades neurodegenerativas. (Tabla adaptada de Celotto *et al.* 2005).

<b>Enfermedad modelada</b>	<b>Proteína afectada</b>
Alzheimer	tau
	APP
	Presenilina
	BACE
X-frágil	PAR-1
	FMR1
Huntington	polyQ
	Huntingtina
Kennedy	Receptor andrógeno
Parkinson	$\alpha$ -sinucleína
Ataxia espinocerebelar tipo 1	Ataxina 1
Ataxia espinocerebelar tipo 2	Ataxina 2
Ataxia espinocerebelar tipo 7	Ataxina 7

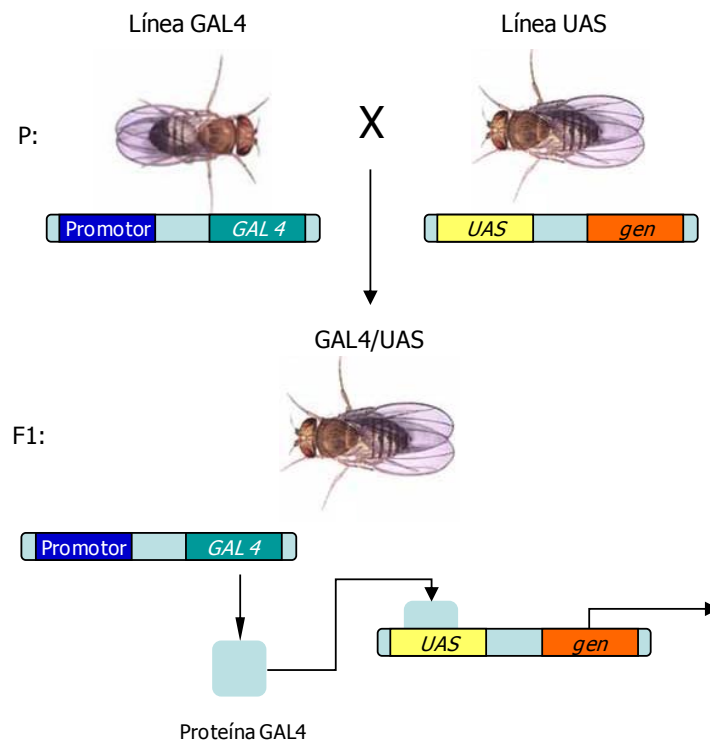
Muchas enfermedades humanas han sido modelizadas con éxito en *Drosophila*. Estos modelos suelen expresar un gen humano con una mutación de carácter dominante o expresar una mutación que de lugar a una pérdida de función en genes ortólogos al gen humano. En la tabla I3 se muestran ejemplos de modelos de enfermedades neurodegenerativas en *Drosophila*.

### **3.2 Métodos experimentales para la obtención, en *Drosophila*, de modelos de enfermedad**

En *Drosophila* la forma clásica de examinar un gen, cuyas mutaciones son responsables de una enfermedad, ha sido provocar la pérdida de función del gen ortólogo de la mosca. Dentro de las metodologías más clásicas destaca la mutagénesis química, con el empleo de compuestos como etilnitrosourea, metilmetanosulfonato o etilmetanosulfonato entre otros, y el empleo de radiaciones ionizantes como los rayos X, los rayos  $\gamma$  y la radiación ultravioleta (Ashburner *et al.* 2004). Estas técnicas se caracterizan por la aleatoriedad de las lesiones generadas en el ADN y forman parte de lo que ha venido designándose como estrategias de genética directa, la cual se caracteriza por la clonación de un gen a partir del fenotipo mutante.

A estas técnicas les han seguido otras desarrolladas para facilitar el estudio molecular de los fenotipos generados por las mutaciones, destacando la utilización de elementos transponibles modificados. Entre ellos el más utilizado ha sido el elemento P, un transposon no retroviral del genoma de *D. melanogaster* (Rubin *et al.* 1982). Actualmente, se dispone de una amplia colección de cepas, cada una de ellas con una sola inserción de un elemento P localizada en una región concreta, fruto del Proyecto de Disrupción de Genes mediante Mutagénesis Insercional del Elemento P. Ello permite tener al alcance un posible mutante del gen de interés con solo consultar la Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). Una mejora de la mutagénesis insercional ha sido la creación del sistema *P-homing* (Taillebourg *et al.* 1999), al aumentar la especificidad de inserción de este elemento en posiciones muy cerca o dentro del gen cuya actividad se desea modificar.

Una de las metodologías que ha revolucionado en cierta medida la investigación con *Drosophila* ha sido la aplicación, en este organismo, del sistema UAS-GAL4 propio de levadura (Brand *et al.* 1993). Éste es un sistema muy versátil ya que permite tanto la sobreexpresión de genes concretos (figura I11) como la reducción de su expresión, en éste último caso al combinarse con la técnica basada en la interferencia del ARN (Kennerdell *et al.* 2000). Una gran ventaja del sistema es la capacidad que ofrece de poder controlar espacial y temporalmente cualquier actuación. De esta forma, es posible dirigir la expresión de un gen en un momento del desarrollo que no le corresponde, o en un tejido donde no suele expresarse. Alternativamente, se puede silenciar la expresión de un gen en un estadio y/o tejido donde su producto es necesario. Su aplicabilidad en la generación de moscas transgénicas, portadoras de genes humanos con mutaciones patológicas, se ha puesto de manifiesto en un importante número de enfermedades neurodegenerativas. Con el tiempo se han ido introduciendo algunas modificaciones que han permitido flexibilizar aún más este sistema e inducir la expresión de la proteína GAL4 bajo el control hormonal o por la presencia de antibióticos (McGuire *et al.* 2004).

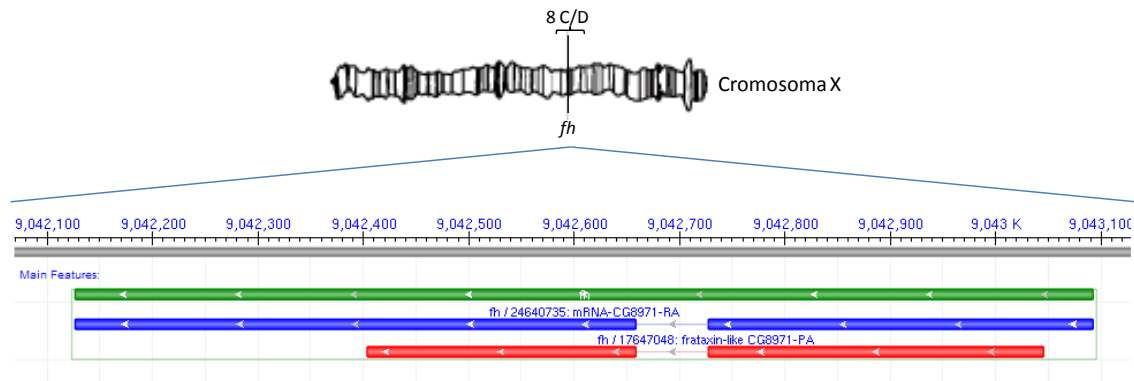


**Figura I10.** Esquema del sistema UAS/GAL4. Las cepas GAL4 expresan la proteína GAL4 según un patrón determinado. La cepa UAS es incapaz de expresar por ella misma el gen de interés. En la descendencia del cruce de ambas, la proteína GAL4 activa la expresión de la construcción UAS con el patrón propio del promotor utilizado.

Se han desarrollado varios modelos de enfermedades neurodegenerativas en *Drosophila* (tabla I3) (Cauchi *et al.* 2006), tras la identificación de los genes responsables de las formas mendelianas en humanos. Algunos de estos modelos han generado resultados muy prometedores, mientras otros no han podido reproducir las características esenciales de la enfermedad. Las enfermedades neurodegenerativas son, generalmente, de inicio tardío y muestran complejas alteraciones como la pérdida de memoria, defectos cognitivos, desórdenes en el movimiento, que conjuntamente llevan a la muerte del individuo. Estas alteraciones son debidas en todos los casos a la pérdida o la disfunción de neuronas especializadas y en un gran número de ellos, a mutaciones que afectan al plegamiento de ciertas proteínas. Esto lleva a una acumulación de las mismas formando grandes agregados, que son tóxicos para las neuronas, conocidos como inclusiones en la enfermedad de Huntington, placas de amiloide en el caso de la enfermedad de Alzheimer y cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson. Los modelos de *Drosophila* para estas enfermedades han sido los pioneros, al tratarse de enfermedades muy prevalentes, especialmente las dos últimas. Actualmente, se están desarrollando modelos para enfermedades genéticas raras, como la AF y las ataxias dominantes espinocerebelares (SCA). Estos trastornos están causados por expansiones anómalas de trinucleótidos, que en el caso de las ataxias SCA originan tramos de poliglutaminas en la proteína correspondiente, como ocurre en la enfermedad de Huntington (Gatchel *et al.* 2005).

### 3.3 Modelo de ataxia de Friedreich en *Drosophila*

El gen ortólogo al gen *FXN*, en *Drosophila*, es el gen denominado *fh* (*frataxin homolog*). Este gen fue localizado en el cromosoma X en la región 8C14 (figura I12). Su tamaño es de 965 pb y consta de dos exones separados por un intrón, los cuales codifican para la proteína homóloga a la frataxina humana (Cañizares *et al.* 2000).



**Figura I12.** Localización del gen *fh* de *Drosophila*.

La expresión del gen es uniforme en todo el embrión de *Drosophila* y se detecta a lo largo del ciclo de vida desde los diferentes estadios embrionarios hasta adulto (Cañizares *et al.* 2000). Los alineamientos múltiples de la proteína FH con las secuencias de otras frataxinas de diferentes organismos, entre ellas la humana, muestran una gran conservación a lo largo de la evolución. En la región central y en la región  $C_t$  existen varios aminoácidos invariables y una región altamente conservada de 38 aminoácidos codificados por los exones 4 y 5a de *FXN* de los cuales 33 son idénticos en la frataxina de *Drosophila*, codificados por el exón 2 de *fh*. Las predicciones de la estructura secundaria de FH han indicado que la secuencia conservada formaría fácilmente una hoja  $\beta$  flanqueada por hélices  $\alpha$ , igual como la frataxina de humanos y de levadura (Campuzano *et al.* 1996 y Gibson *et al.* 1996) y que sería muy importante para la función de la proteína. Los análisis computacionales también muestran la existencia de un péptido señal de importación a la mitocondria.

El primer modelo de AF en *Drosophila* fue generado por Anderson *et al.* (2006). La supresión ubicua de la expresión del gen *fh* produce larvas grandes y con un aumento de la supervivencia. Con la supresión condicional se obtienen individuos adultos con movilidad afectada, reducción de la actividad de diferentes enzimas que contienen centros Fe-S y hemo, pérdida de la homeostasis del hierro y una fuerte susceptibilidad a la toxicidad provocada por el hierro. La reducción de la expresión de *fh* en el SNP (sistema nervioso periférico) produce un desarrollo normal de los embriones y de las larvas pero con reducción de la supervivencia de los adultos. En este modelo se han sobreexpresado varias enzimas, como CuZnSOD, MnSOD y/o la catalasa

citoplasmática, para comprobar si se podía paliar el efecto del estrés oxidativo. La sobreexpresión ubicua de estas actividades no supuso la mejoría de los individuos deficientes para la frataxina cuestionándose que el estrés oxidativo tuviera un papel clave en los fenotipos derivados de la reducción de la frataxina. Posteriormente, provocaron expresión ectópica de enzimas que eliminan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para comprobar si se suprimían los fenotipos asociados a la deficiencia de la frataxina, viéndose que la sobreexpresión de la catalasa de la mosca restauraba la actividad de los enzimas mitocondriales sensibles a las especies reactivas del oxígeno; sin embargo, la sobreexpresión de las enzimas que eliminan el anión superóxido no producía ningún efecto, sugiriendo que es la vía de la formación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la implicada en los fenotipos de los individuos con falta de frataxina (Anderson *et al.* 2008).

La sobreexpresión del gen *fh* da lugar a una mayor capacidad antioxidante, mayor resistencia al estrés oxidativo así como una mayor longevidad de los adultos. Estos resultados indicaban que frataxina podía participar protegiendo a las células contra el efecto pernicioso del estrés oxidativo producido por compuestos como el paraquat y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Runko *et al.* 2008).

En nuestro laboratorio, se han obtenido una serie de líneas que silencian, de forma post-transcripcional el gen *fh*, reduciendo su expresión de forma generalizada utilizando la línea *da*-GAL4, en mesodermo con *24B*-GAL4, en corazón con *dot*-GAL4 y en sistema nervioso con las líneas *V55*-GAL4, *elav*-GAL4, *neur*-GAL4, *D42*-GAL4 y *Ddc*-GAL4. La disminución de la expresión del gen *fh* en el mesodermo somático, en estadios iniciales de desarrollo del sistema nervioso periférico y en el corazón embrionario, provoca la aparición de 100% de letalidad en fase de pupa madura, lo cual indica que *fh* es un gen esencial en el desarrollo de *Drosophila*. Además, esta misma reducción de *fh* en líneas de expresión en los músculos indirectos de vuelo, en el sistema nervioso periférico (SNP) y en las neuronas motoras, va asociada a menor grado de supervivencia y de capacidad de locomoción (Navarro, 2005).

Al mismo tiempo también se han obtenido líneas que sobreexpresaban el gen *fh* (Navarro, 2005). La sobreexpresión utilizando las mismas líneas GAL4 provoca el mismo tipo de alteraciones que la interferencia del gen, aunque con un efecto mucho más acusado. Esto indica que en ambos casos se está afectando a los mismos sistemas y/o procesos. De hecho, la sobreexpresión del gen *fh* en los dominios de establecimiento de los derivados mesodérmicos y del sistema nervioso, produce en el embrión alteraciones musculares, huecos en el corazón y defectos en las proyecciones axonales sensoriales y motoras. Además, cuando el gen *fh* se sobreexpresa mediante líneas GAL4 de expresión en el SNP y en las neuronas motoras, se observa una profunda disminución de la supervivencia y de la capacidad locomotora de los adultos. En conjunto, estos resultados indican que los tejidos más afectados en la AF también están seriamente afectados en *Drosophila*, por lo que este organismo puede ser un modelo adecuado para el estudio de esta enfermedad.

Dentro del proyecto general de nuestro laboratorio, en esta Tesis Doctoral, se presenta un nuevo modelo de supresión generalizada de la expresión de *fh*.



*Objetivos*

## Objetivos

El presente trabajo de Tesis doctoral se ha desarrollado dentro de una línea de investigación del Departamento de Genética de la Universitat de Valencia, cuyo objetivo general es la obtención de un modelo de ataxia de Friedreich en *Drosophila melanogaster*. Con dicho modelo se pretende contribuir al conocimiento de la función del gen involucrado, del mecanismo fisiopatológico de la enfermedad y a la búsqueda de posibles tratamientos para los enfermos. Este trabajo se centra en los dos primeros puntos y parte de las siguientes **hipótesis:**

1. Frataxina, la proteína cuyo nivel está reducido en los pacientes de ataxia de Friedreich, es una proteína mitocondrial presente en todos los organismos eucariotas estudiados, por lo tanto es de esperar que su función esté conservada en *Drosophila*.
2. Las mutaciones de pérdida de función del gen *FXN* son responsables de la ataxia de Friedreich. La pérdida de función del gen ortólogo *fh* podrá generar fenotipos equivalentes en *Drosophila*.
3. El estrés oxidativo es un factor clave del mecanismo fisiopatológico de la ataxia de Friedreich

A partir de estas hipótesis de trabajo se han definido los siguientes **objetivos:**

1. Determinación de la localización subcelular de la proteína frataxina de *D. melanogaster*.
2. Obtención de mutantes estructurales del gen *fh* mediante mutagénesis insercional con elementos P, utilizando la estrategia de *P-homing*.
3. Obtención de mutantes funcionales transitorios del gen *fh*, por interferencia de RNA de doble cadena.
4. Determinación de las actividades de los complejos respiratorios de la mitocondria y de la enzima aconitasa, en condiciones de elevado estrés oxidativo.
5. Análisis del efecto de la sobreexpresión del gen *FXN* en *Drosophila*.

# *Material y Métodos*

# 1. Material biológico

## 1.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas para realizar las transformaciones con diferentes vectores fueron DH10B y TOP10 de *E. coli*, cuyo genotipo se describe en la siguiente tabla:

**Tabla M1.** Cepas bacterianas.

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsd RMS-mcr</i> BC) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>gal/U gal</i> K λ <sup>-</sup> <i>rps</i> L <i>nupG</i> λ <sup>-</sup>
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsd RMS-mcr</i> BC) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 endA</i> <i>ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>gal/U gal</i> K <i>rps</i> L (Str <sup>R</sup> ) <i>nupG</i>

## 1.2 Líneas celulares de eucariotas

La localización subcelular de la proteína FH se llevó a cabo en células eucariotas mantenidas en cultivo. Las células usadas fueron células de ovario de hámster (Chinese Hamster Ovary) de la cepa CHO-K1 y las células de *Drosophila* Schneider 2 (S2).

## 1.3 Cepas de *Drosophila melanogaster*

Las diferentes cepas de *Drosophila melanogaster* usadas en este trabajo se detallan en la Tabla M2. Todas ellas se obtuvieron del *Bloomington Stock Center* de Indiana (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) en Estados Unidos, excepto la cepa transgénica UAS-*fhIR* que fue generada en nuestro laboratorio (Navarro, 2005).

**Tabla M2.** Cepas de *Drosophila melanogaster*.

Cepa	Genotipo	Crom.*	Nº stock
<i>w</i> ; <i>Dr<sup>1</sup>/TMS99B</i>	<i>w</i> [*]; <i>Dr<sup>1</sup>/TMS</i> , <i>P</i> { <i>ry</i> [+ <i>t7.2</i> ]=Δ2-3}99B	3	1610
UAS- <i>fhIR</i>	<i>y</i> [1] <i>w</i> [*]; UAS- <i>fh</i>	2	-
<i>Actin</i> -GAL4	<i>y</i> [1] <i>w</i> [*]; <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>Act5C-GAL4</i> }17bFO/TM6B, <i>Tb</i> [1]	3	3954
<i>Da</i> -GAL4	<i>w</i> [*]; <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>GAL4-da.G32</i> }UH1	3	5460
<i>24B</i> -GAL4	<i>w</i> [*]; <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>GawB</i> }how[24B]/TM3, <i>Sb</i> [1]	3	1767
<i>Dot</i> -GAL4	<i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>Dot-GAL4.K</i> }43A <i>w</i> [*]	1	6903

<i>Neur-GAL4</i>	<i>w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}neur[GAL4-A101]Kg[V]/TM3,Sb[1]</i>	3	6393
<i>OrR</i>	<i>Oregon-R</i> , cepa silvestre	-	-
<i>yw if/CyO;</i> <i>MKRS/TM6</i>	<i>w: If / CyO, ftz-lacZ; MKRS / TM6B</i>	-	-
<i>yw</i>	<i>yellow<sup>1</sup> white<sup>118</sup></i>	-	-

\*indica el cromosoma en el que se ha insertado la construcción propia de cada cepa.

## 2. Oligonucleótidos, vectores y construcciones

En la Tabla M3 se detalla tanto la secuencia de los **oligonucleótidos** como el uso de cada uno de ellos en los diferentes experimentos llevados a cabo. Los criterios seguidos a la hora de diseñar los cebadores utilizados en el presente trabajo han sido los siguientes:

- Longitud de entre 18 y 30 nucleótidos (generalmente 21-25)
- Contenido de G/C de aproximadamente el 50% del total de bases
- Evitar en lo posible los tramos de más de tres G/C o A/T seguidos
- Primera y última base G o C, cuando sea posible

**Tabla M3.** Oligonucleótidos.

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Uso	Observación
MECAD	AAGTTGCGGCCCGCAACTGGGATTTGTA		Programa RT-PCR
MEDAR	ACTAATTCTAGAATTAACACTACAGTAGGGCA		
fhpEGFPN3F	CTCGAGAAATGTTTGCCGGTCGTTTGAT	Localización subcelular de la proteína FH	Programa Standard Netzyme
fhpEGFPN3R	GGATCCACTACAGTAGGGCAGGCGTAGGAAG		
M13F	GTA AACGACGGCCAGT		Programa Col-PCR y de secuenciación
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC		
pHomF	CGATTTCTCGTACTCCAGCTTCTCC		Programa Standard Netzyme
cMelrev	CGGACTGCGACTTCAGTA		
Zonafh1f	ATCGAGGAGAGGTTCCACCATCTG	Mutagénesis mediante p-homing	Programa PCR Multiplex
Zonafh2f	GAATTGTATTTTCTGCGAAAGCG		
Zonafh3f	GATTGCTTCCATGCTCCG		
Zonafh4f	GCTGGACTCCACCATGCG		

Zonafh5f	CATTAAGTTGGCAGCCCCG		
Zonafh6r	GAGTGACCACTGTGCCAACAG		
Zonafh7r	CAACTATATGATGAACCAGCAGCATG	Mutagénesis mediante p-homing	Programa PCR Multiplex
Zonafh8r	GATCTCTAGGTACCAACGATGCC		
Zonafh9r	GTAAGTCCACCACCAAACCCG		
Zonafh10r	GGAAACAGTTCTGGAATCGACG		
plac1	ACACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT		
pwt1	GTAACGCTAATCACTCCGAACAAGGTCACA		Programa PCR Inversa
fxn-pUASTf	CTCGAGATGTGGACTCTCGGGCGCCG	Obtención de individuos transgénicos	Programa Standard Netzyme
fxn-pUASTr	GGTACCTCAAGCATCTTTTCCGGAATAGGCCAAG		

Las construcciones se llevaron a cabo usando los vectores descritos en la siguiente tabla (tabla M4):

**Tabla M4.** Vectores utilizados.

Vector	Descripción	Resistencia
<i>pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup></i>	Vector diseñado para la clonación de productos de PCR. Se suministra en forma lineal, con dos timidinas desapareadas en los extremos. Además posee una topoisomerasa localizada físicamente sobre el sitio de clonación de los fragmentos, que es responsable de la unión del producto de PCR al vector de manera rápida y efectiva.	Ampicilina-Kanamicina
<i>pEGFP-N3</i>	Este vector está diseñado para la expresión de proteínas fusionadas a la GFP. El vector <i>pEGFP-N3</i> codifica una variante rojo brillante de la GFP, que ha sido optimizada para dar mayor fluorescencia y para que de mayor expresión cuando es usada en transfecciones de células de mamíferos.	Ampicilina
<i>pCR-Script SK(+)</i>	Este vector es una modificación del fagémido <i>pBluescript IISK(+)</i> . Incluye zonas de unión para la ARN polimerasa T3 y T7 y la zona de clonación múltiple SK, que ha sido modificada para incluir la secuencia diana de la endonucleasa de restricción <i>SrfI</i> . Este vector permite clonar el mismo tipo de fragmentos que los <i>pUC</i> .	Ampicilina
<i>pUAST</i>	Vector derivado de la familia <i>pCasper</i> . Se utiliza en la obtención de moscas transgénicas para el empleo del sistema UAS-GAL4. Su estructura consta de, por un lado el vector <i>pUC18</i> y por otro los extremos de un elemento transponible P, el gen <i>white</i> como marcador fenotípico y la zona de clonación múltiple junto con las secuencias UAS.	Ampicilina-Kanamicina

GFP: *Green Fluorescent Protein*

En la siguiente tabla se muestran las diferentes **construcciones** realizadas tanto para la localización subcelular como para la obtención de individuos transgénicos con el ADNc del gen *FXN*.

**Tabla M5.** Construcciones generadas.

Clon	Descripción
<i>fhGFP</i> -pCR2.1	Pauta de lectura del gen <i>fh</i> , amplificada con <i>fhpEGFPN3F</i> y <i>fhpEGFPN3R</i> y clonada en pCR2.1 <sup>®</sup> -TOPO <sup>®</sup> .
<i>fh</i> -pEGFPN3	Pauta de lectura del gen <i>fh</i> , subclonada en pEGFP-N3 en los sitios <i>SacI</i> y <i>BamHI</i> , a partir de <i>fhGFP</i> -pCR2.1.
<i>fh</i> homing-pCRScript	Región 5' del gen <i>fh</i> truncado en 3', amplificada con pHomF y cMeldir y clonada
<i>fh</i> homing-pUAST	Región 5' del gen <i>fh</i> truncado en 3', subclonada en pUAST en los sitios <i>NotI</i> y <i>KpnI</i> , a partir de <i>fh</i> homing-pUAST.
<i>FXN</i> -pCR2.1	Pauta de lectura del gen <i>FXN</i> , amplificada con <i>FXN</i> -pUASTf y <i>FXN</i> -pUASTr y clonada en pCR2.1 <sup>®</sup> -TOPO <sup>®</sup> .
<i>FXN</i> -pUAST	Pauta de lectura del gen <i>FXN</i> , subclonada en pUAST en los sitios <i>XhoI</i> y <i>KpnI</i> , a partir de <i>FXN</i> -pCR2.1.

### 3. Marcadores, sondas y enzimas

Las **ADN polimerasas** usadas en este trabajo fueron la transcriptasa reversa (Roche) para obtener la primera cadena del ADNc a partir del ARNm y la ADN polimerasa Pwo (Roche) para obtener el ADNc de los genes *fh* y *FXN*.

Los **nucleótidos** utilizados en las reacciones de PCR, retrotranscripción y RT-PCR fueron usados a la concentración final estándar (200  $\mu$ M).

Tanto en los geles de agarosa para ácidos nucleicos, como en los geles de acrilamida para proteínas, se emplearon los siguientes **marcadores de peso molecular**:

**Tabla M7.** Marcadores de peso molecular

Marcador	Casa comercial
MXIV (100pb)	Roche
MII ( $\lambda$ DNA <i>HindIII</i> )	Fermentas
MVII	Roche
<i>PageRuler</i> <sup>®</sup>	Fermentas

Las **sondas Taqman**<sup>®</sup> utilizadas para cuantificar los transcritos de los genes *RP49*, *fh* y *FXN* fueron, respectivamente, Dm02151827\_g1, Dm01813257\_g1 y Hs00175940\_m1. Todas las sondas se adquirieron de la casa comercial Applied Biosystems.

Para realizar el estudio de la localización subcelular de frataxina en *Drosophila melanogaster*, se utilizó como sonda específica de mitocondria el

*Mitotracker*<sup>®</sup> CMTMRos de Invitrogen. La máxima excitación se produce a 554nm y la máxima emisión a 576 nm.

Todos los **enzimas de restricción** usados en esta tesis, se emplearon a 2U de enzima por µg de ADN. Los enzimas y sus aplicaciones se describen en la siguiente tabla:

**Tabla M6.** Enzimas de restricción.

<b>Enzima</b>	<b>Diana 5' → 3'</b>	<b>Aplicación</b>
<i>SacI</i>	...C TCGAG...	Clonación en pauta de lectura del ADNc del gen <i>fh</i> en el vector pEGFPN3.
<i>BamHI</i>	...G GATCC...	Clonación en pauta de lectura del ADNc del gen <i>fh</i> en el vector pEGFPN3 y obtención de la sonda de ARN de <i>fh</i> (antisonda)
<i>HindIII</i>	...A AGCTT...	Obtención de la sonda control de ARN de <i>fh</i> (sonda)
<i>XhoI</i>	...C TCGAG...	Clonación del ADNc del gen <i>FXN</i> en el vector pUAST.
<i>KpnI</i>	...G GTACC...	Clonación del ADNc del gen <i>FXN</i> y la región 5' del gen <i>fh</i> en el vector pUAST.
<i>EcoRV</i>	...GAT ATC...	Clonación de la región 5' del gen <i>fh</i> en el vector pCRScript
<i>NotI</i>	...GC GGCCGC...	Clonación de la región 5' del gen <i>fh</i> en el vector pUAST.
<i>CfoI</i>	...GCG C...	Obtención de un fragmento de ADN genómico para identificar la localización de la construcción <i>fh</i> homing-pUAST.

## 4. Anticuerpos

Los **anticuerpos primarios**, utilizados en la detección inmunohistoquímica en embriones de *Drosophila melanogaster*, se detallan en la Tabla M8. La mayoría de ellos proceden del *Developmental Studies Hybridoma Bank* (<http://www.HIOWA.edu/~dshbwww>) en Estados Unidos. En los casos en que han sido cedidos por investigadores particulares o adquiridos de una casa comercial, se ha añadido el nombre correspondiente en la columna "anticuerpo".



**Tabla M8.** Anticuerpos primarios

mAb: anticuerpo monoclonal.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Utilización</b>	<b>Animal donante</b>	<b>Dilución empleada</b>
mAb Miosina (Dr Dan Kiehart)	Detección del sistema muscular	Ratón	1:8
Even-skipped (Dr Manfred Frasch)	Detección de la proteína even-skipped	Conejo	1:2000
mAb BP 102 anti-CNS	Detección de los axones de las neuronas del Sistema Nervioso Central	Ratón	1:200
mAb 22C10	Detección del citoplasma y membrana interna de todas las neuronas del Sistema Nervioso Periférico y algunos axones sensoriales	Ratón	1:50
mAb EC11 anti-pericardina	Detección de la matriz extracelular que rodea a las células pericardiacas y cardiacas del tubo cardiaco	Ratón	1:2
mAb anti-FXN (Millipore)	Detección mediante <i>Western blot</i> para detectar la producción de Frataxina humana en <i>D. melanogaster</i>	Ratón	1:5000
mAb anti-GAPDH (Abcam)	Control interno del <i>Western blot</i> anterior	Conejo	1:3000

En la Tabla M9 se indican los **anticuerpos secundarios** utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica y en el western blot.

**Tabla M9.** Anticuerpos secundarios.

<b>Anticuerpo secundario biotinilado</b>	<b>Dilución empleada</b>	<b>Casa comercial</b>
IgG, (H+L) anti-conejo biotinilado hecho en cabra	1:200 en suero de cabra (PIERCE Cat. N° 31873) al 2%	PIERCE Cat. N° 31806
IgG, (H+L) anti-ratón biotinilado hecho en caballo	1:200 en suero de caballo (PIERCE Cat. N° 31874) al 2%	PIERCE Cat N° 31820
IgG, (H+L) anti-ratón conjugado a peroxidasa hecho en cabra	1:2000 en una mezcla de sueros de vaca, caballo y humano	SIGMA Cat N° A2304
IgG, (H+L) anti-conejo conjugado a peroxidasa hecho en cabra	1:2000 en suero humano	SIGMA Cat N° A0545

## 5. Medios, aditivos, tampones y disoluciones

### 5.1 Medios y aditivos para el cultivo bacteriano

Medio LB	hasta 1000 ml de agua destilada	10g Triptona 5g Extracto de Levadura 10g NaCl pH 7,0
Agar para placas	por 1000ml de LB	15g Agar
Kanamicina	por 1000ml de LB	1ml de una disolución de kanamicina de 25mg/ml en H <sub>2</sub> O destilada y estéril
Ampicilina	por 1000ml de LB	0,5ml de una disolución de ampicilina de 100mg/ml en H <sub>2</sub> O destilada y estéril
X-gal	por 1000ml de LB	2 ml de una disolución de X-gal de 20mg/ml en DMF

### 5.2 Medios, tampones y aditivos para el cultivo de células eucariotas

<i>Nutrient Mixture F12 (HAM)</i>	Medio base	Invitrogen Life Technologies
Suero bovino fetal (FCS)	10% en medio base	Invitrogen Life Technologies
Antibióticos (Penicilina/ Streptomycin)	1% en medio base	Invitrogen Life Technologies
PBS 1x	Lavado de las células	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 7,57 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Tripsina	Despega las células de la placa donde se cultivan	Invitrogen Life Technologies
DMSO	10% en medio completo (con suero y antibióticos) para congelación	Sigma

### 5.3 Tampones y disoluciones para la electroforesis en geles de agarosa

En este trabajo se han utilizado geles de agarosa al 1% de agarosa en TBE 1X y Bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. La electroforesis se realiza en posición horizontal del gel y empleando como tampón de electroforesis el TBE 1X.

Tampón de carga 6x	Carga del ADN en los geles de agarosa	0,05% azul bromofenol 0,05% azul de xilencianol 100 mM EDTA 0,5M pH 8,0 50% glicerol
TBE 1X	Tampón para elaborar los geles de agarosa y en el que se desarrolla la electroforesis	89 mM Tris 89 mM Ácido Bórico 2 mM EDTA
Bromuro de etidio	Tinción del ADN en los geles de agarosa	0,5 µg/ml en el gel y en el TBE

### 5.4 Tampones y disoluciones para geles SDS-PAGE y Western blot

Los geles de SDS-PAGE son geles desnaturizantes y discontinuos. Están formados por dos partes, la superior o de empaquetamiento (*stacking*) que acerca todas las proteínas amontonándolas en una banda, y la inferior o resolutive (*resolving*) que las separa por tamaño. Las muestras previamente a su carga son desnaturizadas y se mantienen en tampón de carga a 99°C.

Para la parte resolutive del gel se ha utilizado:

Acilamida/Bisacilamida 30%/0,8%	al 12% en 5ml de volumen
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	Concentración final de 400 mM
SDS 10%	Concentración final de 0,1%
Persulfato amónico 10%	Concentración final de 0,1% para la polimerización
TEMED	2µl, usado para la polimerización
H <sub>2</sub> O	Hasta un volumen final de 5ml

Para la parte empaquetadora del gel se ha utilizado:

Acrilamida/Bisacrilamida 30%/0,8%	al 5% en 5ml de volumen
Tris-HCl 1 M pH 6,8	Concentración final de 130 mM
SDS 10%	Concentración final de 0,1%
Persulfato amónico 10%	Concentración final de 0,1%
TEMED	1µl
H <sub>2</sub> O	Hasta un volumen final de 1ml

Otros tampones usados son:

Tampón de carga	900 µl TESA 300 µl SDS 10% 12 µl β-mercaptoetanol
Tampón TESA	0,1% Azul de Bromofenol 5 mM EDTA 200 mM Tris-HCl pH 8,8 1M sacarosa filtrada H <sub>2</sub> O hasta 50 ml
Tampón de electroforesis	30 g de Tris base 144 g Glicina 5 g SDS 10% H <sub>2</sub> O hasta 1 litro

Los tampones utilizados en el western blot son:

Tampón de transferencia a membrana para <i>Western blot</i>		2,9 g Glicina 5,8 g Tris base 0,37 g SDS 200 ml de metanol H <sub>2</sub> O hasta 1 litro
PBST	Lavados de la membrana	PBS 1X 0,05% Tween-20
Blocking	Bloqueo de la membrana	5% leche desnatada en polvo diluida en PBST 1X
ECL <sup>®</sup>	Detección de la señal	Amersham biosciences

## 5.5 Tampones para inmunofluorescencia

PBS +/-	Lavado de las células	PBS 1X 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub>
PFA 4%	Fijación de las células	4% Paraformaldehído en PBS
Blocking	Bloqueo de uniones inespecíficas, disolución de anticuerpos	1% BSA en PBS +/-
Mowiol	Montaje de las preparaciones	

## 5.6 Tampones para el análisis de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH)

### 5.6.1 Criosecciones

Glicergel	Montaje de larvas	Invitrogen Life Technologies
Tampón fosfato 0,1M pH 7,4	Preparación del tampón de Tetrazolio.  para pH 7,4 mezclar	0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O  40,5 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 9,5 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 50 ml de H <sub>2</sub> O
Solución Nitro-BT	Preparación del tampón de Tetrazolio.	10 mg nitro-BT 0,5 ml dimetilformamida 9,5 ml H <sub>2</sub> O
Cianuro de potasio 0,065% pH 7,2	Preparación del tampón de Tetrazolio.	0,1M KCN
Cloruro de magnesio 0,05M	Preparación del tampón de Tetrazolio.	0,05M MgCl <sub>2</sub>
Tampón de Tetrazolio	Preparación solución de tinción.	28% tampón fosfato 0,1M pH 7,4 28% solución NitroBT 11% KCN 0,065% pH 7,2 11% MgCl <sub>2</sub> 0,05M 22% H <sub>2</sub> O
Solución de succinato	Preparación solución de tinción.	2,3M Succinato disódico pH 7,4
Solución Menadion	Preparación solución de tinción.	5 mg vit K <sub>3</sub> 1 ml acetona

Paraformaldehído 4%	Fijación del tejido	4% Paraformaldehído en PBS
Solución de tinción	Tinción de las criosecciones	2 ml de tampón Tetrazolio 0,1 ml solución succinato 2 gotas solución Menadion

### **5.6.2 Espectrofotometría**

Tampón de incubación	Incubación proteínas mitocondriales	5 mM fosfato potásico pH 7,2 220 mM sacarosa 20 mM KCl 10 mM Hepes pH 7,2
Tampón de reacción	Tampón donde se realiza la medida de la actividad	100 mM trietanolamina pH 8,3 0,5 mM EDTA 2 mM KCN 2 mM INT 12 g/litro cromóforo EL 20 mM succinato pH 7,4

## **5.7 Tampones para el análisis de la actividad hidratasa de la aconitasa**

### **5.7.1 Tampones para el aislamiento de las proteínas mitocondriales**

Para realizar el análisis cuantitativo de la actividad hidratasa de la aconitasa se utilizan los siguientes tampones de extracción:

Tampón de aislamiento	Obtención de las mitocondrias	0,2 mM citrato sódico 50 mM Tris-HCl pH 7,4
Tampón de incubación	Incubación de las mitocondrias aisladas	50 mM Tris-HCl pH 7,4

Para llevar a cabo dicho análisis en gel de acrilamida se utiliza el siguiente tampón de extracción:

Tampón de lisis	150 mM Tris-HCl pH 8,0 50 mM NaCl 2mM citrato
-----------------	---

### 5.7.2 Análisis cuantitativo

Tampón de reacción	Tampón donde se realiza la medida de la actividad hidratasa de la aconitasa	200 $\mu$ l citrato trisódico 200 $\mu$ l isocitrato deshidrogenasa 200 $\mu$ l NADP <sup>+</sup> disuelto en Tris-HCl pH 7,4
--------------------	---	---

### 5.7.3 Análisis en geles de acrilamida

En este análisis se usan geles de acrilamida no desnaturalizantes y discontinuos. En este caso las muestras no se desnaturalizan antes de ser cargadas. La parte superior o de empaquetamiento se preparó a una concentración del 8% de acrilamida, y la inferior o resolutive a una concentración de acrilamida del 4%.

Para la parte resolutive del gel se ha utilizado:

Acrilamida/Bisacrilamida 30%/0,8%	al 8% en 5ml de volumen
Tris-HCl 0,5 M	Concentración final de 132 mM
Borato 0,5 M	Concentración final de 132 mM
Citrato 0,5 M	Concentración final de 3,6 mM
Persulfato amónico 10%	Concentración final de 0,14%
TEMED	5 $\mu$ l

Para la parte empaquetadora del gel se ha utilizado:

Acrilamida/Bisacrilamida 30%/0,8%	al 4% en 5ml de volumen
Tris-HCl 0,5 M	Concentración final de 67 mM
Borato 0,5 M	Concentración final de 67 mM
Citrato 0,5 M	Concentración final de 3,6 mM
Persulfato amónico 10%	Concentración final de 0,14%
TEMED	5 $\mu$ l

Otros tampones usados son:

Tampón de carga	25 mM Tris HCl pH 8'3 10% glicerol 0,025% azul de bromofenol
Tampón de electroforesis	25 mM Tris-HCl pH 8'3 Glicina 192 mM Citrato 3,6 mM

Para llevar a cabo la medida de la actividad aconitasa se utiliza una mezcla de los siguientes tampones:

Tris-HCl 1M pH 8,0	Concentración final de 100 mM
NADP 50 mM	Concentración final de 1 mM
cis-aconitato 50 mM	Concentración final de 2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	Concentración final de 5 mM
Bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT) 15 mM	Concentración final de 1,2 mM
Fenacina metosulfato (PMSF) 50 mM	Concentración final de 0,3 mM
Isocitrato deshidrogenasa	Se utilizan 5U/ml

El volumen total de la reacción depende del tamaño del gel pero por lo general se preparan 5 ml por gel.

### ***5.8 Tampones para la medida del consumo de oxígeno de las mitocondrias***

Tampón de aislamiento	Tampón de aislamiento de mitocondrias intactas	154 mM KCl 1 mM EDTA pH 7,4
Solución de respiración	Tampón de incubación de las mitocondrias preparadas para medir respiración	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM MgCl <sub>2</sub> 120 mM KCl 1,25 mg/ml BSA pH 7,4
Tampón I	Tampón de respiración a partir del complejo I	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM MgCl <sub>2</sub> 120 mM KCl 1,25 mg/ml BSA pH 7,4 60 mM NADH



Tampón II	Tampón de respiración a partir del complejo II	10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5 mM $\text{MgCl}_2$ 120 mM KCl 1,25 mg/ml BSA pH 7,4 100 $\mu\text{M}$ rotenona 100 mM succinato
Tampón III	Tampón de activación del ciclo de Krebs	10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5 mM $\text{MgCl}_2$ 120 mM KCl 1,25 mg/ml BSA pH 7,4 200 $\mu\text{M}$ piruvato 200 $\mu\text{M}$ malato

### ***5.9 Tampones para la hibridación *in situ* y la detección inmunohistoquímica en embriones de *D. melanogaster****

En el protocolo de hibridación *in situ*, en primer lugar se prepara y marca la sonda con la que se van a realizar las hibridaciones. Los tampones necesarios para ello son:

Tampón carbonato	Tampón que degrada la sonda en fragmentos pequeños para poder entrar en los tejidos	120 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 80 mM pH 10,2 $\text{NaHCO}_3$
Tampón de stop	Tampón de parada de la degradación	EDTA 8 mM
Tampón de precipitación		LiCl 0,4 M $\text{ARN}_t$ 0,35 $\mu\text{g/ml}$

Los discos son fijados con los siguientes tampones:

PBS 1X	Lavado del tejido	1,75 M NaCl 8,41 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1,86 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se ajusta el pH 7,4 con HCl
PP*	Fijación del tejido	PBS 1X 4% Paraformaldehido 0,1% Tween-20 0,1% Triton
PP*/DMSO	Fijación del tejido	PP*/DMSO 9:1
PBT	Lavados del tejido fijado	PBS 1X 0,1% Tween-20

En la hibridación se utilizan los tampones:

PBT	Lavado del tejido	PBS 1X 0,1% Tween-20
PBT/proteínasa-K	Tampón de permeabilización del tejido	PBT 1X Proteínasa-K 50 µg/ml
PBT/glicina	Tampón de parada del tampón de permeabilización	PBT 1X 2 mg/ml Glicina
Solución de prehibridación		50% formamida desionizada SSC 5X ARN <sub>t</sub> 200 µg/ml Esperma de salmón 222 µg/ml Solución Denhardt 0,1% Tween-20
Solución de hibridación		Solución prehibridación 1X 1:10-1:50 sonda
PBT-0,1%BSA	Lavado del y preabsorción del anticuerpo	PBTx 1X 0,1g BSA/100ml PBTx
Genius-3	Solución de detección	100 mM pH 9,5 Tris-HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Mezcla de la detección	Detección de la señal	9 µl NBT 7 µl X-fosfato 1 ml Genius-3

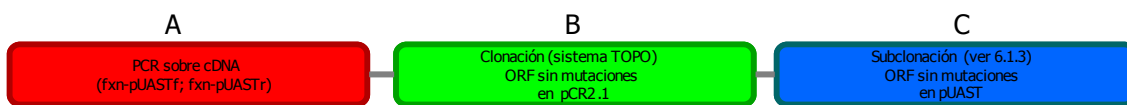
En la detección inmunohistoquímica se utilizan los siguientes tampones:

Solución de prehibridación		ARN <sub>t</sub> 500 µg/ml
Tritón 0,1%	Tampón de decorionización de embriones	50 µl Tritón X-100 (detergente no iónico) 50 ml H <sub>2</sub> O
PFA 4%	Fijación del tejido	4% Paraformaldehído en PBS
PBS 1X	Lavado de los embriones	1,75 M NaCl 8,41 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,86 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O se ajusta el pH 7,4 con HCl
PBTx 1X	Lavado de los embriones	PBS 1X 0,3% Tritón X-100
PBTx-2%BSA	Lavado de los embriones	PBTx 1X 2g BSA/100ml PBTx

## 6. Métodos moleculares

### 6.1 Determinación de la localización subcelular de la proteína frataxina

Para estudiar la localización subcelular de una proteína es necesario partir de la pauta de lectura del gen que la codifica. Posteriormente se clonó el correspondiente fragmento en pauta con el gen chivato, que en nuestro caso fue la proteína verde fluorescente (GFP). El siguiente esquema muestra los pasos realizados en la clonación de la pauta de lectura del gen *fh* en diferentes vectores, hasta la construcción final.



**Figura M1.** Esquema de los pasos seguidos para la obtención del constructo para localizar la proteína FH en la célula.

#### 6.1.1 Obtención de la pauta de lectura del gen *fh* (ORF-*fh*)

A partir de una muestra comercial de ARN poli(A<sup>+</sup>) de embrión de *D. melanogaster* (Invitrogen Life Technologies), se obtuvo, por retrotranscripción, el ADNc correspondiente. Esta reacción se llevó a cabo como sigue:

ARN poli(A <sup>+</sup> ) 100ng/μl	1 μl
Oligo dT (50pmol/ μl)	2 μl
H <sub>2</sub> Od	7.5 μl

Se desnaturalizó la mezcla de ARN y cebadores durante 10 min. a 65°C, pasándola después a hielo otros 5 min. A continuación se añadió:

Tampón de la Transcriptasa reversa 5x	4 μl
DTT (100mM)	2 μl
dNTPs (10mM)	2 μl
Inhibidor de RNasa	0.5 μl
Transcriptasa reversa	1 μl
Volumen total	20 μl

Esta mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 42°C.

Una vez obtenido el ADNc, se amplificó la región codificante de *fh* mediante PCR, usando los cebadores *fhpEGFPN3F* y *fhpEGFPN3R* y la ADN polimerasa Pwo (figura M1A), siguiendo el siguiente esquema:

ADNc	2 $\mu$ l
Tampón 10X	2.5 $\mu$ l
Cebador 1	1 $\mu$ l
Cebador 2	1 $\mu$ l
dNTPs	1 $\mu$ l
Polimerasa Pwo	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> Od	16.5 $\mu$ l
Volumen total	25 $\mu$ l

#### Programa de PCR

96°C	5'	} x 30
96°C	30"	
60°C	1'	
72°C	1'	
72°C	10'	
4°C	$\infty$	

### **6.1.2 Clonación de la ORF-*fh* en el vector pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>**

Los cebadores se diseñaron para incluir las secuencias de corte de las enzimas *BamHI* y *SacI*, para que las regiones codificantes de *fh* y *GFP* quedaran en pauta y que se pudiera generar una proteína de fusión (FH-GFP). El amplificado obtenido en el punto anterior se cargó en un gel de agarosa al 1.0% y, una vez finalizada la electroforesis, se cortó la banda de interés y se extrajo el fragmento de ADN mediante el kit *GFXPCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), eluyendo en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>Od. Para clonar el fragmento de la PCR se empleó el sistema TOPO<sup>®</sup> TA Cloning de Invitrogen (figura M1B). Este kit incluye el vector pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>, que está linealizado y presenta dos timidinas desapareadas y la enzima topoisomerasa localizada sobre el lugar de clonación. Normalmente, las polimerasas incorporan de forma inespecífica una adenina en el extremo amplificado. Estas aparearán con las timidinas del vector, y la topoisomerasa catalizará la ligación, de forma que el proceso puede realizarse en tan sólo 5 minutos. Al utilizar como ADN polimerasa el enzima Pwo que tiene actividad exonucleasa 3'→5', se generaron productos de PCR romos. Para poder clonarlos mediante este sistema fue necesario añadir adeninas en los extremos. Para ello se incubó durante 15' a 72°C la siguiente mezcla de reacción:

Banda extraída		x µl
dATPs (10mM)		0.5 µl
Tampón PCR 10X		1.25 µl
Polimerasa (Netzyme)		1 µl
H <sub>2</sub> O	hasta	12.5 µl

La cantidad de ADN que se añade a la reacción depende del rendimiento tanto de la reacción de amplificación por PCR, como de la extracción posterior del ADN a partir del fragmento de agarosa.

Con esta reacción de ligación se transforman bacterias competentes y, al día siguiente, pueden analizarse ya las colonias resultantes de la transformación.

### **6.1.2.1 Transformación**

Se transformaron bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH10B, preparadas según el método de Sambrook y Russell (2001). Para ello se descongelaron, en hielo, 200 µl de bacterias y se les añadió la totalidad de la ligación, manteniéndolas en frío durante 30 min. A continuación se sometieron a un choque térmico de 45 seg. a 42°C, volviendo a colocarlas después en hielo durante 1 o 2 min. Por último, se les añadió 800 µl de medio LB en condiciones estériles y se incubaron en agitación durante 1 hora a 37°C. Estas bacterias se sembraron en placas preparadas con LB y kanamicina, para seleccionar los clones bacterianos transformados. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

### **6.1.2.2 Cultivo de bacterias y extracción del ADN plasmídico**

Al día siguiente, tras comprobar por PCR las colonias con clones positivos para el inserto, se sembraron en 4 ml de LB con kanamicina, incubándolas toda la noche a 37°C con agitación. La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo con el kit *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del manual, pero con los siguientes cambios:

- se suprimió la incubación tras añadir el tampón de lisis
- una vez finalizados los todos los lavados, se dejó secar al aire durante 5 min., añadiendo después 40 µl de H<sub>2</sub>O (en lugar de 100 µl) e incubándolo durante 15 min.
- la centrifugación final se realizó durante 4 minutos a 12.500 rpm.

En los casos en que interesó obtener una mayor cantidad de plásmido, se usó el *Genopure Plasmid Midi o Maxi Kit* (Roche). En estos casos, también se

partió de un mayor volumen de cultivo, generado a base de incorporar un precultivo de 4 ml, crecido durante varias horas, a un volumen de entre 50 y 150 ml de LB con el antibiótico correspondiente para su incubación durante toda la noche.

La comprobación del ADN plasmídico obtenido se realizó mediante secuenciación.

### 6.1.2.3 Secuenciación y análisis de secuencias

El método de secuenciación aplicado está basado en el método de los didesoxinucleótidos (Sanger *et al.* 1977) y el kit utilizado ha sido el BigDye<sup>®</sup> terminator v3.1 Cycle sequencing kit, que incorpora en una única mezcla todos los componentes necesarios para la secuenciación, excepto el ADN y el cebador. En esta mezcla se incluyen los cuatro dNTPs, una polimerasa, el tampón de reacción y los cuatro didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia, cada uno con un fluorocromo diferente. El ADN que se quiere secuenciar actúa de molde y cada vez que la polimerasa incorpora uno de estos ddNTPs, lo que ocurre al azar, la síntesis se interrumpe, de forma que al final se habrá generado una mezcla de fragmentos de diferentes tamaños con su última base marcada. Esta mezcla se purifica, para eliminar aquellos ddNTPs que no se han incorporado, y se carga en un secuenciador que separará los fragmentos por electroforesis según su tamaño. Un láser permitirá identificar la base marcada en cada uno de los fragmentos obtenidos. Tanto la filtración de las reacciones, como su electroforesis y la lectura de las secuencias se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia. Las mezclas de reacción empleadas fueron las siguientes:

ADN		x µl
Cebador (10 pmol/µl)		0.5 µl
BigDye <sup>®</sup>		1.25 µl
H <sub>2</sub> O	hasta	10 µl

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el siguiente programa estándar:

96°C	5'	} x 36
96°C	30"	
50°C	15"	
60°C	4'	
4°C	∞	

Los cebadores utilizados en la secuenciación son los indicados en la tabla M3 de material y métodos. Se secuenciaron cinco clones y en ningún caso se

detectó ninguna mutación incorporada por la polimerasa. El único cambio coincide con un polimorfismo situado en la tercera base del codón 117 del gen *fh* y no modifica el aminoácido codificado, glicina (Q). Para analizar las secuencias se usó el programa *Sequencher* versión 4.0.5 de la empresa *Gene Codes Corporation*, que permite visualizar los cromatogramas y así comprobar la calidad de las secuencias, pudiéndolas editar en caso de errores en la asignación de bases por parte del secuenciador. Además este mismo programa puede realizar alineamientos múltiples, de forma que se pueden alinear las diferentes secuencias y analizarlas conjuntamente, o generar la secuencia completa de un ADNc a partir de fragmentos de secuencia solapantes, comparando al mismo tiempo con la secuencia de referencia de la base de datos.

Las secuencias editadas se usaron también en otros programas, como BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) en sus diferentes versiones (BLASTN, BLASTP, BLAST2SEQ), ORF Finder, etc.

### **6.1.3 Subclonación de la ORF-*fh* en el vector pEGFP-N3**

#### **6.1.3.1 Digestión**

La clonación del ADNc de *fh* en el vector pCR2.1 fue un paso intermedio para facilitar su clonación en el vector pEGFP-N3. Las dianas de los enzimas *BamHI* y *SacI*, presentes en los cebadores utilizados en la obtención del ADNc, sirvieron para su clonación en pEGFP-N3.

El primer paso en la subclonación fue digerir el clon *fh*-pCR2.1 y el vector pEGFP-N3 con estos enzimas. Las digestiones se realizaron con las siguientes mezclas de reacción, incubándolas durante 2 horas a 37°C:

Clon <i>fh</i> -pCR2.1	hasta	1 µg	Vector pEGFP-N3	hasta	1 µg
Tampón		2 µl	Tampón		2 µl
<i>BamHI</i>		1 µl	<i>BamHI</i>		1 µl
<i>SacI</i>		1 µl	<i>SacI</i>		1 µl
H <sub>2</sub> Od	hasta	20 µl	H <sub>2</sub> Od	hasta	20 µl

La totalidad de las digestiones se cargó, en un gel de agarosa al 1.0% y se cortaron las bandas de interés, eluyéndolas en 20 µl de H<sub>2</sub>Od.

#### **6.1.3.2 Ligación**

Una vez obtenidos los fragmentos se procedió a la ligación de las moléculas de vector e inserto. Para cada ligación, las cantidades de vector e inserto añadidas se determinaron, cargando previamente 1 µl de los fragmentos

extraídos en un gel de agarosa, para comprobar su concentración relativa. La mezcla de ligación fue:

Inserto	hasta	1 µg
Vector digerido	hasta	0.5 µg
Tampón para la ligasa T4 (10X)		1-2 µl
Ligasa T4		1 µl
H <sub>2</sub> O	hasta	12,5 µl

El volumen final de la reacción de ligación se determinó en función de las cantidades de vector e inserto empleadas, procurando mantenerlo siempre lo menor posible. Las reacciones se incubaron toda la noche a 14°C, guardándolas después a -20°C hasta su uso en la transformación de bacterias competentes.

### **6.1.3.3 Transformación, cultivo de bacterias, extracción del ADN plasmídico y secuenciación**

Con las reacciones de ligación se transformaron bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH10B, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.1.2.1. Posteriormente se cultivaron las bacterias y se extrajo el ADN plasmídico.

La secuenciación se realizó mediante el método de secuenciación descrito en el apartado 6.1.2.3 de material y métodos.

### **6.1.4 Transfección del clon pEGFP-N3 en células eucariotas**

Las células CHO-K1 se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, y las células S2 a 30°C, en el Servicio de Cultivos Celulares de la Universitat de València. En ambos casos, se utilizó el reactivo FuGENE6 de Roche para la transfección. Los pasos seguidos fueron:

Día 1:

- Depositar sobre varios cubreobjetos, colocados en el fondo de los pocillos de una placa de 24 pocillos, 0.5 x 10<sup>4</sup> células en medio base (medio F12 HAM más suero bovino fetal para las CHO-K1 y medio de células S2 para las células de *Drosophila*) sin antibióticos.
- Incubar hasta el día siguiente a la temperatura correspondiente.



Día 2:

- Para cada pocillo se prepara, en un tubo de 1,5 ml, la mezcla de transfección añadiendo 97  $\mu$ l de medio de cultivo sin suero ni antibióticos y 3  $\mu$ l de FuGENE 6 atemperado directamente en el medio, cuidando de no tocar las paredes del tubo.
- Mezclar e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
- Añadir 1  $\mu$ g del clon a transfectar, mezclar e incubar durante 15 min a temperatura ambiente.
- Añadir esta mezcla gota a gota a las células, agitando suave pero continuamente para que se mezcle bien.

Día 3:

- Análisis de las células transfectadas. En su forma más simple consiste en fijar las células con paraformaldehído, lavar y montar sobre un portaobjetos (se llevan a cabo los tres primeros pasos de la inmunofluorescencia que se describe a continuación, pero con 3 lavados en PBS antes del montaje). Sin embargo, si se quiere marcar alguna estructura celular, puede hacerse con sondas específicas (inmunofluorescencia, ver 6.1.5).

### ***6.1.5 Inmunofluorescencia.***

Cuando se quiere determinar la localización subcelular de una nueva proteína, puede ser necesario marcar alguna estructura celular con moléculas específicas, para así complementar la información obtenida con la GFP fusionada a dicha proteína. En este caso fue necesaria una tinción de mitocondrias, para lo que se empleó una sonda comercial derivada de la tetrametilrosamina (MitoTracker Orange CMTMRos). El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Lavado rápido de las células con PBS +/+
- Fijación durante 10 min con una disolución de paraformaldehído al 4% en PBS
- 2 lavados de 10 min cada uno con PBS +/+
- Incubación durante 5 min en Triton-X-100 al 0,2% en PBS para permeabilizar las células y permitir la entrada de la sonda que tiñe las mitocondrias.
- 1 lavado de 10 min en PBS +/+
- Incubación durante 1 hora con la sonda que marca las mitocondrias diluida en PBS +/+
- 3 lavados de 10 min cada uno con PBS +/+
- Lavado rápido con H<sub>2</sub>O y montaje sobre un portaobjetos con Mowiol

La preparación debe dejarse hasta el día siguiente, antes de observarla al microscopio.

## 6.2 Obtención de moscas transgénicas para la mutagénesis estructural de *fh* por *p-homing*

La especificidad de inserción del elemento P en un determinado gen, aumenta cuando incorpora un fragmento de ADN correspondiente a las secuencias reguladoras de dicho gen.

### 6.2.1 Obtención de la construcción *fh-Phoming*

Se partió de un clon portador de un fragmento de alrededor de 4 kb de ADN genómico del locus de *fh* clonado en pUC18 (clon CB). A partir de 1 µl de ADN plasmídico de dicho clon, se amplificó un fragmento de 1,4 kb que contenía el extremo 5' del gen junto con la secuencia adyacente a dicho extremo. Los cebadores utilizados para la reacción de PCR fueron el pHomF (diseñado a partir de la secuencia aguas arriba del inicio de *fh*) y el cMelrev (del propio gen *fh*). Esta reacción se llevó a cabo de la misma forma que la mostrada en la sección 6.1.1 de material y métodos, con la misma temperatura de unión de los cebadores, 60°C, y con un tiempo de extensión de 2 minutos.

El producto de la PCR fue clonado directamente en el sitio *EcoRV* del vector *pCR-Script SK(+)*, obteniéndose la construcción *fh-Phoming*.

La ligación se llevó a cabo con el vector previamente desfosforilado. La reacción de desfosforilación se mantuvo durante 2 horas a 37°C:

vector digerido con <i>EcoRV</i>		x µl
Tampón (10X)		1 µl
Fosfatasa alcalina		1 µl
H <sub>2</sub> O	hasta	10 µl

Posteriormente, se inactivó la enzima a 65°C durante 20 min. y se guarda la reacción en nevera a 4°C o se congela a -20°C hasta su uso.

Se transformaron bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH10B, y se sembraron en placas preparadas con LB y ampicilina, puesto que el vector *pCR-Script SK(+)* contiene un gen que confiere resistencia a dicho antibiótico. Una vez transformadas la bacterias, se realizó un cultivo bacteriano y se extrajo el ADN plasmídico tal y como se ha indicado en anteriores apartados.

Se secuenciaron cinco de estos clones y en uno de ellos no se detectó ninguna mutación incorporada por la ADN polimerasa. La secuencia del clon coincide con otras previamente obtenidas en nuestro laboratorio y con la secuencia del clon AF208492 de la base de datos GeneBank. La construcción *fh-Phoming* clonada en el vector *pCR-Script SK(+)* fue subclonada en el vector

*pUAST*, en los sitios *NotI* y *KpnI*. Las digestiones de dicha construcción y del vector *pUAST*, la ligación entre ambos fragmentos, su transformación en cepas bacterianas, la extracción de ADN plasmídico y la secuenciación de 5 de los nuevos clones en *pUAST*, se llevaron a cabo como se ha descrito en otras secciones.

## **6.2.2 Obtención de individuos transgénicos para la construcción *fh-Phoming***

### **6.2.2.1 Preparación de la mezcla de inyección**

- Se mezclan, en un tubo de 500  $\mu$ l, 20  $\mu$ g de la construcción a inyectar y 5  $\mu$ g de plásmido ayudante, que codifica la transposasa necesaria para la inserción en el genoma, y se añade H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen de 100  $\mu$ l.
- Se precipita la mezcla con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y NaAc 3M pH 5,2 (24:1) toda la noche a -20°C.
- Al día siguiente se centrifuga la mezcla a 14000 rpm durante 15 min a 4°C.
- Se lava el precipitado dos veces con EtOH 70% frío, 0,2 M NaCl a -20°C, centrifugando 5 min a 14000 rpm y a 4°C en ambos lavados.
- Se realiza un último lavado con EtOH 70% frío (-20°C), centrifugando 5 min a 14000rpm y a 4°C.
- Se seca el precipitado al aire o en el bloque seco a 37°C y se redisuelve en 50  $\mu$ l de tampón de inyección. Se comprueba en gel de agarosa obteniéndose 2-3 bandas de alto peso molecular.
- Se guarda a -20°C hasta su uso.

### **6.2.2.2 Obtención de los embriones**

Se utilizaron embriones *yw* de 0-1 h. El uso de este fondo genético es útil para distinguir no sólo los individuos transformados, sino también las contaminaciones por otras cepas de *Drosophila*. Es importante tener siempre una población elevada de moscas en cultivo, como recambio de las que están siendo utilizadas para la obtención de embriones.

- Antes de empezar los experimentos, se sometió a las moscas a un periodo de adaptación de dos o tres días en el sistema de puesta de huevos (*Tubular fly cage*, Labscientific inc. Cat. N° BGSU-4).
- Se cultivaron las moscas en un incubador a 18°C bajo un ciclo día-noche (día desde 2AM a 2PM y noche desde 2PM a 2AM) puesto que así se incrementa la eficacia en la puesta de huevos. Las moscas ponen más huevos durante el ciclo de noche.
- Durante el transcurso de los experimentos, se sincronizaron los embriones diariamente. Para ello se cambia la placa varias veces a lo largo de

las primeras 2-3 horas y luego se coloca la primera placa de recogida que se deja 1 hora, al final de esa hora se cambia de nuevo la placa y así sucesivamente.

### ***6.2.2.3 Preparación de la aguja y del aceite de microinyección***

- El aceite de inyección se oxigena durante 3 horas antes de la microinyección, porque así se favorece la supervivencia de los embriones. Se prepara la aguja de microinyección (femtotips, Eppendorf Cat. N° 5242 952.008) unos minutos antes de iniciar el proceso.
- Se centrifuga la mezcla de inyección 10 min a 4°C a máxima velocidad para enviar al fondo las moléculas más grandes.
- Se toman unos 20 µl de la parte de arriba de la mezcla con puntas especiales de carga (microloader, Eppendorf Cat. N° 5242 953.003) y se llena la aguja con unos 2 µl de mezcla con cuidado de no generar burbujas.
- En un portaobjetos se colocan 3-4 embriones, se decorionizan y se cubren de aceite, se pone el portaobjetos en la platina y se enfocan los embriones. A continuación se enfoca el borde del portaobjetos, se retira éste y se acerca la aguja hasta que quede enfocada, sin tocar el microscopio, de modo que veamos sólo el extremo de la aguja. Se acerca el portaobjetos hasta que quede muy próximo a la aguja y con un movimiento seco rompemos el extremo de la aguja intentando hacerla lo más fina posible.

### ***6.2.2.4 Montaje de los embriones (18°C)***

- Para una sesión de inyección de 4 horas se preparan unos 8-10 portaobjetos (2 por cada hora). En cada uno de los portaobjetos se coloca en su centro un trozo de celo de doble cara y el pegamento de montaje en uno de los bordes.
- Se recogen los embriones de la placa de puesta con un pincel y se extienden sobre el celo de doble cara.
- Con el gancho manipulador (que lleva en su extremo un trozo de alambre fino doblado a modo de garfio) se ruedan los embriones para decorionizarlos, con cuidado de no dañarlos.
- Se escogen aquellos que sean jóvenes (cuanto más opacos mejor) y se colocan sobre el pegamento de montaje, con el extremo posterior (donde están las células polares) hacia fuera.
- Se montan en grupos de cinco durante 10-12 min. Es importante que no estén muy juntos para que puedan respirar bien.

### **6.2.2.5 Desecado de los embriones (18°C)**

La cámara de desecación es un recipiente en el que colocamos como desecador sulfato cálcico anhidro en polvo, con una toallita de papel encima para que el contacto no sea directo. El desecador hay que cambiarlo cuando se hidrata.

- Se coloca el portaobjetos (al que le hemos quitado el celo de doble cara) con los embriones decorionizados en la cámara de desecación durante 10-12 min. Este tiempo es crítico y se ha de ir regulando. Transcurrido el mismo se saca el portaobjetos y los embriones se cubren con aceite halocarbonado oxigenado de la serie 700 (Sigma Cat. Nº H-8898), con cuidado de no ensuciar la parte inferior del portaobjetos.

### **6.2.2.6 Microinyección de los embriones (18°C)**

- Se sitúa un portaobjetos, con embriones ya desecados, en un microscopio invertido con el objetivo de 40 aumentos y se empieza desde la parte inferior del portaobjetos. Se coloca la aguja en el centro de un embrión haciendo presión hasta atravesar la membrana.

- Se saca la aguja hasta quedar dentro solo el extremo de la misma y entonces se inyecta la burbuja de ADN ejerciendo presión sobre la jeringuilla y observando como se desplaza ligeramente el frente de las células polares.

- Se limpia la aguja de cualquier resto del embrión y se sigue el proceso repitiendo los pasos anteriores, moviendo la platina del microscopio.

- Se revisan en el microscopio los embriones inyectados y se hace una lista de los que tienen mejor aspecto. Posteriormente, se eliminan bajo la lupa los embriones inservibles (los embriones que se han montado al revés, torcidos, viejos, secos, húmedos, rotos, etc.).

- Se colocan los portaobjetos en placas cuadradas con medio de puesta de huevos y se recubren de nuevo los embriones con aceite, se nivelan las placas y se dejan a 18°C durante unas 36 horas.

### **6.2.2.7 Obtención de líneas transformadas**

- Transcurridas unas 36 horas, los portaobjetos con los embriones se pasan a temperatura ambiente y se empiezan a buscar larvas supervivientes, durante un par de días.

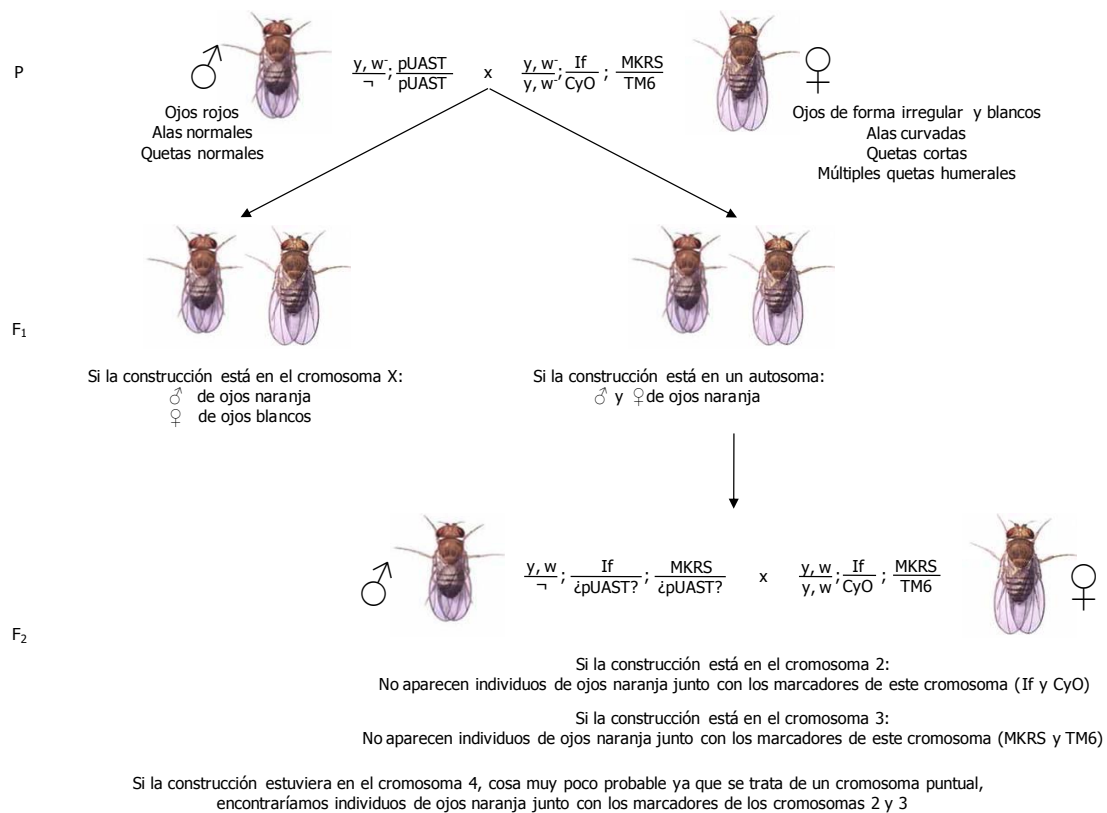
- Todas las larvas supervivientes que hayan sido inyectadas con la misma construcción se colocan en el mismo vial con comida y se espera a que se desarrollen hasta adultos. Conviene cuartear la comida para evitar que se seque si colocamos pocas larvas.

- La descendencia de los adultos supervivientes son los posibles individuos transformados, porque la inyección ha tenido lugar en las células polares. Por ello se cruzan estos adultos con moscas de la cepa *yw*.

- Se observa la descendencia para detectar moscas que tengan los ojos rojos, ya que ellas habrán incorporado el plásmido inyectado. De cada línea transformada se seleccionan 3-4 individuos y se cruzan de nuevo con moscas *yw* para amplificar el cromosoma con la inserción.
- A continuación se establece la línea transformada, con la inserción en homocigosis siempre que sea posible.
- Finalmente, mediante cruces sencillos, se mapean las inserciones obtenidas (figura M2). Es interesante conocer su localización para comprobar, en los experimentos posteriores, si los fenotipos obtenidos son debidos a su efecto intrínseco y no a la posición de la inserción.

### 6.2.3 Localización de las inserciones

En la figura M2 se presenta un esquema de los cruces necesarios para conocer la localización de las construcciones microinyectadas.



**Figura M2.** Esquema de los cruces necesarios para mapear las nuevas inserciones microinyectadas.

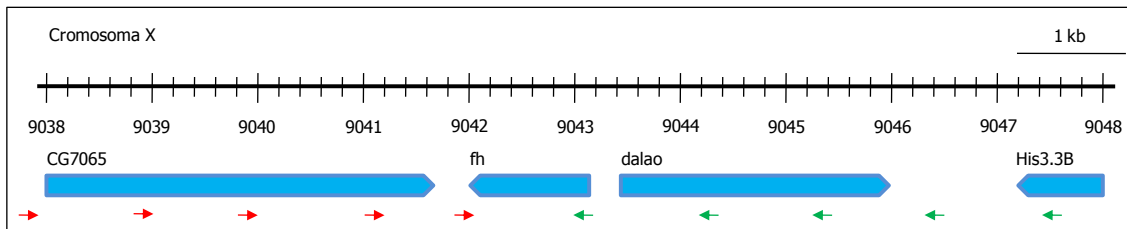
Para determinar la localización exacta de la construcción dentro de cada cromosoma y saber si se ha insertado en el locus *fh* o cerca de él, se llevaron a cabo PCR multiplex y PCR inversa.

### 6.2.3.1 PCR multiplex

La PCR multiplex es una variante de la PCR donde se emplean dos o más pares de cebadores en una única reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. En nuestro caso la reacción se realizó con 10 cebadores diseñados para cubrir la zona adyacente y el locus *fh* (figura M3). El programa de PCR fue:

#### PCR

96°C	5'	} x 30
96°C	30''	
60°C	1'	
72°C	4'	
72°C	10'	
4°C	∞	



**Figura M3.** Esquema de la región genómica donde se localiza el gen *fh*. Se indica, mediante flechas cortas, la posición de los cebadores utilizados en la PCR multiplex.

Como ADN molde se utilizó ADN genómico de cada una de las líneas transformadas a partir de 80-100 individuos. El ADN genómico se extrajo siguiendo el método de Junakovic *et al.* (1984) con una serie de modificaciones establecidas en nuestro laboratorio. Las modificaciones afectan al volumen de los distintos tampones y a la incorporación de pasos de purificación mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, dado que la cantidad de restos celulares e impurezas era elevada al partir de dicho número de adultos.

### 6.2.3.2 PCR inversa

Mediante este tipo de reacción es posible obtener fragmentos de ADN genómico correspondientes a las regiones adyacentes a las inserciones de la construcción *fh-Phoming*.

El método que hemos empleado puede encontrarse en la dirección página *web* del proyecto genoma de *Drosophila melanogaster* ([www.fruitfly.org/about/methods/pcr.inverse.html](http://www.fruitfly.org/about/methods/pcr.inverse.html)). Brevemente:

-Se digieren 500 ng de ADN genómico de cada línea transformada con las enzimas adecuadas. En nuestro caso, hemos empleado *CfoI* (isoesquizómero de *HinP1I*) que corta en ambos extremos del elemento.

-Posteriormente se inactiva el enzima de restricción mediante calor (20 minutos a 65°C) y se precipita el ADN con etanol absoluto y NaCl.

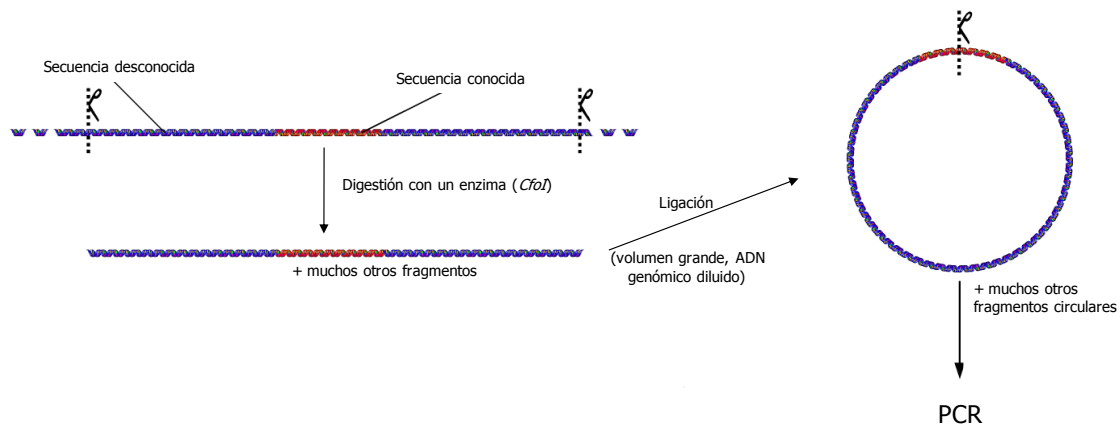
-Se liga el ADN digerido en un volumen elevado (400 µl), para favorecer la recircularización de los fragmentos frente a la unión de distintos fragmentos entre si. La reacción de ligación se incuba toda la noche a 4°C. La ligasa utilizada fue la del fago T4 (Roche).

- Se precipita de nuevo del ADN con etanol absoluto y NaCl 5 M

- Se disuelve en 50 µl de H<sub>2</sub>O.

- Se prepara la reacción de PCR, empleando las parejas de cebadores especificados en la tabla M3. El programa de PCR usado en este caso fue el mismo que la PCR multiplex pero con una temperatura de asociación de 50°C.

- El fragmento resultante será posteriormente purificado con el kit *JetQuick PCR Purification spin kit/250* (Genomed).



**Figura M4.** Esquema del protocolo de PCR inversa.

## 6.3 Obtención de moscas transgénicas portadoras del gen humano *FXN*

### 6.3.1 Obtención de la construcción *FXN-pUAST*

Primeramente se obtuvo la pauta de lectura completa del gen *FXN*, a partir de ARN poli(A<sup>+</sup>) de cerebro fetal humano (Invitrogen), generando ADNc por retrotranscripción utilizando el cebador oligo(dT)<sub>15</sub>. Del ADNc se amplificó la región codificante de *FXN* mediante PCR, usando los cebadores *fxn-pUASTf* y *fxn-pUASTr* y la ADN polimerasa Pwo. El protocolo seguido en este caso es idéntico al que se detalla en el punto 6.1, así como los pasos realizados para la clonación de la ORF de *FXN* en el vector *pCR2.1-TOPO* como paso previo a su clonación en el vector *pUAST*.



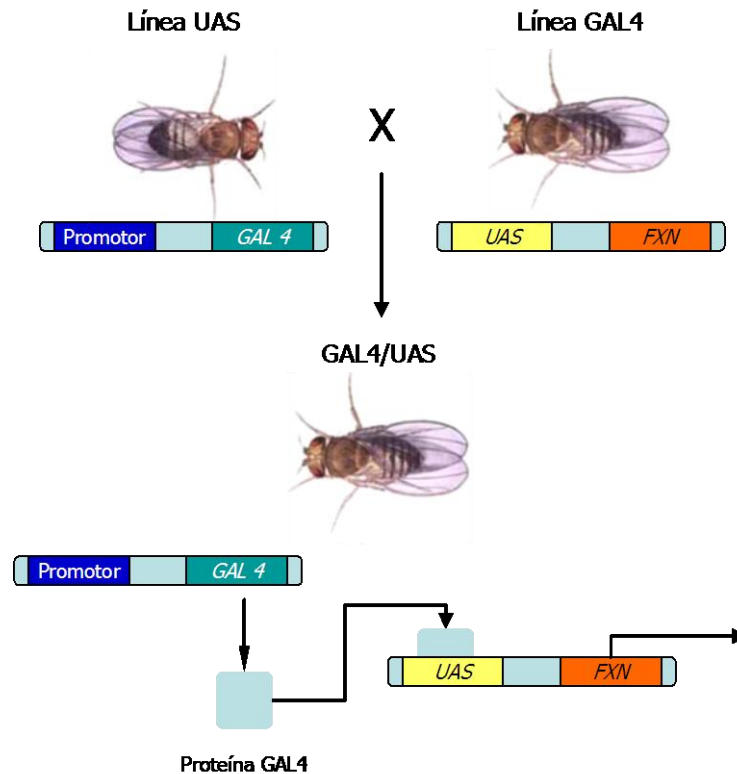
Los cebadores utilizados en la amplificación de la pauta de lectura de *FXN* se diseñaron para que presentasen secuencias diana de los enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*. El primer paso en la subclonación fue la digestión, con estas enzimas, del constructo *FXNpCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>* y el vector *pUAST*. Estas digestiones se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado 6.1.3.1. Una vez obtenidas las bandas se procedió a la ligación de las moléculas de vector e inserto, tal y como se describe en el apartado 6.1.3.2.

### ***6.3.2 Obtención de individuos transgénicos portadores de la construcción FXN-pUAST***

Todos los pasos para poder obtener individuos transgénicos portadores de la construcción FXN-pUAST coinciden con los descritos en el punto 6.2.2 y sus correspondientes apartados.

### ***6.4 Obtención de mutantes funcionales por silenciamiento del gen *fh* y por sobreexpresión del gen *FXN*: El sistema UAS-GAL4***

El sistema UAS/GAL4 (Brand and Perrimon, 1993) permite controlar y/o dirigir la expresión de una proteína de interés en un patrón de expresión concreto. Este sistema, originario de la levadura, se basa en el uso del factor de transcripción GAL4 y su capacidad de unión a las secuencias activadoras de la transcripción, secuencias UAS. Para ello, se parte de una línea de moscas transgénicas que contenga en su genoma una construcción donde la región codificante de la proteína GAL4 esté bajo el control de las regiones reguladoras de interés. Al mismo tiempo, se construye otra línea de moscas que contengan en su genoma una construcción donde la región codificante del gen de interés quede bajo control de las secuencias reguladoras de la transcripción UAS. Al cruzar estas dos líneas de moscas se obtienen descendientes que contienen ambas construcciones (GAL4 y UAS) de manera que, la región reguladora dirigirá la expresión de la proteína GAL4 según su propio patrón y esta proteína GAL4 se unirá a las secuencias reguladoras UAS que dirigirán a su vez la expresión del gen de interés (figura M5). De esta forma, lo que finalmente conseguimos es que el gen de interés se exprese bajo el control de las regiones reguladoras de interés. Debido a la naturaleza binaria del sistema (línea UAS y línea GAL4) la expresión de un mismo gen puede ser dirigida a distintos tejidos sin necesidad de generar nuevas moscas por transformación de la línea germinal.



**Figura M5.** Esquema del sistema de expresión UAS/GAL4. Las cepas GAL4 expresan la proteína GAL4 en un patrón determinado. Cuando ambas construcciones coincidan en un mismo individuo, este expresará la proteína de interés en el patrón apropiado.

Este sistema se ha aplicado tanto para la sobreexpresión del gen *FXN* como para la interferencia del gen *fh*. En este último caso, la construcción UAS contiene dos copias de ADNc de *fh*, invertidas una respecto de la otra, y separadas por un fragmento de unas 500 pb de otra secuencia diferente (en nuestro caso fue de la proteína GFP). De esta manera se formará una estructura de ARN de doble cadena necesaria para que se produzca el mecanismo de ARNi y por lo tanto se interfiere la expresión del gen *fh*. Se realizaron cruces entre hembras vírgenes GAL4 y machos de las líneas transformadas (UAS-*FXN* y UAS*fhIR*). La importancia de seleccionar vírgenes reside en el hecho de que las hembras de *Drosophila* suelen retener en su interior esperma de la primera cópula y esto impediría un análisis adecuado de la prole real del cruce.

Las líneas GAL4 empleadas ya fueron descritas en el apartado 1.3 de material y métodos. Los cruces tuvieron lugar a tres temperaturas diferentes (29°C-25°C-21°C) que serán especificadas en cada caso. Cada experimento incluyó el cruce control (*yw* x *driver*-GAL4)

## **6.5 Análisis de la expresión de los genes *fh* y *FXN***

El análisis de la expresión de ambos genes se abordó mediante Western blot y PCR cuantitativa.

### **6.5.1 Western blot**

#### **6.5.1.1 Extracción de proteínas totales**

Se extrajeron proteínas totales de unas 50 larvas con el gen *fh* interferido (individuos *actin-GAL4/UAS-fhIR*), 50 larvas que sobreexpresaban el gen *FXN* (individuos *actin-GAL4/UAS-FXN*) y del correspondiente control (individuos *actin-GAL4/yw*). La homogenización se realizó en el tampón de aislamiento de proteínas mitocondriales. Tras esta homogenización se centrifugaron las muestras para eliminar los restos, y el sobrenadante se mezcló con el tampón de carga de proteínas, calentándose la muestra a 99°C durante 10 minutos. Posteriormente se cargaron las muestras en un gel desnaturante de proteínas *SDS-PAGE*. Para cargar la misma cantidad de proteína en todas las carreras se mide la concentración de cada una de las muestras mediante el método Bradford de cuantificación de proteínas (Bradford *et al.* 1974).

#### **6.5.1.2 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa**

En primer lugar se corre un gel *SDS-PAGE*, al 12% la parte resolutive y al 5% la parte empaquetadora, desnaturante y discontinuo. Una vez corrido el gel *SDS-PAGE* y separadas las proteínas según su peso molecular, éstas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa Hybond™-ECL™ (Amersham Biosciences) mediante el sistema semi-seco de Amersham Biosciences. Para una transferencia eficaz de las proteínas se calcula el amperaje de la transferencia según la siguiente regla: 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de la membrana.

#### **6.5.1.3 Revelado de las membranas**

La membrana se revela siguiendo el siguiente protocolo:

- En primer lugar se bloquea la membrana en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C
- Una vez bloqueada la membrana se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBST
- Se añade el anticuerpo primario a la dilución adecuada dejándolo actuar durante 1-2 horas.

- Se continúa haciendo 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBST para eliminar el exceso de anticuerpo
- Se añade el anticuerpo secundario a la dilución adecuada dejándolo actuar durante 1-2 horas.
- Se vuelven a realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBST.
- Por último, antes de revelar el western blot, se incuba la membrana con la solución de revelado ECL<sup>®</sup> de Amersham Biosciences, en oscuridad.

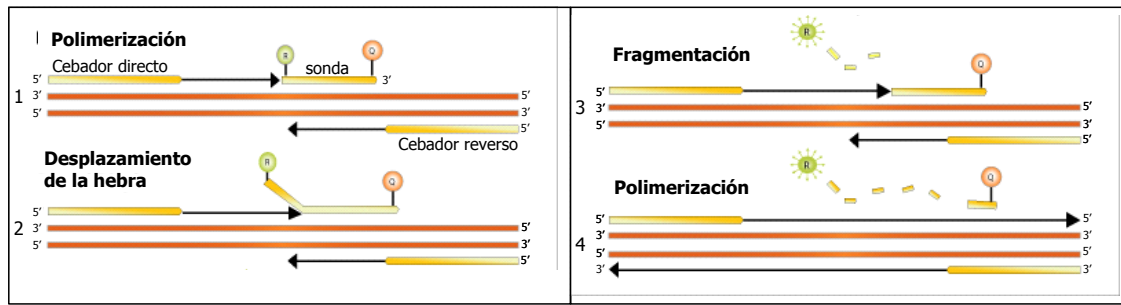
## **6.5.2 PCR cuantitativa**

### **6.5.2.1 Obtención de ADNc para PCR cuantitativa**

El ADNc se obtuvo por retrotranscripción a partir de ARN extraído de unos 100 individuos adultos *actin-GAL4/UAS-fhIR* en el caso de la interferencia de *fh*, de 100 individuos adultos *actin-GAL4/UAS-FXN* (sobrexpresión de *FXN*) y 100 adultos *actin-GAL4/yw* (control). Esto se llevó a cabo usando el kit *QuickPrep<sup>TM</sup>* (Amersham) siguiendo las instrucciones del manual. Con este kit, la fracción poli(A<sup>+</sup>) se obtiene mediante cromatografía de afinidad en columnas de celulosa de oligo(dT). El ARN mensajero es retenido por esta celulosa en condiciones de alta fuerza iónica, y su elución se lleva a cabo en condiciones de baja fuerza iónica. Dicho mensajero se trata posteriormente con *RQ1 Rnase-Free Dnase* (Promega), 15 min a 37°C, para eliminar el ADN genómico que pudiese quedar en la muestra. La ADNasa se elimina por fenolización y el ARNm se precipita con 3 volúmenes de EtOH absoluto y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Ac 4 M.

### **6.5.2.2 Reacción de PCR**

La PCR cuantitativa se realizó mediante el uso de las sondas TaqMan<sup>®</sup> indicadas anteriormente (apartado 6.3). Estas sondas están formadas por 20-25 nucleótidos y llevan un fluorocromo en uno de sus extremos y un secuestrador de fluorescencia en el otro, de forma que la emisión de fluorescencia en la sonda intacta es nula. La sonda aparece con el fragmento que se pretende amplificar y cuando la ADN polimerasa, que posee actividad 5'→3' exonucleasa, llega a la posición de la sonda, comienza a degradarla. Esto hace que el fluorocromo se separe físicamente del secuestrador y pueda emitir fluorescencia, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de producto sintetizado. En la siguiente figura está esquematizado el proceso.



**Figura M6. Esquema de la técnica empleada en la PCR cuantitativa.**

1. La sonda Taqman, con el fluoróforo en un extremo y el secuestrador en el otro, aparece con el fragmento que se quiere amplificar. 2. Cuando la polimerasa alcanza la posición en la que hibrida la sonda, su actividad exonucleasa 5'→ 3' comienza a degradarla. 3. Esta degradación permite que el fluoróforo se separe físicamente del secuestrador, pudiéndose así registrar su fluorescencia. 4. La polimerasa completa la elongación y puede comenzar un nuevo ciclo.

Para la reacción se usó el *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que incluye todos los reactivos necesarios, excepto la sonda TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems), los cebadores y el ADNc. En la disolución de la sonda TaqMan<sup>®</sup> correspondiente a cada gen se encuentran también los cebadores para la reacción de PCR. En concreto, la mezcla de reacción fue la siguiente:

Mix (2X)	12.5 µl
Sonda TaqMan <sup>®</sup> (20X)	1.25 µl
ADNc	1.5 µl
H <sub>2</sub> O	9.75 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

Se llevaron a cabo 3 réplicas de la amplificación del ADNc en cada línea (*actin-GAL4/UAS-fhIR*, *actin-GAL4/UAS-FXN* y *actin-GAL4/yw*). Además se realizó una amplificación con 3 diluciones de cada tipo de ADNc (1; 1/10; 1/100), haciendo 3 réplicas por dilución, para el cálculo de la eficiencia de la PCR. El programa empleado fue:

50°C	2min	
95°C	10min	
95°C	15seg	} x 40
60°C	1min	

### 6.5.3 Análisis de los resultados

El método seguido para el análisis fue de cuantificación relativa, por comparación del valor  $C_T$ . Es un método similar al de las curvas Standard, pero en este caso se emplean fórmulas matemáticas para la cuantificación.

La ecuación que describe la amplificación exponencial que tiene lugar en la reacción de PCR es:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

Donde  $X_n$  = número de moléculas diana en el ciclo  $n$   
 $X_0$  = número inicial de moléculas diana  
 $E_x$  = eficiencia de la amplificación de la diana  
 $n$  = número de ciclos

El ciclo umbral ( $C_T$ ) indica el número fraccional de ciclo en el que la cantidad de diana amplificada alcanza un umbral determinado. Por tanto:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x$$

Donde  $X_T$  = número umbral de moléculas diana  
 $C_{T,X}$  = ciclo umbral para la amplificación de la diana  
 $K_x$  = constante

Una ecuación similar para la reacción de referencia es:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

Donde  $R_T$  = número umbral de moléculas de referencia  
 $R_0$  = número inicial de moléculas de referencia  
 $E_R$  = eficiencia de la amplificación de la referencia  
 $C_{T,R}$  = ciclo umbral para la amplificación de la referencia  
 $K_R$  = constante

Si se divide  $X_T$  entre  $R_T$ , se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K$$

Como los valores exactos de  $X_T$  y  $R_T$  dependen de varios factores, la constante  $K$  no tiene que ser necesariamente 1.

Asumiendo que la eficiencia de la amplificación de la referencia y la diana son iguales:

$$E_x = E_R = E,$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

o

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

Donde  $X_N = X_0/R_0$ , cantidad normalizada de diana  
 $\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$ , diferencia en el ciclo umbral de la diana y la referencia

Reorganizando la ecuación anterior se obtiene:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

El paso final consiste en dividir  $X_N$  de cualquier muestra  $q$  por  $X_N$  de la muestra que se considerará como calibrador (cb):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

Donde  $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$

Para amplicones diseñados según las directrices de Applied Biosystems, la eficiencia es cercana a 1. Por tanto, la cantidad de diana, normalizada respecto a una referencia endógena y relativa al calibrador, viene dada por:

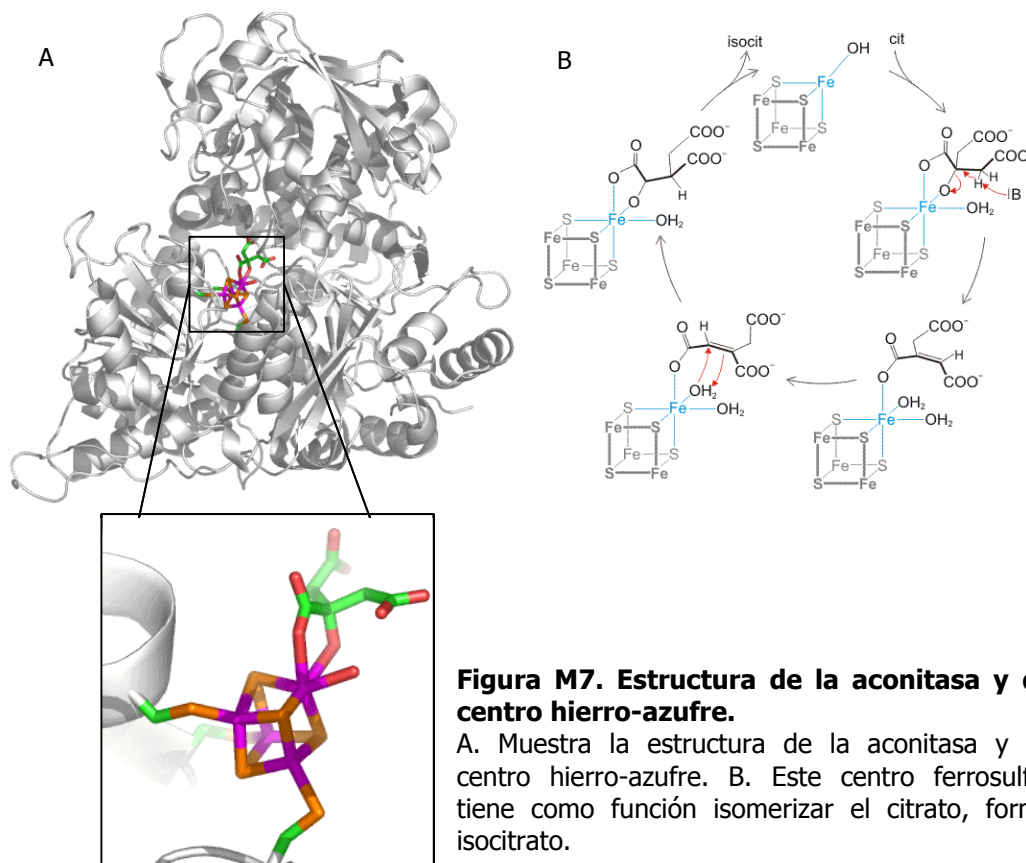
$$2^{-\Delta \Delta C_T}$$

El gen de referencia usado fue el *rp49* (*RpL32*) que codifica una proteína ribosomal, y como diana los genes *fh* y *FXN*, de forma que el valor de cuantificación quedó determinado con respecto a *rp49*. Como la aplicación de este método está condicionada a que las eficiencias en la amplificación de la diana y la referencia sean prácticamente iguales, este punto se comprobó analizando la variación de  $\Delta C_T$  en función de la dilución de la muestra. Al haberse realizado con 3 réplicas de 3 diluciones diferentes, se calculó la media de  $C_T$  para cada dilución, tanto para *fh* (o *FXN*) como para *rp49*, obteniendo mediante una resta el valor de  $\Delta C_T$ . Al representar estos valores de  $\Delta C_T$  frente al logaritmo de la dilución del ADNc, se obtuvieron una serie de puntos. La pendiente de la recta de regresión que pasa por dichos puntos debe ser lo más próxima a 0. Si su valor absoluto es menor de 0.1, puede aplicarse el método descrito en este apartado.

## 7. Métodos bioquímicos

### 7.1 Determinación de la actividad enzimática de la aconitasa

La aconitasa (figura M7) es una enzima ferro-sulfurada que se encuentra tanto en la mitocondria como en el citoplasma. La aconitasa citosólica es una enzima bifuncional. La forma holo tiene un centro  $[4\text{Fe-4S}]$  mantiene la actividad aconitasa, mientras que la forma apo, libre de átomos de hierro, actúa como una proteína reguladora de hierro (IRP-1). La forma catalíticamente activa es la aconitasa mitocondrial (citrato-isocitrato hidratasa) que forma parte del ciclo del ácido cítrico. Su centro  $[4\text{Fe-4S}]$  interactúa con los grupos carboxilo e hidroxilo de los sustratos. Esta unión entre el hierro y el azufre del centro ferro-sulfurado, proporciona un sitio de coordinación libre que está implicado en la unión del sustrato al centro activo de la aconitasa (Gardner *et al.* 1992 y Gardner 1997).

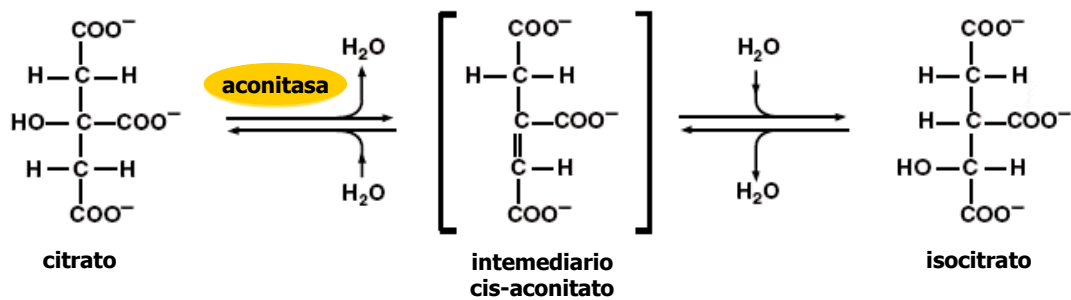


**Figura M7. Estructura de la aconitasa y de su centro hierro-azufre.**

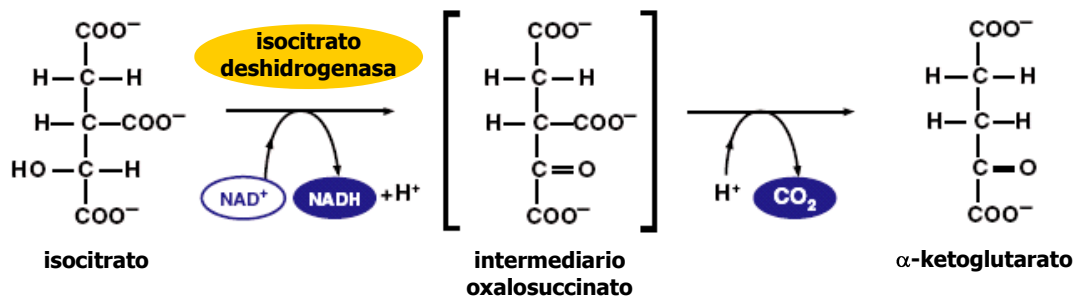
A. Muestra la estructura de la aconitasa y de su centro hierro-azufre. B. Este centro ferrosulfurado tiene como función isomerizar el citrato, formando isocitrato.

La aconitasa pertenece a las enzimas de la clase hidratasa, y cataliza la isomerización estero-específica del citrato a isocitrato vía el intermediario cis-aconitato.





El isocitrato sufre una descarboxilación oxidativa, catalizada por la isocitrato deshidrogenasa, para formar  $\alpha$ -ketoglutarato, y en esta reacción se forma NADH.



### 7.1.1 Ensayo cuantitativo de la actividad hidratasa de la aconitasa

Para realizar las medidas de la actividad aconitasa mitocondrial se partió de una muestra enriquecida en mitocondrias. El procedimiento seguido fue:

- Se añaden 100 moscas al tampón de aislamiento de mitocondrias frío (ver sección 5.5 de material y métodos) y se homogenizan durante unos 30 segundos. El volumen de tampón utilizado debe ser del 2-3% (relación peso/volumen).

- Se centrifuga la muestra dos veces a 800g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar los restos de las moscas homogenizadas.

- El sobrenadante obtenido de las centrifugaciones anteriores se vuelve a centrifugar, pero esta vez a 20000g durante 10 minutos a 4°C, para obtener las mitocondrias. Se elimina el sobrenadante.

- El pellet de mitocondrias se resuspende en tampón de incubación (ver sección 5.5 de material y métodos) hasta una concentración de alrededor de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

- Posteriormente, se sonica la muestra durante 30 segundos con un nivel de amplitud del 60% que corresponde a 132  $\mu\text{m}$  de amplitud y una densidad de potencia acústica de 600  $\text{W}/\text{cm}^2$  y con intervalos alternos de 1 segundo de pulsación, esperando 1 minuto entre cada sonicación.

- Una vez sonicada la muestra se mide la concentración de proteínas mediante el método de Bradford para referenciar la actividad aconitasa a la cantidad de proteína total extraída.

Es importante tener en cuenta que todo el proceso de extracción de proteínas se realiza a 4°C. Nunca debe superarse dicha temperatura para que no actúen proteasas que puedan eliminar cierta cantidad de proteína y por tanto interferir en la eficiencia de posteriores medidas de la actividad enzimática.

Para llevar a cabo la medición de la actividad hidratasa de la aconitasa se utilizó el kit *BIOXYTECH Aconitase-340™* de la casa comercial *OXIS Health Products Inc.* siguiéndose sus instrucciones. El ensayo de esta actividad está basado en la medida de la formación de NADPH a partir del NADP<sup>+</sup> y por acción de la isocitrato deshidrogenasa. La formación de NADPH está monitorizada por el incremento de la absorbancia a 340 nm. Bajo las condiciones apropiadas, la producción de NADPH es proporcional a la actividad aconitasa. El incremento de isocitrato es igual al consumo de NADP<sup>+</sup>, medido como el incremento en la absorbancia a 340 nm. Dado que los ensayos fueron llevados a cabo a 37°C, se aplicó una corrección del coeficiente de temperatura (c = 2,4435) por el incremento de la actividad de la aconitasa a 37°C.

El ensayo de la actividad aconitasa se realiza añadiendo 200 µl de muestra (tampón de incubación si es el blanco), 200 µl de citrato trisódico en Tris-HCl, pH 7,4, 200 µl de Isocitrato deshidrogenasa en Tris-HCl, pH 7,4 y 200 µl de NADP<sup>+</sup> en Tris-HCl, pH 7,4. Se mezcla todo bien y se incuba durante 20 minutos a 37°C midiendo la absorbancia a 340 nm cada minuto.

Una vez obtenidos los datos de la absorbancia se calcula el incremento de la absorbancia a 340 nm ( $\Delta A_{340}$ ) por minuto. Estos valores deben seguir una recta lineal durante un intervalo de al menos unos 5 minutos. Al valor del incremento de la absorbancia se le debe restar el incremento de la absorbancia de cada muestra del blanco. Para obtener la concentración final de la aconitasa se necesita conocer una serie de parámetros:

Sabiendo que:      Coeficiente de extinción molar del NADPH ( $\epsilon$ ) es igual a 6220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, o 6,220 x 10<sup>3</sup> mL/nmol si la longitud de la cubeta donde se mide es de 1 cm.  
                           Miniunidades de actividad (mU) = nmol/min.  
                           Coeficiente de corrección de la temperatura (c) = 2,4435  
                           Dilución del ensayo (d) = 4

Se pueden calcular las unidades de actividad de la aconitasa:

$$mU = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{c \times \epsilon} \times d$$

La concentración final de la aconitasa debe ser normalizada, refiriéndola a la concentración de proteínas total de la muestra.

### **7.1.2 Ensayo cualitativo de la actividad hidratasa de la aconitasa**

En este caso, la medida de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa se llevó a cabo mediante el protocolo de Tong *et al.* (2006). Para ello, se realizan los siguientes pasos:

- Se parte de una muestra de unos 50 individuos a la cual se añadió el tampón de lisis (apartado 5.8.1). Cabe destacar que el tampón de lisis no lleva ningún detergente que pueda producir espuma, ya que la muestra será posteriormente sonicada.

- Posteriormente se trituran los individuos y se centrifuga la muestra 10 minutos, a 3000 rpm y a 4°C. Se recoge el sobrenadante en otro tubo y se repite la centrifugación.

- Una vez obtenido el sobrenadante, se sonica durante 30 segundos con un nivel del 60% que corresponde a 132  $\mu\text{m}$  de amplitud y una densidad de potencia acústica de 600  $\text{W}/\text{cm}^2$  y con intervalos alternos de 1 segundo de pulsación, esperando 1 minuto entre cada sonicación y manteniendo la muestra en todo momento a 4°C. Hay que evitar la formación de posibles burbujas.

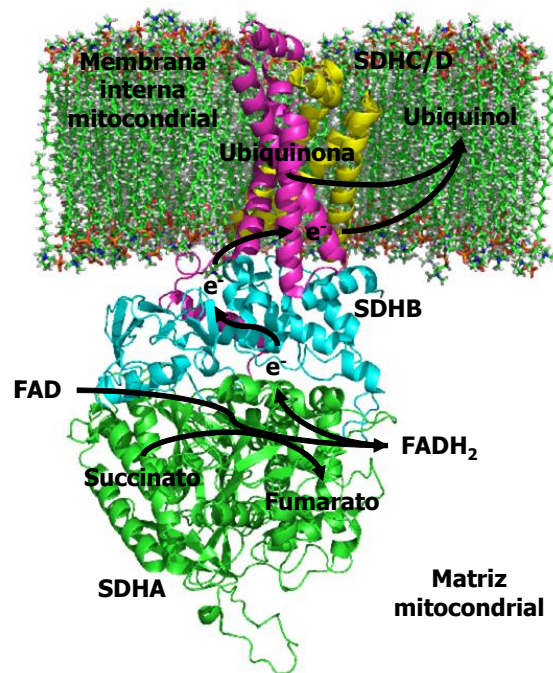
- Por último se centrifuga la muestra 10 minutos a 14000 rpm y a 4°C para eliminar los restos celulares.

Con el sobrenadante obtenido se cuantifica la concentración de proteínas mediante el método Bradford, para cargar en el gel la misma cantidad de proteínas de cada muestra. La muestra se mezcla con el tampón de carga y se lleva a cabo la electroforesis a 4°C, 180 voltios (máximo amperaje). Una vez corrido el gel se incuba en el tampón de incubación, manteniéndolo en oscuridad y a 37°C. El resultado es la aparición de una banda oscura donde se encuentra la enzima aconitasa.

## **7.2 Determinación de la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa**

La succinato deshidrogenasa (SDH) o succinato coenzima Q reductasa, conocida también como el complejo II de la cadena de transporte de electrones, se encuentra imbricada en la membrana interna de la mitocondria, y constituye el punto de unión entre el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones. La SDH es una proteína mitocondrial heterotetramérica formada por cuatro subunidades SDHA, SDHB, SDHC y SDHD. La subunidad SDHB (~30 KDa) es una proteína ferrosulfurada muy conservada a lo largo de la evolución. Esta subunidad contiene tres centros hierro-azufre diferentes ([2Fe-2S], [3Fe-4S] y [4Fe-4S]) y está directamente unida a la subunidad SDHA (~70 KDa), una flavoproteína que interviene en el ciclo de Krebs y en la cadena de

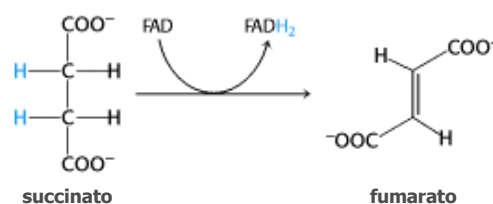
transporte de electrones y que contiene un grupo prostético FAD (flavín-adenín-dinucleótido) unido covalentemente a un residuo de histidina que está muy conservado. Las dos subunidades restantes, SDHC y SDHD, funcionan conjuntamente anclando la proteína a la membrana interna de la mitocondria y proporcionan una zona protegida para la unión de la ubiquinona. Además, estas dos subunidades contienen un grupo hemo donde los electrones son transferidos desde los centros hierro-azufre de la subunidad SDHB (figura M8).



**Figura M8. Esquema de la SDH.**

La figura muestra la estructura de las diferentes subunidades de la SDH y su posición respecto a la membrana interna de la mitocondria. En ella se indica el paso de los electrones desde la molécula de FAD hasta el ubiquinol.

La función de la SDH es la de transferir los electrones desde el succinato al ubiquinol. Para ello, el succinato es oxidado a fumarato por la subunidad A de la SDH (figura M9). Esto causa la reducción del FAD produciendo FADH<sub>2</sub> en un proceso que conlleva un transporte de dos electrones. Los electrones son transferidos a una molécula de ubiquinona (Q) a través de los centros hierro-azufre de la SDHB. La ubiquinona está unida al dímero formado por las subunidades C y D de la SDH, y es reducida a ubiquinol (QH<sub>2</sub>). La reducción de la quinona es un proceso que requiere el tránsito de dos electrones además de la formación de un radical intermedio de ubisemiquinona.



**Figura M9. Esquema de la actividad de la SDH (subunidades SDHA y SDHB).**

Estas dos subunidades catalizan la conversión de succinato a fumarato.

La molécula de ubiquinol resultante es liberada y difunde a través de la membrana interna de la mitocondria para interactuar con los enzimas posteriores de la cadena de transporte de electrones.

La actividad de la succinato deshidrogenasa se midió cualitativamente mediante tinción de criosecciones, y cuantitativamente mediante un ensayo espectrofotométrico con Iodonitrotetrazolio como aceptor final de electrones.

### ***7.2.1 Ensayo de la actividad SDH mediante tinción de criosecciones***

El protocolo seguido para este ensayo es el siguiente:

- Los adultos se enfrían y se mantienen en hielo para facilitar su montaje en glicergel. Tanto las muestras control como la de los mutantes se cortan simultáneamente, para reducir al máximo las diferencias entre ellas. Durante el proceso de corte, el portaobjetos con las secciones se mantiene en hielo. Se obtienen criosecciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor que se conservan congeladas.

- Posteriormente, se deja la muestra a temperatura ambiente para que se descongele.

- Una vez descongeladas las muestras, se incuban en el humectador con la solución de tinción durante 20 minutos, a temperatura ambiente y controlando la coloración, a la vez que se controla que las muestras no queden secas.

- Se lavan dos veces con agua destilada durante 5 minutos.

- El siguiente paso es fijar el tejido con paraformaldehído 4% durante 10 minutos.

- Se lavan dos veces con agua destilada durante 5 minutos.

- Se sumergen en glicergel para mantener y guardar la muestra.

### ***7.2.2 Ensayo de la actividad SDH mediante espectrofotometría***

En este ensayo se utilizó el cloruro de idonitrotetrazolio (INT) como aceptor final de electrones. La actividad enzimática se determina midiendo la absorbancia a 500nm, al formarse formazan por la reducción de la sal de tetrazolio (INT). El ensayo es continuo, rápido, sensible a variaciones de actividad y puede ser usado para la determinación de la actividad de la enzima, tanto en homogenizados como en la fracción mitocondrial tras procedimientos de aislamiento y fraccionamiento celular. Además, el método está optimizado para obtener una cinética lineal, una máxima actividad específica y que se guarde la mayor proporcionalidad posible entre la actividad enzimática y la concentración de la enzima.

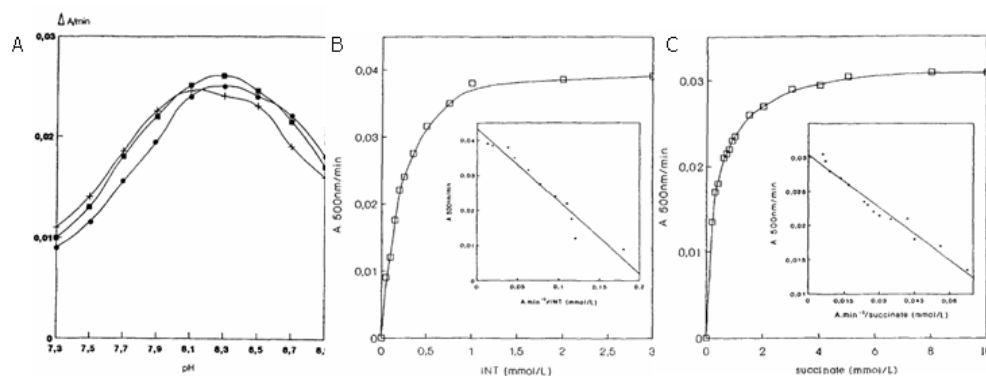
Para llevar a cabo el ensayo se extraen las proteínas mitocondriales, tal y como se ha explicado anteriormente. Una vez se obtiene el pellet de proteínas mitocondriales, éste se resuspende en un volumen de tampón de incubación hasta obtener una concentración final de proteínas de 5 a 10 mg/ml (usando el método Bradford para calcular dicha concentración). Las medidas se hacen en extractos frescos.

La reacción del ensayo espectrofotométrico comienza al mezclar 990  $\mu$ l del tampón de reacción con 10  $\mu$ l del extracto mitocondrial. A partir de este momento se mide la aparición de color durante 10-15 minutos, a 30  $^{\circ}$ C y a una longitud de onda de 500nm. El blanco se realiza en ausencia de succinato y el valor obtenido se le sustrae al resultado de la medición de las muestras.

Para calcular las unidades de actividad enzimática por mililitro, se ha de tener en cuenta que el valor de la absorbancia molar de la transformación completa del idonitrotetrazolio a formazan a 500nm es un valor constante de 0,193 (Gella *et al.* 1981) y, por tanto, la fórmula seguida para el cálculo de la concentración catalítica es:

$$U/ml = (\Delta \text{ Absorbancia/minuto}) \times 1/0,193$$

También hay que tener en cuenta que la medida de la actividad SDH se ve afectada por diferentes variables como son: el pH de la muestra, la concentración de succinato, la concentración del idonitrotetrazolio y del cromóforo EL, así como el efecto de inhibidores de la fosforilación oxidativa (figura M10). En nuestro caso las medidas se llevaron a cabo en las condiciones óptimas de pH, concentración de INT y de succinato descritas por Munujos *et al.* (1993).



**Figura M10.** (A) Efecto del pH sobre la actividad SDH usando TEA (■), Tris (●) y fosfato (+). El pH óptimo de la actividad SDH es 8,3 y no existen diferencias significativas en el uso de diferentes tampones. (B) Efecto de la concentración de INT en la actividad SDH. Representación de las gráficas de Michaelis-Menten y Eadie-Hofstee de las velocidades iniciales en función de la concentración del sustrato. La máxima actividad SDH se encontró cuando la concentración de INT era de 1 a 3 mmol/litro. (C) Efecto de la concentración de succinato en la actividad SDH. Representación de las gráficas de Michaelis-Menten y Eadie-Hofstee de las velocidades iniciales en función de la concentración del sustrato. Según la constante de Michaelis la mejor concentración de succinato propuesta fue de 20 mmol/litro.

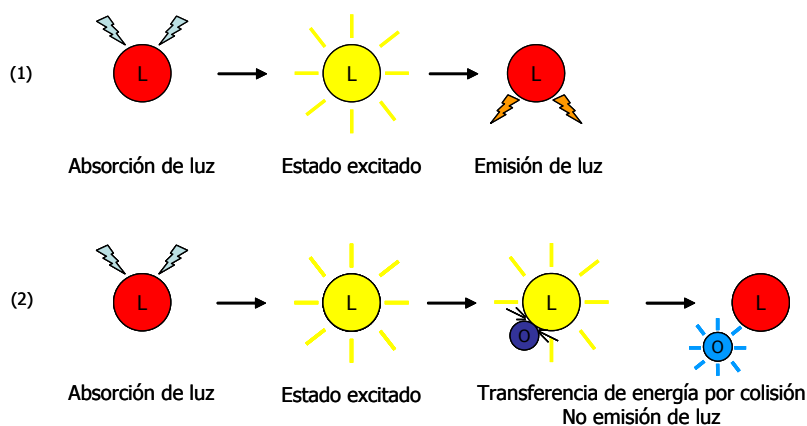
### 7.3 Análisis de la respiración mitocondrial

La respiración mitocondrial es un mecanismo necesario para la obtención de energía por la mitocondria. Se define como el conjunto de reacciones en las cuales el ácido pirúvico, producido por la glucólisis, se desdobla en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  obteniéndose 36 moléculas de ATP. En las células eucariotas la respiración se produce en diferentes etapas acopladas: en primer lugar se da la oxidación del piruvato, seguida del ciclo de Krebs y por último la cadena de transporte de electrones.

La cadena de transporte de electrones, con el poder reductor ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$ ) obtenido en el ciclo de Krebs, bombea protones al espacio intermembrana de la mitocondria. Este bombeo produce un gradiente de protones que es usado por la ATPasa para la formación de energía (ATP). El bombeo constante de protones al espacio intermembrana está acoplado a una cesión de electrones desde el complejo I hasta el complejo IV de la cadena de transporte de electrones, y es en el complejo IV donde los electrones se combinan con el oxígeno y el hidrógeno formando moléculas de agua. Una de las metodologías para determinar la respiración celular o mitocondrial es la cuantificación del consumo de oxígeno en preparados de células o mitocondrias. Esta cuantificación se puede realizar mediante diferentes técnicas siendo una de las más sencillas el uso del electrodo de oxígeno.

#### 7.3.1 Bases de la medición del consumo de oxígeno

La medición del consumo de oxígeno se realizó mediante un microsensor de fibra óptica, Microx TX3 (Precision Sensing GmbH, Regensburg University, Alemania). Para entender los resultados obtenidos, es necesario establecer las bases de dicha medición. El principio de estas medidas y del funcionamiento del sensor está basado en el efecto del secuestro dinámico de la luminiscencia por las moléculas de oxígeno. La figura M11 esquematiza este principio:



**Figura M11.** Principio del secuestro dinámico de la luminiscencia por el oxígeno molecular. (L) Luminóforo, (O) Oxígeno. (1) Proceso de luminiscencia en ausencia de oxígeno molecular. (2) Desactivación del indicador de luminiscencia por el oxígeno molecular.

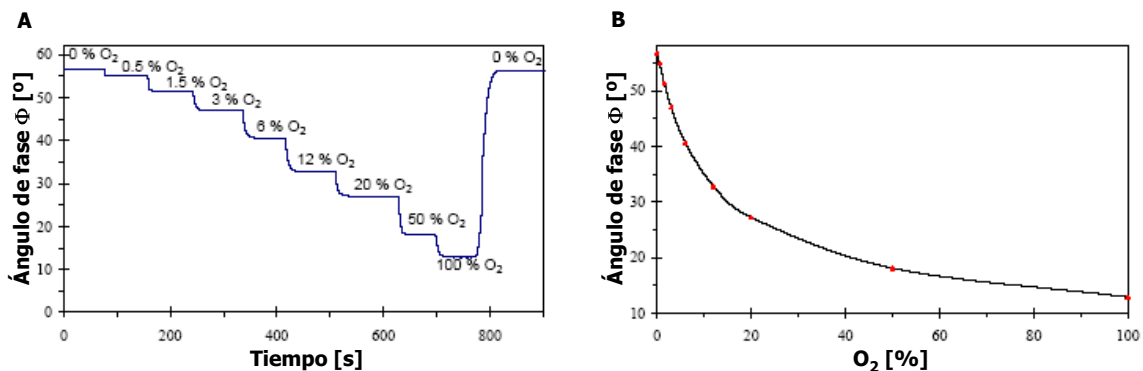
La colisión entre el luminóforo en su estado excitado y el secuestrador (oxígeno) da como resultado una desactivación sin radiación llamada desactivación colisional o secuestro dinámico. Después de la colisión, la transferencia de energía tiene lugar desde la molécula excitada al oxígeno, que como consecuencia pasa de un estado sin energía (estado triplete) a un estado excitado (estado singlete). El resultado de esta transferencia de energía es que la molécula excitada (luminóforo) no emite luz y la medida de la señal lumínica decrece. Por esto, en presencia de oxígeno, la señal decrece.

El oxígeno puede secuestrar la luminiscencia de moléculas como, por ejemplo, carbonos aromáticos policíclicos, complejos metálicos como el Ru(II), Os(II) y el Rh(II) y porfirinas fosforescentes que contengan Pt(II) o Pd(II) como átomo central.

El microsensador MICROX TX3 mide el tiempo de descenso de la luminiscencia del luminóforo en función de la concentración de oxígeno.

$$\tau = f([\text{O}_2])$$

Este sistema se basa en la técnica de la modulación de fase para evaluar el tiempo de descenso de la luminiscencia del luminóforo. Si éste es excitado por una luz de intensidad modulada sinusoidalmente, su tiempo de descenso de luminiscencia provoca un retraso en la señal de luz emitida. Este retraso se conoce como ángulo de fase entre la señal de excitación y la de emisión ( $\Phi$ ). El ángulo de fase varía en función de la concentración de oxígeno (figura M12).



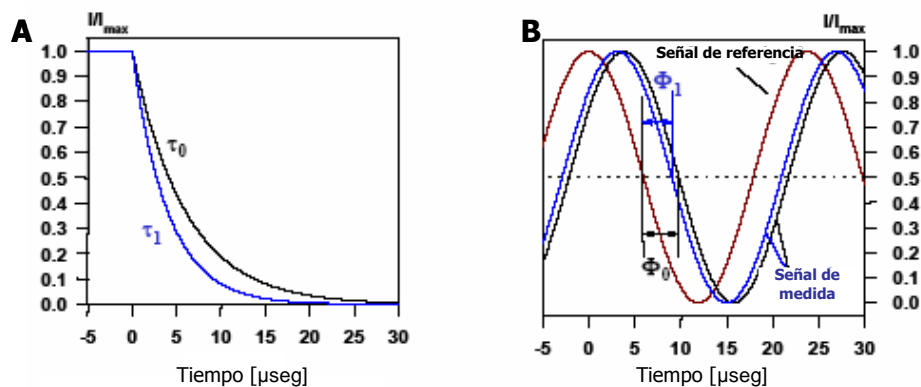
**Figura M12.** (A) Respuesta de un microsensador de oxígeno frente a los cambios en la concentración de O<sub>2</sub> y (B) Variación de la concentración de O<sub>2</sub> en función del ángulo de fase  $\Phi$  (Precision Sensing GmbH).



El tiempo de descenso y el ángulo de fase  $\Phi$  se relacionan según se muestra en la siguiente ecuación:

$$\frac{\tan \Phi}{2\pi \times f_{\text{mod}}} \\ \tan \Phi = 2\pi \times f_{\text{mod}} \times \tau \\ \tau \equiv \tan \Phi \equiv \Phi \equiv f([\text{O}_2])$$

Donde  $\tau$  = Tiempo de descenso de la luminiscencia en presencia de oxígeno  
 $\Phi$  = ángulo de fase  
 $f_{\text{mod}}$  = frecuencia de modulación



**Figura M13.** (A) Esquema del descenso exponencial de la luminiscencia de un único proceso. (B) El luminóforo es excitado por una luz de intensidad modulada sinusoidalmente. La emisión se encuentra retrasada en fase con un ángulo de fase  $\Phi$  respecto a la señal de excitación, causado por el tiempo de descenso del estado excitado. Figura tomada del manual de uso del microsensor. (Precision Sensing GmbH).

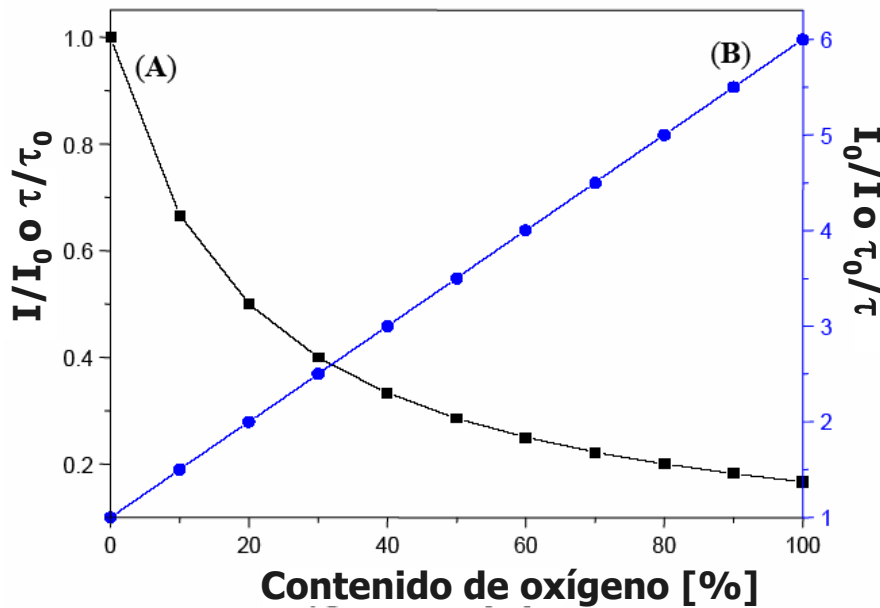
La relación existente entre la concentración de oxígeno en la muestra con la intensidad de la luz emitida, así como con la duración de la misma se describe en la ecuación de Stern-Volmer :

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{\text{SV}} \times [\text{O}_2]$$

$$I = f([\text{O}_2]) \\ \tau = f([\text{O}_2])$$

Donde  $I$  = Intensidad de la luminiscencia en presencia de oxígeno  
 $I_0$  = Intensidad de la luminiscencia en ausencia de oxígeno

$\tau$  = Tiempo de descenso de la luminiscencia en presencia de oxígeno  
 $\tau_0$  = Tiempo de descenso de la luminiscencia en ausencia de oxígeno  
 $K_{SV}$  = Constante Stern-Volmer (cuantifica la eficiencia del secuestro y por lo tanto la sensibilidad del sensor)  
 $[O_2]$  = Contenido en oxígeno.



**Figura M14.** (A) Descenso de la luminiscencia en presencia de oxígeno. (B) Gráfica Stern-Volmer. Figura tomada del manual de uso del microsensor (Precision Sensing GmbH).

La ecuación de Stern-Volmer muestra una correlación lineal entre el ángulo de fase o el tiempo de descenso de la luminiscencia y la concentración de  $O_2$  (figura M14) como se indica a continuación:

$$\frac{\tan \Phi_0}{\tan \Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} \times [O_2]$$

Donde  $\Phi_0$  = ángulo de fase en agua sin oxígeno  
 $\Phi$  = ángulo de fase medido  
 $K_{SV}$  = Constante de Stern-Volmer  
 $[O_2]$  = contenido de oxígeno en % de saturación del aire.

Sin embargo existe un problema con los detectores, ya que su comportamiento frente a la medida del tiempo de descenso de la luminiscencia no es lineal. Para salvar este escollo, se puede describir este comportamiento mediante una modificación de la ecuación de Stern-Volmer. El modelo simplifica

el problema, asumiendo que el indicador se distribuye en dos puntos diferentes y que cada fracción ( $f_1$ ,  $1-f_1$ ) muestra una constante de Stern-Volmer diferente ( $K_{sv1}$ ,  $K_{sv2}$ ). Teniendo en cuenta esto, la ecuación modificada de Stern-Volmer queda como:

$$\frac{\tan \Phi_0}{\tan \Phi} = \left[ \frac{f_1}{1 + K_{sv1} \times [O_2]} + \frac{1-f_1}{1 + K_{sv2} \times [O_2]} \right]^{-1}$$

Se asume que una de las dos fracciones no secuestra la luz, y por tanto, que  $K_{sv2} = 0$ , y si se toma que  $f_1 = 0,89$ , lo que se determinó empíricamente, la fórmula queda:

$$\frac{\tan \Phi_0}{\tan \Phi} = \left[ \frac{0,89}{1 + K_{sv1} \times [O_2]} + (0,11) \right]^{-1}$$

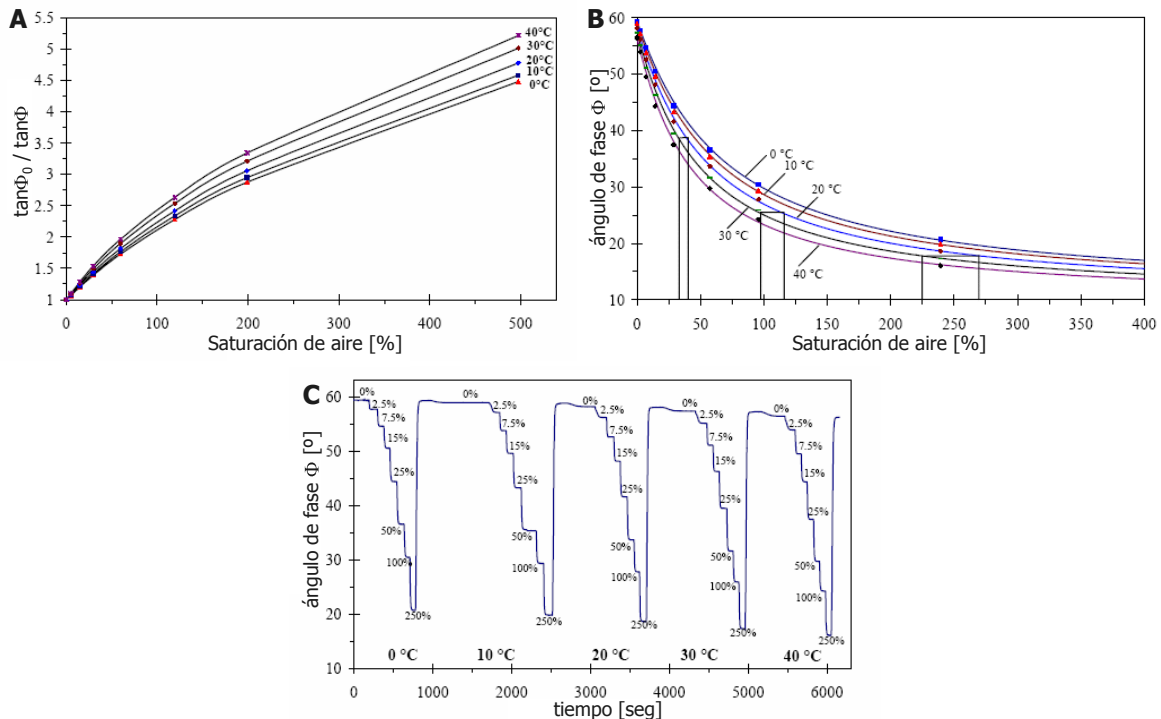
Así, el contenido de oxígeno de la muestra, en valores de porcentaje de aire saturado, se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$[O_2] = \frac{1 - \frac{\tan \Phi}{\tan \Phi_0}}{K_{sv} \times \left[ \frac{\tan \Phi}{\tan \Phi_0} - 0,11 \right]}$$

Existen una serie de ventajas a la hora de determinar la concentración de oxígeno de la muestra midiendo el tiempo de descenso de la luminiscencia. En primer lugar, no depende ni de las fluctuaciones de la intensidad de luz emitida por la fuente ni de la sensibilidad del detector. Además, este tiempo no está influenciado por cambios en el ángulo de emisión de la luz, ni por variaciones en las propiedades ópticas de la muestra (turbidez, índice de refracción o coloración). Sin embargo, debemos tener en cuenta la temperatura a la que se llevan a cabo los experimentos, ya que afecta al descenso en la intensidad de la luminiscencia del luminóforo y a la frecuencia de colisión de las moléculas de oxígeno con éste. Por consiguiente, variaciones en la temperatura causan variaciones en los resultados de las medidas, con un contenido constante de oxígeno. La respuesta característica del oxígeno a la temperatura se puede ver en la figura M15.

El software del sistema Microx TX3 permite realizar las medidas del consumo de oxígeno y las calibraciones tanto con compensación automática de

la temperatura como sin ella. Las medidas sin dicha compensación solamente tienen sentido si se realizan a una temperatura constante y conocida. En nuestro caso tanto las medidas como las calibraciones se realizaron mediante compensación automática de la temperatura.



**Figura M15.** (A) Efecto de la temperatura en la constante de Stern-Volmer. (B) Efecto de la temperatura en el ángulo de fase a diferentes porcentajes de saturación de aire. (C) Respuesta típica del oxígeno a diferentes temperaturas. Figura tomada del manual de uso del microsensor. (Precision Sensing GmbH).

La calibración de los microsensores se lleva a cabo obteniendo el punto de menor cantidad de oxígeno (cal 0), a partir de una muestra de agua sin oxígeno; y el punto de mayor cantidad de oxígeno (cal 100) a partir de aire saturado de vapor de agua.

La preparación de la solución de calibrado (cal 0) se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se pone un gramo de sulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) en una botella.
- Se añaden 100 ml de agua destilada.
- Se cierra la botella y se mezcla bien durante un minuto hasta disolver el  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . El oxígeno del agua reacciona con el  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  produciendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e hidrógeno.
- Por último se inserta el microsensor.

La vida media del agua libre de oxígeno es de unas 24 horas.

A su vez, se preparó la solución de calibrado cal 100 (aire saturado de vapor de agua):

- Se pone algodón húmedo en una botella en la que se ha practicado un pequeño orificio por donde se pueda insertar el microsensar sin tener que abrirla.
- Se esperan unos minutos para asegurarse de que la atmósfera de la botella se encuentre saturada de vapor de agua.
- Se inserta el microsensar.

Finalmente, para determinar el consumo de oxígeno hay que conocer la presión atmosférica, ya que este dato es necesario para que el software utilizado (Micro TX3 de Precision Sensing, GMBH) realice la conversión y corrección de los valores de las unidades de oxígeno en % de saturación del aire, a unidades de concentración de oxígeno (mg/L). La información sobre la presión atmosférica de la zona donde se realizó el experimento se obtuvo acudiendo a una página web de meteorología, <http://www.accuweather.com>.

### ***7.3.2 Obtención de mitocondrias intactas***

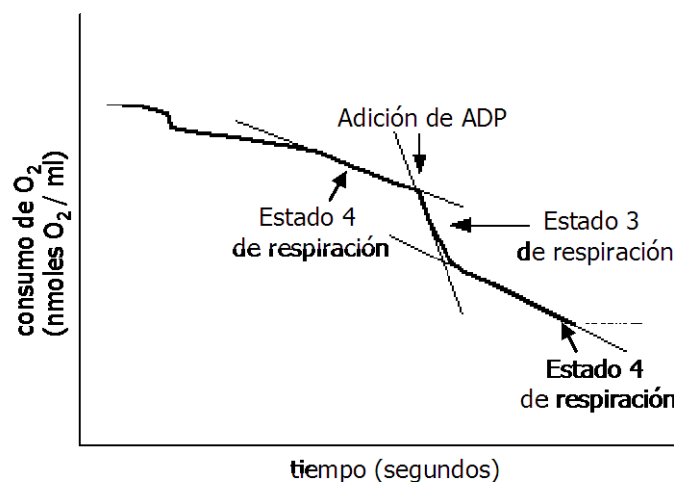
Para realizar las medidas del consumo de oxígeno hay que partir de mitocondrias intactas para no perder la capacidad de creación del gradiente de electrones y, en definitiva, la capacidad de consumir oxígeno. El procedimiento seguido fue:

- Se añaden 100 moscas al tampón de aislamiento previamente enfriado.
- Se trituran con suavidad. Los homogenizados son filtrados con una malla de 0,5 mm de poro, colocando el filtrado en un nuevo tubo.
- El filtrado se centrifuga a 1500 g durante 8 minutos y a 4°C, para obtener la masa mitocondrial de las células.
- El siguiente paso es descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con 200 µl del tampón de aislamiento.
- Se repite el paso de centrifugación a 1500 g, durante 8 minutos a 4 °C y se descarta de nuevo el sobrenadante.
- Por último, se resuspende el sedimento de mitocondrias en 200 µl del tampón de aislamiento y se aparta una alícuota para determinar la concentración de proteínas en esta suspensión mitocondrial.

Es importante señalar que todas las mediciones se han de llevar a cabo dentro de las 3 horas posteriores a la obtención de las mitocondrias y que durante todo ese tiempo la suspensión de mitocondrias se ha de mantener en hielo.

### 7.3.3 Medición de la respiración mitocondrial

Las medidas se realizaron en el estado activado (estado 3) y en el estado inactivado (estado 4) (figura M16). El estado 4 se define como el consumo de oxígeno en ausencia de ADP, mientras que el estado 3 se define como la respiración estimulada por el ADP. Cabe destacar la diferencia entre el estado 4 y el estado 2 de la respiración. Aunque muchas veces se definen como estados completamente equivalentes, el estado 2 es un estado parecido al estado 4 en el nivel de activación donde no hay ADP en el medio pero, a diferencia del estado 4, todavía no se ha formado ATP. En el estado 4, la reducción del consumo de oxígeno es debida a que todo el ADP ya ha sido convertido a ATP. El ADP en presencia de fosfato inorgánico se une a la ATP sintasa, permitiendo el paso de protones del espacio intermembrana a la matriz mitocondrial. Esto produce energía, la cual es usada por la ATP sintasa para crear ATP a partir del ADP y del fosfato inorgánico. La pérdida del gradiente de protones hace que la cadena de transporte de electrones se acelere para poder recuperarlo. Por eso, cuando se añade ADP, se acelera la cadena de transporte de electrones y, en consecuencia, el consumo de oxígeno. En la figura M16 se puede ver la diferencia en la velocidad del consumo de oxígeno entre los estados 3 y 4 de la respiración.

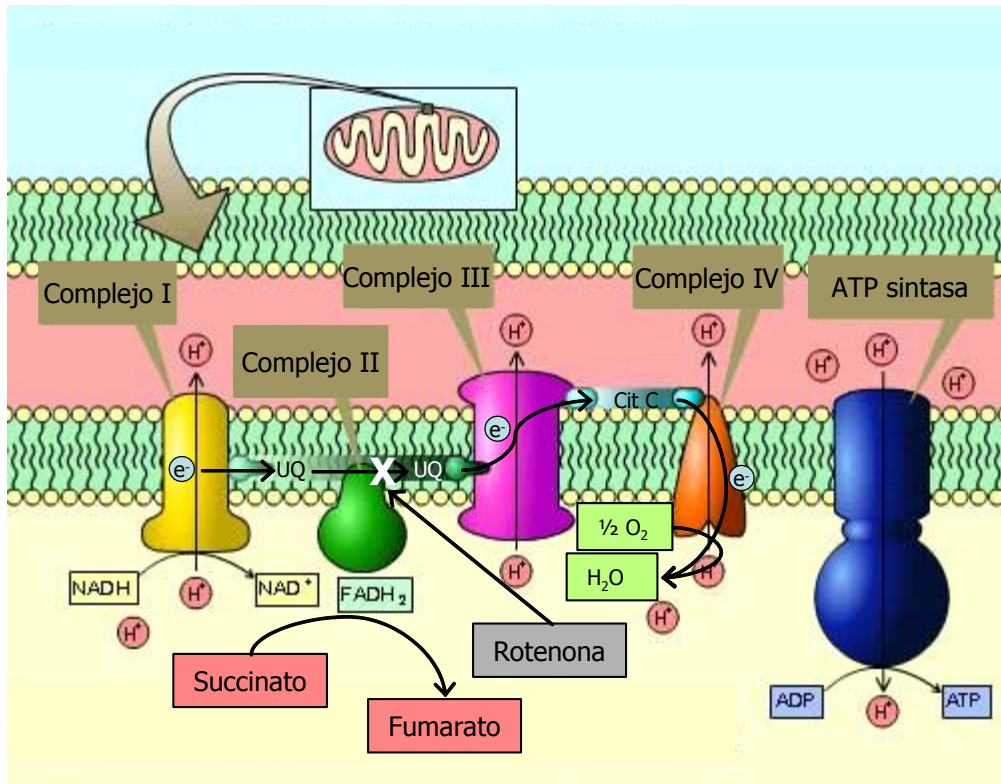


**Figura M16.** Cinética del consumo de oxígeno. Obsérvese el cambio de la velocidad en el consumo de oxígeno después de añadir ADP.

En la medición de la respiración, se usaron 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión mitocondrial a los que se les añadió 50  $\mu\text{l}$  de solución de respiración permitiendo que el conjunto se mezcle durante 30 segundos.

Para medir la respiración a través del complejo I, se añadió un exceso de NADH (60 mM), que es usado por el complejo I para el bombeo de protones. En el caso de la respiración a través del complejo II se añadió rotenona (100  $\mu\text{M}$ ), que actúa inhibiendo al complejo I, y succinato (10 mM) para favorecer la formación de  $\text{FADH}_2$ . La medida de la respiración, mediante la activación del ciclo de Krebs, se llevó a cabo añadiendo piruvato y malato (200  $\mu\text{M}$  de cada),

dos componentes de dicho ciclo . Por último, se determinó la concentración de proteínas en una alícuota de la suspensión mitocondrial, como referencia de la concentración de mitocondrias.



**Figura M17.** Esquema de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

## ***8. Métodos citológicos e histológicos***

### ***8.1 Hibridación in situ con sondas de ARN***

#### ***8.1.1 Marcaje de sondas de ARN***

En la técnica de hibridación *in situ* sobre discos imaginales de *Drosophila* se emplearon sondas de ARN, pues son más sensibles y dan menos ruido de fondo que las de ADN. El marcaje de las sondas de ARN se realiza mediante la transcripción de un clon de ADNc, por lo que es necesario clonar el ADNc a marcar en un vector que contenga un promotor para una ARN polimerasa (como por ejemplo la T3, T7 o SP6), como el *pBluescript* o el *pCRScript*. Además, es necesario linearizar el plásmido para determinar el punto donde debe finalizar la transcripción. Se generaron sondas y antisondas para el gen *fh*. La antisona sirvió de control negativo para las hibridaciones *in situ*.

El marcaje de las sondas de ARN se realizó empleando el kit *SP6, T3, T7 Transcription Labelling* (Roche), que introduce Digoxigenina-11-dUTP, y se siguieron las recomendaciones del fabricante, pero añadiendo DTT (100 mM) que aumenta la eficacia del marcaje. Las sondas para las hibridaciones *in situ* se degradaron parcialmente con tampón carbonato después del marcaje, para generar fragmentos más pequeños que puedan entrar más fácilmente en los tejidos. El protocolo de tratamiento con el tampón carbonato consistió en añadir 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y 25 µl de tampón carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 120 mM y NaHCO<sub>3</sub> pH 10,2 80 mM) a la reacción de marcaje, e incubar a 65°C durante 20 minutos. Estas condiciones de degradación se deben ajustar empíricamente según el tampón carbonato preparado, puesto que un pH más básico o un tiempo más prolongado degradaría demasiado la sonda, mientras que un pH más ácido o un tiempo de incubación más corto produciría fragmentos más grandes que penetrarían más difícilmente. El tratamiento con tampón carbonato se detiene añadiendo EDTA a una concentración final de 8 mM. El ARN marcado se purificó mediante un tratamiento de fenol/cloroformo y su posterior precipitación con LiCl 0,4 M de concentración final y ARNt (0,35 µg/ml).

La sonda de ARN se obtuvo a partir de un clon de *fh* digerido con *BamHI* (secuencia complementaria al mensajero) y la digestión con *HindIII* sirvió para obtener la sonda control (la misma secuencia que el mensajero).

### **8.1.2 Hibridación *in situ* en discos imaginales de larvas de *Drosophila melanogaster***

En primer lugar se lleva a cabo la disección de las larvas para extraer los discos imaginales y se fijan:

- Extraer los discos en PBS 1X frío y transferirlos a un tubo con PP\* (PBS 1X, paraformaldehído al 4%, Tween 20 al 0,1% y triton al 0,1%) mientras se diseccionan todos.
- Añadir DMSO en una proporción 9:1 de PP\*/DMSO y fijar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Hacer cinco lavados con PBT de 5 minutos cada uno.
- Deshidratar con tratamiento de etanol a concentración creciente (etanol al 30%, 50%, 70%, 90% y 100%) y guardar en etanol absoluto a -20°C. Este paso se realiza si los discos se quieren guardar para usarlos posteriormente; si no, se pasa directamente a los lavados con PBT de 10 minutos.

Una vez fijados se pasa a realizar una serie de pretratamientos:

- Rehidratar con una serie de etanol de concentración decreciente (etanol al 90%, 70%, 50% y 30%).
- Lavar tres veces con PBT durante 10 minutos.
- Incubar en PBT con proteinasa-K, 50 µg/ml, durante 2 minutos y medio y en agitación suave.



- Detener la digestión con proteinasa-K con dos lavados de glicina 2 mg/ml en PBT de 1 minuto.
- Realizar dos lavados con PBT de 5 minutos cada uno.
- Incubar en PP\*/DMSO 9:1 durante 20 minutos.
- Hacer cinco lavados con PBT durante 5 minutos.

Acabados los pretratamientos, se pasa a realizar la hibridación:

- Lavar con una solución 1:1 de PBT y tampón de hibridación a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Lavar con tampón de prehibridación 10 minutos.
- Prehibridar con 100 µl de solución de prehibridación a 46°C durante 1-2 horas.
- Hibridar en un volumen de 75 µl de solución de hibridación con una concentración de sonda entre 1:10 y 1:50 a 46°C durante toda la noche sin agitación. La sonda se desnaturaliza incubándola a 80°C durante 5 minutos, y enfriándola en hielo/agua.
- Preabsorber el anticuerpo  $\alpha$ -digoxigenina de forma similar a la realizada en la hibridación *in situ* de embriones con los restos de larvas a las que se les han extraído los discos, fijados de igual manera que éstos.

Por último se realizan diferentes lavados y la detección de la hibridación:

- Realizar tres lavados rápidos con 200 µl de tampón de hibridación.
- Realizar cinco lavados con PBT/solución de hibridación (1:4) a 45°C durante 15 minutos.
- Realizar cinco lavados con PBT/solución de hibridación (2:3) a 45°C durante 15 minutos.
- Realizar cinco lavados con PBT/solución de hibridación (3:2) a 45°C durante 15 minutos.
- Realizar cinco lavados con PBT/solución de hibridación (4:1) a 45°C durante 15 minutos.
- Lavar 2-3 veces con PBT durante 45 minutos.
- Incubar con anticuerpo  $\alpha$ -digoxigenina preabsorbido en PBT a una concentración 1:2000 durante al menos 2 horas a temperatura ambiente (o toda la noche a 4°C).
- Realizar tres lavados con PBT, uno rápido, uno de 1 hora y otro rápido para eliminar el exceso de anticuerpo.
- Transferir los discos a un recipiente donde puedan ser observados bajo una lupa binocular y lavar dos veces con la solución de detección (Genius-3 y Tween 20 al 0,1%) durante 5 minutos.
- Preparar la siguiente mezcla de detección: 9 µl de NBT en 1 ml de Genius-3, mezclar bien y agregar 7 µl de X-fosfato.
- Añadir la mezcla a los discos y mantener en oscuridad sin agitación, verificando periódicamente la aparición de la señal. La reacción de color puede tardar de unos pocos minutos hasta 1 hora.
- Detener la reacción realizando varios lavados con PBT.

-Montar los discos para su observación en el microscopio óptico en glicerol al 80%.

## **8.2 Inmunohistoquímica en embriones de *Drosophila melanogaster***

### **8.2.1 Puesta de huevos**

En primer lugar hay que colocar los individuos del cruce problema, en nuestro caso hembras X-GAL4 (siendo X cualquiera de la cepas GAL4 citadas en el apartado 1.3) y machos UAS-*FXN*, en un vial al cual se le acopla una placa de agar, con un poco de levadura, donde las hembras realizan la puesta de los huevos. Los cruces se mantienen en una cámara termoregulada a 25°C o 29°C según el experimento en cuestión. Al día siguiente se cambia la placa de agar por una nueva y se utiliza la primera para recoger los embriones.

### **8.2.2 Fijación de los embriones**

Los embriones reciben toda una serie de tratamientos previos a la detección inmunohistoquímica. Estos son:

- Tras recogerlos de las placas de puesta con agua, un pincel y un tamiz, se decorionizan con lejía comercial al 50%, durante 4 minutos, en agitación.
- Posteriormente se elimina el exceso de lejía con agua destilada y se lavan con Tritón al 0,1% (detergente no iónico) durante 3 minutos y después se vuelven a lavar con agua destilada.

Una vez decorionizados reciben un tratamiento de fijación para conservar los tejidos, de forma que muestren el mayor parecido posible a su estado *in vivo*. Para la fijación se llevan a cabo estos pasos:

- Se transfieren los embriones con un pincel a un tubo con una mezcla de paraformaldehído al 4% y heptano (1:1), y se agitan vigorosamente durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras este paso, la mayoría de embriones deberían encontrarse en la interfase creada en la mezcla entre el paraformaldehído y el heptano.
- Se elimina la fase inferior (paraformaldehído) correspondiente al fijador y se añade metanol hasta conseguir una proporción con el heptano de 1:1. Se agita fuertemente durante 30 segundos. En este paso los embriones deben irse al fondo del tubo.
- Pasados los 30 segundos de agitación vigorosa, se elimina todo el líquido y los embriones se lavan varias veces con metanol.
- Se mantienen los embriones en metanol 100% y se conservan a -20°C hasta su uso.

### **8.2.3 Detección inmunohistoquímica en embriones de *Drosophila melanogaster***

Los pasos a seguir tras la fijación son:

- Lavados de 5 minutos con diluciones decrecientes de metanol (80%, 50%, 30%) para rehidratar los embriones fijados.
- Se hacen dos lavados, de 10 minutos cada uno, con PBTx 1X, a temperatura ambiente, en agitación.
- Se hacen dos lavados, de 15 minutos cada uno, con PBTx-2%-BSA, a temperatura ambiente, en agitación.
- Los embriones se incuban con el anticuerpo primario diluido en PBTx-2%-BSA, durante toda la noche a 4°C, o bien 2 horas a temperatura ambiente.
- Tras la incubación con el anticuerpo primario, se hace un lavado rápido y dos lavados de 30 minutos con PBTx-2%BSA, a temperatura ambiente, en agitación.
- Se incuban con el anticuerpo secundario biotinilado a una dilución entre 1:200 y 1:400 en PBTx-2%BSA con suero al 2%, durante toda la noche a 4°C, o bien 2 horas a temperatura ambiente.
- Después de la incubación se elimina el anticuerpo y se hace un lavado rápido y otros dos de 30 minutos con PBTx-2%BSA, a temperatura ambiente y en agitación.
- Se prepara el reactivo ABC. A 500µl de PBTx-2%BSA se añaden 9µl de reactivo A y 9µl de reactivo B, se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los embriones se incuban con el reactivo ABC al menos durante 30 minutos.
- Posteriormente se realizan tres lavados de 20 minutos cada uno con PBTx 1X.
- La detección de la señal se lleva a cabo por la acción de la peroxidasa, conjugada a la biotina, sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual provoca la rotura de esta molécula y se generan radicales libres OH<sup>-</sup> muy reactivos. Estos radicales producen un cambio redox en el substrato DAB, que cambia a color oscuro y precipita. Para este cometido se utiliza el kit SIGMAFAST™: se disuelve una tableta de DAB (3,3' diaminobencidina) y otra de UREA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua, se añade esta disolución a los embriones y se incuba entre 1 y 5 minutos.
- Se detiene la reacción con varios lavados con PBS.

## **9. Métodos fisiológicos**

### **9.1 Test de supervivencia**

Para la realización de estos tests se tomaron 100 machos adultos, descendientes de los cruces realizados entre las cepas UAS-*fhIR* y *actin*-GAL4 y entre las cepas UAS-*FXN* y *neur*-GAL4. Se colocaron 25 individuos en cada vial. Los controles fueron cruces realizados entre *yw* y *actin*-GAL4 para los primeros

cruces, y cruces entre *yw* y *neur-GAL4* para los segundos cruces. Cada día se contabilizaban las moscas supervivientes, y cada dos días se transferían éstas a viales nuevos con comida recién preparada. Los experimentos se llevaron a cabo durante 100 días a 25°C en normoxia y durante 9 días, a 25°C en hiperoxia.

## **9.2 Test de escalada**

Para realizar este test se tomaron 15 machos adultos, descendientes del cruce realizado entre las cepas *UAS-fhIR* y *actin-GAL4*: machos *UAS-fhIR/actin-GAL4*, y machos *UAS-fhIR/yw* (control). En el cruce *UAS-FXN* y *neur-GAL4*, también se partió de 15 adultos *UAS-FXN/neur-GAL4* y *UAS-FXN/yw* (control). Los adultos se situaron individualmente en una cámara de escalada, consistente en una pipeta graduada de 10 ml. En cada test, se coloca una mosca en la cámara y se golpea suavemente ésta para que la mosca se vaya al fondo. Tras 12 segundos se mide la distancia recorrida; por lo tanto, con este test lo que realmente medimos es la velocidad de cada individuo. El experimento se realizó a los 5 y a los 10 días después de la salida del adulto de la pupa, a 25°C en normoxia. No se pudo realizar en condiciones de hiperoxia por la incapacidad de los individuos mutantes para escalar. Para cada cruce se realizaron 3 réplicas.

*Resultados*

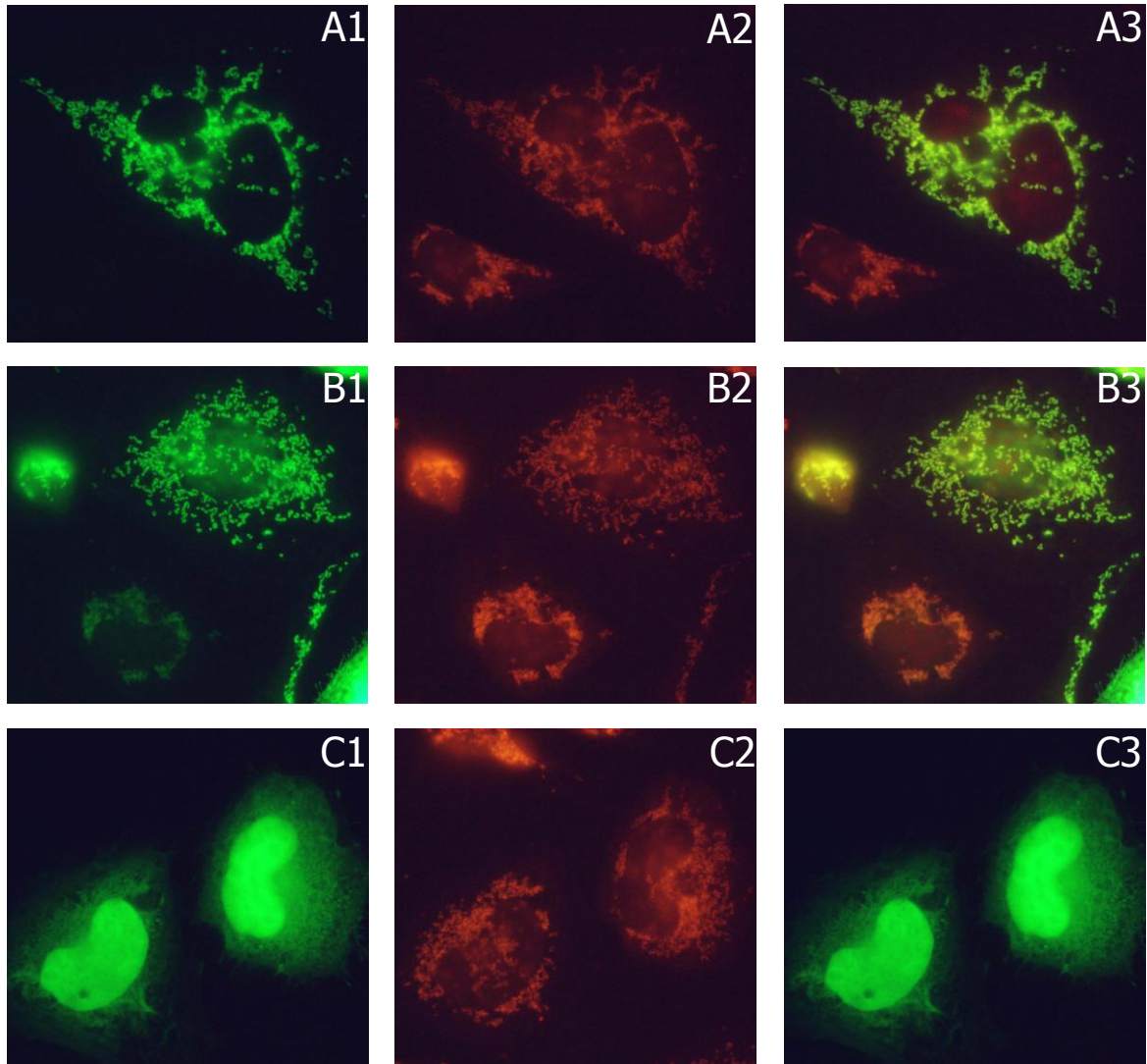
## **1. Localización subcelular de la proteína frataxina de *Drosophila melanogaster***

Una de las estrategias seguidas para conocer cual puede ser la función de una nueva proteína es analizar su secuencia, en busca de regiones que mantengan similitud con la secuencia de otras proteínas cuya función sea conocida. En el caso de la frataxina de *D. melanogaster* (FH), se reconocieron una serie de secuencias que, tras diferentes análisis *in silico*, proponían a la mitocondria como su localización subcelular más probable (Cañizares *et al.* 2000). En posteriores análisis (Blanca, 2001) se encontraron, en esta proteína, características típicas de los péptidos señal mitocondriales como son: ausencia total de aminoácidos ácidos, preponderancia de Arginina, Serina y Leucina y un segmento con un gran motivo helicoidal hidrofóbico. Por todo esto, se decidió analizar la localización subcelular de FH y confirmar las predicciones llevadas a cabo anteriormente.

Para este análisis se siguió una estrategia que consistió en generar fusiones de la pauta de lectura del gen *fh* con la que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). Cuando estas construcciones son transfectadas en células eucariotas, la maquinaria celular transcribe y traduce estas secuencias, generándose una proteína unida a la GFP. Iluminando después las células con luz de la longitud de onda adecuada, se puede observar fluorescencia verde allí donde esté localizada la proteína de fusión.

Para generar estas fusiones, se amplificó la pauta de lectura completa de *fh*, a partir de cDNA obtenido por retrotranscripción de ARNpoli(A<sup>+</sup>) de embriones de *D. melanogaster*. Para ello se diseñaron cebadores que contenían las dianas de los enzimas de restricción *SacI* y *BamHI* en cada uno de sus extremos, con el fin de poder clonar en pauta la secuencia de *fh* en un vector de expresión y obtener las fusiones anteriormente descritas. Previamente se clonó el producto resultante de esta PCR en el vector *pCR2.1-TOPO* y se analizaron diversos clones para utilizar el que no mostrase ningún cambio en su secuencia que pudiese dar un cambio de aminoácido en la proteína o un codón de parada. Posteriormente, se transfirió el ADNc al vector *pEGFP-N3*, generándose así la construcción de fusión FH-GFP para su transfección en células eucariotas.

Con la construcción que se generó, se transfectaron células de la línea CHO-K1, que es una línea celular de origen fibroblástico procedente de ovario de hámster chino, y células S2 (células Schneider), línea celular de *Drosophila*. Como control de la transfección se usó el vector *pEGFP-N3* sin inserto, del que se espera que de lugar a la síntesis de GFP, que muestra un patrón de localización homogéneo en núcleo y citoplasma. A continuación se muestran, en la figura R1 y R2, las imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia.

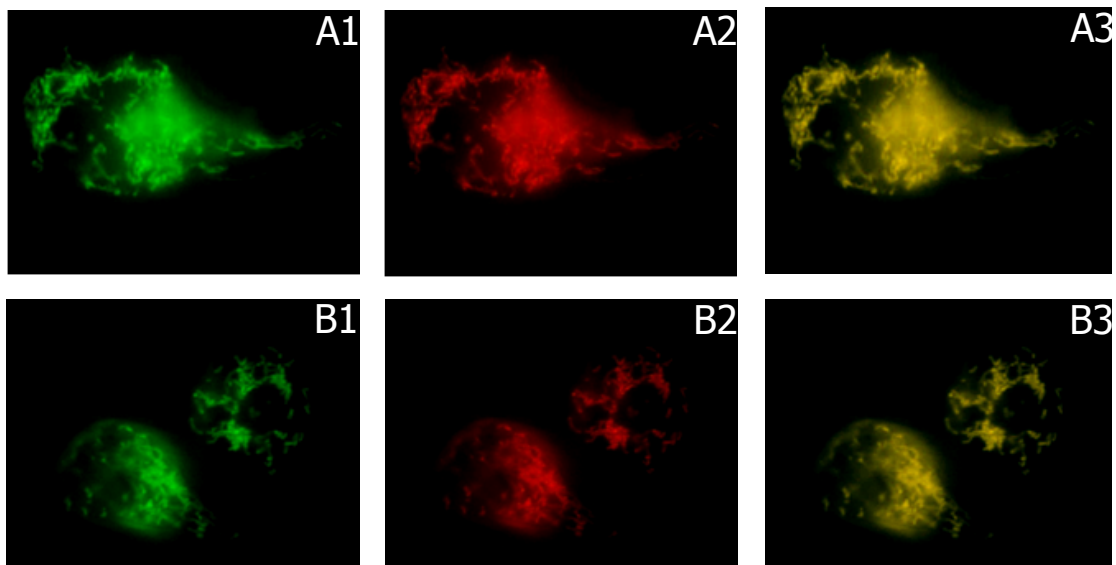


**Figura R1: Localización de frataxina en células CHO-K1.**

Las células CHO-K1 fueron transfectadas con la construcción *fhpEGFP-N3* (A1, B1) o con el plásmido sin inserto (C1). En las células transfectadas con la construcción *fhpEGFP-N3* se aprecia la señal distribuida por todo el citoplasma (A1, B1). Para confirmar que el patrón que aparece en las células transfectadas, que expresan la proteína de fusión frataxina-GFP, es un patrón de distribución mitocondrial, se usó la sonda CMTMRos que marca de rojo a las mitocondrias (A2, B2, C2). La superposición de las imágenes demuestra la colocalización de la proteína frataxina con las mitocondrias (A3, B3). Las células transfectadas con el plásmido control (C) presentan una señal uniforme en el núcleo y citoplasma (C1) que no muestra el patrón de distribución mitocondrial (C3).

Como puede apreciarse en estas figuras, las células transfectadas con la construcción FH-GFP no muestran señal en el núcleo, sino que ésta se reparte por el citoplasma formando un patrón típico de las mitocondrias en cuanto a distribución y forma (figuras R1 y R2, A1 y B1). Para poner de manifiesto este patrón mitocondrial, se empleó una sonda comercial derivada de la tetrametilrosamina (MitoTracker Orange CMTMRos). Esta sonda produce el marcaje al ser secuestrada por las mitocondrias funcionales. El fluoróforo, al ser excitado, emite en el espectro del rojo y las mitocondrias aparecerán teñidas de

este color (figuras R1 y R2, A2 y B2), mientras que la localización de la proteína de fusión FH-GFP se verá en verde (figuras R1 y R2, A1 y A2). Al superponer las imágenes de los canales verde y rojo, un pseudocolor amarillo anaranjado marcará las regiones donde coincida la localización de FH-GFP con las mitocondrias, como se ve en las figuras R1 y R2 (A3 y B3). En cambio las células que fueron transfectadas con el vector control mostraron una señal uniforme por todo el núcleo y el citoplasma (figura R1, C1-C3). La detección de la señal se llevó a cabo 24 horas después de la transfección, mediante tinción inmunocitoquímica.



**Figura R2: Localización de frataxina en células S2.**

Las células S2 fueron transfectadas con la construcción *fhpEGFP-N3* (A1, B1). En las células transfectadas con la construcción *fhpEGFP-N3* se aprecia la señal distribuida por todo el citoplasma (A1, B1). Para confirmar que el patrón que aparece en las células transfectadas, que expresan la proteína de fusión frataxina-GFP, es un patrón de distribución mitocondrial, se usó la sonda CMTMRos que marca de rojo a las mitocondrias (A2, B2). La superposición de las imágenes demuestra la colocalización de la proteína frataxina con las mitocondrias (A3, B3).

La localización de la proteína FH confirma que se trata de una proteína cuya función debe ser realizada en la mitocondria, tal y como se predijo de los estudios bioinformáticos anteriores (Cañizares *et al.* 2000). Estos resultados, a su vez, concuerdan con los de localización de sus ortólogos en otras especies, como el ratón (Gibson *et al.* 1996), el gusano nematodo (Vázquez-Manrique *et al.* 2006) y la especie humana (Koutnikova *et al.* 1997 y Priller *et al.* 1997). Por lo tanto, este resultado proporciona una evidencia indirecta de que la función de FH en *D. melanogaster* está conservada con respecto a la de otras especies, incluso la especie humana, lo que justifica el uso de este organismo como modelo para el estudio de la ataxia de Friedreich.

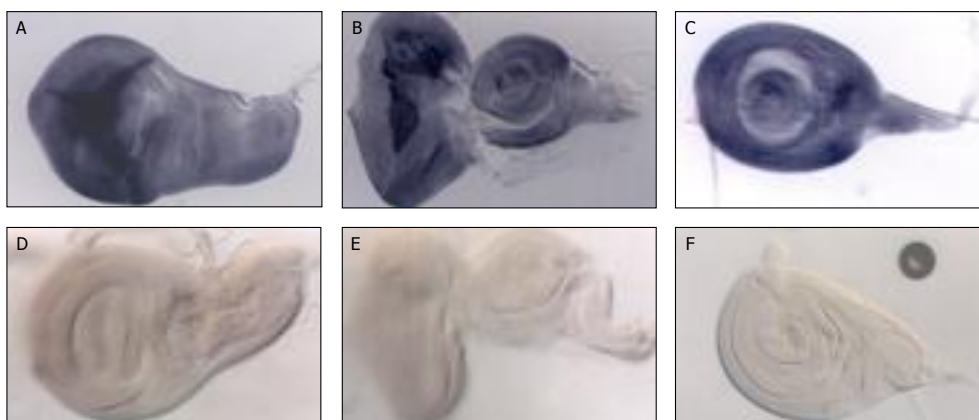


## 2. Estudio de la expresión de *fh* en discos imaginales

El patrón de expresión espacio-temporal del gen *fh*, en *D. melanogaster*, fue determinado en distintas fases del desarrollo desde embriones a adultos, mediante *Northern blot*. Los resultados demostraron que existía una expresión en todos los momentos del desarrollo analizados, aunque se obtuvo un pico de expresión más alto entre las 6 y las 12 horas del desarrollo embrionario. Al mismo tiempo, el análisis de expresión en embriones, mediante hibridaciones *in situ*, mostró que la expresión del gen era ubicua en tales estadios (Cañizares *et al.* 2000).

Conociendo la expresión temporal (desde embrión hasta adulto) y espacial en el embrión, nos planteamos estudiar la expresión en los discos imaginales, dado que representan tejidos embrionarios que van a dar lugar a ciertas estructuras del adulto. Los discos imaginales son grupos de 20-40 células que provienen de la invaginación del epitelio embrionario y de los cuales derivan la mayoría de estructuras ectodérmicas. Estos discos están rodeados de una membrana peripodal, formada por células de gran tamaño. Durante la metamorfosis, las células de la membrana peripodal juegan un papel activo en el cambio de forma, mediante fuertes contracciones y extensiones, permitiendo la eversión y formación de las estructuras ectodérmicas del adulto.

Para el estudio de la expresión de *fh* en los discos imaginales, se partió de larvas de tercer estadio de la cepa *OrR* de *Drosophila*. A estas larvas se les extrajeron los discos imaginales de ala, pata, ojo y halterio, los cuales fueron fijados y preparados para realizar las hibridaciones *in situ*. Se utilizó como sonda el ARN antisentido, marcado con digoxigenina, y obtenido a partir del ADNc que cubría la totalidad de la pauta de lectura de *fh*. Para el control negativo se usó la cadena con sentido marcada con digoxigenina.



**Figura R3. Hibridación *in situ* en discos imaginales de *D. melanogaster*.**

Las hibridaciones *in situ* se realizaron con la sonda anti-sentido del gen *fh* (A-C) y la sonda con sentido (D-F) en discos imaginales de ala (A y D), ojo-antena (B y E) y pata (C y F).

En la figura R3 se muestran los resultados obtenidos de las hibridaciones *in situ* en los discos de ala, ojo-antena y pata mediante las sondas antisentido (A-C) y con sentido, que nos sirve de control negativo (D-F). Puede comprobarse cómo la expresión del gen *fh* se extiende a lo largo de todo el disco imaginal, aunque parece haber una expresión un poco mayor en las células peripodales.

### 3. Utilización de la técnica P-homing para la mutagénesis del gen *fh*.

En *D. melanogaster* el elemento transponible P ha sido muy utilizado para la mutagénesis dirigida, dada su capacidad de movilización, la cual puede ser controlada en el laboratorio; además, las lesiones que provoca en el genoma pueden ser detectadas con facilidad. Cuando el elemento P incorpora secuencias de la región reguladora de un gen, aumenta su capacidad de inserción en o muy cerca de dicho gen. Esta estrategia es conocida como *P-homing* (Hama *et al.* 1990).

Para llevar a cabo la mutagénesis del gen *fh* aplicando esta técnica, se obtuvo una construcción (*fh-Phoming*) portadora de un fragmento de 1,4 kb del locus *fh*, clonado en el vector pUAST. Este fragmento comprende desde 866 pb previas al codón de inicio de la traducción, hasta las 32 pb anteriores al codón de parada del gen. Dicha construcción fue microinyectada a embriones de menos de una hora de la cepa *yw*. Los cromosomas portadores de las nuevas inserciones se amplificaron mediante cruces de los individuos transformados con individuos de la cepa *yw*, tal y como se detalla en el punto 6.2.2. de material y métodos. De esta forma, se obtuvieron 50 líneas transformadas con la construcción en homocigosis. En ninguna de ellas se observó ninguna alteración fenotípica evidente.

Las nuevas inserciones se localizaron siguiendo el esquema de cruces de la figura M2 (pag. 61). En la tabla R1 se indica el cromosoma donde se localiza la construcción *fh-Phoming* en cada una de las líneas transformadas. De todas ellas, en tan solo 7 se localizó la construcción en el cromosoma X. Con el fin de precisar el lugar de inserción del transgen en este cromosoma, se realizaron PCR multiplex y PCR inversa, utilizando como DNA molde el DNA genómico extraído de individuos de cada línea transformada.

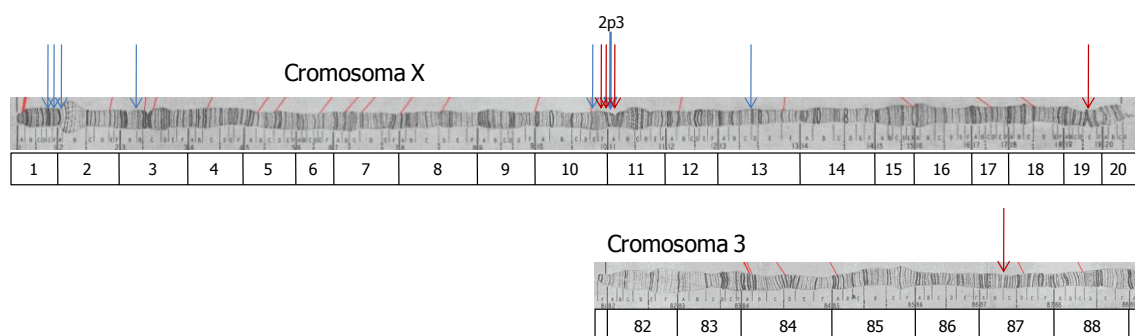
**Tabla R1.** Localización cromosómica de la construcción *fh-Phoming-pUAST*

Cromosoma	Líneas
X	1p15, 2p3, 2p8, 2p11, 2p13, 2p15, 3p5
2	1p1, 1p2, 1p3, 1p5, 1p6, 1p8, 1p13, 1p14, 1p16, 1p17, 1p19, 2p2, 2p6, 2p14, 2p16, 2p17, 3p2, 3p6, 3p7
3	1p4, 1p7, 1p10, 1p11, 1p12, 1p18, 2p1, 2p7, 2p9, 2p10, 2p12, 3p1, 3p3, 3p4, 3p8

Los cebadores utilizados en la PCR multiplex se diseñaron para cubrir una región de 10 kb que comprende el gen *fh* y varios genes colindantes (figura M3, pag 62). El nombre asignado a cada cebador (tabla M3, pag 36-37) lleva un número que indica su proximidad al gen *fh*; para el caso de los cebadores directos, a mayor número mayor proximidad y en los cebadores inversos a mayor número menor proximidad. Los resultados de PCR indicaron que en ninguna línea transformada se había insertado la construcción dentro de la región genómica definida por los cebadores.

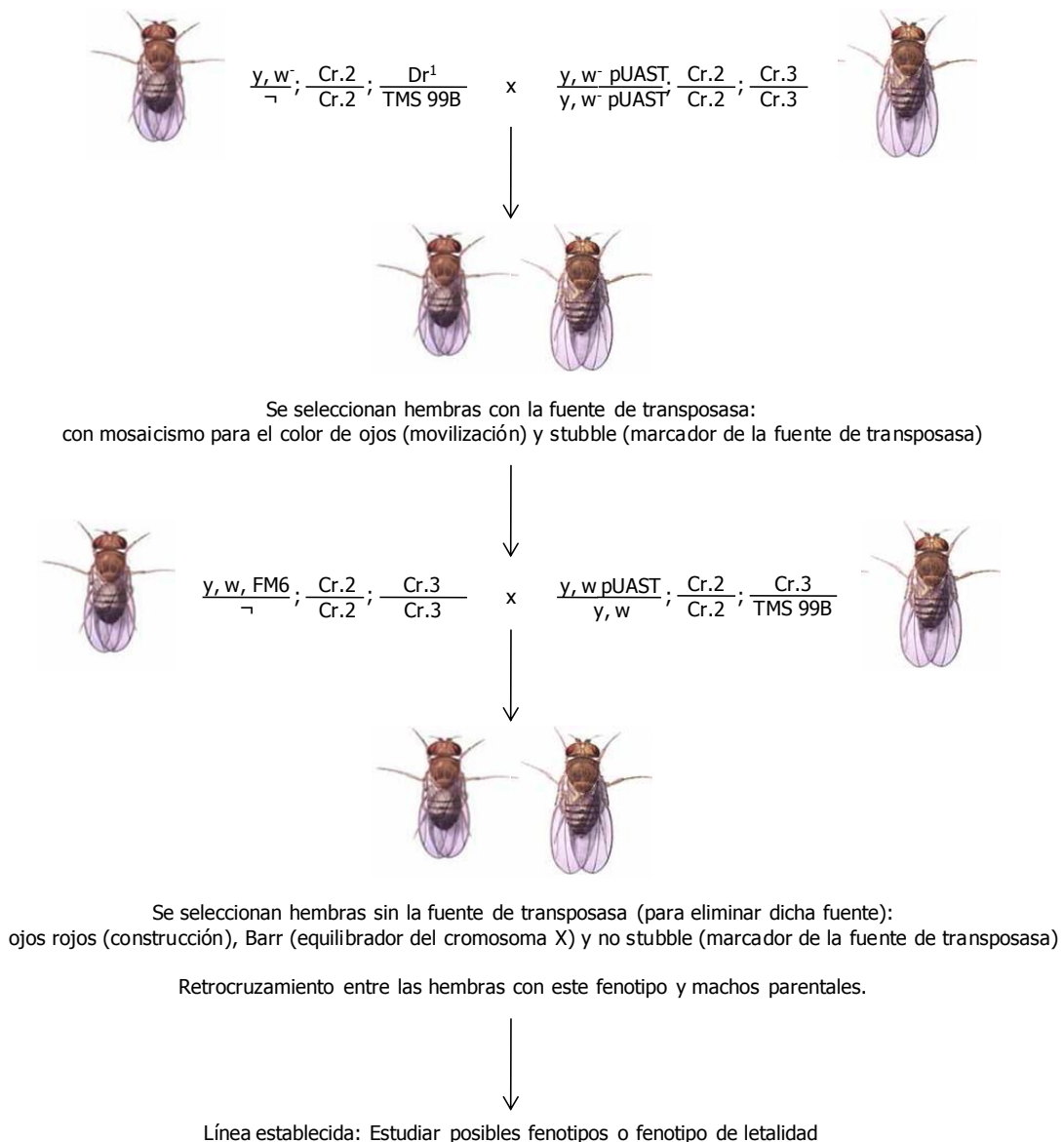
Para corroborar estos resultados, se obtuvieron las secuencias de las regiones adyacentes a las inserciones mediante PCR inversa de aquellos casos en que la inserción se había mapeado en el cromosoma X. En todos los casos se determinó mediante BLAST que la construcción se había insertado a gran distancia del gen *fh* (figura R4).

Dado que no se consiguió que la construcción *fh-Phoming* cayera dentro o en las proximidades del gen *fh*, nos planteamos movilizar dicha construcción en una de las 7 líneas con el transgen en el cromosoma X. Se cruzaron hembras de la línea 2p3 con machos de una cepa portadora de una fuente de transposasa, enzima que permite movilizar cualquier construcción que contenga las secuencias del elemento P reconocidas por dicha enzima. Elegimos la cepa *w\**; *Dr1/TMS*,  $P\{ry^{+t7.2}=\Delta 2-3\}99B$  como cepa con actividad transposasa, ya que es posible identificar la capacidad de sintetizar transposasa mediante la expresión de la mutación dominante *stubble* (quetas cortas), presente en el mismo cromosoma. De esta forma se conoce qué individuos pueden sintetizar el enzima y por tanto, tienen capacidad para movilizar la construcción *fh-Phoming*. Por otro lado, los individuos portadores de la construcción *fh-Phoming* también pueden ser identificados fenotípicamente por el color rojo de los ojos, ya que el vector pUAST lleva una copia normal del gen *white*.



**Figura R4.** Localización de las nuevas inserciones obtenidas con la técnica del *Phoming*. Las flechas azules muestran las inserciones directas de la construcción *fh-Phoming*, marcándose la línea usada para la posterior movilización. Las flechas rojas muestran la movilización de la construcción *fh-Phoming*.

En la figura R5 se presenta un esquema de los cruces que fueron realizados para llevar a cabo la movilización. Al final se establecieron 100 líneas diferentes de las que 5 eran letales en homo o hemicigosis. Estas últimas se mantuvieron en heterocigosis utilizando el cromosoma X equilibrador FM6. La localización exacta de las nuevas inserciones dentro del cromosoma X, en las 5 líneas letales, se determinó mediante PCR multiplex y PCR inversa, y sólo mediante PCR multiplex en las 95 líneas restantes. Tampoco en este caso la mutagénesis insercional consiguió afectar al gen *fh* (figura R4).



**Figura R5.** Esquema de los cruces para la movilización de la construcción *fhoming-pUAST*.

## **4. Obtención de mutantes funcionales transitorios con reducción sistémica de frataxina.**

Otra estrategia desarrollada para obtener mutantes de pérdida de función del gen *fh*, ha consistido en la utilización del ARN de interferencia acoplado al sistema UAS-GAL4.

En nuestro laboratorio, el sistema UAS-GAL4 se aplica tanto para silenciar como para sobreexpresar el gen *fh* de forma ubicua y en tejidos y/o momentos del desarrollo determinados. A 29°C, el silenciamiento del gen de forma generalizada conlleva letalidad. Lo mismo ocurre cuando se reduce su expresión en el mesodermo y durante el desarrollo del corazón. En cambio, el sistema nervioso presenta una sensibilidad diferente a la reducción de frataxina, ya que se obtienen individuos adultos viables aunque, en algunos mutantes condicionales, se observa una menor longevidad y una menor capacidad de escalada respecto a los individuos control (Navarro, 2005).

El trabajo de Navarro (2005) aportó las bases experimentales necesarias para la búsqueda de aquellas condiciones que permitieran obtener, en *Drosophila*, un modelo más próximo a la ataxia de Friedreich. Dos parámetros han sido cruciales a este respecto:

- La reducción sistémica de frataxina, como ocurre en los enfermos
- La presencia de cierto nivel de proteína que impida el incorrecto desarrollo asociado a la letalidad de los mutantes de supresión generalizada obtenidos hasta la fecha.

Esto ha sido posible cuando utilizamos la línea *actin*-GAL4, de expresión generalizada, en los cruces con la línea transgénica UAS-*fhIR*, manteniendo la temperatura del cruce a 25°C. La eficiencia del sistema UAS-GAL4 varía con la temperatura, a temperaturas altas (29°C) se produce más expresión, reduciéndose a medida que baja la temperatura.

Los descendientes de este cruce (hembras *actin*-GAL4 x machos UAS-*fhIR*), portadores de ambas construcciones, sintetizan ARN de doble cadena del gen *fh*, que es capaz de interferir la expresión del propio gen endógeno. La supresión de la expresión del gen *fh* fue tal que los individuos pudieron llegar a fase adulta. Un dato curioso, del que desconocemos la causa, es que se obtuvieron muchos más machos que hembras, siempre que realizamos dicho cruce a la temperatura indicada.

Para cuantificar la expresión de *fh*, en los mutantes transitorios obtenidos por interferencia en las condiciones experimentales descritas, se determinó la cantidad de transcrito, mediante PCR cuantitativa. Como control se

usaron los descendientes del cruce de la misma línea GAL4 con la cepa *yw*. Se llevaron a cabo 3 réplicas de la amplificación del ADNc de cada tipo de descendencia (*actin-GAL4/UAS-fhIR* y *actin-GAL4/yw*). Para analizar los cambios relativos en la cantidad de transcritos, se elige como patrón un transcrito de referencia que no varíe su expresión con los tratamientos a realizar, normalmente un gen de mantenimiento (*housekeeping*), en nuestro caso el gen *rp49* (*rp32*). Comparando, en las muestras, los ciclos umbrales de amplificación ( $C_T$ ) del gen de referencia con los del gen problema, se pueden determinar los cambios relativos en la expresión del gen problema.

Es necesario comprobar previamente que la eficiencia de la amplificación del gen a analizar (*fh*) y del gen de referencia (*rp49*) sean equivalentes para distintas concentraciones de ADNc. Por lo tanto, se llevó a cabo dicha comprobación, obteniéndose resultados satisfactorios para ambos genes.

**Tabla R2.** Cuantificación de la expresión de *fh* en los mutantes de interferencia *actin-GAL4/UAS-fhIR*

Individuos	$C_T$ media <i>fh</i>	$C_T$ media <i>rp49</i>	$\Delta C_T$	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
control	21,93 ± 0,11	16,45 ± 0,18	5,47 ± 0,21	0 ± 0,21	1 (0,86-1,16)
<i>interferencia</i>	23,19 ± 0,12	16,14 ± 0,09	7,05 ± 0,15	1,58 ± 0,15	0,33 (0,30-0,37)

$C_T$ : ciclo umbral de ciclos de amplificación.

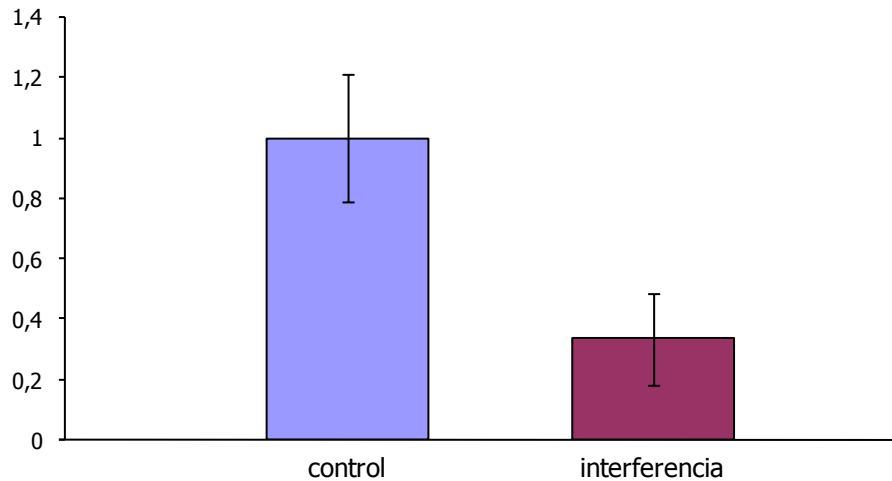
$C_T$  media: media de los valores  $C_T$  obtenidos en las tres réplicas realizadas.

$\Delta C_T$ : valor obtenido al restar los valores de las dos columnas anteriores. La nueva desviación estándar es la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las desviaciones de las dos columnas anteriores.

$\Delta\Delta C_T$ : valor obtenido al restarle a  $\Delta C_T$  el valor de  $\Delta C_T$  del control (*rp49*) tomado arbitrariamente como referencia (calibrador).

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ : cantidad de diana, normalizada respecto a una referencia endógena y relativa al calibrador.

En la tabla R2 podemos ver cómo la media del valor de  $C_T$  para el gen de referencia (*rp49*), es prácticamente la misma en los controles y en los mutantes, mientras que para el gen *fh* es mayor en los mutantes que en los controles. Si interpretamos este resultado en términos de la PCR, en la muestra de los mutantes se necesitan alrededor de dos ciclos más para obtener la misma cantidad de transcrito de *fh* que en los controles. A partir de estos datos, y como se ve en la última columna de la tabla, en los mutantes la cantidad de diana (ARNm del gen *fh*), normalizada respecto a una referencia endógena (*rp49*), es un 33% de la del control. En la figura R6 se muestran los valores  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  para los individuos control y los mutantes interferidos.



**Figura R6. Expresión relativa del gen *fh* en controles, *actin-GAL4/yw*, y en mutantes interferidos, *actin-GAL4/UAS-fhIR*.** Los histogramas representan los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  de la tabla R1. Puede observarse que los individuos mutantes por interferencia muestran un nivel de ARNm, para frataxina, en torno al 30% del de los individuos control.

Las condiciones en las que hemos llevado a cabo el experimento (línea *actin-GAL4* a 25°C) nos han permitido obtener individuos adultos, con una reducción generalizada de frataxina a niveles muy similares a los observados en los pacientes de ataxia de Friedreich. En estos pacientes se detecta una cantidad residual de ARNm para frataxina que varía entre el 4% y el 29% del nivel normal (Campuzano *et al.* 1996, Bidichandani *et al.* 1998, Cossee *et al.* 1997, Campuzano *et al.* 1997 y Pianese *et al.* 2004).



## ***5. Análisis de la supervivencia y de la capacidad locomotora en los mutantes funcionales transitorios***

La ataxia de Friedreich es una enfermedad que produce lesiones progresivas en el sistema nervioso, ocasionando síntomas que van desde debilidad muscular y problemas de habla, hasta cardiomiopatías. El primer síntoma que se manifiesta en los pacientes es, generalmente, la dificultad al caminar, condición que empeora gradualmente. Por norma general, la persona queda reclusa en una silla de ruedas entre 15 y 20 años después de aparecer los primeros síntomas y, en las etapas posteriores de la enfermedad, queda totalmente incapacitada. La esperanza de vida se ve muy reducida en estos pacientes.

Por este motivo, nos planteamos determinar si existía pérdida de movilidad y reducción del tiempo de vida en los mutantes obtenidos por interferencia. En todos los experimentos se analizaron, al mismo tiempo, individuos obtenidos del cruce control (*yw* x *actin-GAL4*) y los obtenidos del cruce que permite la interferencia (*UAS-fhIR* x *actin-GAL4*), para que las condiciones fueran las mismas en los dos grupos y así poder comparar los resultados. Todos los análisis se realizaron en los machos dado que, como se ha indicado anteriormente, son mucho más abundantes que las hembras en la descendencia del cruce de interferencia.

### ***5.1 Análisis de la capacidad locomotora***

Los tests de escalada se llevaron a cabo en condiciones de normoxia (concentración normal de oxígeno) e hiperoxia (concentración del 99,5% de oxígeno) a 25°C. En ambos casos las mediciones se realizaron el 5º y 10º día tras la emersión del adulto.

Los resultados obtenidos en las condiciones de normoxia se presentan en la tabla R3. Se indica la media de los valores derivados de los 15 individuos que fueron analizados para cada genotipo. Estos valores representan los centímetros recorridos por segundo por cada individuo, de tal forma que podemos comparar las velocidades entre los controles y los mutantes. Tales velocidades se representan en la figura R7. Podemos observar diferencias importantes en la capacidad locomotora de los individuos mutantes; tanto al quinto como al décimo día, el valor medio de la capacidad locomotora de éstos es, aproximadamente, la mitad del de los individuos control.

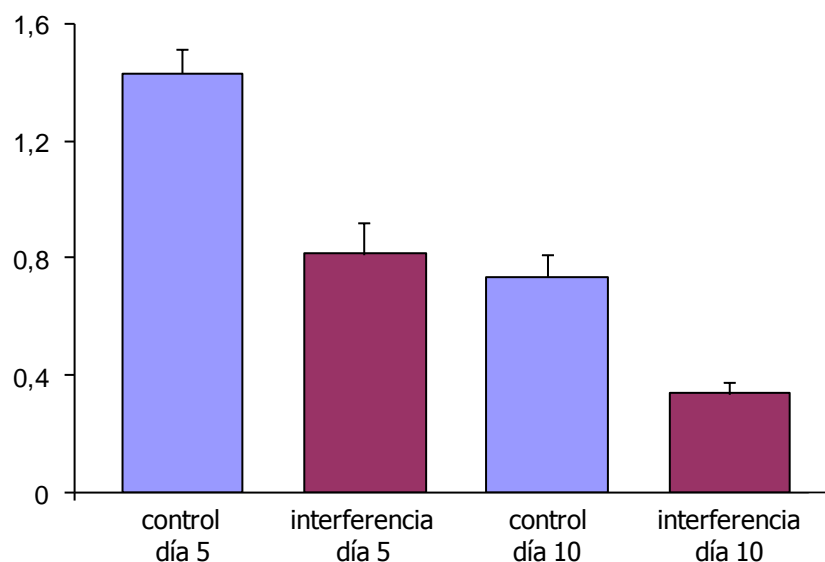
Dado que las diferencias en la capacidad locomotora eran ya significativas desde los primeros días después de la emersión de los adultos, y que éstas se mantenían, se decidió no continuar con las mediciones. Además, en tiempos posteriores, la capacidad se iba perdiendo con el tiempo, tanto en

los individuos control como en los mutantes, dificultando la obtención de una medida correcta.

Respecto a los tests llevados a cabo en condiciones de hiperoxia, no se muestran los resultados, por la falta de movilidad que presentan los individuos mutantes desde el primer momento en que se someten a estas condiciones.

**Tabla R3.** Capacidad locomotora de los individuos control y de los mutantes funcionales en condiciones de normoxia.

Individuos	Día 5	Día 10
	Velocidad media (cm/s)	Velocidad media (cm/s)
control	1,43 ± 0,08	0,73 ± 0,08
interferencia	0,81 ± 0,11	0,34 ± 0,04



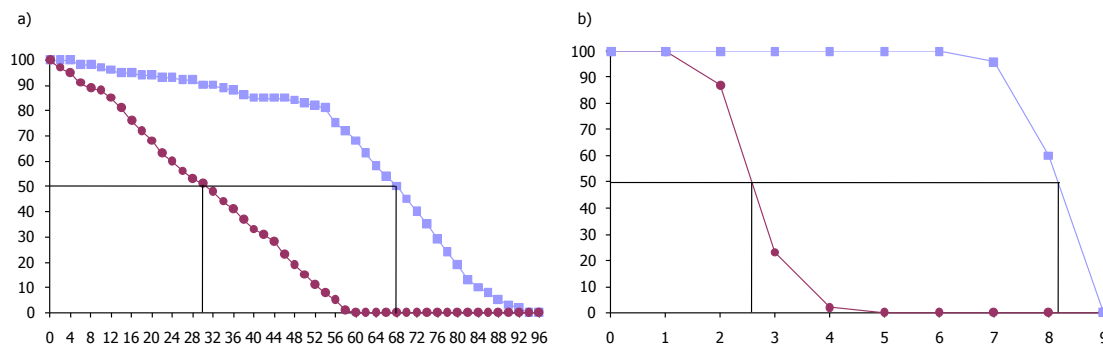
**Figura R7.** Resultado de los tests de escalada en los mutantes y los individuos control, a los 5 y 10 días de la emergencia de la pupa. Los histogramas representan los valores de velocidad (cm/s) de la tabla R2.

## 5.2 Análisis de la supervivencia

El análisis de la supervivencia también se llevó a cabo en condiciones de normoxia e hiperoxia. En ambos casos se partió de 100 individuos para cada genotipo (control e interferencia) y se fueron contando los individuos supervivientes cada dos días en normoxia y cada día en hiperoxia. En estas condiciones, los individuos se vigilaban bajo la lupa para ver si movían alguna parte del cuerpo y asegurarnos de que no rechazábamos individuos que aún

estaban vivos dado que, en hiperoxia, pierden rápidamente su capacidad de movimiento.

Los resultados se muestran en una gráfica (figura R8) que representa el porcentaje de individuos supervivientes a lo largo del tiempo.



**Figura R8. Resultado de los tests de supervivencia de los individuos mutantes (línea roja y con círculos) frente a los individuos control (línea azul y con cuadrados), a) en normoxia, b) en hiperoxia, ambos a 25°C.** Las gráficas representan el porcentaje de supervivientes (ordenadas) a lo largo de los días (abcisas). Las líneas en negrita marcan el valor de vida media.

Como se aprecia en las gráficas, tanto en normoxia como en hiperoxia existe una reducción de la supervivencia en los individuos mutantes. La vida máxima para el control es de 90 días en normoxia y de 9 en hiperoxia; para los mutantes es de 60 en normoxia y entre 4-5 días en hiperoxia. La vida media también está afectada en los mutantes y en las condiciones de fuerte estrés oxidativo. Entendemos por vida media la edad (en días) en la que se observa la mitad de los adultos de partida. En normoxia, los mutantes tienen una vida media de alrededor de 30 días mientras que en los controles este valor se observa en el día 68, es decir, la diferencia de los valores es de alrededor del doble. Por otra parte, en hiperoxia la diferencia en el valor de la vida media entre controles y mutantes es todavía más alta, de unas 4 veces. El valor de vida media en los mutantes se encuentra entre el 2º y 3º día, mientras que en los controles entre el 8º y 9º día.

En conjunto, los resultados obtenidos sobre la supervivencia y la capacidad locomotora de los individuos mutantes, concuerdan con los síntomas de los pacientes de ataxia de Friedreich, en cuanto a que tienen reducida su esperanza de vida y su capacidad de movimiento. Por otra parte, el hecho de que en condiciones de hiperoxia la diferencia en la supervivencia entre los mutantes y los controles sea mucho mayor que en normoxia, y además con una capacidad locomotora muy limitada, sugiere por una parte, que el estrés oxidativo podría estar implicado en estos fenotipos y por otra, que la frataxina podría proteger a la célula frente a dicho tipo de estrés.

## **6. Análisis de las actividades de diferentes proteínas ferrosulfuradas en los mutantes funcionales transitorios**

El hecho de que en los mutantes funcionales la capacidad locomotora y la supervivencia estén muy afectadas en hiperoxia, nos dio una clara evidencia de que el estrés oxidativo jugaba un papel importante en estos resultados. Por lo tanto, nos planteamos medir la actividad de diferentes enzimas con centros hierro-azufre como la aconitasa, muy sensible a este tipo de estrés, la succinato deshidrogenasa, y los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones: NADH deshidrogenasa (CI), SDH (CII), complejo citocromo *bc<sub>1</sub>* (CIII) y la citocromo *c* oxidasa (CIV), mediante la medida del consumo de oxígeno. Todas estas actividades están disminuidas en los pacientes con ataxia de Friedreich (Rötig *et al.* 1997).

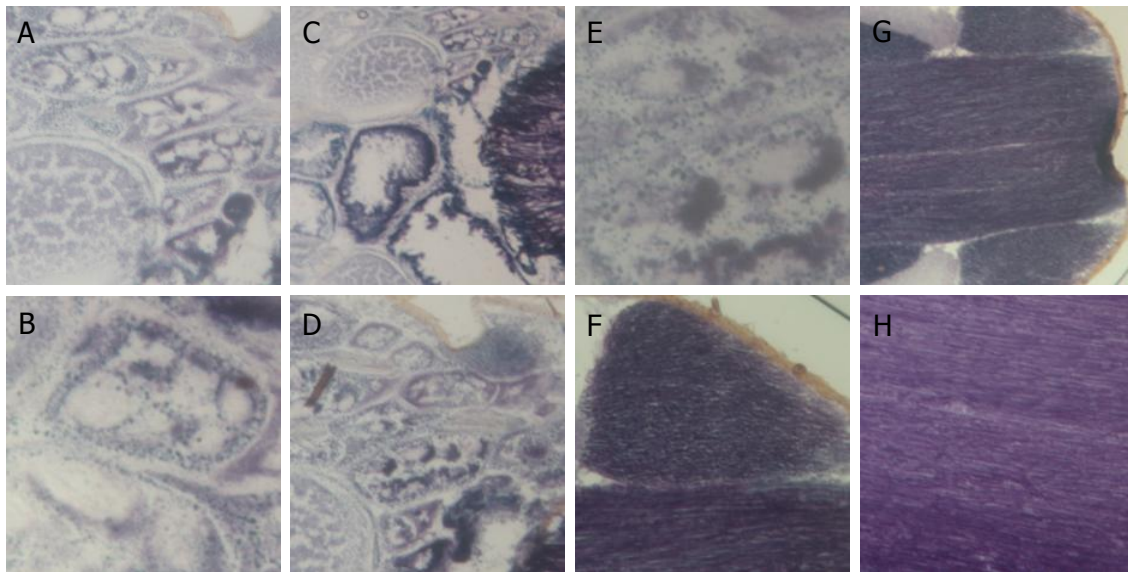
### **6.1 Análisis de la actividad Succinato deshidrogenasa**

La SDH fue la primera enzima cuya actividad analizamos. Se llevaron a cabo dos tipos de análisis, uno cualitativo (mediante tinción de criosecciones de adultos) y otro cuantitativo (mediante medición espectrofotométrica continua). En este último análisis se llevaron a cabo mediciones tanto en normoxia como en hiperoxia.

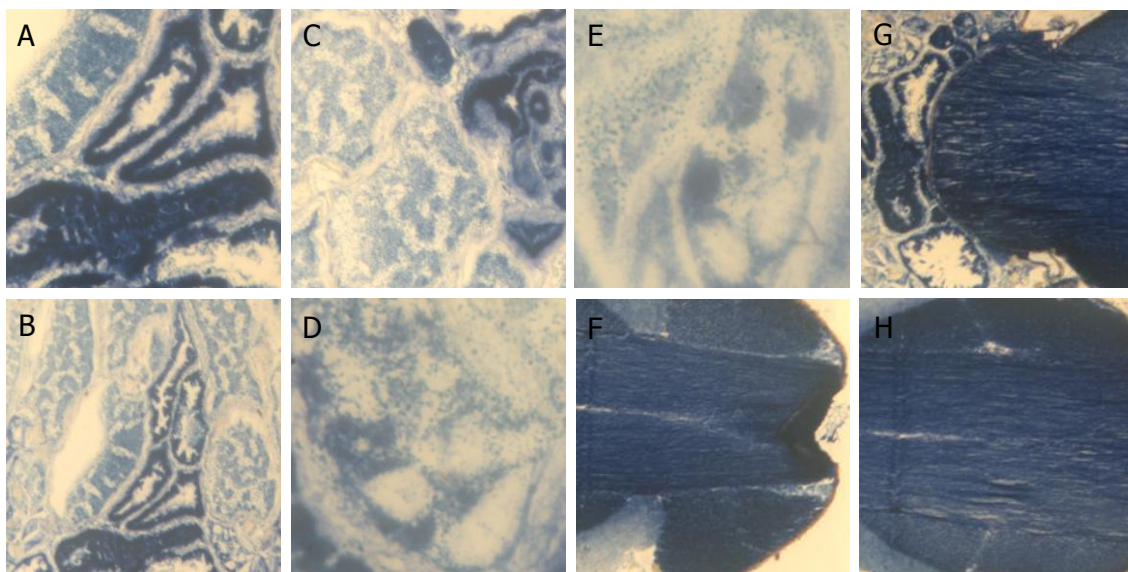
#### **6.1.1 Análisis cualitativo de la actividad SDH**

Para este análisis se realizaron criosecciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor, de individuos adultos controles (figura R9) y mutantes (figura R10), a las que se aplicó la solución de tinción específica. En este caso, la ausencia de tinción indica la falta de actividad de la enzima.

Los resultados obtenidos con esta tinción no revelaron diferencia alguna en la actividad de la SDH, entre los individuos mutantes por interferencia y los individuos control, en normoxia. Esto podía ser debido a que la técnica en sí no es capaz de discriminar pequeñas diferencias, aunque pudiesen resultar significativas, en dicha actividad. Por esta razón se decidió realizar un análisis cuantitativo



**Figura R9: Tinción histoquímica para detectar la actividad SDH en individuos adultos *actin-GAL4/yw* mantenidos en normoxia.** (A-E) Secciones longitudinales del abdomen donde se aprecia el tejido intestinal. (F-H) Secciones longitudinales del tórax mostrando los músculos longitudinales dispuestos paralelamente.



**Figura R10: Tinción histoquímica para detectar la actividad SDH en individuos adultos *actin-GAL4/UAS-fhIR* mantenidos en normoxia.** (A-E) Secciones longitudinales del abdomen donde se aprecia el tejido intestinal. (F-H) Secciones longitudinales del tórax mostrando los músculos longitudinales dispuestos paralelamente.

### **6.1.2 Análisis cuantitativo de la actividad SDH**

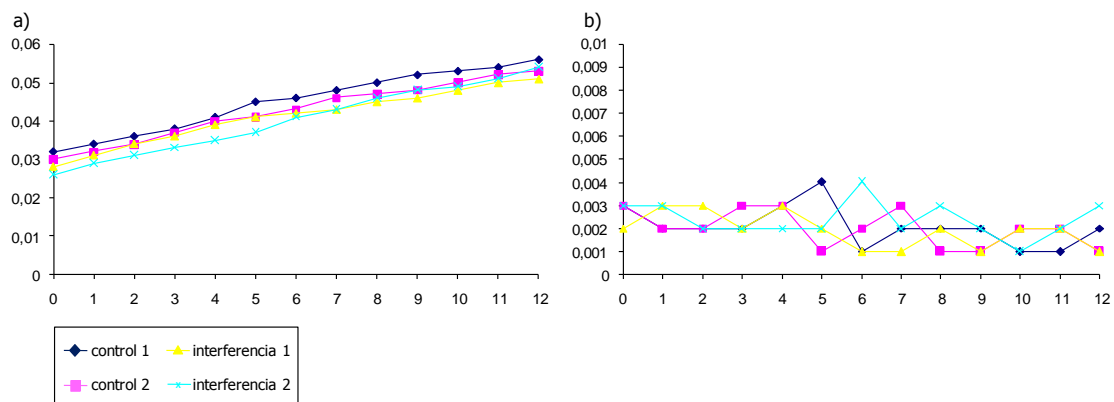
El análisis cuantitativo de la actividad SDH se realizó en diferentes tiempos del adulto, concretamente en los días 1, 5 y 25, tras su emergencia de la pupa. Este seguimiento se realizó para evaluar posibles efectos acumulativos de la falta de frataxina sobre la actividad de la enzima, ya que, independientemente de que frataxina actúe o no sobre la SDH, el centro hierro-azufre de la enzima podría verse afectado por el estrés oxidativo asociado a la falta de frataxina.

La medición de la actividad SDH se realizó de forma continua, midiendo la absorbancia a 500nm cada minuto durante 20 minutos, para detectar la reducción del Iodonitrotetrazolio (INT) por acción de la enzima. Para el cálculo de la actividad se utilizó la parte de la gráfica que más se acercaba a la linealidad, en nuestro caso los últimos 10 minutos (figuras R11a-R13a), siguiendo así lo estandarizado en el artículo de Munujos *et al.* (1993). Además, las medidas se llevaron a cabo a una temperatura constante de 37°C para eliminar la variabilidad debida a este factor y simplificar los cálculos de las mediciones. En todos los casos se hicieron dos réplicas para cada genotipo.

El dato que nos aporta el valor de actividad de la enzima es la diferencia de las absorbancias a lo largo del tiempo ( $\Delta$ Absorbancia/tiempo). Este valor, corresponde matemáticamente a la pendiente de la recta de la parte lineal de la gráfica de la absorbancia (figuras R11b-R13b). Las actividades enzimáticas se presentan en unidades de enzima normalizadas con la concentración de proteínas de la muestra, lo que permite comparar los resultados entre muestras (tablas R4-R6).

#### **6.1.2.1 Análisis de la actividad SDH en el adulto en condiciones de normoxia**

Tanto a la edad de 1 día (figura R11, tabla R4), como de 5 (figura R12, tabla R5), y de 25 días (figura R13, tabla R6), no se aprecian variaciones importantes en la actividad SDH en los mutantes, respecto a los controles.

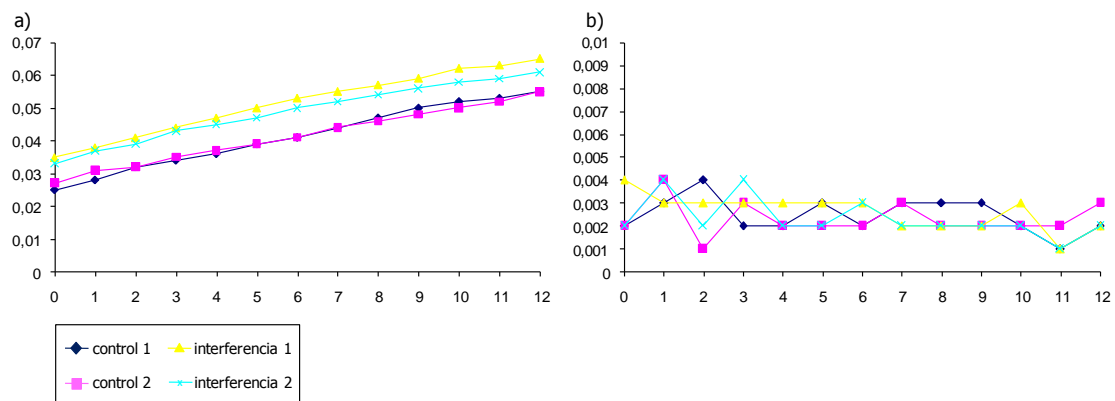


**Figura R11: Cinética de la actividad SDH el día 1 en normoxia.**

a) Representación gráfica de la absorbancia (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abcisas).  
 b) Representación gráfica del  $\Delta$ absorbancia (ordenadas) frente al tiempo (abcisas). Los valores representados en ambas gráficas son valores de los controles y de los mutantes, el día 1 tras la emersión del adulto, en condiciones de normoxia.

**Tabla R4.** Actividad SDH el día 1 en condiciones de normoxia.

Individuos		$\Delta$ Abs/t (nm/min)	[prot] (mg/ml)	dilución	U/ml	U/mg prot	media
Control	Medida 1 control	0,0020	0,45	1/100	10,362	23,028	22,452 ± 0,576
	Medida 2 control	0,0019	0,45	1/100	9,844	21,876	
Interferencia	Medida 1 interferencia	0,0017	0,5	1/100	8,808	17,616	20,725 ± 3,109
	Medida 2 interferencia	0,0023	0,5	1/100	11,917	23,834	



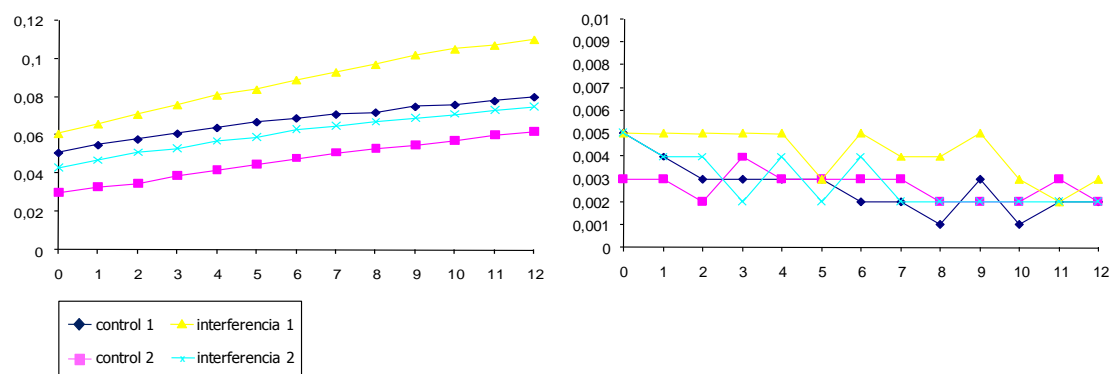
**Figura R12: Cinética de la actividad SDH el día 5 en normoxia.**

a) Representación gráfica de la absorbancia (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abcisas).  
 b) Representación gráfica del  $\Delta$ absorbancia (ordenadas) frente al tiempo (abcisas). Los valores representados en ambas gráficas son valores de los controles y de los mutantes, el día 5 tras la emersión del adulto, en condiciones de normoxia.

**Tabla R5.** Actividad SDH el día 5 en condiciones de normoxia.

Individuos		$\Delta$ Abs/t (nm/min)	[prot] (mg/ml)	dilución	U/ml	U/mg prot	media
Control	Medida 1 control	0,0023	0,49	1/100	11,917	24,321	24,321 ± 0,001
	Medida 2 control	0,0023	0,49	1/100	11,917	24,321	
Interferencia	Medida 1 interferencia	0,0024	0,51	1/100	12,435	24,383	23,367 ± 1,016
	Medida 2 interferencia	0,0022	0,51	1/100	11,399	22,351	





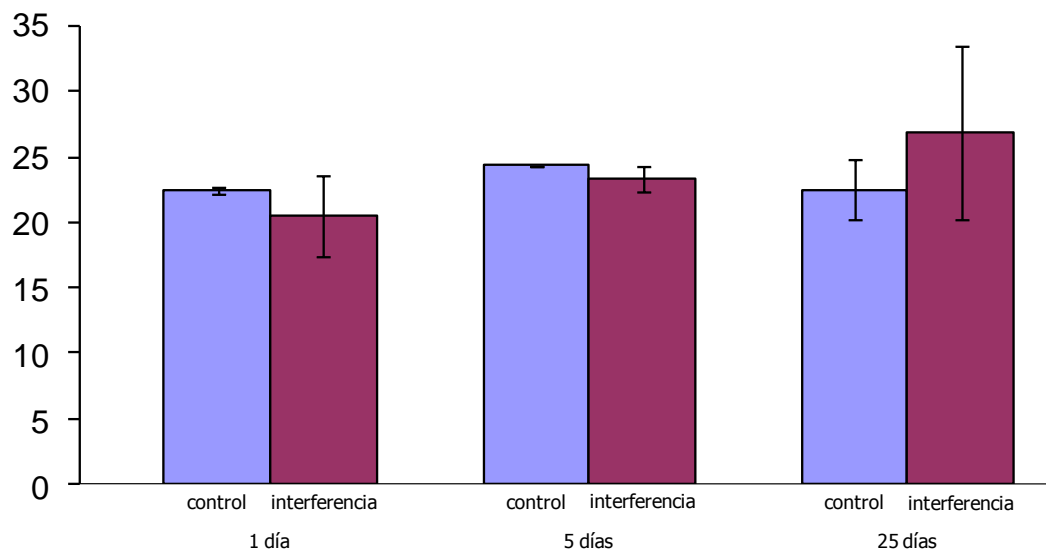
**Figura R13: Cinética de la actividad SDH el día 25 en normoxia.**

a) Representación gráfica de la absorbancia (ordenadas) frente al tiempo (abcisas). b) Representación gráfica del  $\Delta$ absorbancia (ordenadas) y su variación frente al tiempo (abcisas). Los valores representados en ambas gráficas son valores de los controles y de los mutantes, el día 25 tras la emersión del adulto, en condiciones de normoxia.

**Tabla R6.** Actividad SDH el día 25 en condiciones de normoxia.

Individuos		$\Delta$ Abs/min	[prot] (mg/ml)	dilución	U/ml	U/mg prot	media
Control	Medida 1 control	0,0022	0,56	1/100	11,399	20,355	22,636 ± 2,313
	Medida 2 control	0,0027	0,56	1/100	13,990	24,918	
Interferencia	Medida 1 interferencia	0,0039	0,59	1/100	20,207	34,249	27,663 ± 6,586
	Medida 2 interferencia	0,0024	0,59	1/100	12,435	21,077	

Resumiendo, en condiciones de normoxia no se detectaron diferencias importantes en la actividad SDH entre individuos control y mutantes, a lo largo de la vida de los individuos adultos (figura R14). Por lo tanto, podemos considerar que la función de frataxina no es crítica para la actividad de la enzima SDH.



**Figura R14: Actividad de la SDH a lo largo del tiempo en normoxia.**

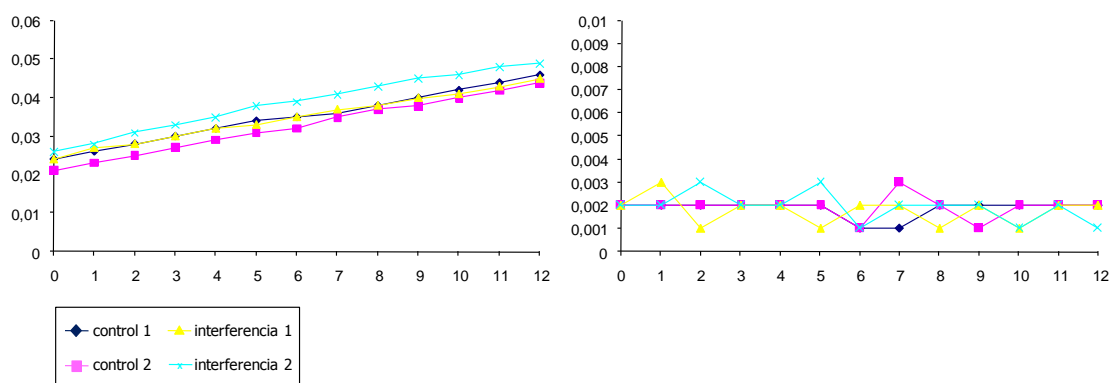
Representación de los datos de actividad SDH (mU/mg prot.) en diferentes momentos de la vida de los adultos control y mutantes por interferencia.

### ***6.1.2.2 Análisis de la actividad SDH en el adulto en condiciones de hiperoxia***

Dado que la SDH cuenta con centros hierro-azufre que podrían verse afectados en un ambiente oxidativo, se planteó la posibilidad de hacer estos experimentos en una atmósfera rica en oxígeno (hiperoxia: 99,5% de oxígeno) y comprobar si un estrés oxidativo de este tipo, en presencia de bajos niveles de frataxina, podría tener efecto sobre la actividad de esta enzima.

Los individuos *actin-GAL4/UAS-fhIR*, tras emerger de la pupa, se situaron a 25°C en una cámara que mantenía el porcentaje de oxígeno ambiental al 99,5%. Dado que los individuos mutantes muestran una reducción muy drástica de la supervivencia en este tipo de atmósfera (ver figura R8), se recogieron a las 24 horas de haber sido puestos en hiperoxia. De esta forma obtuvimos el máximo número posible de individuos vivos, para determinar la actividad SDH, y evitamos la degradación de la enzima por proteasas en los individuos muertos.

De nuevo, no se observaron diferencias en la actividad de la SDH entre los individuos control y los individuos mutantes por interferencia, después de un día de hiperoxia (figura R15 y tabla R7)



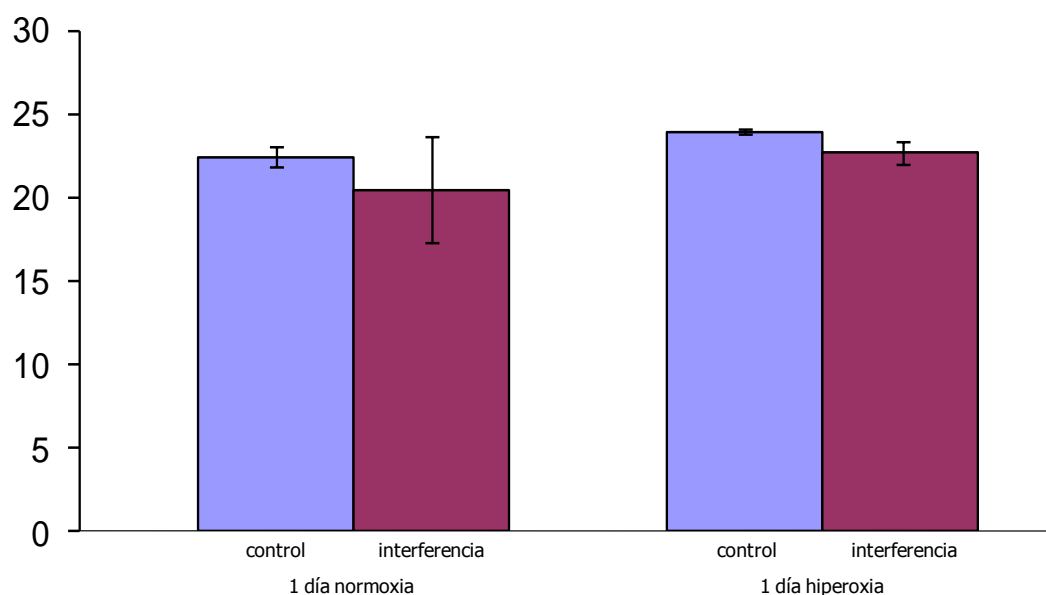
**Figura R15. Cinética de la actividad SDH tras un día en hiperoxia.**

a) Representación gráfica de la absorbancia (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abcisas).  
 b) Representación gráfica del  $\Delta$ absorbancia (ordenadas) frente al tiempo (abcisas). Los valores representados en ambas gráficas son valores de los controles y de los mutantes, el día 1 tras la emersión del adulto, en condiciones de hiperoxia durante 24h.

**Tabla R7.** Actividad SDH el día 1 en condiciones de hiperoxia.

Individuos		$\Delta$ Abs/min	[prot] (mg/ml)	dilución	U/ml	U/mg prot	media
Control	Medida 1 control	0,0018	0,40	1/100	9,326	23,316	23,965 $\pm$ 0,205
	Medida 2 control	0,0019	0,40	1/100	9,845	24,611	
Interferencia	Medida 1 interferencia	0,0017	0,40	1/100	8,808	22,021	22,669 $\pm$ 0,648
	Medida 2 interferencia	0,0018	0,40	1/100	9,326	23,316	

Si comparamos los valores de actividad de la enzima, obtenidos en las condiciones de normoxia e hiperoxia (figura R16), se observa que tampoco existen diferencias entre estos dos tipos de atmósferas, por lo que podemos decir que en condiciones de estrés oxidativo, la disminución de la función de frataxina no es crítica para la actividad de la enzima SDH.



**Figura R16: Actividad de la SDH el día 1 en normoxia e hiperoxia.**

Representación de los datos de actividad SDH (mU/mg prot.) en individuos control y mutantes de 1 día tras 24h en normoxia e hiperoxia.

## 6.2 Análisis de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa

La aconitasa es una enzima del ciclo de Krebs, con centros ferrosulfurados y cuya actividad se ve afectada en los pacientes con ataxia de Friedreich (Rötig *et al.* 1997).

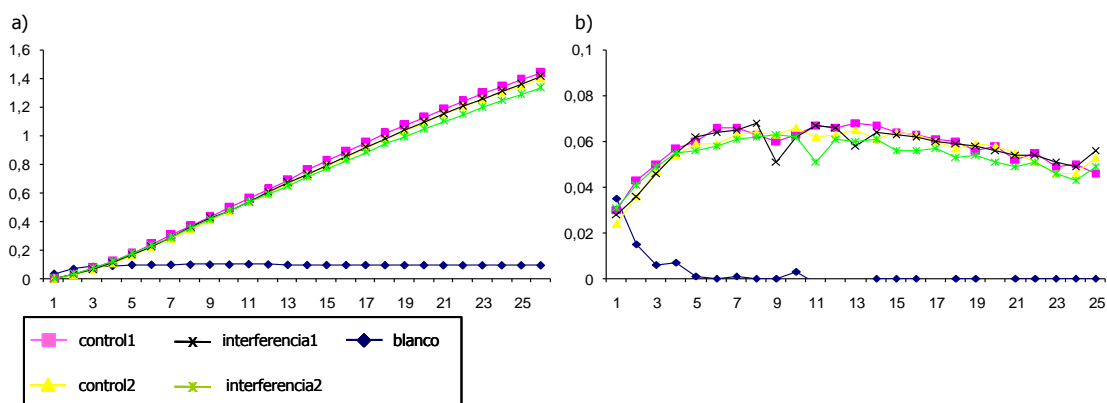
La medición de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa, en los mutantes funcionales, se hizo utilizando el kit de BIOXYTECH Aconitase-340<sup>TM</sup>, aprovechando que dicha actividad está directamente relacionada con la formación del producto NADPH. Esto es así porque el citrato es isomerizado a isocitrato, mediante la actividad hidratasa de la enzima, y el isocitrato es convertido a  $\alpha$ -ketoglutarato, mediante la isocitrato deshidrogenasa que transforma el  $\text{NADP}^+$  en NADPH (véase 7.1 de material y métodos). La formación de NADPH, por la reducción de  $\text{NADP}^+$ , se cuantificó de forma continua, midiendo la absorbancia a 340nm cada minuto durante 20 minutos. Para el cálculo de la actividad hidratasa de la aconitasa, se utilizó solo la parte de la gráfica que más se acerca a la linealidad (figuras R17a-R19a). Las medidas se realizaron a una temperatura constante de 37°C y los valores obtenidos se corrigieron aplicando el coeficiente de temperatura ( $c = 2,4435$ ), dado el incremento de la actividad aconitasa a 37 °C. El dato que nos aporta el valor de actividad de la enzima, es la variación de la absorbancia en función del tiempo ( $\Delta\text{Absorbancia}/\text{tiempo}$ ). Este valor es, matemáticamente, la pendiente de la recta de la gráfica de la absorbancia, representada en la parte b) de las figuras R17-R19. La actividad enzimática se presenta en unidades de enzima normalizadas con la concentración de proteínas de la muestra, para poder comparar los resultados entre diferentes muestras. Este análisis es de tipo

cuantitativo y se llevó a cabo tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hiperoxia. Se realizaron dos réplicas de estas mediciones para cada genotipo.

### 6.2.1 Análisis de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa en condiciones de normoxia

Se realizó un seguimiento de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa a lo largo de la vida de individuos adultos, tanto mutantes como controles. En concreto las medidas se realizaron los días 1, 15 y 25 tras la emergencia del imago de la pupa.

Tanto para adultos de 1 día (figura R17, tabla R8), como de 15 (figura R18, tabla R9), y de 25 días (figura R19, tabla R10), no se aprecian variaciones importantes en la actividad enzimática en los mutantes respecto de los individuos control, en condiciones de normoxia.

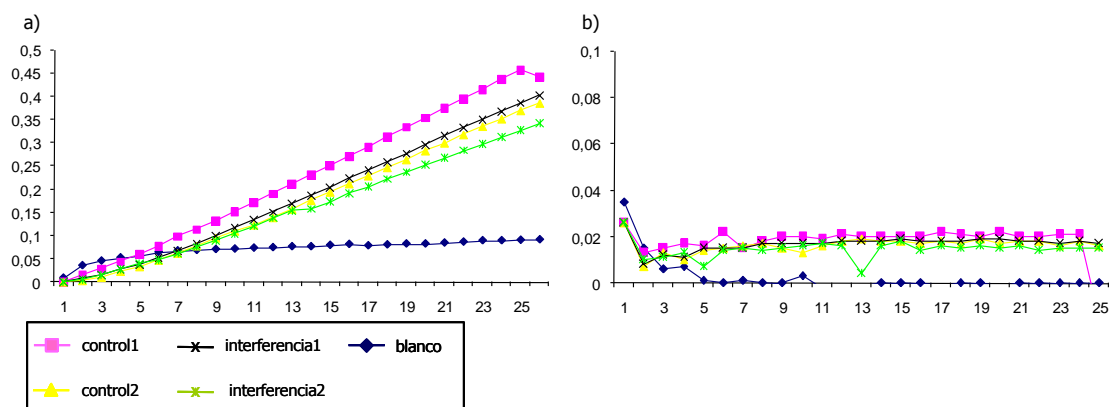


**Figura R17. Cinética de la actividad hidratasa de la aconitasa, 1 día en normoxia.**

a) Representación gráfica de la absorbancia en nanómetros (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abcisas). b) Representación gráfica del  $\Delta$ absorbancia en nanómetros (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abcisas). Los valores representados en ambas gráficas son valores de los controles y de los mutantes, el día 1 tras la emergencia del adulto, en condiciones de normoxia.

**Tabla R8.** Actividad hidratasa de la aconitasa el día 1 en condiciones de normoxia.

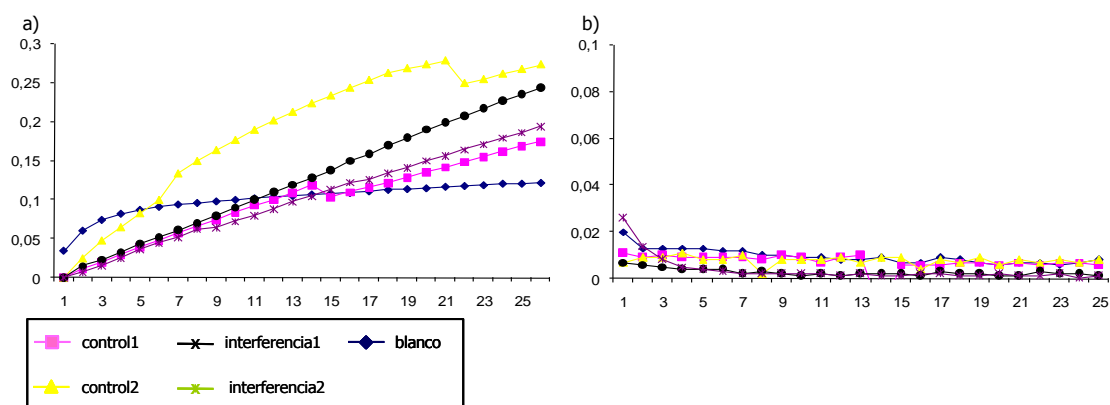
Individuos		$\Delta$ Abs/min	[prot] (mg/ml)	dilución	mU/ml	mU/mg prot	media
Control	Medida 1 control	0,0603	0,56	1/4	15,879	31,757	31,714 ± 0,044
	Medida 2 control	0,0602	0,56	1/4	15,835	31,669	
Interferencia	Medida 1 interferencia	0,0596	0,53	1/4	15,703	31,406	30,047 ± 1,360
	Medida 2 interferencia	0,0545	0,53	1/4	14,343	28,687	



**Figura R18. Cinética de la actividad hidratasa de la aconitasa el día 15 en normoxia.**  
 a) Representación gráfica de la absorbancia en nanómetros (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abscisas). b) Representación gráfica del  $\Delta$ absorbancia en nanómetros (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abscisas). Los valores representados en ambas gráficas son valores de los controles y de los mutantes el día 15 tras la emersión del adulto, en condiciones de normoxia.

**Tabla R9.** Actividad hidratasa de la aconitasa el día 15 en condiciones de normoxia.

Individuos		$\Delta$ Abs/min	[prot] (mg/ml)	dilución	mU/ml	mU/mg prot	media
Control	Medida 1 control	0,0193	0,59	1/4	5,088	10,176	9,343
	Medida 2 control	0,0162	0,59	1/4	4,255	8,509	± 0,833
Interferencia	Medida 1 interferencia	0,0170	0,63	1/4	4,474	8,948	8,203
	Medida 2 interferencia	0,0142	0,63	1/4	3,728	7,457	± 0,746

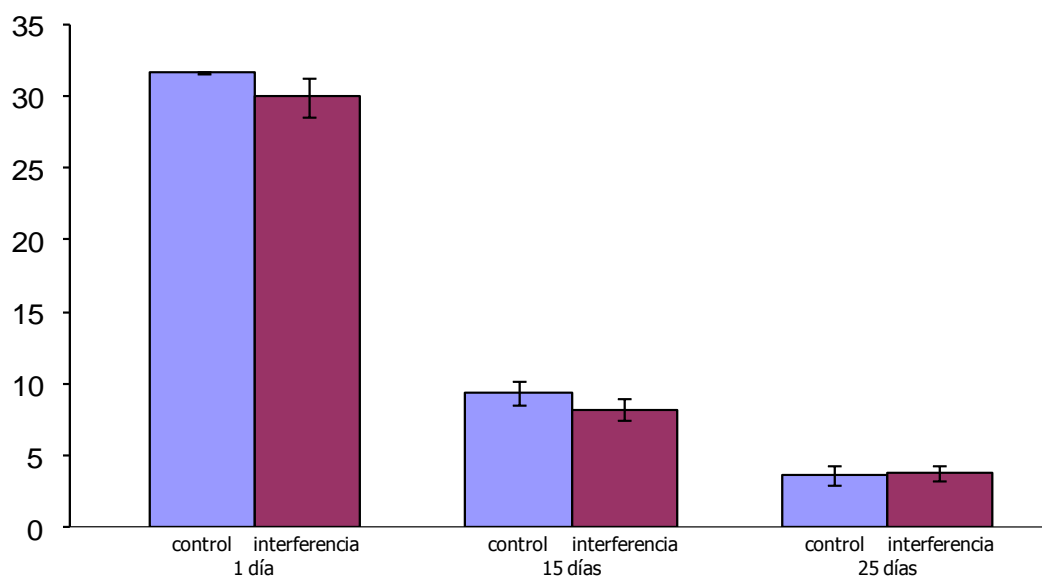


**Figura R19. Cinética de la actividad hidratasa de la aconitasa el día 25 en normoxia.** a) Representación gráfica de la absorbancia en nanómetros (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abcisas). b) Representación gráfica del  $\Delta$ absorbancia en nanómetros (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abcisas). Los valores representados en ambas gráficas son valores de los controles y de los mutantes el día 25 tras la emersión del adulto, en condiciones de normoxia.

**Tabla R10.** Actividad hidratasa de la aconitasa el día 25 en condiciones de normoxia

Individuos		$\Delta$ Abs/min	[prot] (mg/ml)	dilución	mU/ml	mU/mg prot	media
Control	Medida 1 control	0,0055	0,51	1/4	1,448	2,895	3,639
	Medida 2 control	0,0083	0,51	1/4	2,191	4,383	± 0,744
Interferencia	Medida 1 interferencia	0,0083	0,52	1/4	2,174	4,348	3,821
	Medida 2 interferencia	0,0063	0,52	1/4	1,648	3,295	± 0,526

Este análisis demostró que la actividad hidratasa de la enzima aconitasa, en condiciones normales de oxígeno, no es diferente entre individuos control e individuos mutantes, pero a diferencia de lo que ocurre con la SDH, hay una bajada de la actividad de la enzima con el tiempo (figura R20) coincidiendo con los resultados de trabajos anteriores (Yan *et al.* 1997, Das *et al.* 2001, Yarian *et al.* 2005a y 2005b).



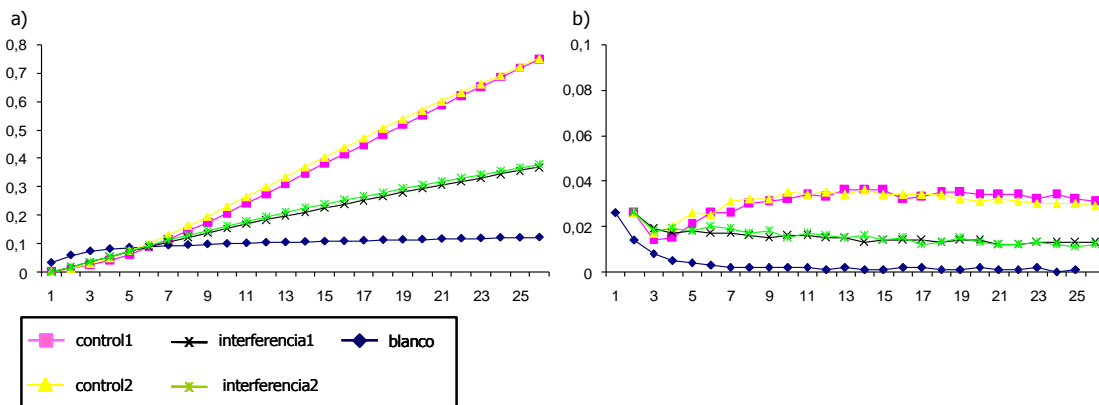
**Figura R20. Actividad hidratasa de la aconitasa a lo largo del tiempo, en normoxia.** Representación de los datos de actividad hidratasa de la aconitasa (mU/mg prot.) en diferentes momentos de la vida de los adultos control y mutantes por interferencia.

A continuación se planteó llevar a cabo el mismo análisis en un medio que produjese estrés oxidativo al organismo (hiperoxia). Con ello pretendíamos comprobar si el efecto combinado de este tipo de estrés con la disminución de frataxina podría afectar a la actividad de la aconitasa.

### ***6.2.2 Análisis de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa en condiciones de hiperoxia***

Las medidas en hiperoxia se realizaron el día 1 tras la emersión de los individuos de las pupas, los cuales fueron sometidos a tales condiciones durante 24h debido a la drástica reducción de la supervivencia, en estas condiciones, especialmente en los mutantes. Los resultados obtenidos se muestran en las figura R21 y en la tabla R11. Se puede observar la existencia de diferencias importantes, en la actividad de la aconitasa, entre los individuos control y los individuos mutantes por interferencia, en un ambiente oxidativo. La bajada en dicha actividad nos indica que la disminución de frataxina afecta, de forma directa o indirecta, a la actividad aconitasa.





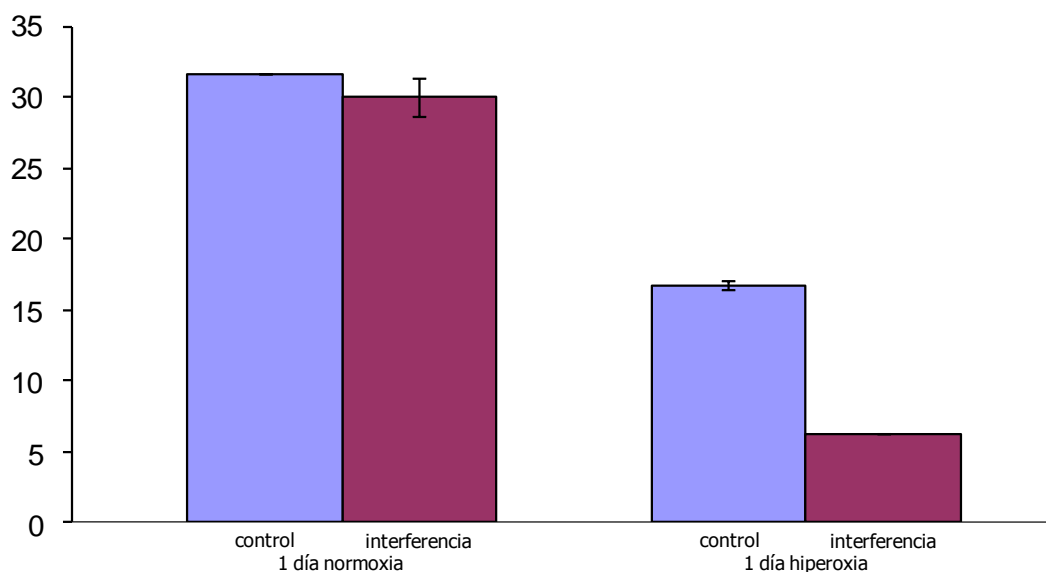
**Figura R21. Cinética de la actividad aconitasa el día 1 tras 24 h en hiperoxia.**

a) Representación gráfica de la absorbancia en nanómetros (ordenadas) frente al tiempo en minutos (abcisas). b) Representación gráfica de la  $\Delta$ absorbancia en nanómetros (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas). Los valores representados en ambas gráficas son valores de los controles y de los mutantes el día 1 tras la emersión del adulto, en condiciones de hiperoxia.

**Tabla R11. Actividad hidratasa de la aconitasa el día 1 en condiciones de hiperoxia.**

Individuos		$\Delta$ Abs/t (nm/min)	[prot] (mg/ml)	dilución	mU/ml	mU/mg prot	media
Control	Medida 1 control	0,0323	0,57	1/4	8,509	17,019	16,756 ± 0,263
	Medida 2 control	0,0313	0,57	1/4	8,246	16,493	
Interferencia	Medida 1 interferencia	0,0120	0,53	1/4	3,158	6,316	6,273 ± 0,044
	Medida 2 interferencia	0,0118	0,53	1/4	3,114	6,229	

Si comparamos los valores de actividad de la enzima, obtenidos en condiciones de normoxia e hiperoxia (figura R22), podemos ver que existen diferencias importantes entre estos dos tipos de atmósferas. En un ambiente oxidativo, tanto los controles como los mutantes, ven disminuida su actividad aconitasa, pero esta disminución es mucho más acentuada en los individuos con falta de frataxina. Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurre para la SDH, la disminución de frataxina es crítica para la actividad aconitasa en condiciones de estrés oxidativo.



**Figura R22. Actividad hidratasa de la aconitasa a diferentes concentraciones de oxígeno.**

Representación de los datos de la actividad hidratasa de la aconitasa (mU/mg prot.), en individuos control y mutantes por interferencia, en normoxia e hiperoxia.

### 6.3 Análisis de la respiración mitocondrial

Para determinar el efecto de la reducción de frataxina en los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones, se midió la actividad de dichos complejos. Estas medidas se realizaron con individuos mutantes por interferencia (*actin-GAL4/UAS-*fhIR**) y con controles (*actin-GAL4/*yw**), mantenidos tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hiperoxia. Las medidas en hiperoxia, al igual que en los casos anteriores, se realizaron el día 1 tras la emersión de los adultos.

Todas las medidas se llevaron a cabo utilizando un microsensor de fibra óptica Microx TX3 (Precision Sensing GMBH, Regensburg University, Alemania) embebido en 50  $\mu$ l de la suspensión mitocondrial extraída inmediatamente antes de realizar la medición. Las medidas se realizaron en dos estados diferentes, en estado activado o estado 3 y en estado inactivado o estado 4. Estos dos estados se definen según el nivel de consumo de oxígeno del sistema, y dependen de la cantidad de ADP y fosfato inorgánico (Pi) en el medio. El estado activo o estado 3 se define como el de consumo de oxígeno en presencia de ADP y Pi en el medio, mientras que el estado 4 se define como el de consumo de oxígeno en ausencia de ADP, una vez ha sido consumido éste (véase Material y Métodos apartado 7.3.3).

La suspensión mitocondrial se utilizó para medir la tasa de respiración a través del complejo I, del complejo II o cuando se activa el ciclo de Krebs, añadiendo diferentes compuestos intermediarios del ciclo además de

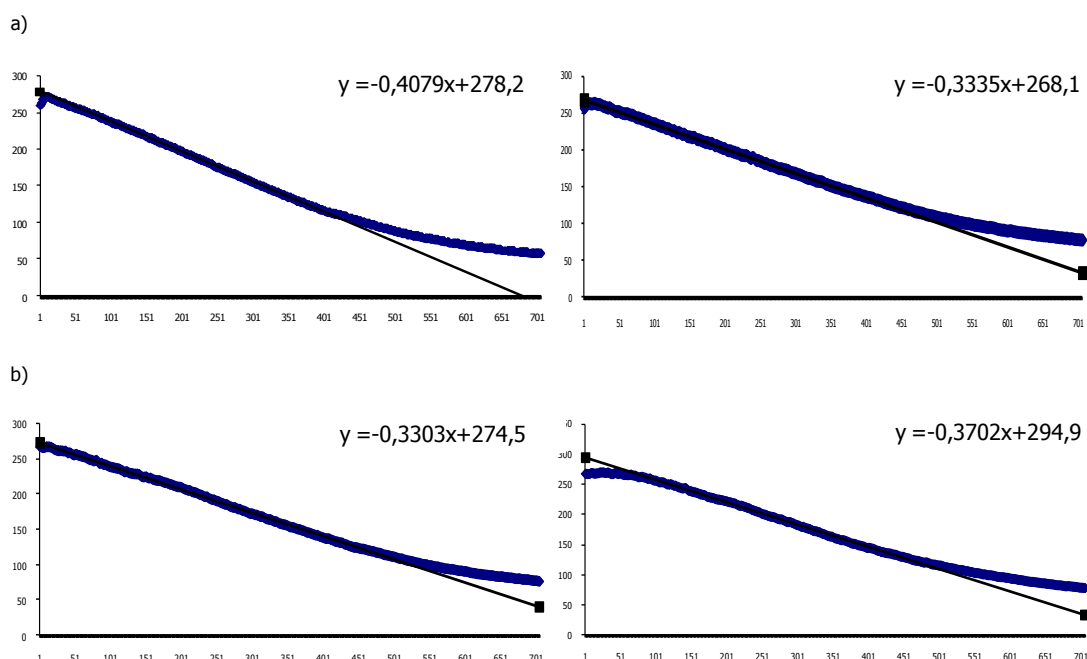
inhibidores en cada caso concreto. Acopladas a estas medidas se encuentran las actividades de los complejos III y IV. De estar uno de estos dos complejos afectados en los mutantes, se obtendría una reducción en el consumo de oxígeno cuando se midan los complejos I y II. El consumo de oxígeno depende directamente de la conversión simultánea de ADP y fosfato inorgánico en ATP, fenómeno que se conoce como respiración acoplada. Es por tanto imprescindible que las mitocondrias se encuentren intactas para realizar la medición, de forma que la cadena de transporte de electrones se mantenga acoplada a la ATP-sintasa. Así, al añadir ADP en exceso (5 mM) se alcanza el estado activado (o estado 3) mientras que en el caso contrario, la respiración se encuentra en estado inactivado.

### ***6.3.1 Análisis de la respiración en condiciones de normoxia***

Se realizaron dos medidas para cada muestra, tanto de controles como de mutantes. Para obtener el valor del consumo de oxígeno de las mitocondrias nos centramos en la parte de la gráfica que mantiene la linealidad, que permite obtener una recta y así poder determinar la pendiente de la misma. En este caso, el valor de la pendiente de la recta viene definido por el cambio de la concentración de oxígeno respecto al tiempo, es decir, el consumo de oxígeno en el tiempo (nmol/L/seg). Para poder comparar entre sí los valores obtenidos en los controles y en los mutantes, éstos se normalizan respecto a la concentración de proteínas totales extraídas en cada caso. Así, una vez extraída y purificada la muestra de mitocondrias, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por el método Bradford. Se realizaron tres medidas y se obtuvo la media para que el valor de la concentración de proteínas fuera representativo. Los resultados finales se indican en nmol/min/mg prot.

#### ***6.3.1.1 Determinación de la respiración vía el complejo NADH deshidrogenasa o complejo I***

El complejo NADH deshidrogenasa cataliza la transferencia de electrones a partir de la molécula de NADH. Para determinar la funcionalidad de este complejo se partió de una suspensión de mitocondrias intactas, a las que se añadió NADH en exceso (60 mM). En la figura R23 vemos representado el consumo de oxígeno, así como la función de la recta que nos define dicho consumo en el estado 4 o estado inactivado. Esta recta viene definida por la fórmula representada en cada gráfica, que nos da el valor de la pendiente utilizado para calcular el consumo de oxígeno.



**Figura R23. Cinética del consumo de oxígeno a través del complejo I, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivado, en normoxia.**

Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas), de las dos medidas realizadas en los individuos controles a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

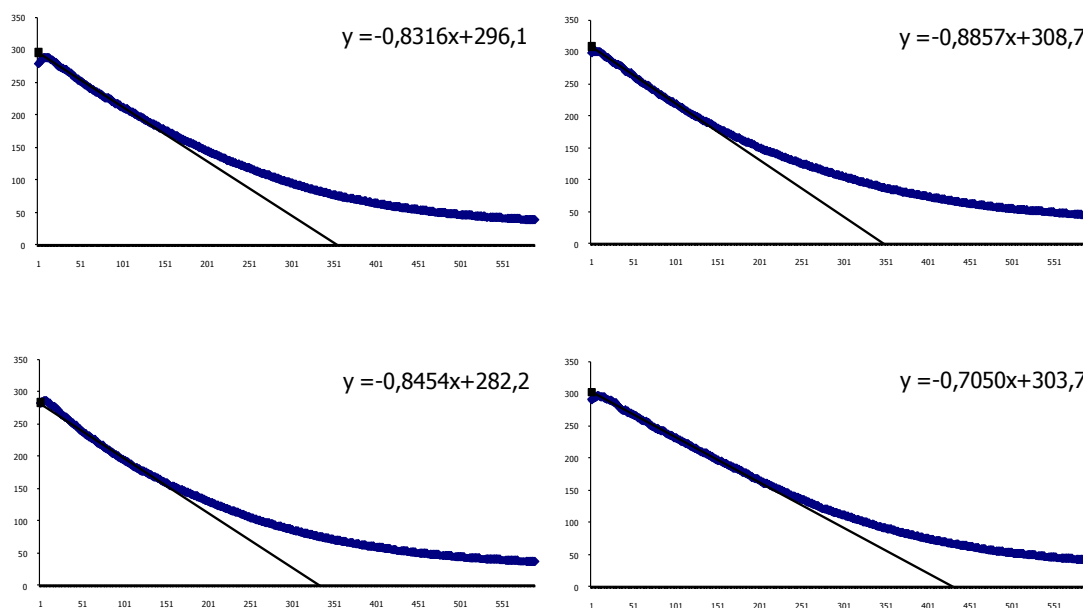
En la tabla R12 se detallan los valores de consumo de oxígeno para cada medida, tanto para controles como para mutantes, y la media con su error correspondiente.

**Tabla R12.** Consumo de oxígeno a partir del Complejo NADH-deshidrogenasa, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivado, en normoxia.

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] ( $\text{mg/ml}$ )	$\text{nmol/min/mg}$ prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,4079	0,61	40,121	36,462 $\pm$ 3,65
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,3335	0,61	32,803	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,3303	0,53	37,392	39,651 $\pm$ 2,25
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,3702	0,53	41,909	

Los resultados del consumo de oxígeno, medido a través del complejo NADH deshidrogenasa en estado inactivado, no revelaron diferencias en la respiración entre las mitocondrias de los individuos control y las de los mutantes, con lo que no parece haber ningún problema de funcionamiento en este complejo, cuando hay reducción de frataxina.

Posteriormente, se llevaron a cabo las mismas medidas de consumo de oxígeno a través del complejo NADH deshidrogenasa añadiendo 5 mM de ADP lo que, junto con el  $P_i$ , activa la cadena de transporte de electrones por medio de la ATP-sintasa. Ésta, al tener mayor cantidad de sustrato, acelera la producción de ATP, con lo que estimula el consumo del gradiente de protones. De esta forma, la cadena de transporte de electrones se acelera para recuperar esa pérdida del gradiente y como consecuencia final aumenta el consumo de oxígeno. En la figura R24 vemos representado el consumo de oxígeno, pero teniendo en cuenta que éste se verá acelerado por la presencia de ADP, confirmando así el acoplamiento en la cadena de transporte de electrones con la ATP-sintasa. Además, también se muestra la recta patrón y la función que la define, que nos da el valor del consumo de oxígeno en estas muestras.



**Figura R24. Cinética del consumo de oxígeno a través del complejo I, con la cadena de transporte de electrones en estado activado, en normoxia.**

Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abscisas) de las dos medidas realizadas en los individuos controles a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

En la tabla R13 se detallan los valores de consumo de oxígeno para cada medida, tanto para controles como para mutantes, y la media con su error correspondiente.

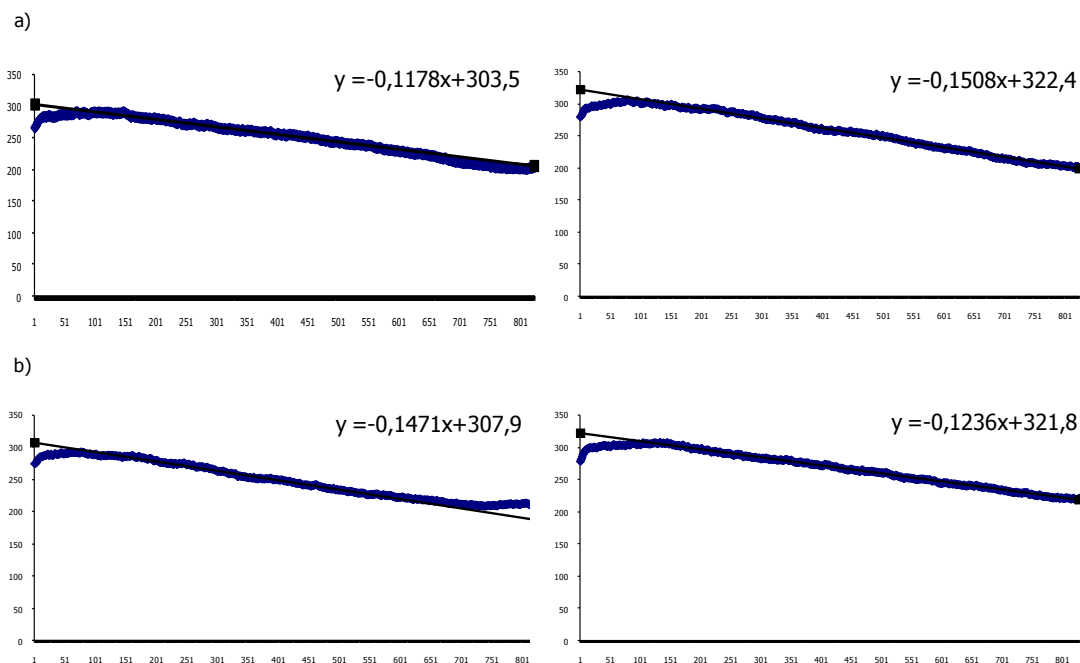
**Tabla R13.** Consumo de oxígeno a partir del Complejo NADH deshidrogenasa, con la cadena de transporte de electrones en estado activado, en normoxia.

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] (mg/ml)	nmol/min/mg prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,8316	0,61	81,796	84,457 $\pm$ 2,65
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,8857	0,61	87,118	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,8454	0,53	95,706	87,759 $\pm$ 7,95
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,7050	0,53	79,811	

Los resultados del consumo de oxígeno, medido a través del complejo NADH deshidrogenasa activado, tampoco revelaron diferencias en el comportamiento de este complejo entre los individuos control y los mutantes.

### ***6.3.1.2 Determinación de la respiración vía el complejo SDH o complejo II***

El complejo SDH cataliza la transferencia de electrones a partir de la molécula de FADH<sub>2</sub>. Los electrones que cede el FAD a la cadena de transporte electrónico, provienen del ciclo del ácido cítrico a partir del succinato, que se desarrolla en la matriz mitocondrial. Este succinato da lugar al fumarato mediante la pérdida de dos protones que recoge el FAD, dando lugar al FADH<sub>2</sub>. Para determinar el consumo de oxígeno, teniendo en cuenta la funcionalidad del complejo II, se partió de una suspensión de mitocondrias intactas a las que se añadió por una parte succinato, sustrato de la SDH, para que su oxidación permita reducir la molécula de FAD a FADH<sub>2</sub> y por otra rotenona, un inhibidor del complejo NADH deshidrogenasa. Las concentraciones de succinato y rotenona utilizadas fueron en exceso, de 10 mM y de 100  $\mu\text{M}$  respectivamente. El resultado de la medida de la respiración en estado 4 o inactivado se muestra en la figura R25.



**Figura R25. Cinética del consumo de oxígeno a través del complejo II, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en normoxia.**

Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas) de las dos medidas realizadas en los individuos control a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

En la tabla R14 se detallan los valores de consumo de oxígeno para cada medida, en los controles y en los mutantes, y la media junto con su error correspondiente.

**Tabla R14.** Consumo de oxígeno a partir del Complejo II, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en normoxia.

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] ( $\text{mg/ml}$ )	$\text{nmol/min/mg}$ prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,1178	0,61	11,587	13,210 $\pm$ 1,60
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,1508	0,61	14,833	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,1471	0,53	16,653	15,323 $\pm$ 1,35
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,1236	0,53	13,992	

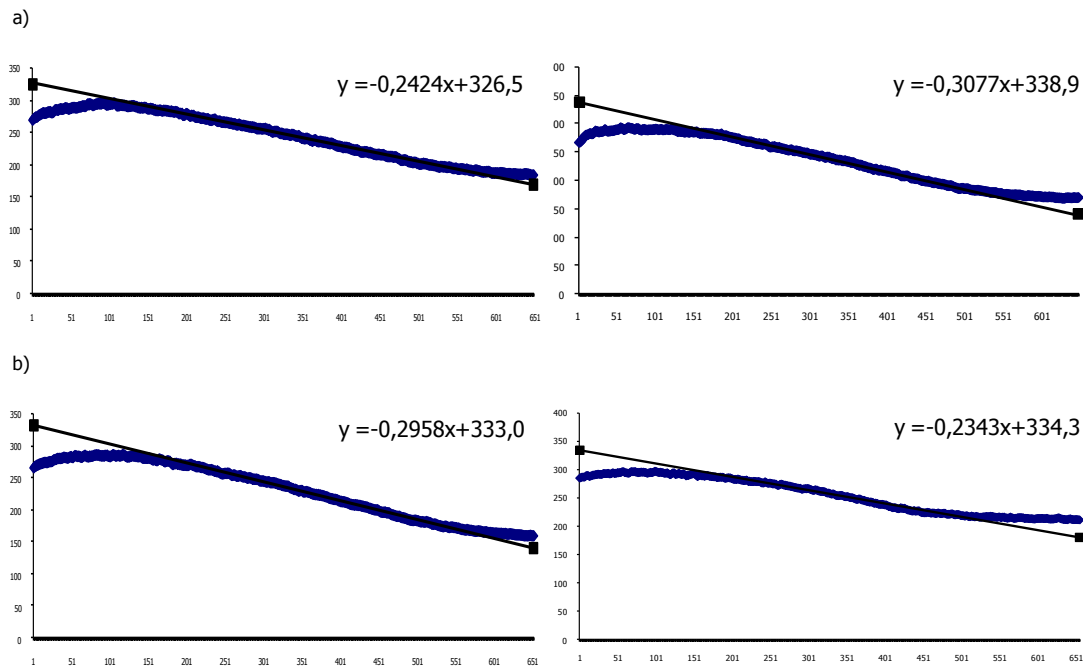
Los resultados obtenidos de la medida del consumo de oxígeno a través del complejo SDH, no muestran diferencias entre los individuos control y los individuos mutantes. Posteriormente, se realizaron diferentes medidas añadiendo distintas concentraciones de succinato y de ADP para activar la respiración, pero en ninguna de ellas se obtuvo aceleración de la cadena de transporte de electrones. Esto puede ser debido a que el succinato no atraviesa la membrana mitocondrial libremente, sino gracias a un transportador dicarboxilado, el transportador de malato/succinato (Chappell *et al.* 1965). Esto limita la medida de la respiración a través del complejo II ya que los resultados obtenidos, muy probablemente, se vieron afectados por la cinética del transportador de succinato.

Con estos resultados podemos concluir que no existen evidencias claras de un fallo en la función de la SDH, o complejo II de la cadena de transporte de electrones, en los individuos mutantes por interferencia. Estos resultados coinciden con los de la medida de la actividad SDH, realizada por espectrofotometría, comentados anteriormente, y en los que tampoco se veían diferencias en la actividad entre los controles y los mutantes bajo condiciones de normoxia.

### ***6.3.1.3 Determinación de la respiración vía el ciclo de Krebs***

Tras medir la actividad de los complejos I y II, se midió la respiración a partir de la activación del ciclo de Krebs. Para ello se añadió piruvato y malato (200  $\mu$ M de cada uno), dos componentes del ciclo que al ser añadidos en exceso aceleran el ciclo y la producción de poder reductor (NADH y FADH<sub>2</sub>) y, por tanto, la cadena de transporte de electrones y el consumo de oxígeno. En la figura R26 y en la tabla R15 se muestran los resultados obtenidos en el estado 4 o estado inactivado. Vemos de nuevo que los mutantes tienen el mismo comportamiento que los controles.





**Figura R26. Cinética del consumo de oxígeno a través del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en normoxia.**

Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abscisas) de las dos medidas realizadas en los individuos controles a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas se indica la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

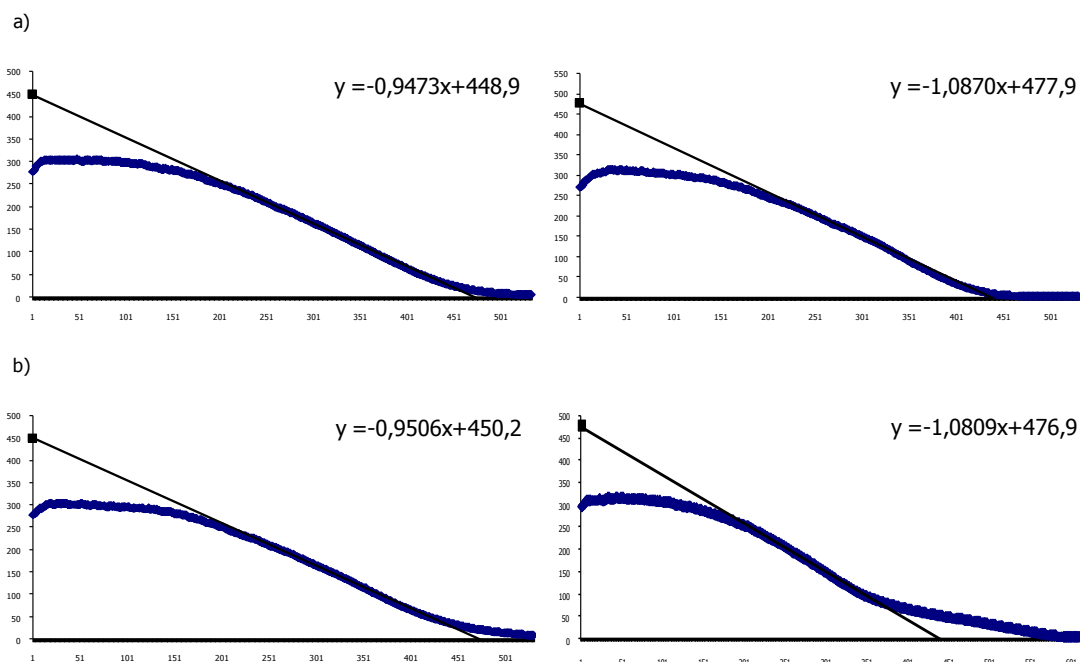
En la siguiente tabla se detallan los valores de consumo de oxígeno para cada medida, tanto para controles como para mutantes, y su media, representada con su error correspondiente.

**Tabla R15.** Consumo de oxígeno a partir del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivado, en normoxia.

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] (mg/ml)	nmol/min/mg prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,2424	0,59	24,651	27,711 ± 3,060
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,3077	0,60	30,770	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,2958	0,55	32,269	29,652± 2,617
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,2343	0,52	27,035	

Este resultado concuerda con lo visto anteriormente a nivel del funcionamiento de la aconitasa en condiciones de normoxia, ya que no parece haber ningún problema en la actividad de esta enzima en estas condiciones, en los mutantes por interferencia para frataxina.

Posteriormente, se llevaron a cabo las mismas medidas de consumo de oxígeno a partir de la activación del ciclo de Krebs añadiendo 5 mM de ADP (estado 3 o estado activo). En la figura R27 vemos representado el consumo de oxígeno, pero teniendo en cuenta que éste se verá acelerado por la presencia de ADP, confirmando así el acoplamiento en la cadena de transporte de electrones con la ATP-sintasa.



**Figura R27. Cinética del consumo de oxígeno a través del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado activo, en normoxia.**

Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas) de las dos medidas realizadas en los individuos controles a) y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

Los valores de consumo de oxígeno para cada medida, se detallan en la Tabla R16.

**Tabla R16.** Consumo de oxígeno a partir del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado activo, en normoxia.

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] ( $\text{mg/ml}$ )	$\text{nmol/min/mg}$ prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,9473	0,59	96,346	102,523 $\pm$ 6,177
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-1,0870	0,60	108,700	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,9506	0,52	109,685	113,801 $\pm$ 4,116
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-1,0809	0,55	117,916	

De la misma forma que los resultados en estado inactivo, los resultados del consumo de oxígeno a partir de la activación del ciclo de Krebs y sin ninguna restricción a nivel de los complejos de la cadena de transporte de electrones, no mostraron la existencia de diferencias importantes en la respiración, entre las mitocondrias de los individuos control y de los mutantes por interferencia.

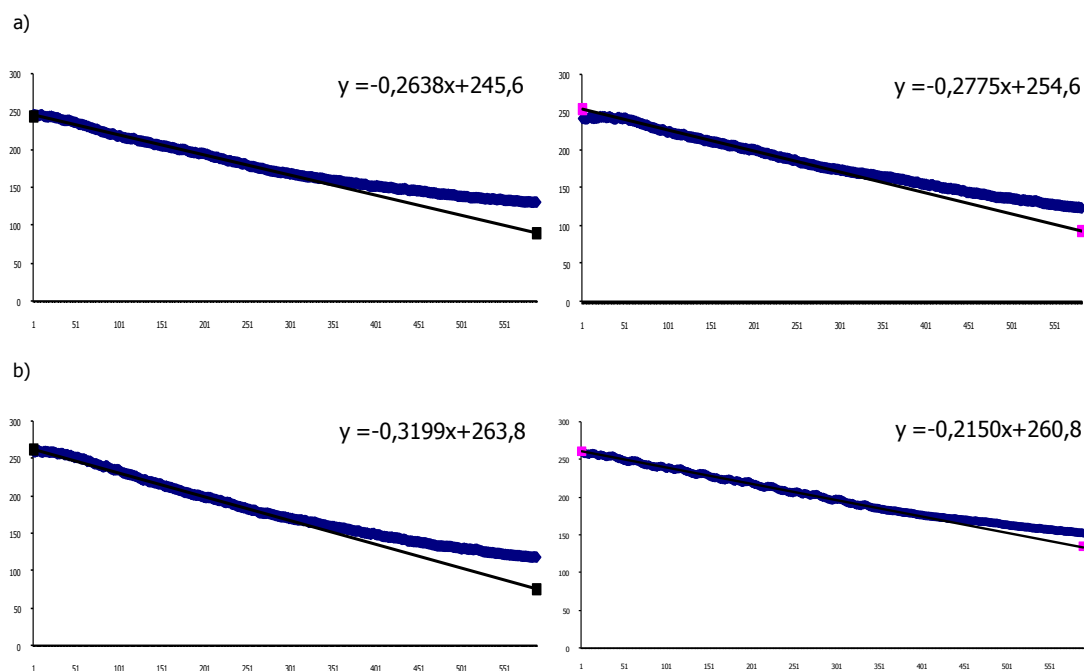
El análisis de la respiración en condiciones de normoxia, nos indica que no se ha detectado ninguna pérdida de función de los complejos de la cadena de transporte de electrones, en nuestro mutante. La disminución de frataxina no parece relevante para el funcionamiento de todos los complejos en dichas condiciones.

### ***6.3.2 Análisis de la respiración en condiciones de hiperoxia***

Para analizar el efecto del estrés oxidativo en condiciones de menor cantidad de frataxina, se realizaron los mismos experimentos que en el apartado anterior, pero sometiendo a los individuos a hiperoxia. Para ello se mantuvieron las moscas en una atmósfera de 99,5% de O<sub>2</sub>, a partir del primer día tras la emersión del imago, hasta las 24 primeras horas aproximadamente, debido, como anteriormente ya se ha explicado, a la menor supervivencia de los mutantes a partir del primer día en hiperoxia.

#### ***6.3.2.1 Determinación de la respiración vía el complejo NADH deshidrogenasa o complejo I***

Como se ha señalado anteriormente, para llevar a cabo estas mediciones se parte de una suspensión de mitocondrias intactas a las que se añade NADH en exceso (60 mM). El resultado de la medida de la respiración en estado 4 o estado inactivado se muestra en la figura R28, y en la tabla R17, donde aparece representado el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo, así como la recta que nos define dicho consumo.



**Figura R28. Cinética del consumo de oxígeno a través del complejo I, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en hiperoxia.**

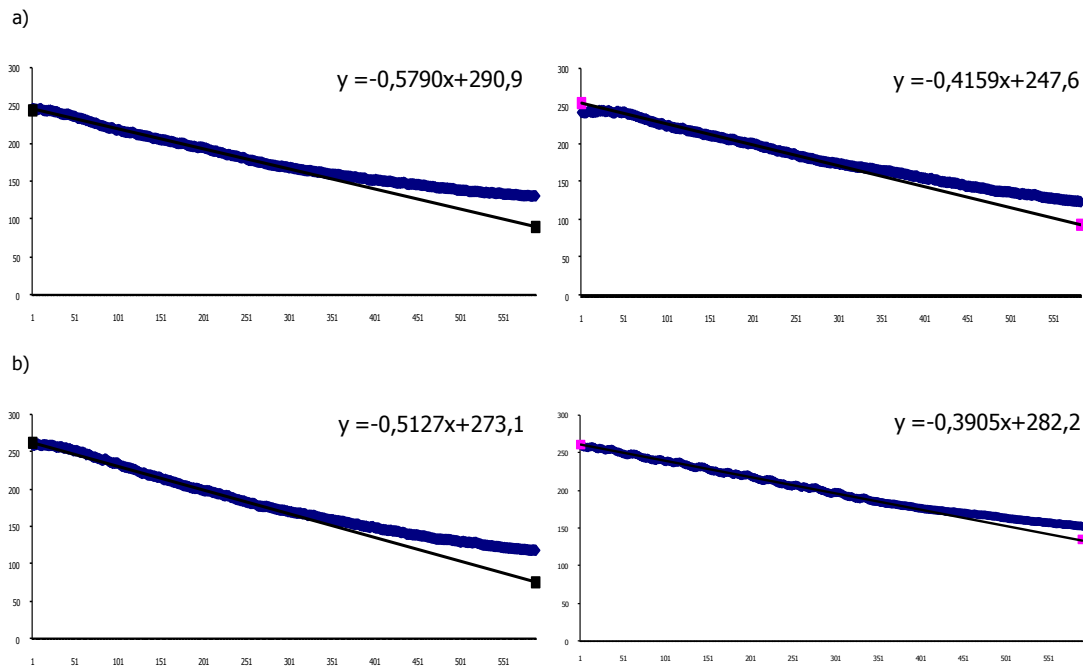
Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas) de las dos medidas realizadas en los individuos controles a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

**Tabla R17. Consumo de oxígeno a partir del Complejo NADH deshidrogenasa, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en hiperoxia.**

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] ( $\text{mg/ml}$ )	$\text{nmol/min/mg prot}$	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,2638	0,62	25,529	27,118± 1,589
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,2775	0,58	28,707	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,3199	0,53	36,215	30,052± 6,163
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,2150	0,54	23,889	

El resultado de la medida de la respiración en estado 4 o estado inactivo del complejo NADH deshidrogenasa, no muestra diferencias entre controles y mutantes, lo que indica que no debe haber problemas en la funcionalidad de este complejo bajo las condiciones del experimento.

Como en todos los casos anteriores, también se llevaron a cabo medidas de consumo de oxígeno a través de este complejo en estado 3 o estado activo de la respiración. Los resultados de dichas mediciones se presentan en la figura R29 y en la tabla R18.



**Figura R29. Cinética del consumo de oxígeno a través del complejo I, con la cadena de transporte de electrones en estado activo, en hiperoxia.**

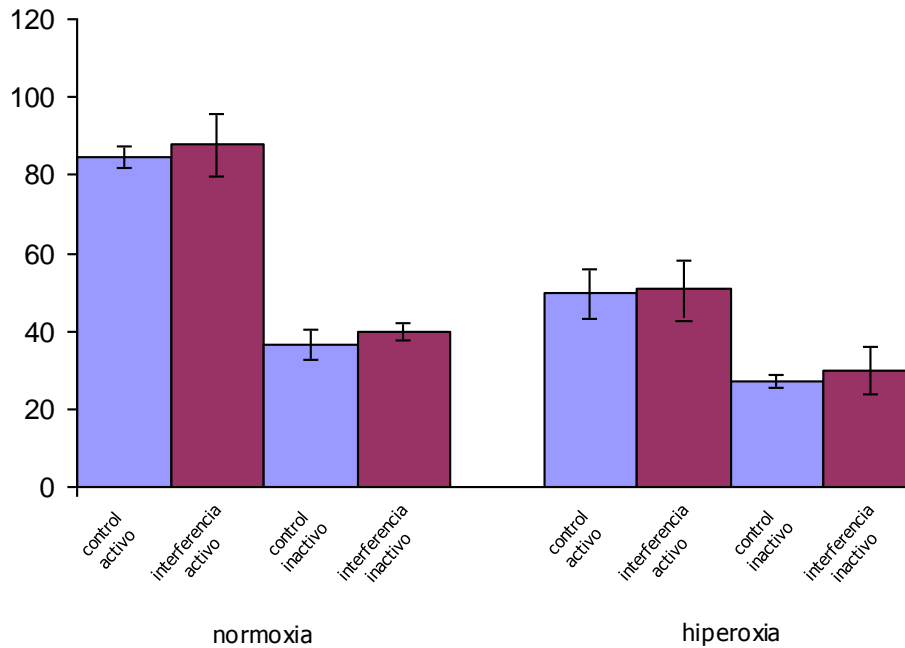
Representación gráfica de la concentración de oxígeno en μmol/l (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas) de las dos medidas realizadas en los individuos controles a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

**Tabla R18.** Consumo de oxígeno a partir del Complejo NADH-deshidrogenasa, con la cadena de transporte de electrones en estado activo, en hiperoxia.

Individuos		pendiente (μmol/L/seg)	[prot] (mg/ml)	nmol/min/mg prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,5790	0,62	56,032	49,528± 6,504
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,4159	0,58	43,024	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,5127	0,53	58,042	50,896± 7,327
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,3905	0,54	43,389	

En este caso, aunque se forzó la maquinaria de la cadena de transporte de electrones añadiendo ADP, tampoco se observó diferencia alguna entre los controles y los mutantes.

Al comparar los valores de la respiración, a través de este complejo en estado activo e inactivo y en condiciones de normoxia e hiperoxia (figura R30), se observa que no existen grandes diferencias entre controles y mutantes, aunque sí se aprecia una fuerte disminución de la respiración en todos los individuos que se mantuvieron un día en condiciones de hiperoxia.

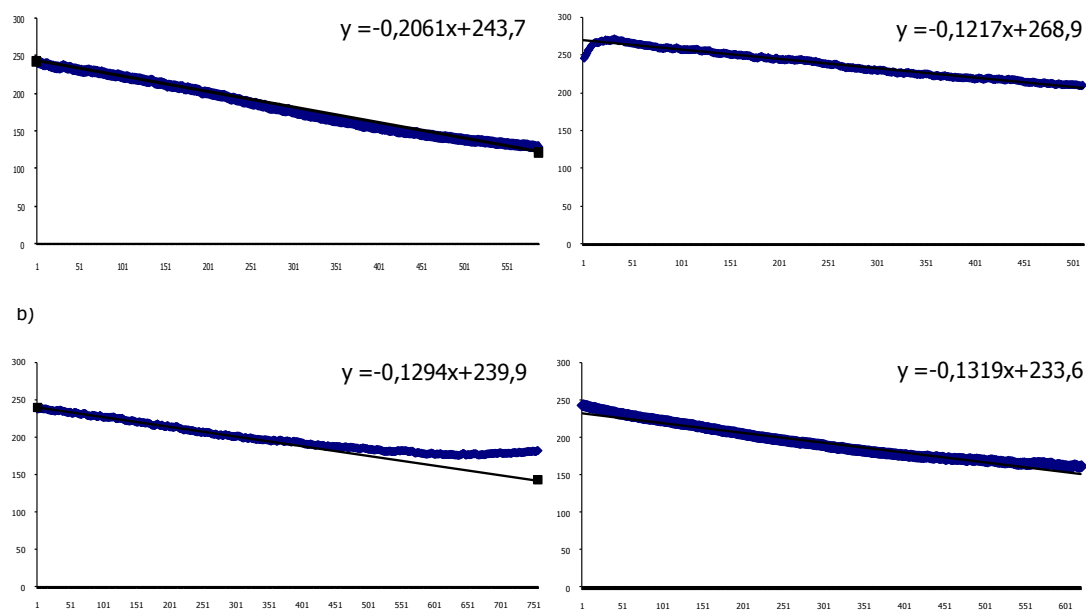


**Figura R30. Consumo de oxígeno a través del complejo I, con la cadena de transporte de electrones en estado activo e inactivo, en normoxia e hiperoxia.**

Los histogramas representan los valores del consumo de oxígeno (nmol/min/mg prot.).

### ***6.3.2.2 Determinación de la respiración vía el complejo SDH o complejo II***

Las muestras fueron tratadas de igual forma que las muestras del apartado 6.3.1.2. La única diferencia es, que los individuos se mantuvieron un día en condiciones de hiperoxia. Cuando se añade ADP para intentar activar la respiración, tampoco en este caso se consiguió la aceleración de la cadena de transporte de electrones, debido a la limitación en el transporte de succinato a la mitocondria como ya se ha indicado anteriormente. Por lo tanto, los resultados que se obtienen son similares a los de la respiración en estado inactivo o estado 4. La figura R31 y la tabla R19 muestran el consumo de oxígeno así como la recta que nos define dicho consumo en estado inactivado.



**Figura R31. Cinética del consumo de oxígeno a través del complejo II, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en hiperoxia.**

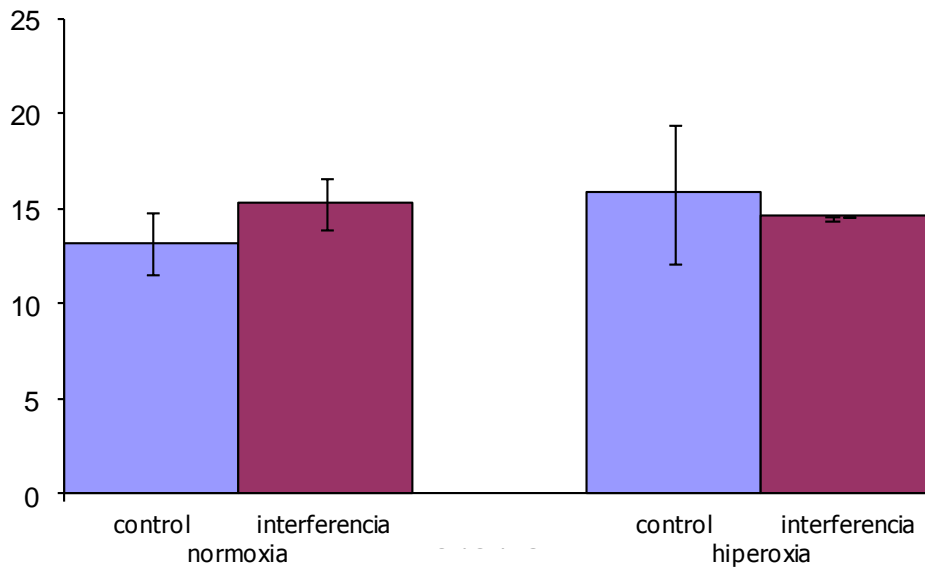
Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas) de las dos medidas realizadas en los individuos controles a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

**Tabla R19.** Consumo de oxígeno a partir del Complejo SDH, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en hiperoxia.

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] (mg/ml)	nmol/min/mg prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,2061	0,62	19,945	15,846± 3,678
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,1217	0,58	12,589	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,1294	0,53	14,649	14,653± 0,004
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,1319	0,54	14,656	

No se aprecian diferencias importantes en el consumo de oxígeno, a partir de este complejo en estado inactivo, entre controles y mutantes mantenidos en condiciones de hiperoxia.

Comparando estos valores, con los obtenidos en el caso de normoxia, se constata el mismo comportamiento en los individuos control y en los mutantes en ambas condiciones. Tampoco se ven diferencias entre los individuos mantenidos en normoxia y los mantenidos en hiperoxia (figura R32). Estos resultados apoyan los previamente obtenidos para la actividad SDH, la cual no se vio afectada por el estrés oxidativo provocado por la hiperoxia.



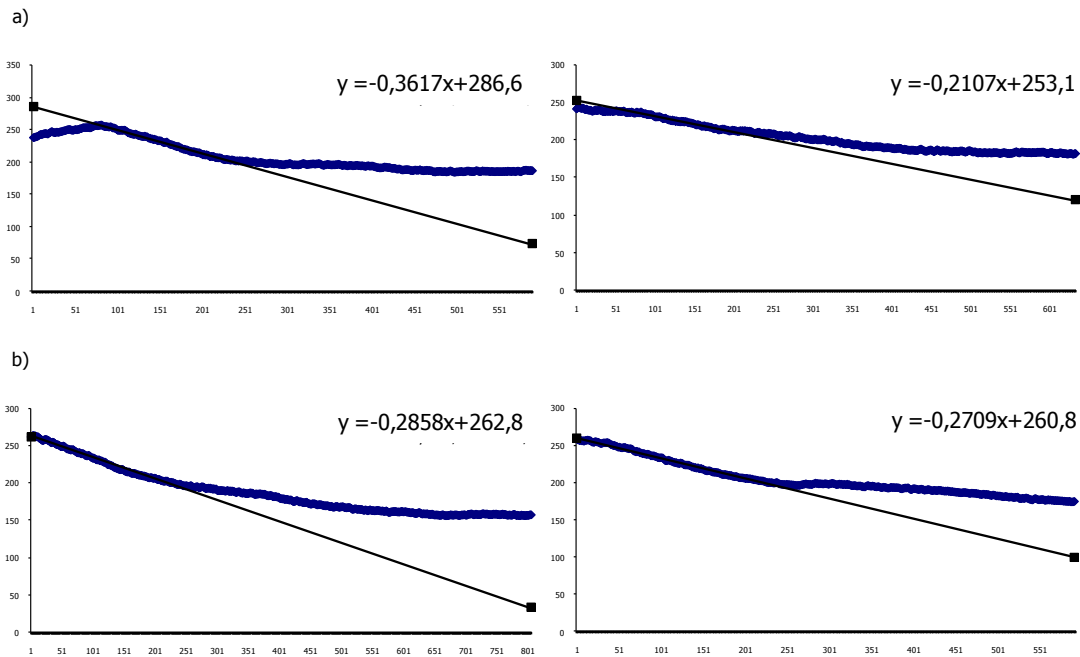
**Figura R32. Consumo de oxígeno a través del complejo II, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en normoxia e hiperoxia.**

Los histogramas representan los valores del consumo de oxígeno (nmol/min/mg prot.).

### ***6.3.2.3 Determinación de la respiración vía el ciclo de Krebs***

Tras medir la actividad de los complejos I y II en hiperoxia, el siguiente paso era medir la respiración a partir de la activación del ciclo de Krebs en estas condiciones, igual que se hizo en normoxia. En este caso también se realizaron las medidas con la cadena de transporte de electrones en estado activo e inactivo. En la figura R33 y tabla R20 se indica el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo y la recta que nos define dicho consumo.





**Figura R33. Cinética del consumo de oxígeno a través del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivo, en hiperoxia.**

Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas) de las dos medidas realizadas en los individuos controles a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

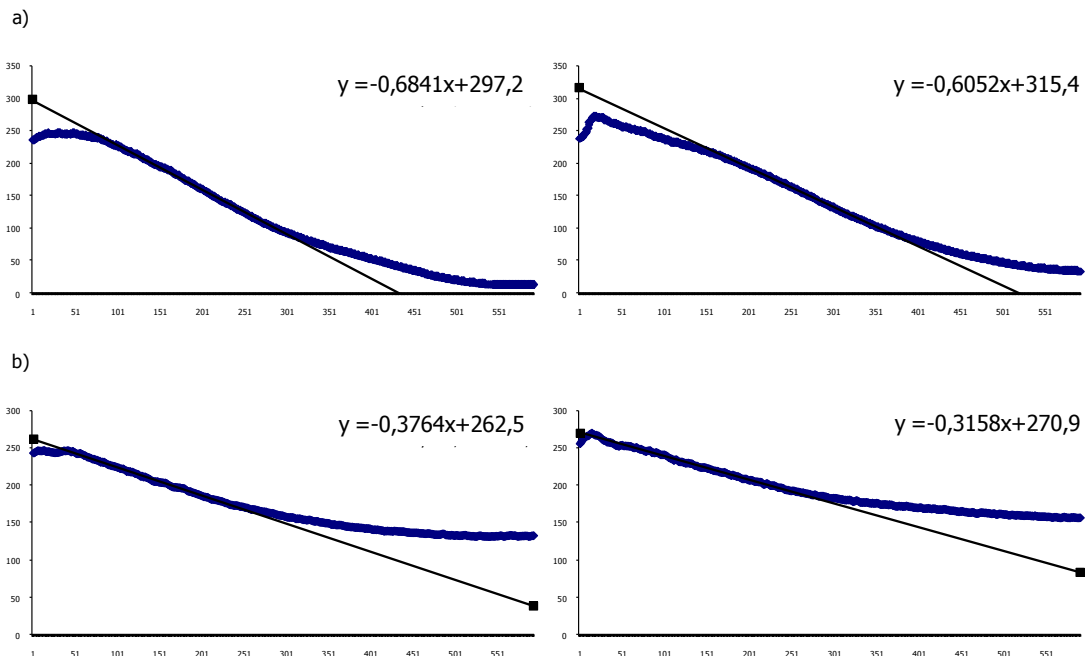
**Tabla R20. Consumo de oxígeno a partir del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado inactivado, en hiperoxia.**

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] (mg/ml)	nmol/min/mg prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,3617	0,62	35,003	28,400± 6,603
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,2107	0,58	21,797	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,2858	0,53	32,355	31,228± 1,128
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,2709	0,54	30,100	

Los resultados del consumo de oxígeno a partir de la activación del ciclo de Krebs, y sin ninguna restricción a nivel de los complejos de la cadena de transporte de electrones en estado inactivado, no revelaron la existencia de diferencias en la respiración entre las mitocondrias de los individuos control y los mutantes por interferencia, resultado que, en principio, no concuerda con lo obtenido anteriormente a nivel del funcionamiento de la aconitasa en condiciones de hiperoxia. Para forzar la maquinaria de la respiración, las medidas de consumo de oxígeno se llevaron a cabo añadiendo 5 mM de ADP lo

que, como ya se ha explicado anteriormente, activa la cadena de transporte de electrones por la acción de la ATP sintasa.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura R34 y en la tabla R21. En este caso aparecen diferencias muy importantes entre controles y mutantes. Estos resultados indican la existencia de algún problema, a nivel del ciclo de Krebs en los mutantes con reducción de frataxina, que se manifiesta en condiciones de fuerte estrés oxidativo. De todas las actividades enzimáticas analizadas, la actividad hidratasa de la aconitasa es la única que hemos visto disminuida en estos mutantes en condiciones de hiperoxia, lo que sugiere que ésta puede ser la enzima responsable de la disminución del consumo de oxígeno, cuando se estimula la activación del ciclo de Krebs, en condiciones de hiperoxia.



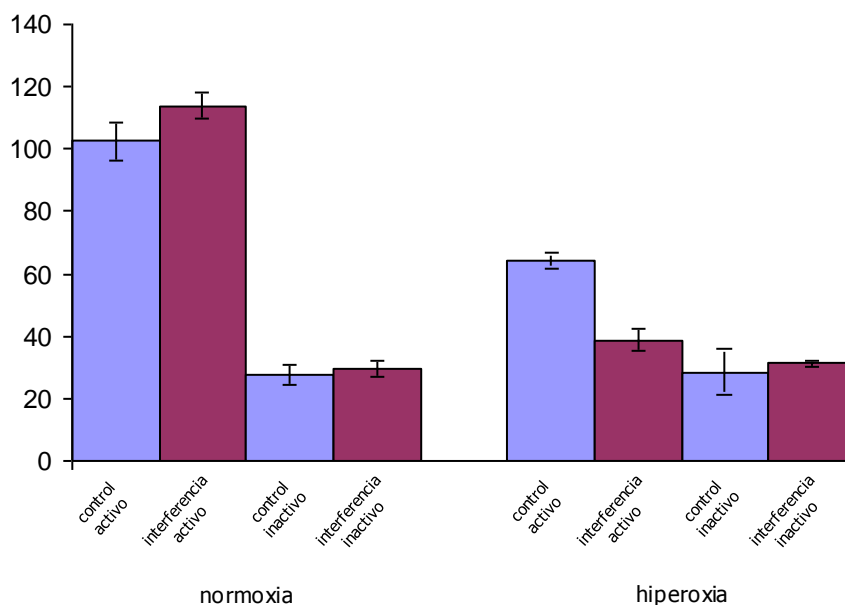
**Figura R34. Cinética del consumo de oxígeno a través del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado activo, en hiperoxia.**

Representación gráfica de la concentración de oxígeno en  $\mu\text{mol/l}$  (ordenadas) frente al tiempo en segundos (abcisas) de las dos medidas realizadas en los individuos controles a), y en los individuos mutantes b). En cada una de ellas aparece la recta cuya pendiente define el consumo de oxígeno.

**Tabla R21.** Resultados del consumo de oxígeno a partir del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado activo, en hiperoxia.

Individuos		pendiente ( $\mu\text{mol/L/seg}$ )	[prot] (mg/ml)	nmol/min/mg prot	media
Control	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,6841	0,62	66,203	64,405± 1,798
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,6052	0,58	62,607	
Interferencia	[O <sub>2</sub> ] medida 1	-0,3764	0,53	42,611	38,850± 3,761
	[O <sub>2</sub> ] medida 2	-0,3158	0,54	35,089	

Tal y como podemos observar en la figura R35, al comparar la respiración de los individuos control y de los mutantes, tanto en estado activo como en estado inactivo, en condiciones de normoxia y estimulando la respiración al activar el ciclo de Krebs, no existen diferencias entre ellos. En cambio, cuando realizamos las mismas medidas cambiando las condiciones a un alto estrés oxidativo, vemos que los mutantes tienen la respiración mucho más afectada que los controles. Cabe destacar que cuando el estado de la respiración está inactivado, no se requiere tanto poder reductor para reponer el gradiente que es usado en la formación de ATP, por tanto no se fuerza al ciclo de Krebs ni tampoco a la aconitasa, con lo que el defecto de ésta no se detecta en dichas condiciones.

**Figura R35.** Consumo de oxígeno a través del ciclo de Krebs, con la cadena de transporte de electrones en estado activo e inactivo, en normoxia e hiperoxia.

Los histogramas representan los valores del consumo de oxígeno (nmol/min/mg prot.).

## **7. Obtención de mutantes funcionales transitorios por sobreexpresión del gen *FXN***

La segunda línea de trabajo, desarrollada para el estudio de la función de la frataxina, se basó en la obtención de individuos que sobreexpresasen el gen humano responsable de la ataxia de Friedreich. Así, podríamos comparar los fenotipos generados por la sobreexpresión del gen *FXN*, con los descritos por Navarro (2005) para la sobreexpresión del propio gen ortólogo de *Drosophila*.

### **7.1 Obtención de las construcciones UAS del gen *FXN***

El ADNc del gen *FXN* se obtuvo por retrotranscripción a partir de ARNm poli(A)<sup>+</sup> de cerebro fetal humano. Los cebadores utilizados en la reacción de PCR fueron *FXN*-pUASTf y *FXN*-pUASTr, amplificándose un fragmento de ADN de 645pb, que contiene toda la región codificadora de *FXN*. Este fragmento fue clonado en primer lugar en el vector *pCR2.1*<sup>®</sup>-*TOPO*<sup>®</sup>, obteniéndose la construcción *FXN*-pCR2.1.

Se secuenciaron veinte clones con los cebadores específicos del vector M13F y M13R, y sólo tres de ellos no mostraron mutaciones incorporadas por la polimerasa Netzyme (Fermentas). La secuencia de estos tres clones coincide con la secuencia U43747 de la base de datos GenBank.

A partir de un clon *FXN*-pCR2.1, sin mutaciones, se subclonó el fragmento *XhoI-KpnI* (639pb) del ADNc de *FXN* en el vector *pUAST*, generando la construcción pUAST-*FXN* (UAS-*FXN*). Los cebadores *FXN*-pUASTf y *FXN*-pUASTr fueron diseñados incorporando, en su secuencia, sitios de restricción para los enzimas *XhoI* y *KpnI*, respectivamente. Se secuenciaron tres clones de esta nueva construcción, para asegurarse de que no se hubiera producido ninguna mutación que diera lugar a una proteína diferente a la nativa. No se encontró ningún cambio en los clones secuenciados.

### **7.2 Obtención de las líneas transgénicas y localización de los transgenes**

Tal y como se detalla en el apartado 6.3.2 de material y métodos, la microinyección de las construcciones se realizó en las células polares de embriones de menos de una hora, de la cepa *yw*. Se obtuvieron 7 líneas transformadas portadoras de la construcción de sobreexpresión. Como ninguna de las inserciones parecía afectar a la viabilidad o a la fertilidad de los individuos, todas fueron mantenidas en homocigosis.

El mapeo de todos los transgenes fue realizado siguiendo el esquema de cruces descrito en la figura M2 (página 61). En la tabla R22 se indica el

cromosoma en el que se localiza el transgen en cada una de las líneas. La presencia de las construcciones se comprobó mediante reacciones de PCR a partir de ADN genómico extraído de cada línea transformada y empleando los cebadores PUASTDIR y PUASTREV, que flanquean el sitio de clonación múltiple del vector *pUAST*. Los fragmentos fueron secuenciados para asegurarnos de que no existía ninguna mutación en el ADNc insertado. Para estudiar los efectos de la sobreexpresión del gen *FXN*, se escogió la línea fxn 2(3), en la que el transgen se localiza en el cromosoma 3.

**Tabla R22.** Localización de las construcciones UAS-*FXN*

<b>UAS-<i>FXN</i></b>	<b>Cromosoma</b>
fxn 1(2)	3
fxn 2(0)	2
fxn 2(3)	3
fxn 6(0)	3
fxn 6(1)	X
fxn 6(2)	X
fxn 6(3)	X

### **7.3 Comprobación del funcionamiento del sistema de sobreexpresión del gen *FXN***

La sobreexpresión del gen humano *FXN* en *D. melanogaster* se analizó en los descendientes del cruce entre hembras *actin-GAL4* y machos de la cepa transgénica fxn 2(3), realizado a 25°C. Se utilizó la línea *actin-GAL4*, de expresión generalizada, para poder cuantificar la producción del transcrito de *FXN*. Esto se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa y Western blot.

Tanto en el cruce problema (*actin-GAL4* x UAS-*FXN*) como en el cruce control (*actin-GAL4* x *yw*), se recogieron larvas de tercer estadio para realizar los análisis, ya que en las condiciones experimentales utilizadas no se obtuvieron individuos adultos.

#### **7.3.1 PCR cuantitativa**

Para llevar a cabo la PCR cuantitativa se extrajo ARN total de las larvas de la F<sub>1</sub>. Como ya se ha comentado en la sección correspondiente de Material y Métodos, es necesario comprobar que la eficiencia de la amplificación del gen a analizar y del gen de referencia sean equivalentes para distintas concentraciones de ADNc.

En este caso, el nivel de expresión del gen *FXN*, presente solamente en la F<sub>1</sub> del cruce problema, fue referido al nivel de expresión del gen *fh*, presente en la F<sub>1</sub> de este cruce y del cruce control. También analizamos la expresión del

gen de referencia *rp49* en los descendientes de ambos cruces. En la tabla R23 podemos ver cómo el valor de  $C_T$  media, para el gen de referencia *rp49* y para *fh*, es prácticamente el mismo en los controles y los mutantes, mientras que el valor de  $C_T$  media para el gen *FXN* es mucho menor en los mutantes que en los controles. Si interpretamos este resultado en términos de la PCR, en los controles, como es de esperar, no se amplifica el ADNc del gen *FXN* ( $C_T$  media de  $39,44 \pm 0,11$ ). Como se observa en la tabla R23 (última fila), el nivel de expresión de la diana (ARNm del gen *FXN*), normalizado respecto a una referencia endógena (*fh*), es de unas 17 veces más en los individuos que sobreexpresan el gen humano.

**Tabla R23.** Resultados obtenidos en la cuantificación de la expresión de *FXN*.

	<i>actin-GAL4/yw</i>	<i>UAS-FXN/actin-GAL4</i>
$C_T$ media <i>rp49</i>	$18,30 \pm 0,19$	$17,37 \pm 0,06$
$C_T$ media <i>fh</i>	$26,68 \pm 0,06$	$25,27 \pm 0,08$
$C_T$ media <i>FXN</i>	$39,44 \pm 0,11$	$21,16 \pm 0,12$
$\Delta C_T$ ( <i>rp49-fh</i> )	$8,38 \pm 0,20$	$7,90 \pm 0,10$
$\Delta C_T$ ( <i>rp49-FXN</i> )	$21,14 \pm 0,11$	$3,79 \pm 0,12$
$\Delta\Delta C_T$ ( <i>rp49-fh</i> )	$0 \pm 0,20$	$-0,48 \pm 0,10$
$\Delta\Delta C_T$ ( <i>rp49-FXN</i> )	$12,76 \pm 0,23$	$-4,11 \pm 0,12$
$2^{-\Delta\Delta C_T}$ ( <i>fh-FXN</i> )	$0,00 \pm 0,23$	$17,27 \pm 0,12$

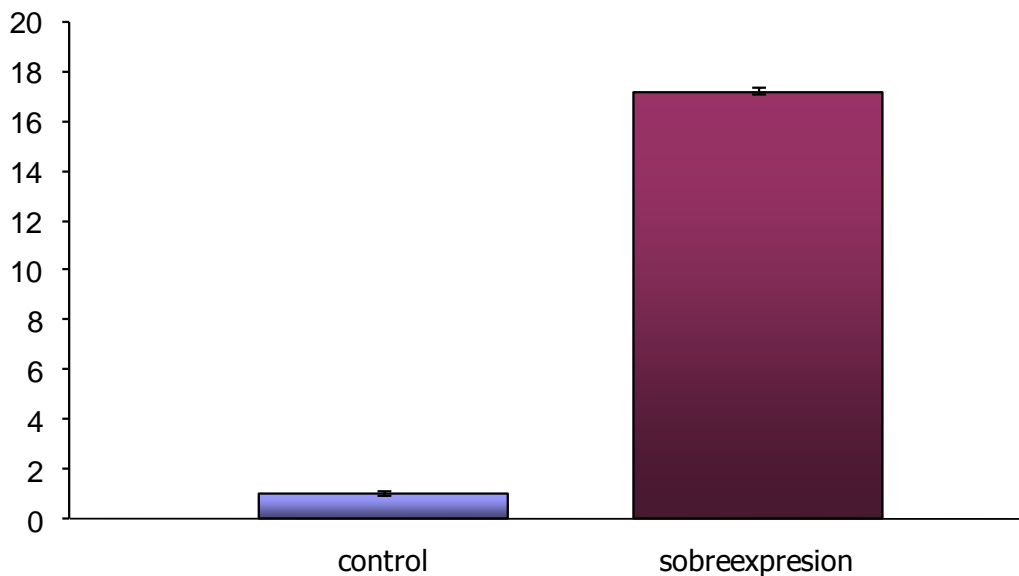
$C_T$  media: media de los valores  $C_T$  obtenidos en las tres réplicas realizadas para cada gen.

$\Delta C_T$ : valor obtenido al restar los valores de  $C_T$  de los dos genes indicados. La nueva desviación estándar es la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las desviaciones de los dos genes indicados.

$\Delta\Delta C_T$ : valor obtenido al restarle a  $\Delta C_T$  el valor de  $\Delta C_T$  del control tomado arbitrariamente como referencia (calibrador), *rp49*.

$2^{-\Delta\Delta C_T}$  (*fh-FXN*): cantidad de diana, normalizada respecto a una referencia endógena y relativa al gen referencia *fh*.

En la figura R36 se muestran los valores  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  para los individuos control y los que sobreexpresan el gen *FXN*.



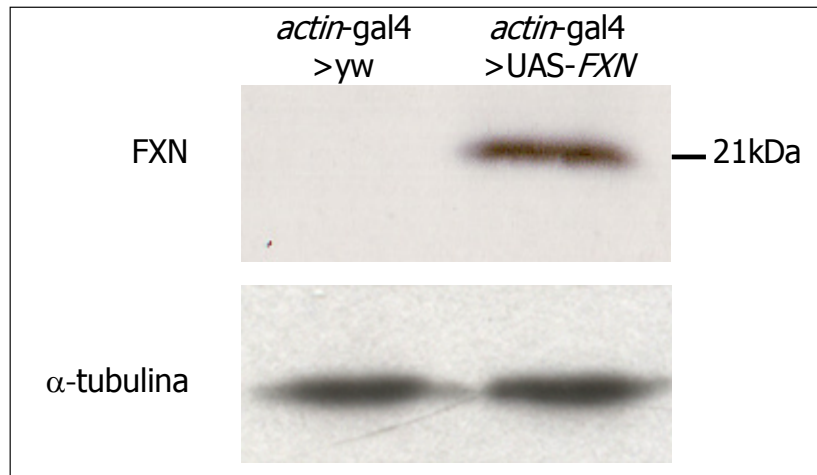
**Figura R36.** Expresión relativa del gen *FXN* respecto al gen endógeno *fh*, en moscas control (*actin-GAL4/yw*) y en moscas sobreexpresadas (*actin-GAL4/UAS-FXM*). Los histogramas representan los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  de la tabla R23.

### 7.3.2 Western blot

Para comprobar que el nivel de expresión se mantenía en la traducción/producción de proteína, se realizó un Western-blot con proteínas extraídas de larvas control (*actin-GAL4/yw*) y larvas mutantes (*actin-GAL4/UAS-FXM*).

Para poder comparar las intensidades de las bandas entre las dos carreras se llevó a cabo la técnica de Bradford, que permite calcular la concentración de proteínas obtenida en la extracción. Una vez conocida la concentración total de proteínas en cada muestra, se cargó en el gel la cantidad necesaria de cada una de ellas para tener un total de 5  $\mu\text{g}$  de proteína por carrera. El anticuerpo primario usado fue el anti-FRDA (anti-frataxina humana), cedido por el laboratorio del doctor Palau (Instituto de Biomedicina, Valencia) y como anticuerpo secundario, el IgG, (H+L) anti-ratón biotinilado hecho en cabra.

Como era de esperar, según los resultados obtenidos en la PCR cuantitativa, se obtuvo señal sólo en la carrera de la muestra de sobreexpresión. La banda detectada corresponde a la proteína frataxina humana de 21 kDa (figura R37).



**Figura R37.** Detección, mediante Western blot, de la expresión del gen humano *FXN* en larvas control (*actin-GAL4/yw*) y las larvas sobreexpresadas (*actin-GAL4/UAS-FXN*). También se muestra un control de  $\alpha$ -tubulina.

#### 7.4 Análisis de los fenotipos obtenidos con la sobreexpresión del gen *FXN*

La sobreexpresión del gen *FXN* en *Drosophila* se llevó a cabo en diferentes patrones: uno de expresión generalizada en el inicio del desarrollo embrionario y otro en determinadas células o tejidos, concretamente aquellos que están más afectados en los pacientes de ataxia de Friedreich (neuronas sensitivas, corazón y músculo). Para ello se utilizaron diferentes líneas GAL4 (tabla R24) y se llevaron a cabo cruces entre hembras vírgenes de dichas líneas y machos de la cepa *fxn* 2(3). La temperatura de los cruces fue de 29°C, para poder comparar los resultados con los obtenidos de la sobreexpresión del gen *fh*, que se hizo a dicha temperatura (Navarro, 2005). Esta es la temperatura a la que se consigue un mejor equilibrio entre la expresión de la proteína GAL4 y un efecto mínimo sobre la viabilidad y/o fertilidad en *Drosophila* (Duffy, 2002).

**Tabla R24.** Líneas utilizadas y su patrón de expresión.

Línea GAL4	Expresión
daughterless (da) actin	Ubicua en el embrión
neuralized (neur) 24B	Sistema nervioso periférico Sistema muscular
dorothy (dot)	Corazón

Para descartar que los resultados obtenidos pudieran deberse a efectos secundarios de la temperatura, cada una de las líneas GAL4 y UAS, así como los cruces de la línea *yw* con las diferentes líneas GAL4, se cultivaron paralelamente a 29°C. En todos los casos se encontró que la viabilidad y la fertilidad eran prácticamente normales.



Como la expresión de la proteína GAL4 depende en cierta medida de la temperatura, aquellos cruces en los que se obtuvo un fenotipo de letalidad a 29°C se repitieron a temperaturas inferiores, de 25°C y/o 21°C, por si en algún caso se obtenía una progenie cuyo análisis pudiera ser de utilidad.

#### **7.4.1 Fenotipos mutantes obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión generalizada**

Los primeros experimentos se realizaron con las líneas *da*-GAL4 y *actin*-GAL4 para estudiar el efecto de la sobreexpresión desde el inicio del desarrollo embrionario. Tanto con la línea *actin*-GAL4 como con la línea *da*-GAL4 se observó un 100% de letalidad (tabla R25), que se produce a lo largo de todos los estadios preadultos, desde embrión a pupa, aunque la letalidad afecta a estadios más tempranos con la línea *da*-GAL4. En esta línea los individuos morían antes de llegar al estadio de pupa madura, mientras que con *actin*-GAL4 parte de los individuos conseguían desarrollarse hasta el estadio de pupa madura. Estas pequeñas diferencias pueden deberse a diferencias en el patrón de expresión y/o en el nivel de expresión de la proteína GAL4 en estas líneas. Los resultados fueron similares a los obtenidos en la sobreexpresión del gen *fh* (Navarro, 2005 y Llorens *et al.* 2007).

Cuando los cruces se llevaron a cabo a 25°C se observó un 100% de letalidad en pupa madura y cerca del 100% a 21°C; a 21°C, los individuos no conseguían emerger de la pupa o morían al poco tiempo de emerger.

Tanto para estas líneas como para el resto de líneas que se describirán en sucesivos apartados, se ha observado un retraso del momento de aparición de la letalidad, directamente proporcional a la disminución de la temperatura del experimento.

**Tabla R25.** Fenotipo obtenido de la sobreexpresión de *FXN* utilizando las líneas GAL4 de expresión generalizada.

<b>Línea GAL4</b>	<b>Patrón de expresión</b>	<b>fenotipo observable</b>
daughterless ( <i>da</i> )	Ubicuo en embrión, con un patrón más o menos uniforme	letal
actin	Ubicuo en embrión, con un patrón uniforme	letal

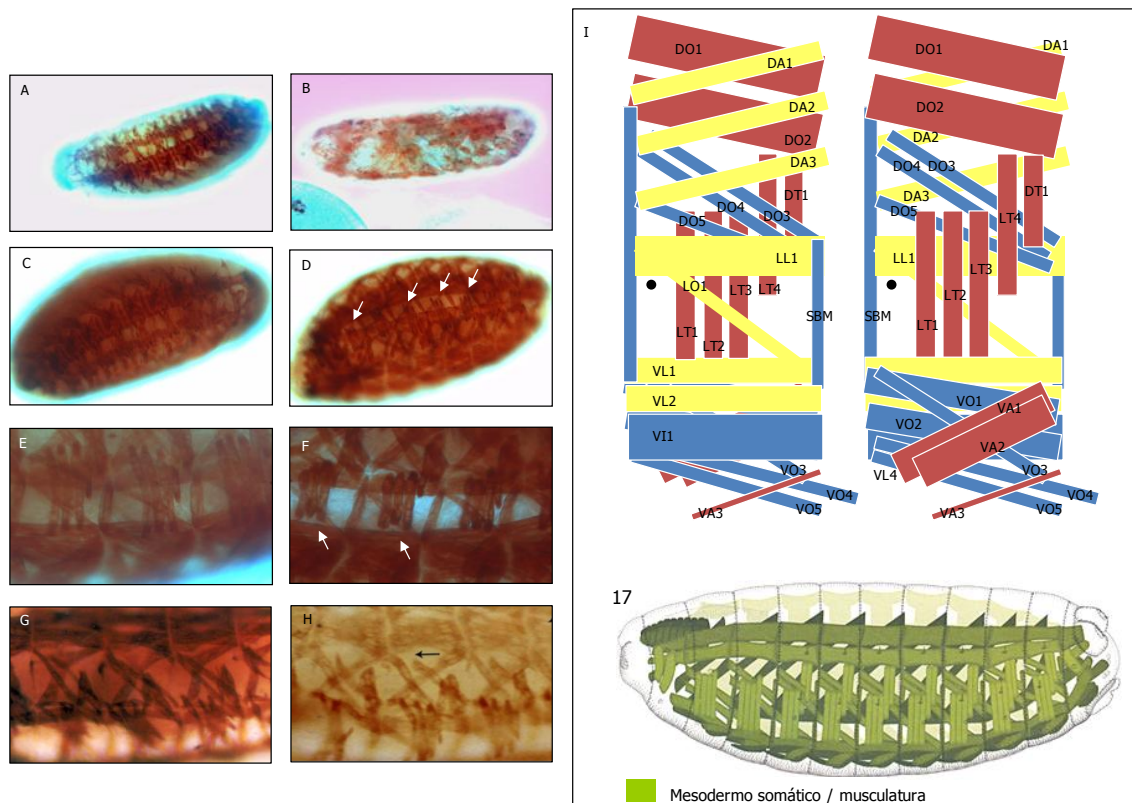
Con el objetivo de explicar la letalidad observada en estos cruces, se buscaron posibles alteraciones en aquellos sistemas que, en humanos, son más sensibles a la falta de frataxina (sistema nervioso, corazón y sistema muscular). Para ello se realizó inmunohistoquímica en embriones utilizando los anticuerpos apropiados.

### **7.4.1.1 Alteraciones en el Sistema muscular y el corazón**

En *D. melanogaster* la musculatura esquelética se genera a partir del mesodermo embrionario, y de esta capa celular derivan dos tipos de mioblastos, las células fundadoras y las células competentes para la fusión. Las primeras determinan el tamaño, orientación y disposición de un determinado músculo, mientras que las segundas se fusionan a las primeras para dar lugar al músculo final completo. Al término del proceso el patrón muscular queda constituido por 30 músculos por hemisegmento abdominal.

Respecto al corazón de *Drosophila*, está formado por una estructura en forma de tubo situada en la parte dorsal, que bombea la hemolinfa hacia el cerebro. El corazón se genera también desde el mesodermo, pero son necesarias ciertas señales ectodérmicas para que, en cada hemisegmento, un subconjunto de células mesodérmicas adquiera destino cardíaco. Dichas células migran dorsalmente y convergen para formar el corazón, junto con otros tipos celulares especificados, durante la migración. La forma final del corazón embrionario consiste en dos filas centrales de células cardíacas rodeadas por las pericardíacas.

La tinción del sistema muscular con anti-miosina reveló, en un número elevado de embriones, falta de conexión de los músculos Lateral Transversal 1 (LT1), Lateral Transversal 2 (LT2) y Lateral Transversal 3 (LT3), con el músculo Ventral Longitudinal 1 (VL1), debida probablemente a la formación incompleta de dichos músculos (figura R38D y F) en comparación con el control (R38A, C y E). Por otra parte, aunque en menor número, aparecían embriones con una fuerte desestructuración del sistema muscular (figura R38B). Con esta misma tinción, los embriones que sobreexpresan el gen *fh* al utilizar la línea *da*-GAL4, muestran ciertos músculos incompletamente formados, como los músculos Dorsal Agudo 3 (DA3), Dorsal Oblicuo 3 (DO3) y Dorsal Oblicuo 4 (DO4) (figura R38H; Navarro, 2005), en comparación con el control (figura R38G).



**Figura R38. Análisis de la musculatura de embriones que sobreexpresan *FXN*.** (A, C, E y G) *yw*, (B, D) *+UAS-FXN; da-GAL4/+*, (F) *+UAS-FXN; actin-GAL4/+*, (H) *+UAS-fn; da-GAL4* (Navarro, 2005). La tinción con anti-miosina reveló la formación incompleta de los músculos Laterales Transversales (LT1, LT2 y LT3) en los embriones sobreexpresados tanto con la cepa *da-GAL4* como con la *actin-GAL4*. (I) Esquema del patrón muscular para facilitar la identificación de los músculos afectados, figura adaptada de Bate (1993) y Hartenstein (1993).

En la tinción con el anticuerpo anti-*eve*, no se encontraron defectos en las células pericardiacas de embriones sobreexpresados, presentando un orden y disposición normal a lo largo del eje antero-posterior del embrión.

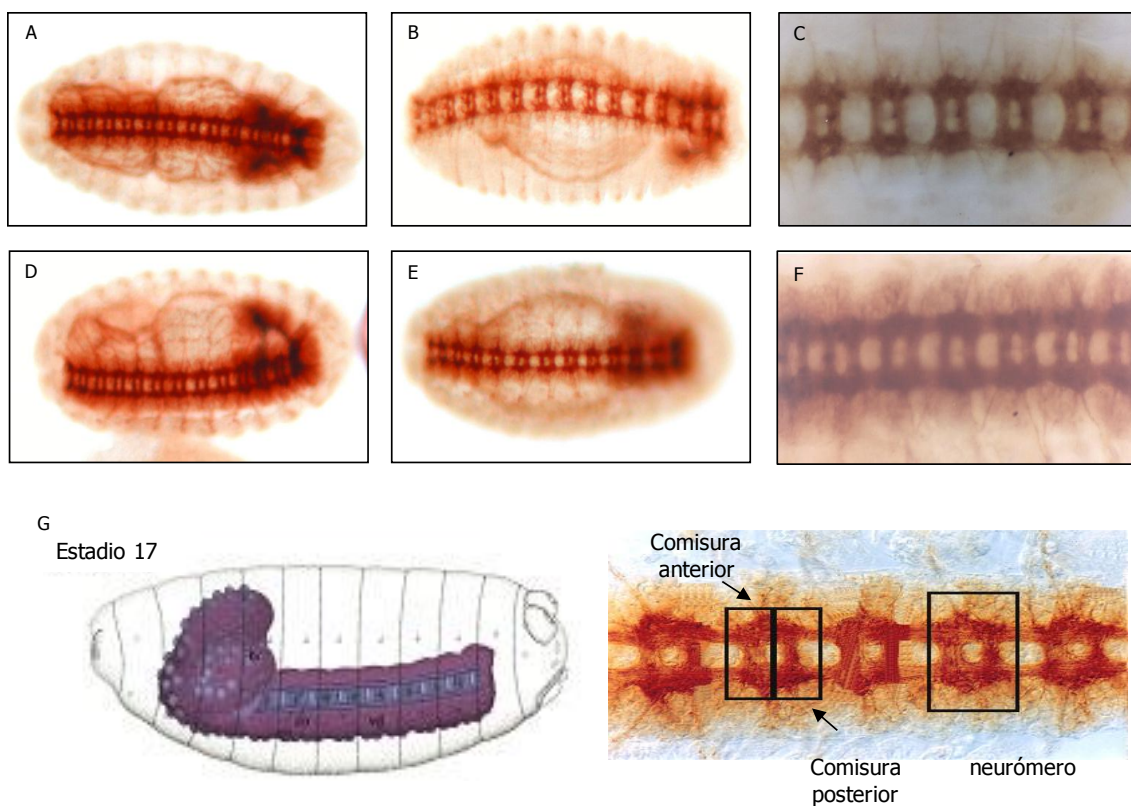
#### 7.4.1.2 Alteraciones en el Sistema nervioso

En *Drosophila*, por cada hemisegmento se separan 30 neuroblastos a partir del ectodermo y cada uno se divide asimétricamente dando origen a unas cinco Células Madre Ganglionares (GMC) como media; cada una de estas células va a generar un par de neuronas. A partir del estadio 13 comienza la diferenciación de las neuronas formadas, y cada tipo neuronal migra de forma específica y extiende las fibras axonales características. El conjunto comienza a condensarse y se forma el cerebro en la región anterior y la estructura nerviosa central, con el aspecto típico de escalera, a lo largo de todos los segmentos. Este proceso se completa en el estadio 17.

El SNP está formado por varios elementos: (i) órganos sensoriales, constituidos por conjuntos de neuronas sensoriales que derivan de células

precursoras (SOPs) segregadas del ectodermo; (ii) axones sensoriales, que crecen desde la epidermis hacia el SNC y (iii) axones motores, que crecen desde el SNC hasta alcanzar los músculos que inervan. Cada neurómero del SNC tiene, en cada lado, dos raíces nerviosas que permiten que los axones motores salgan hacia la periferia y los axones sensoriales entren en el SNC.

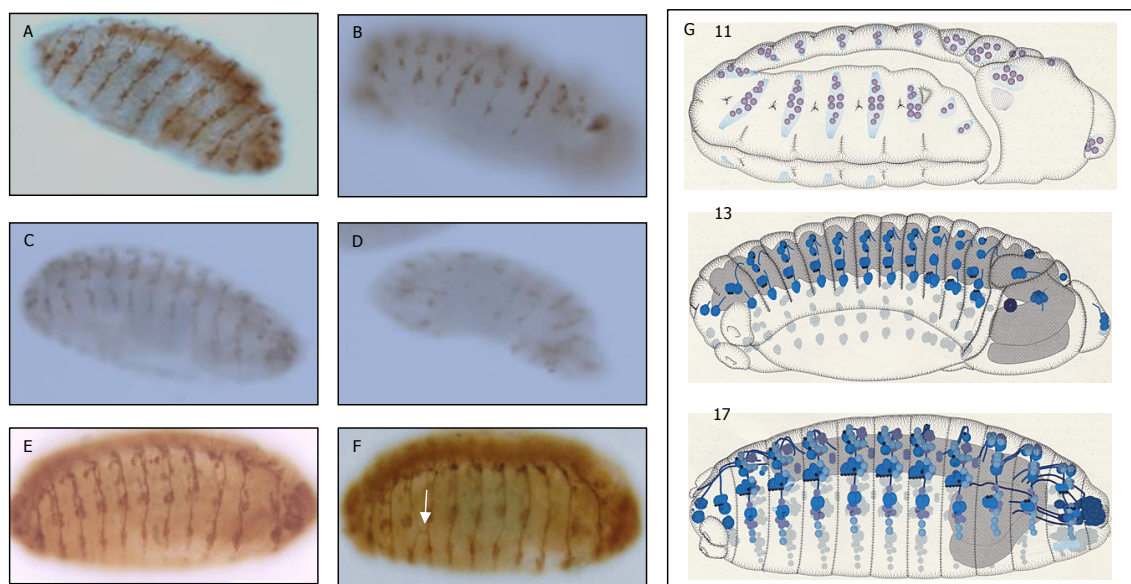
Para poder detectar posibles alteraciones en el SNC de los embriones con sobreexpresión de *FXN*, utilizamos el anticuerpo BP102. En ningún caso se observaron defectos en las GMC, sus neuronas hijas ni en la escalera del SNC (figura R39D y E). Este resultado concuerda con el obtenido cuando se sobreexpresa el gen *fh*, ya que en ese caso tampoco se observó defecto alguno en el SNC (Navarro, 2005).



**Figura R39. Análisis del SNC de embriones que sobreexpresan *FXN*.** (A-C) *yw*, (D) *+/UAS-FXN; da-GAL4/+*, (E) *+/UAS-FXN; actin-GAL4/+* y (F) *+/UAS-fh; da-GAL4*. La tinción con BP102 no reveló ninguna anomalía en la escalera central de los embriones sobreexpresados tanto con la cepa *da-GAL4* como con la *actin-GAL4*. (G) Esquema del patrón del SNC con la estructura de la escalera típica del SNC, figura adaptada de Hartenstein (1993) y Goodman y Doe (1993).

Las tinciones con el anticuerpo 22C10 mostraron, sin embargo, una gran desestructuración de los axones sensoriales (figura R40B y D). Este tipo de alteraciones también se han descrito para la sobreexpresión del gen *fh* en un patrón ubicuo en el embrión, aunque con un menor grado de

desestructuración, presentándose fusiones anómalas de axones sensoriales de segmentos contiguos (figura R40F; Navarro, 2005).



**Figura R40. Análisis del SNP sensorial de embriones que sobreexpresan *FXN*.** (A, C y E) *yw* (B) *+/UAS-FXN; actin-GAL4/+*, (D) *+/UAS-FXN; da-GAL4/+* y (F) *+/UAS-fhh; da-GAL4/+*. Con el anticuerpo 22C10, se detectó una gran desestructuración de este sistema. (G) Esquema del desarrollo del SNP, figura adaptada de Hartenstein (1993).

### 7.4.2 Fenotipos mutantes obtenidos a partir de líneas *GAL4* de expresión específica en sistema muscular y corazón

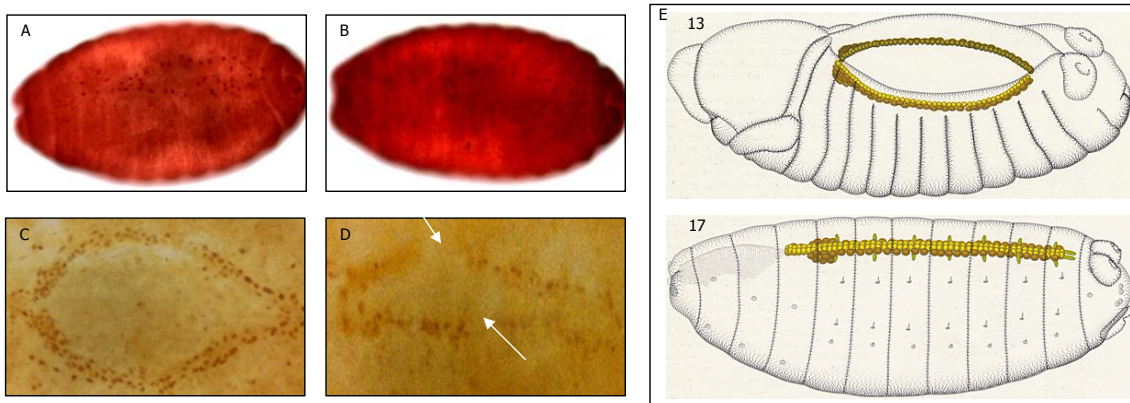
Para la obtención de estos fenotipos se han usado dos líneas *GAL4*, una con un patrón espacio-temporal de expresión de la proteína *GAL4* en músculo (*24B-GAL4*) y otra con expresión en los cardioblastos y células pericárdicas (*dot-GAL4*). Los resultados obtenidos fueron, en el caso de *24B* de letalidad, mientras que con la línea *dot-GAL4* se obtenía descendencia viable (Tabla R26). Para *24B* todos los individuos morían durante fase de pupa, mientras que para la línea *dot*, la gran mayoría de ellos alcanzaba la fase adulta.

**Tabla R26.** Resultados obtenidos de la sobreexpresión del gen *FXN* utilizando las líneas *GAL4* de expresión en músculo y corazón.

Línea <i>GAL4</i>	Patrón de expresión	fenotipo observable
<i>24B</i>	Mesodermo embrionario y células miogénicas (incluyendo cardioblastos). A partir del estadio 9.	letal
<i>dot</i>	Células cardíacas, pericárdicas y proventriculares, a lo largo de todo el desarrollo.	viable

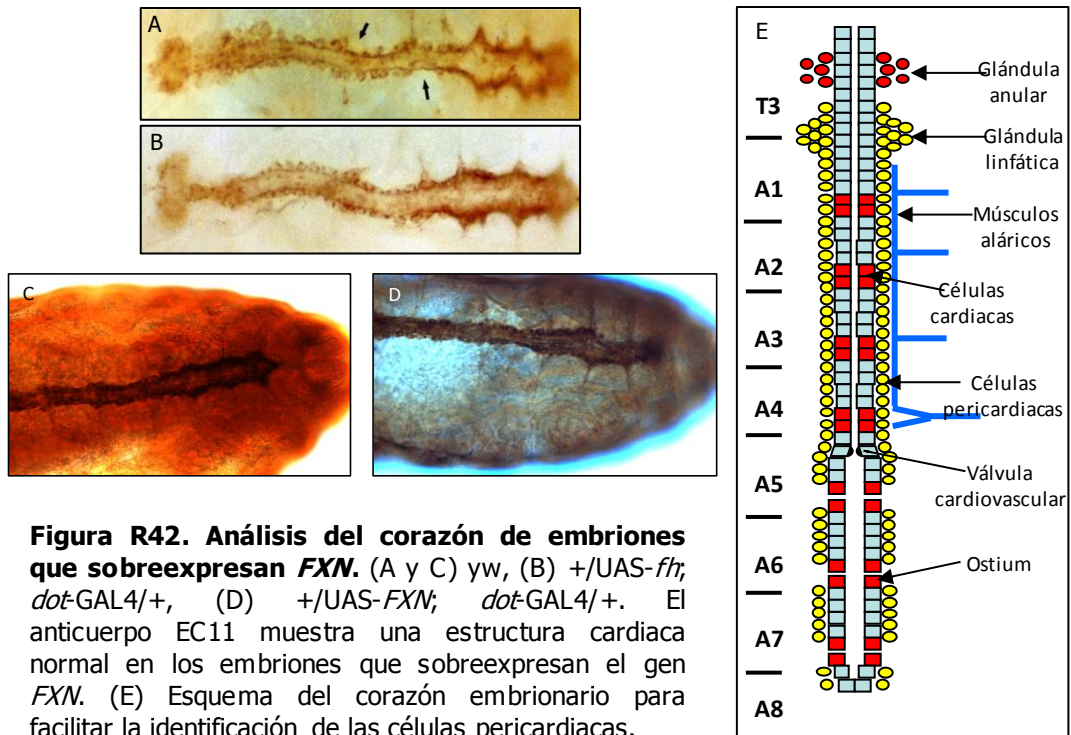


Con el anticuerpo anti-*eve*, específico de las células cardíacas y pericárdicas, se vio que la localización de las células pericárdicas (figura R41B) era normal al utilizar la línea *24B*, al igual que cuando se usan líneas de expresión ubicua, *da*-GAL4 o *actin*-GAL4. Este resultado es diferente al obtenido cuando se sobreexpresa el gen *fh*, ya que en este caso se observan huecos en la disposición de las células pericárdicas, a partir del estadio 13 (figura R41D; Navarro, 2005).



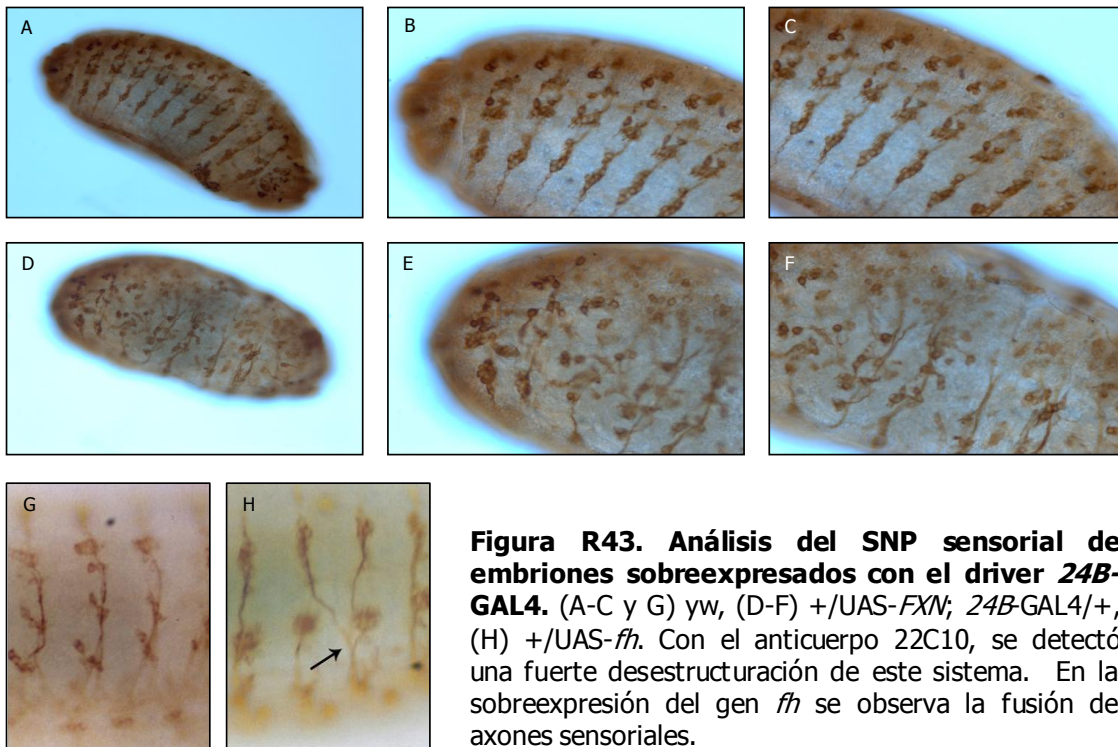
**Figura R41. Análisis del corazón de embriones que sobreexpresan *FXN*.** (A y C) *yw*, (B)  $+/UAS-FXN; 24B-GAL4/+$  y (D)  $+/UAS-fh; 24B-GAL4/+$ . Con el anticuerpo anti-*eve*, no se detectó ninguna pérdida de células cardíacas. (E) Esquema del desarrollo del corazón, figura adaptada de Hartenstein (1993).

Para corroborar que no existían defectos en el corazón de los embriones de *Drosophila* que sobreexpresan el gen humano *FXN*, se utilizó la línea *dot*-GAL4 específica de corazón. Se estudiaron los efectos de la sobreexpresión de *FXN* sobre dicha estructura, utilizando los anticuerpos: EC11, que marca la matriz extracelular que rodea a las células cardíacas y pericárdicas del tubo cardíaco, y el anticuerpo anti-*eve*, específico de las células cardíacas y pericárdicas. Con ninguno de los dos anticuerpos se detectaron alteraciones a lo largo de la estructura tubular cardíaca, como ausencia de algunas células pericárdicas, como ocurre cuando se sobreexpresa el gen *fh* (figura R42A). Además, en este caso la mayoría de embriones llegaban hasta la fase de pupa en la que se detecta un 100% de mortalidad (Navarro, 2005).



**Figura R42. Análisis del corazón de embriones que sobreexpresan *FXN*.** (A y C) *yw*, (B) *+UAS-fh; dot-GAL4/+*, (D) *+UAS-FXN; dot-GAL4/+*. El anticuerpo EC11 muestra una estructura cardíaca normal en los embriones que sobreexpresan el gen *FXN*. (E) Esquema del corazón embrionario para facilitar la identificación de las células pericárdicas.

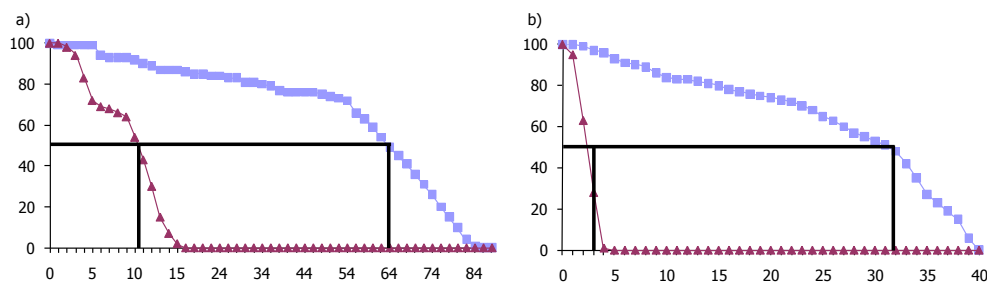
Dado que la formación del sistema muscular y del nervioso están íntimamente relacionadas, ya que uno actúa como soporte del desarrollo del otro, estudiamos la integridad del SNP, de los axones sensoriales y de los axones motores, en los embriones sobreexpresados con *24B*. La tinción con el anticuerpo 22C10 mostró bastante desestructuración del SNP (figura R43D-F), aunque no tan importante como la detectada usando las líneas de expresión generalizada, *da-GAL4* y *actin-GAL4* (figura R40). Esta desestructuración es mucho mayor en individuos que sobreexpresan el gen humano que en aquellos que sobreexpresan el gen de *Drosophila*. En los individuos *+UAS-fh; 24B-GAL4/+* el anticuerpo 22C10 reveló la fusión de axones sensoriales (figura R43H; Navarro, 2005).



### 7.4.3 Fenotipos mutantes obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión específica en el sistema nervioso

Se usó la línea *neuralized-GAL4*, que permite la expresión de la proteína GAL4 en las células progenitoras de los precursores de los órganos sensoriales. Los individuos obtenidos en este cruce son viables y, con ellos, se determinó la supervivencia y la capacidad locomotora. Para realizar el test de supervivencia se contabilizó el número de supervivientes cada dos días, a lo largo de todo el experimento. Los experimentos se llevaron a cabo tanto a 29°C como a 25°C.

Con esta línea, específica de SNP, se observaron claras diferencias entre los cruces control y los de sobreexpresión de *FXN* (figura R44).





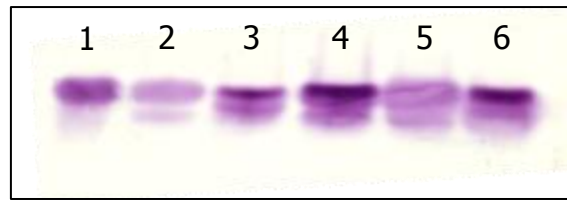
Como se aprecia en las gráficas, a ambas temperaturas existe una reducción muy drástica de la longevidad de los individuos mutantes. A 25 °C, el valor de vida media de los mutantes se encuentra alrededor del día 10, mientras que en controles este valor se encuentra en el día 64. Por su parte, a 29 °C, la diferencia del valor de la vida media entre controles y mutantes sigue siendo importante; en mutantes se encuentra entre el 2º y 3º día, mientras que en controles este valor se encuentra alrededor del día 30.

También se analizó la capacidad locomotora de los individuos a las dos temperaturas y, en ambos casos, los individuos mutantes no conseguían escalar, mientras que los controles escalaban de forma normal.

#### **7.4.4 Análisis de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa**

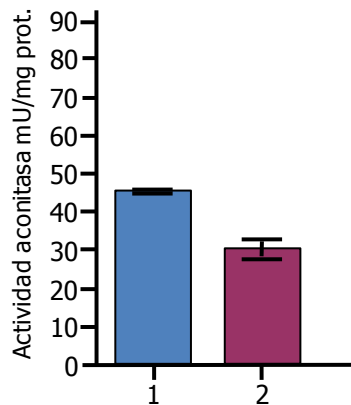
La medida de la actividad hidratasa de la enzima aconitasa, se realizó en larvas que sobreexpresan el gen *FXN* en un patrón de expresión ubicuo, usando la cepa *actin-GAL4 (+/UAS-FXN; actin-GAL4/+)*. También se incluyeron larvas en las que el gen *fh* era silenciado siguiendo dicho patrón (*+/UAS-fhIR; actin-GAL4/+*). Se decidió realizar la medición de la actividad aconitasa en gel de acrilamida, debido a que la gran cantidad de grasa de las larvas dificulta la medida de dicha actividad mediante ensayo cuantitativo.

Las medidas se realizaron tanto en condiciones de normoxia como de hiperoxia, manteniendo a las larvas en una atmosfera del 99,5% de oxígeno durante 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R45. Tal y como se observa en la misma, hay una reducción de la actividad aconitasa, en condiciones de normoxia, en individuos que sobreexpresan el gen *FXN*, mientras que los individuos que interfieren la expresión del gen *fh* en estas condiciones, mantienen la actividad más o menos a nivel normal. En condiciones de hiperoxia la actividad aconitasa se reduce en todos los genotipos, aunque de forma más acusada en los individuos que sobreexpresan el gen *FXN*, seguidos de los que interfieren el gen *fh* de *Drosophila*. Estos resultados nos indican que la actividad hidratasa de la aconitasa está influida por el nivel de frataxina en la célula, ya que tanto la reducción de FH como la sobreexpresión de frataxina humana disminuyen su actividad.



**Figura R45.** Actividad aconitasa medida en gel de acrilamida. (1) *+UAS-fhIR; actin-GAL4/+*, (2) *+UAS-FXN; actin-GAL4/+*, (3) *yw*, estas tres medidas se realizaron con individuos mantenidos en condiciones de hiperoxia. (4) *+UAS-fhIR; actin-GAL4/+*, (5) *+UAS-FXN; actin-GAL4/+*, (6) *yw*, estas tres medidas se realizaron con individuos mantenidos en condiciones normales de oxígeno.

Para confirmar estos resultados, se realizaron medidas cuantitativas de la actividad aconitasa en larvas mantenidas en condiciones de normoxia (figura R46).



**Figura R46.** Medida cuantitativa de la actividad aconitasa en condiciones de normoxia. (1) Larvas *yw*, (2) larvas *+UAS-FXN; actin-GAL4*.

La gráfica nos muestra que la actividad aconitasa en individuos con sobreexpresión de *FXN* en condiciones de normoxia se ve reducida un 30% respecto del valor de los controles. Si comparamos esto con los resultados de actividad aconitasa en normoxia en individuos con interferencia del gen *fh*, en los que no existía reducción alguna, podemos afirmar que el efecto de la sobreexpresión de *FXN* sobre la actividad aconitasa es más fuerte que el de la interferencia del gen *fh*.

*Discusión*

## **1. Obtención de un modelo en *Drosophila* para el estudio de la ataxia de Friedreich**

La ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad hereditaria causada por mutaciones de pérdida de función en el gen *FXN*. Como consecuencia, los pacientes tienen una disminución significativa de la proteína frataxina que ejerce su función, todavía no definida, en el interior de la mitocondria.

Existe una gran conservación entre la secuencia de la proteína frataxina humana, y las secuencias de las frataxinas descritas en otras especies, incluida la de *Drosophila melanogaster*. El grado de conservación es mayor en los residuos pertenecientes a las superficies aniónica e hidrofílica neutra; la frataxina de *D. melanogaster* conserva la mayor parte de estos residuos, que se han mantenido desde *E. coli* a *H. sapiens*, y tiene una similitud global elevada, lo cual indica que tanto la estructura como la función bioquímica también deben estar conservadas.

Por el contrario, hay una región que no presenta conservación de secuencia entre frataxinas y que ni siquiera está presente en las CyaY bacterianas. Esta región es, en *H. sapiens* (Campuzano *et al.* 1997), *M. musculus* (Koutnikova *et al.* 1997) y *S. cerevisiae* (Babcock *et al.* 1997), un péptido señal de importación a la mitocondria, que una vez utilizado es cortado y no aparece en la proteína madura. Es lógico, por tanto, que no se encuentre en las bacterias, que no tienen mitocondrias. Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, a nivel de secuencia de la frataxina de *D. melanogaster* (Cañizares *et al.* 2000), indican que el mecanismo de maduración y de importación de frataxina a la mitocondria podría estar conservado.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis, previamente planteada por nuestro grupo, de que la frataxina de *D. melanogaster* se localiza en la mitocondria, coincidiendo con lo que ocurre en otros organismos (Campuzano *et al.* 1997, Babcock *et al.* 1997 y Huynen *et al.* 2001). Esto nos ha permitido plantear una nueva hipótesis de trabajo, respecto a que la frataxina de *Drosophila* pudiera participar en los mismos procesos celulares que la frataxina humana y el resto de frataxinas de otros organismos. Bajo esta hipótesis es posible establecer, en *Drosophila*, un modelo de estudio de la AF, generando mutaciones de pérdida de función en el gen *frataxin homolog* de *Drosophila* (*fh*).

Existen diferentes estrategias que permiten generar este tipo de mutaciones. Se puede modificar la estructura de un gen, produciendo un mutante estructural, o alterar específicamente su expresión, creando así un mutante funcional de dicho gen.

Para obtener mutantes estructurales se han usado, frecuentemente, los elementos transponibles ya que son capaces de generar mutaciones fácilmente detectables y reproducibles, debido a su capacidad de inserción o escisión. En

*Drosophila*, el elemento transponible más conocido y utilizado para llevar a cabo mutagénesis es el elemento P. Sus características, además de su manipulación mediante ingeniería genética, hacen del elemento P uno de los instrumentos más potentes para la obtención de mutantes en *Drosophila*.

Aunque el patrón de inserción de este elemento a lo largo del genoma es aleatorio, se han descrito algunas excepciones; los vectores generados a partir de los elementos P, que incluyen secuencias reguladoras específicas de los genes *engrailed* (*en*) y de los complejos homeóticos *Bithorax* (BX-C) y *Antennapedia* (ANT-C), muestran un patrón selectivo de inserción en el genoma, a menudo cerca del gen endógeno en cuestión (Hama *et al.* 1990 y Engström *et al.* 1992). En otros estudios, se han clonado secuencias reguladoras del gen *polyhomeotic* (*ph*) (Kassis *et al.* 1992, Fauvarque *et al.* 1993 y Chiang *et al.* 1995) o el gen *linotte* (*lio*) (Taillebourg *et al.* 1999), observándose también la inserción preferencial en las zonas cromosómicas cercanas a las secuencias clonadas en estos vectores. Este fenómeno de inserción dirigida, denominado *P-homing*, es la técnica en la que hemos basado nuestra estrategia para poder obtener mutantes estructurales del gen *fh*.

En este trabajo se ha clonado parte del gen *fh* junto con parte de su región reguladora y, tras la obtención de 100 líneas diferentes de inserción por microinyección, y de 100 líneas más por movilización de las inserciones, no se obtuvo, en ningún caso, una inserción que afectase al gen *fh*, como en principio esperábamos. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio, se habían realizado experimentos de movilización de elementos P localizados en la región cromosómica 8C/D, donde se sitúa el gen *fh*; en ellos no se pudo conseguir una inserción que afectase al gen, pero se identificaron puntos calientes de inserción para los elementos P en 8C/D (Navarro, 2005). Nuestros resultados, junto con el pequeño tamaño del gen *fh*, (es el menor de la región, con menos de 1kb), y su situación en una zona cromosómica densa en genes, nos llevaron a considerar que la probabilidad de lograr su alteración por mutagénesis insercional era muy baja. Por ello, optamos por abordar la obtención de un mutante funcional del gen *fh*, utilizando el sistema UAS-GAL4 que, combinado con la técnica de la interferencia del ARN (ARNi), permite silenciar específicamente la expresión de un gen.

En *Drosophila*, la técnica de ARNi ha ido evolucionando a lo largo del tiempo. En primer lugar se suplementaba la comida con levadura manipulada para producir ARN de doble cadena, lo que funciona bien en *C. elegans* pero no en *Drosophila*. Después se procedió a microinyectar el ARN de doble cadena a los embriones, y finalmente se introdujo el sistema UAS/GAL4, permitiendo el silenciamiento en momentos del desarrollo y/o tejidos concretos (Brand *et al.* 1993). En los últimos años se han producido diferentes mejoras, como es el uso de construcciones de ARNi basadas en dos repeticiones invertidas del ADNc del gen a silenciar (Kennerdell *et al.* 2000, Martinek *et al.* 2000 y Fortier *et al.* 2000), o el uso de espaciadores entre tales repeticiones, que facilitan, tanto la clonación de la construcción de ARNi como la formación de la molécula de ARN de doble cadena necesaria para la interferencia (Piccin *et al.* 2001). No

obstante, es importante señalar que existe una gran variabilidad de funcionalidad de la construcción entre las distintas líneas transgénicas que pueden obtenerse, debido especialmente a efectos de posición dependientes del lugar donde se localice el transgen.

En nuestro caso, se utilizó una construcción con una secuencia espaciadora entre las dos copias del ADNc del gen *fh* (Navarro, 2005). De entre las diferentes líneas transgénicas obtenidas, seleccionamos aquella con una reducción de la expresión del gen *fh* del 70% del nivel normal, equiparable a la reducción que tiene el gen *FXN* en los enfermos de AF (entre el 70 y el 95 %).

### ***1.1 La reducción generalizada de la expresión de fh afecta a la supervivencia y a la capacidad de escalada, especialmente en condiciones de estrés oxidativo.***

Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio nos indicaron que el silenciamiento de *fh*, de forma generalizada a 29°C, conlleva letalidad en las fases preadultas. En cambio, cuando se utilizaban cepas GAL4 que dirigen este silenciamiento en el SNP, la progenie era viable pero con menor longevidad y capacidad de escalada de los adultos respecto a los controles. Este fenotipo puede equipararse a ciertas características clínicas de los pacientes de AF, dado que estos tienen una menor capacidad de movimiento y una menor esperanza de vida. Pero hay una diferencia importante que cabe destacar y es que, mientras la reducción de frataxina en los pacientes de AF afecta a todas las células del organismo, en las moscas solo afectaba a determinadas partes del SNP. Por lo tanto, nos propusimos obtener un modelo en *Drosophila* en el que la reducción de frataxina fuera también generalizada, pero permitiendo que los individuos llegaran a la fase adulta. Esto se consiguió con la cepa *actin-GAL4* y realizando los cruces a la temperatura de 25°C.

Los descendientes de los cruzamientos realizados con la cepa *actin-GAL4* mostraron menor capacidad de escalada y menor longevidad que los controles. Es importante destacar que estos fenotipos también se han obtenido cuando la expresión de *fh* se interfiere en las células progenitoras de los órganos sensoriales, al utilizar la línea *neur-GAL4* y mantener los cultivos a 29°C (Navarro, 2005). Esto nos indica que el SNP es un tejido muy sensible a la reducción de frataxina, siendo uno de los más afectados, lo que concuerda con algunas características clínicas de los pacientes de ataxia de Friedreich (Delatycki *et al.* 2000).

También hay que destacar que, tanto la supervivencia como la capacidad de escalada de los adultos sufren un fuerte empeoramiento en condiciones de hiperoxia, es decir, al someterlos a un mayor estrés oxidativo. En estas condiciones los individuos *actin-GAL4/UAS-fhIR* perdieron rápidamente la capacidad de movimiento, hasta tal punto que los test de escalada no pudieron realizarse. En cuanto a la supervivencia de las moscas, ésta se redujo cuatro

veces respecto de los controles, y dos veces respecto del valor obtenido cuando los individuos se sitúan en condiciones de normoxia. Esto reabre el debate sobre el papel del estrés oxidativo como factor clave en el desarrollo de la enfermedad que se discutirá en otro apartado. La exposición a condiciones de hiperoxia ( $\sim 100\%$  O<sub>2</sub>) ofrece un modelo muy atractivo para realizar estudios fisiológicos del estrés oxidativo, ya que los efectos adversos son debidos al incremento del flujo intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por las vías metabólicas normales (Jamieson *et al.* 1986 y Gille *et al.* 1992).

## **1.2 La reducción moderada de la expresión de *fh* no afecta a la actividad de la enzima SDH**

En los primeros estudios sobre la AF se vio que esta enfermedad compartía características con algunas enfermedades mitocondriales, lo que indicaba, incluso antes de que se identificase la frataxina como una proteína mitocondrial, la posible implicación de este orgánulo en la enfermedad. Posteriormente se ha demostrado que la frataxina tiene algún papel crucial en la función mitocondrial, relacionado con la homeostasis del hierro. La reducción de los niveles de la frataxina conlleva un incremento de la susceptibilidad al estrés oxidativo, una reducción de la formación de los centros Fe-S y una acumulación de hierro en la mitocondria (Wilson, 2003, Pandolfo M. 2006 y Di Prospero *et al.* 2005). La desregulación de la homeóstasis del hierro en la AF produce efectos muy diversos, entre los que destaca el impacto sobre el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, ya que en estas vías existen enzimas que requieren de centros Fe-S para realizar su función (la aconitasa y los complejos de la cadena de transporte de electrones I, II y III, respectivamente). En levadura se ha comprobado que existe una interacción física directa entre la frataxina y los complejos que proporcionan los electrones a la ubiquinona, o sea, con la SDH y con subunidades del complejo de transferencia de electrones de la flavoproteína (ETF $\alpha$  y ETF $\beta$ ). Por otra parte, los mutantes de falta de frataxina muestran una reducción de la actividad SDH. Esto demuestra la relación funcional entre la frataxina y el complejo SDH en levadura, sugiriendo que la frataxina regularía la entrada de electrones a la cadena de transporte, al menos, vía la SDH (González-Cabo *et al.* 2005). Sin embargo, estudios anteriores realizados en levadura proponían que la reducción de la actividad enzimática de la SDH es un efecto secundario de la falta de frataxina, siendo el efecto primario el daño en la biogénesis de los centros Fe-S y, por tanto, afectando a la síntesis de las subunidades con estos centros, como es la subunidad 2 de la SDH (Gerber *et al.* 2003 y Ramazzotti *et al.* 2004). Posteriormente, en un modelo de *C. elegans* (Vázquez-Manrique *et al.* 2006) se demostró una interacción a nivel genético entre el gen *frh-1* (ortólogo al *FXN*) y el gen *mev-1* (codifica para la subunidad C de la SDH). Este resultado apoya la idea de que ambas proteínas deben estar involucradas en la misma vía bioquímica, o sea, la cadena de transporte de electrones, como se demostraba en el estudio de González-Cabo *et al.* (2005).

En el mutante condicional de músculo en ratón (MCK), descrito en el trabajo de Puccio *et al.* (2001), se obtuvo una reducción de la actividad aconitasa y de los complejos respiratorios, en los tejidos cardíaco y neuronal. Centrando la atención en el complejo II de la cadena respiratoria, su actividad se veía reducida en un 77-87% respecto de la actividad normal. Además, también se observó la reducción de esta actividad en el tejido muscular de los mutantes condicionales de neuronas (NSE) y una reducción de la actividad aconitasa en neuronas, aunque los autores sugieren también cierta reducción de la actividad SDH en neuronas. Cabe destacar que en los mutantes MCK se producía una eliminación completa de la frataxina en todos los tejidos; sin embargo, en los mutantes NSE se eliminaba por completo la frataxina en tejido cardíaco, mientras que en las diferentes partes del SNC la disminución de frataxina rondaba el 25% (25% en cerebro total, 20% en cerebelo).

En el modelo de AF en *D. melanogaster* obtenido por Anderson *et al.* (2006), el silenciamiento total o prácticamente total de la expresión del gen *fh* en un patrón generalizado, reduce la actividad del complejo II de la cadena de transporte de electrones (SDH) en un 40-60% en larvas.

En el modelo estudiado en este trabajo se mide la actividad de la SDH de dos formas diferentes: de forma cualitativa, mediante tinción de tejidos, y de forma cuantitativa, mediante espectrofotometría. Ambas técnicas son complementarias ya que, aunque las dos miden la actividad de la SDH, usan diferentes metodologías, lo cual da más solidez a los resultados obtenidos.

Las mediciones de la actividad SDH, ya sea mediante la técnica cualitativa o la cuantitativa, en condiciones normales o de elevado estrés oxidativo, no mostraron diferencias significativas entre los controles (*actin-GAL4/γw*) y los mutantes (*actin-GAL4/UAS-fhIR*). Este resultado nos indica que, en nuestro modelo, la reducción del ARNm de la frataxina hasta el 30% del nivel normal, no afecta a la actividad de la SDH. Si comparamos este resultado con los obtenidos en los diferentes modelos expuestos anteriormente, vemos que existe una clara correlación entre el defecto de la actividad de la SDH y el nivel de expresión de la frataxina. En los modelos en los cuales la reducción de la frataxina es total o casi total, la actividad de la SDH se ve disminuida (González-Cabo *et al.* 2005, Vázquez-Manrique *et al.* 2006, Anderson *et al.* 2005 y Puccio *et al.* 2001). Sin embargo, en aquellos casos (Puccio *et al.* 2001) en los que la expresión de frataxina se reduce a niveles parecidos a los que obtenemos en este trabajo, no existe una clara disminución de la actividad SDH, aunque sí que se puede sugerir cierta tendencia a la baja. Por lo tanto, proponemos que una fuerte reducción de los niveles de frataxina llevaría asociada la disminución de la actividad SDH, mientras que ésta permanece más o menos intacta cuando hay cierto nivel de frataxina en la célula, aunque no podemos determinar si la frataxina actúa directa o indirectamente sobre la actividad SDH en *Drosophila*.



### **1.3 La reducción moderada de la expresión de fh afecta a la actividad de la aconitasa en condiciones de estrés oxidativo**

Son muchos los artículos que demuestran que la aconitasa es uno de los enzimas cuya función se encuentra reducida en condiciones de falta de frataxina. Uno de los primeros es el publicado en 1997 por Rötig *et al.* donde, además de demostrar la disfunción de los complejos de la cadena de transporte de electrones, mostraron una reducción de la actividad de la aconitasa en tejido cardiaco, y sugirieron su disfuncionalidad en el tejido neuronal de pacientes con AF. Además, este grupo también demostró la falta de función de la aconitasa en mutantes nulos de levadura (*yfh1Δ*); en este caso, la explicación de los resultados, respecto a la aconitasa, fue que la frataxina causaba dicha anomalía como efecto secundario del estrés oxidativo producido por el acúmulo de hierro en la mitocondria. Cabe destacar que la aconitasa es la única enzima del ciclo de Krebs afectada por el estrés oxidativo, de hecho es un marcador del daño oxidativo en la célula (Bulteau *et al.* 2003)

En trabajos posteriores se ha continuado relacionando la disminución de la actividad aconitasa con la falta de frataxina, pero dando como explicación la falta de producción de centros Fe-S; según esta nueva hipótesis de trabajo, la frataxina es necesaria para el ensamblaje de los centros Fe-S. La mayoría de las correlaciones directas *in vivo* entre frataxina y los centros Fe-S provienen de estudios realizados en levadura (Chen *et al.* 2002, Duby *et al.* 2002 y Muhlenhoff *et al.* 2002), en los que se detectaron interacciones directas entre la frataxina y la maquinaria de ensamblaje (Gerber *et al.* 2003, Muhlenhoff *et al.* 2003 y Ramazzotti *et al.* 2004). Posteriormente se ha confirmado el requerimiento de frataxina en la maduración de los centros Fe-S (Stehling *et al.* 2004). Otros trabajos indican que la frataxina podría actuar a nivel de la actividad de la aconitasa, cediendo el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a ésta, de tal forma que repararía su centro Fe-S desde su forma inactiva  $[\text{3Fe-4S}]^+$ , a su forma activa  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$  (Bulteau *et al.* 2004).

También se ha demostrado una interacción directa de la frataxina con la aconitasa en condiciones de altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno, sugiriendo la posible protección del centro Fe-S de la aconitasa por parte de la frataxina, y evitando su inactivación irreversible y su potencial degradación (Bulteau *et al.* 2004).

En este trabajo, los resultados obtenidos para la actividad de la enzima aconitasa, en condiciones de normoxia, no mostraron ninguna diferencia significativa entre los controles (*actin-GAL4/yw*) y los mutantes (*actin-GAL4/UAS-fhIR*); aunque sí que se produce una reducción de la actividad de la enzima durante el envejecimiento, en individuos de ambos genotipos, tal y como se había observado previamente en diferentes estudios (Yan *et al.* 1997, Das *et al.* 2001, Delaval *et al.* 2004, Yarian *et al.* 2005 y Yarian *et al.* 2006). También se ha visto que en condiciones de un gran estrés oxidativo (hiperoxia), la aconitasa también ve reducida su actividad entre el 83 al 91% (Gardner *et al.* 1994). Dicha reducción la hemos detectado en nuestros controles; más aún, en

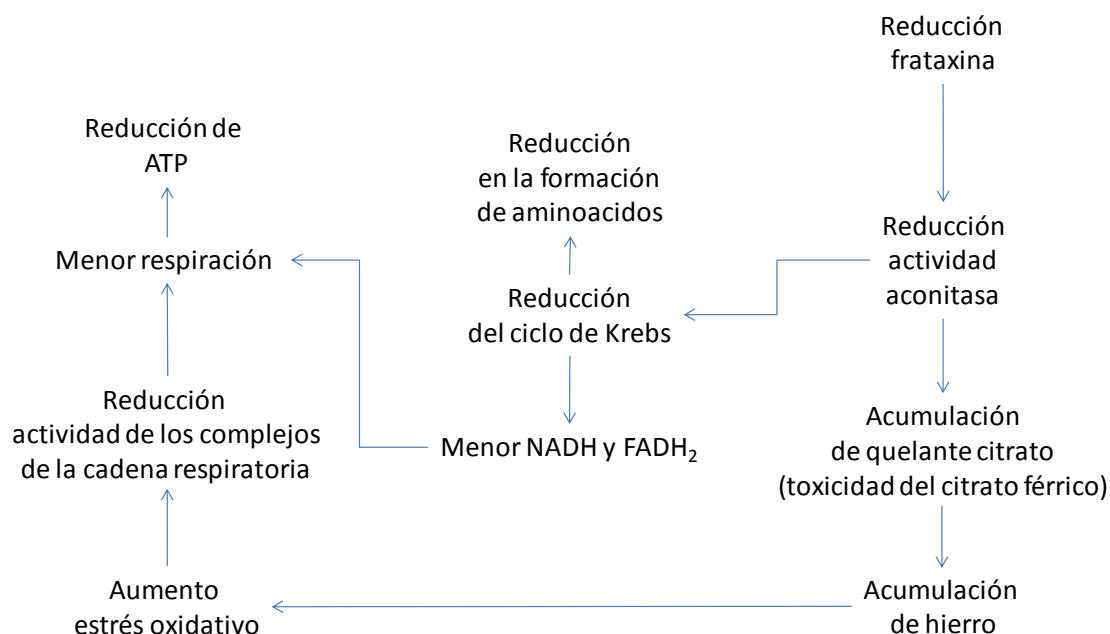
los individuos donde se produce además una reducción de la expresión del gen *fh*, la disminución de la actividad aconitasa es de alrededor del 50% respecto del control. Este resultado estaría de acuerdo con el papel de la frataxina como chaperona de la aconitasa, propuesto previamente por Bulteau *et al.* (2004). La presencia de frataxina protegería a esta enzima de su inactivación por las especies reactivas del oxígeno. El estrés oxidativo conlleva la pérdida de un ion hierro (Fe- $\alpha$ ) del centro Fe-S, y por tanto, su inactivación (Brazzolotto *et al.* 1999). Teniendo esto en cuenta, la falta de frataxina supone que el hierro no puede ser recambiado (o que se pierde fácilmente por la falta de protección) y, por tanto, la aconitasa no puede ser reactivada cuando el nivel de estrés oxidativo es alto, como ocurre en hiperoxia o durante el proceso de envejecimiento de los individuos, de tal manera que dicha inactivación resulta irreversible.

Considerando los resultados obtenidos en nuestro modelo de *Drosophila* para la SDH y para la aconitasa y dentro del contexto de los resultados obtenidos en los otros modelos, proponemos que es la aconitasa mitocondrial la primera diana de la falta de frataxina en las moscas con reducción de la expresión del gen *fh*.

El ciclo de Krebs juega un papel muy importante en la función bioenergética desarrollada por la mitocondria, debido a la elevada formación de poder reductor (NADH y FADH<sub>2</sub>). La falta de actividad de la aconitasa podría explicar perfectamente la reducción de la producción de ATP observada en pacientes con AF (Lodi *et al.* 1999 y Vorgerd *et al.* 2000). Cuando la función de la aconitasa mitocondrial está seriamente dañada, el fallo del ciclo de Krebs lleva a una falta de energía para las células (Janero *et al.* 1996). Esto explicaría porque, en los pacientes con AF, los tejidos con una alta demanda energética, como el músculo esquelético y el corazón, se encuentran más afectados

La inactivación de la aconitasa tiene como resultado la acumulación de citrato, el sustrato que es usado por la enzima. Dicha acumulación ha sido observada en mamíferos y correlacionada con el descenso de la actividad aconitasa durante el envejecimiento (Zahavi *et al.* 1965). En levaduras deficientes para frataxina, el citrato es un quelante de hierro y su toxicidad es dependiente de este metal (Chen *et al.* 2002). Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* un aumento en el daño oxidativo debido a la formación de complejos de citrato férrico (Prabhu *et al.* 1993). Es muy interesante destacar que el tejido cardiaco es uno de los tejidos que mayor concentración de citrato presenta (Williams *et al.* 1974) y que, en pacientes con AF, los cardiomiocitos presentan depósitos de hierro (LaMarche *et al.* 1980 y Bradley *et al.* 2000), al igual que los cultivos primarios de fibroblastos de los enfermos (Delatycki *et al.* 1999 y Wong *et al.* 1999). El hierro ferroso puede generar especies ROS tóxicas al reducir el oxígeno al radical superóxido y reduciendo el peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Horton *et al.* 1987); este efecto puede aumentar el daño del estrés oxidativo, pudiendo acelerar la inactivación de la aconitasa y afectar a otras macromoléculas, como los enzimas de la cadena de transporte de electrones, que contienen centros Fe-S. El

consiguiente daño en la cadena de transporte de electrones podría inducir la acumulación de sustratos como el NADH que por autooxidación podrían generar un “estrés reductivo”, condición que aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (Yan *et al.* 1997). La figura D1 esquematiza la posible cascada de acontecimientos debidos a la reducción de la actividad aconitasa.



**Figura D1.** Propuesta de los acontecimientos bioquímicos generados por la reducción de la frataxina.

### ***1.4 La reducción de la expresión de fh afectaría, en primer lugar, a la actividad de la aconitasa y, posteriormente, a la cadena de transporte de electrones***

En la mayoría de los artículos publicados hasta la fecha sobre la bioquímica de la AF, ya sea en organismos modelo o en cultivos de células de pacientes, se ha detectado una disminución en la actividad de los complejos I, II y III de la cadena de transporte de electrones, con lo que existen suficientes evidencias experimentales para concluir que, en los enfermos de AF, existe un problema en la cadena de transporte de electrones. Pero la cuestión que se plantea es, si dicha disfunción es un efecto primario de la falta de frataxina o es un efecto secundario debido al ataque de especies reactivas del oxígeno. De ser un efecto primario, ¿es debido a que la frataxina participa en la formación de sus centros Fe-S, o más bien a una interacción directa con los complejos ya completamente funcionales? Hoy en día, existen dos posturas principales, claramente diferenciadas, al respecto: una que defiende que la AF es una enfermedad de las denominadas OXPHOS, que afectaría de forma principal a la cadena de transporte de electrones, cualquiera que sea el punto en la cadena donde se encuentre la disfunción, pero sin descartar la posibilidad de que frataxina tenga otras funciones; y la segunda que defiende que la frataxina es

una chaperona de la formación de los centros Fe-S de las diferentes proteínas con este tipo de grupos prostéticos, que incluirían a los complejos de la cadena de transporte de electrones y a la aconitasa, entre otras.

En el modelo que hemos desarrollado en este trabajo, no se detecta ningún defecto en la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones. Esto podría ser debido, como ya hemos explicado anteriormente, a que la reducción de la frataxina en nuestro modelo no es suficiente para desarrollar defectos cuantificables de dichas actividades. Sin embargo, lo que sí que encontramos es una reducción del consumo de oxígeno cuando partimos de intermediarios del ciclo de Krebs que se encuentran en pasos metabólicos anteriores al de la enzima aconitasa. Nuestro modelo muestra que el efecto primero, cuando se reduce la cantidad de frataxina, es la falta de actividad aconitasa, ya sea porque la frataxina actúe protegiendo o porque actúe reactivando su centro Fe-S, y que los defectos en los demás enzimas serían secundarios, debidos a la acumulación de especies reactivas del oxígeno. Alternativamente, podríamos explicar los resultados obtenidos por la falta de formación de los centros Fe-S, actuando la frataxina como uno de los intermediarios en su formación. Cuando el nivel de frataxina es del orden del 30% del normal, los centros Fe-S podrían formarse a una velocidad a la que sólo se detectaría la bajada de la actividad aconitasa, por ser la enzima del ciclo de Krebs más sensible al ataque de las especies reactivas del oxígeno (Yan *et al.* 1997) y que, por el momento, es la única enzima conocida que recambia su centro Fe-S (Rose *et al.* 1967).

### ***1.5 El estrés oxidativo juega un papel clave en el desarrollo de la ataxia de Friedreich***

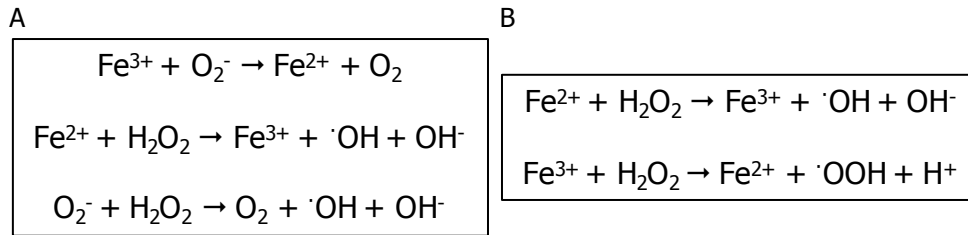
En la AF todavía no están claros los mecanismos por los que se produce la enfermedad, aunque hay cierto consenso respecto a que el estrés oxidativo juega un papel clave. La acumulación de hierro mitocondrial podría originar el daño oxidativo a partir de la producción de radicales libres, mediante la reacción de Fenton. Algunos estudios han demostrado que la pérdida de frataxina conlleva un incremento en la sensibilidad al estrés oxidativo en levaduras (Foury *et al.* 1997) y en fibroblastos de pacientes (Wong *et al.* 1999), un incremento del daño oxidativo en el ratón knock-out condicional de células  $\beta$  pancreáticas (Ristow *et al.* 2003) o en hepatocitos (Thierbach *et al.* 2005), disfuncionalidad en la respuesta de los fibroblastos de pacientes al daño oxidativo (Chantrel-Groussard *et al.* 2001) y un incremento de los niveles de marcadores del estrés oxidativo en muestras de pacientes (Emond *et al.* 2000). El papel del daño oxidativo en la AF también está apoyado por los resultados obtenidos en pacientes tratados con idebenona, un antioxidante que puede reducir la hipertrofia miocárdica y los marcadores de estrés oxidativo (Rustin *et al.* 1999, Schulz *et al.* 2000 y Hausse *et al.* 2002). Además, el uso de una terapia combinada, con altas dosis de vitamina E y coenzima Q10, muestra un rápido y sustancial aumento en la energía generada por el corazón y el músculo

esquelético, aunque solo se obtienen mejoras parciales de los síntomas. Sin embargo, otros estudios, como el realizado en el modelo de ratón knock-out condicional de neuronas, han planteado que el estrés oxidativo tendría un papel minoritario en la AF (Seznec *et al.* 2005); en dicho trabajo se utilizó como defensa antioxidante el MnTBAP, un compuesto que mimetiza a la MnSOD, además de sobreexpresar las Cu y ZnSOD, en los ratones con cardiomiopatía. En el caso de la MnTBAP, la cardiomiopatía no mejoró, sugiriendo que la producción de radicales libres en este modelo es un componente menor en la patofisiología de la enfermedad; por otra parte, la sobreexpresión citosólica de Cu,ZnSOD no induce cambio positivo ni negativo en los ratones, sin embargo, anteriormente se había descrito una hipersensibilidad al estrés oxidativo en ratones transgénicos, donde el nivel de expresión de Cu,ZnSOD se relacionaba de forma directamente proporcional con los niveles de peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas (dos efectos de la acción del estrés oxidativo) (Seznec *et al.* 2005).

De forma similar a estos resultados, en el modelo de AF en *D. melanogaster* publicado por Anderson *et al.* (2005), se sugiere una contribución mínima del estrés oxidativo y/o de las especies reactivas del oxígeno, a los fenotipos encontrados en los individuos mutantes por interferencia para *fh*. Basan esta conclusión en que la sobreexpresión de los genes *Sod1*, *Sod2* o *Cat* no recupera los fenotipos de las moscas con problemas de eclosión de la pupa y de viabilidad.

Nuestro modelo, sin embargo, sí muestra un fenotipo fuertemente ligado al estrés oxidativo. Al someter a los individuos a condiciones de hiperoxia, los mutantes muestran una gran reducción de la supervivencia además de mantenerse prácticamente inmóviles. Por otro lado, en los individuos mantenidos en condiciones de hiperoxia, se detecta la bajada de la actividad aconitasa y la reducción de la respiración, cuando se parte de intermediarios del ciclo de Krebs, lo que lleva a concluir que el estrés oxidativo, sí que tiene una gran importancia en el desarrollo de la enfermedad, de acuerdo con otros trabajos citados anteriormente.

En este sentido, se ha visto que la expresión ectópica de enzimas que eliminan el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), suprime los fenotipos asociados a la deficiencia de frataxina en *Drosophila* (Anderson *et al.* 2008). El aumento de la catalasa endógena restaura la actividad de los enzimas mitocondriales sensibles a las especies reactivas del oxígeno, como es la aconitasa, en individuos con deficiencia de frataxina. Teniendo en cuenta las reacciones de Haber-Weiss y de Fenton (Figura D2), esto es explicable ya que al sobreexpresar las *Sod* se eliminaría el anión superóxido, pero se formaría peróxido de hidrógeno que puede reaccionar con el hierro ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) formando grupos hidroxilo muy reactivos. El aumento de la expresión de la catalasa actuaría eliminando el peróxido de hidrógeno y se mejoraría el fenotipo



**Figura D2.** (A) Reacción de Haber-Weiss. Esta reacción genera radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno y radicales superóxido. Esta reacción está catalizada por hierro. (B) Reacción de Fenton. En esta reacción el hierro ferroso es oxidado por peróxido de hidrógeno a hierro férrico y éste es reducido a hierro ferroso produciendo un radical peróxido.

## ***2. La sobreexpresión del gen FXN produce un fenotipo muy similar al de la sobreexpresión y la interferencia del gen fh***

Se han realizado muchos trabajos donde se estudia el efecto de la reducción de la frataxina; sin embargo, tan sólo unos pocos han estudiado los efectos de la sobreexpresión de esta proteína. Estos estudios, además de darnos más pistas para entender la función de la frataxina, también nos pueden ayudar en el desarrollo de nuevas aproximaciones a la terapia génica.

Los estudios realizados en cultivo de células de mamífero que sobreexpresan el gen *FXN* demuestran que la sobreexpresión induce la activación de la cadena OXPHOS y la producción de energía, coincidiendo con que los niveles bajos de frataxina reducen la producción de ATP, además de causar la alteración del metabolismo del hierro (Ristow *et al.* 2000); también demuestran que la frataxina ejerce propiedades antioxidantes, ya que induce la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, protegiendo a las células del daño oxidativo (Shoichet *et al.* 2002). Por otro lado, cuando se sobreexpresa el gen humano *FXN* en ratón, entre 2 y más de 10 veces, en los órganos donde la expresión de frataxina es normalmente mayor que en el resto del organismo, como el corazón (de 3 a 6 veces), cerebro (de 0 a 3 veces), músculo (de 3 a 6 veces) y páncreas (más de 10 veces), su efecto es inocuo a nivel de fenotipo externo y de comportamiento (Miranda *et al.* 2004).

Por el contrario, la sobreexpresión del gen humano *FXN* en *D. melanogaster*, provoca la aparición de los mismos fenotipos que la sobreexpresión del propio gen de *Drosophila* (*fh*). De hecho, la sobreexpresión de *FXN* en el patrón determinado por las líneas *da*, *actin* y *24B*, produce letalidad, como la sobreexpresión del gen endógeno *fh* (Navarro, 2005 y Llorens *et al.* 2007). Según los resultados obtenidos en el análisis inmunohistoquímico de los embriones sobreexpresados con *da*-GAL4 y *actin*-GAL4, el incremento de la expresión del gen *FXN* no afecta al desarrollo embrionario del SNC, y el efecto sobre el sistema muscular se concentra en algunas fibras musculares. Estos resultados coinciden con los observados en la sobreexpresión del gen *fh*.

Respecto al sistema cardiaco, no existen alteraciones visibles en ninguno de los dos genotipos. Las alteraciones más importantes se presentan en el SNP y son características de la modificación del proceso normal de diferenciación neuronal: aparece una gran desestructuración de los axones sensoriales, al igual que con la sobreexpresión del gen *fh*, pero mucho más fuerte.

La sobreexpresión del gen *FXN* en un patrón de expresión mesodérmico, utilizando la línea *24B*, muestra un fenotipo de letalidad que puede estar relacionado con la alta desorganización muscular observada en los embriones. Estos mantienen un SNC aparentemente normal, mientras que en el SNP se detecta una fuerte desorganización. Este resultado concuerda con el obtenido al utilizar una línea de expresión en el sistema nervioso periférico; cuando *FXN* se expresa en las células de los precursores de los órganos sensoriales, los mutantes no consiguen escalar, y muestran una drástica reducción de la vida máxima y la vida media. Este resultado, aunque más potente, también concuerda con los obtenidos con la sobreexpresión del gen ortólogo en *Drosophila*, el gen *fh*.

En líneas generales, el efecto de la sobreexpresión de *FXN* en *Drosophila* difiere bastante de lo que ocurre en cultivo celular y en ratón. La explicación más plausible para esta diferencia es que un pequeño aumento de la expresión de frataxina produciría efectos beneficiosos para el organismo, mientras que una mayor sobreexpresión generaría una disfuncionalidad del sistema (posiblemente afectando al ciclo de Krebs y otras rutas metabólicas) y, por consiguiente, un defecto en los diferentes sistemas del organismo. En nuestro caso, el nivel de sobreexpresión de *FXN* es de 17 veces, comparado con la expresión endógena de *fh*, mientras que la sobreexpresión de *fh* es de 9 veces (Llorens *et al.* 2007). A favor de esta hipótesis están los resultados obtenidos recientemente en *Drosophila*. La sobreexpresión moderada (de unas 4 veces) de *fh* permite una mayor tolerancia al estrés oxidativo producido por el hierro (Runko *et al.* 2008). Por lo tanto, la sobreexpresión moderada de frataxina en la mitocondria podría mitigar el estrés oxidativo inducido por el acúmulo de hierro. Además, se ha comprobado que dicha tolerancia al estrés oxidativo está relacionada directamente con la actividad antioxidante. Estos resultados implican que la sobreexpresión moderada de frataxina protegería a los individuos del estrés oxidativo mediante el incremento de la capacidad antioxidante, permitiendo una mayor viabilidad en tales condiciones. En cambio, la sobreexpresión de la frataxina a niveles elevados, que estarían en torno a 9 veces más en *Drosophila*, tiene un efecto perjudicial. Es posible que frataxina sea capaz de secuestrar aquellas proteínas con la que se ha propuesto que interacciona, impidiendo que éstas ejerzan su función de forma normal.

Es curioso que se obtengan los mismos fenotipos cuando se sobreexpresa el gen *FXN*, o el gen *fh*, que cuando éste es interferido. A nivel bioquímico también se produce una reducción de la actividad aconitasa, en todos los casos; esto sugiere que un exceso de la frataxina induciría defectos en *Drosophila*, probablemente relacionados con defectos en la aconitasa, como ocurre con la disminución de la función de la frataxina. La inactivación de la

aconitasa comprometería la actividad del ciclo de Krebs y por tanto, el suministro energético proporcionado por la cadena de transporte de electrones, produciendo letalidad cuando la sobreexpresión se da de forma generalizada desde los estadios embrionarios. Esto explicaría el paralelismo observado entre la sobreexpresión y la interferencia de frataxina en *Drosophila*.

La síntesis de aconitasa requiere de la formación de un centro Fe/S [4Fe-4S] para realizar su función y dicha formación podría estar afectada si existe una limitación en la disponibilidad de hierro en el medio. Se ha descrito que la sobreexpresión de la ferritina mitocondrial, una proteína involucrada en el metabolismo del hierro de la célula, inhibe la actividad de la aconitasa mitocondrial (Nie *et al.* 2005). Por otra parte, se ha demostrado que, *in vitro*, la frataxina forma agregados multiméricos (Adamec *et al.* 2000) cuya estructura podría ser similar a las macromoléculas que forma la ferritina. Por lo tanto, la sobreexpresión de la frataxina podría inducir, *in vivo*, una nueva función, siendo responsable, en parte, del secuestro del hierro e impidiendo su disponibilidad en la mitocondria, lo que provocaría una menor actividad de la aconitasa. Alternativamente, el exceso de frataxina podría saturar a alguna de las proteínas con las que interacciona. Se han descrito, en otros modelos, las interacciones físicas entre la frataxina y la SDH, la propia aconitasa, la ferroquelatasa o la proteína Isu1 (Gonzalez-Cabo *et al.* 2005, Bulteau *et al.* 2004, Yoon *et al.* 2004 y Gerber *et al.* 2003). Estos genes también se han descrito en *Drosophila* (Drysdale *et al.* 2005) y dado que nuestros resultados apoyan la posible interacción con la aconitasa, también cabe esperar interacciones con las otras proteínas. Esta interpretación implica que la sobreexpresión actuase como una mutación dominante negativa, lo que comportaría una disfunción del ciclo de Krebs, de la cadena respiratoria y/o la maquinaria de síntesis de los centros Fe/S, provocando una debacle energética.

En resumen, los resultados de este trabajo, nos permiten afirmar que las funciones de la frataxina humana y la de *Drosophila melanogaster* están conservadas, apoyando el uso de *D. melanogaster* como organismo modelo, tanto para el estudio de la función de la frataxina como para el ensayo de posibles tratamientos para los pacientes de ataxia de Friedreich. La utilización de *D. melanogaster* permitirá realizar rastreos, rápidos y a gran escala, en quimiotecas, para encontrar nuevas moléculas terapéuticas que mejoren los fenotipos más visibles en nuestro modelo, cubriendo así el paso intermedio entre los ensayos *in vitro* y los ensayos en mamíferos previos a las fases clínicas de la investigación farmacológica



*Conclusiones*

## Conclusiones

1. La proteína frataxina de *Drosophila melanogaster* se localiza en la mitocondria como en el resto de organismos eucariotas, por lo que podría desempeñar la misma función en todos ellos.
2. La reducción de la expresión del gen *fh*, de forma generalizada manteniendo el 33% del nivel de la expresión normal, es compatible con un desarrollo embrionario aparentemente normal. No obstante, bajo estas condiciones los adultos muestran una reducción del 45% en su capacidad locomotora y una reducción del 60% de la vida media y del 32% de la vida máxima.
3. Los mutantes funcionales del gen *fh* son muy sensibles al estrés oxidativo. Bajo condiciones de hiperoxia, las moscas prácticamente no se mueven y han reducido en un 44% la vida máxima que presentan los controles en estas condiciones.
4. La actividad de la enzima succinato deshidrogenasa no varía con la edad de los adultos en condiciones de normoxia, ni tampoco en moscas de 1 día mantenidas durante 24h. en hiperoxia, tanto en los mutantes funcionales como en los controles.
5. La actividad hidratasa de la aconitasa disminuye con la edad en los mutantes funcionales en condiciones de normoxia, como ocurre en los controles. No obstante, en condiciones de hiperoxia esta actividad sufre una mayor reducción en los mutantes funcionales del gen *fh*.
6. Los complejos respiratorios mitocondriales trabajan normalmente en los mutantes funcionales, tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hiperoxia. Sólo se produce reducción del consumo de oxígeno cuando éste se mide a partir de la activación del ciclo de Krebs, en condiciones de hiperoxia, lo que confirma el defecto en la actividad de la aconitasa y apoya la hipótesis de frataxina como chaperona de esta enzima.
7. La sobreexpresión generalizada del gen *FXN*, a niveles 17 veces superiores respecto del nivel de expresión del gen *fh*, produce letalidad en fases preadultas en *Drosophila*. Esto es fruto de las importantes alteraciones musculares y anomalías de las proyecciones axonales sensoriales identificadas en los embriones.

8. Se ha identificado una diferente sensibilidad de los distintos tejidos de *Drosophila* a la sobreexpresión del gen *FXN*. La sobreexpresión en músculo es letal, mientras que no lo es ni en corazón y ni en sistema nervioso. Para el caso del SNP, se ha visto que los adultos no son capaces de escalar y tienen muy disminuida su longevidad.
9. La sobreexpresión del gen *FXN* produce un efecto muy similar al de la sobreexpresión e interferencia del gen *fh*, que a nivel bioquímico implica la reducción de la actividad aconitasa en los tres casos. Esto permite concluir que las funciones de la frataxina humana y de la frataxina de *Drosophila* deben ser muy similares.
10. El estrés oxidativo tiene un papel clave en el mecanismo fisiopatológico de la ataxia de Friedreich, siendo la aconitasa una enzima muy sensible a los desequilibrios del nivel de frataxina.
11. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la idoneidad de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para el estudio de la ataxia de Friedreich.

## *Bibliografía*

## ***Bibliografía***

**Adam, A. C., Bornhovd, C., Prokisch, H., Neupert, W. and Hell, K.** (2006). The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *Embo J* **25**, 174-83.

**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**, 549-62.

**Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A. S., Martin, S. and Pastore, A.** (2002). A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet* **11**, 1865-77.

**Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M. B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J. M., King, R. et al.** (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* **88**, 580-90.

**Anderson, P. R., Kirby, K., Hilliker, A. J. and Phillips, J. P.** (2005). RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* **14**, 3397-405.

**Anderson, P. R., Kirby, K., Orr, W. C., Hilliker, A. J. and Phillips, J. P.** (2008). Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 611-6.

**Ashburner, M., Golic, K. and Scout, R.** (2004). *Drosophila a Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbour Press.

**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**, 1709-12.

**Barja, G.** (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 347-66.

**Beinert, H., Kennedy, M. C. and Stout, C. D.** (1996). Aconitase as Ironminusulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem Rev* **96**, 2335-2374.

**Bencze, K. Z., Kondapalli, K. C., Cook, J. D., McMahon, S., Millan-Pacheco, C., Pastor, N. and Stemmler, T. L.** (2006). The structure and function of frataxin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**, 269-91.

**Bidichandani, S. I., Ashizawa, T. and Patel, P. I.** (1998). The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet* **62**, 111-21.

**Blanca, J.** (2001). Caracterización y análisis molecular de la zona homóloga, en *D. melanogaster*, al gen responsable de la ataxia de Friedreich. *Tesis Doctoral*.

**Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T. M. and Dennis Chasteen, N.** (2004). Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **341**, 605-15.

**Bradley, J. L., Blake, J. C., Chamberlain, S., Thomas, P. K., Cooper, J. M. and Schapira, A. H.** (2000). Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* **9**, 275-82.

**Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.

**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**, 22763-9.

**Branda, S. S., Yang, Z. Y., Chew, A. and Isaya, G.** (1999). Mitochondrial intermediate peptidase and the yeast frataxin homolog together maintain mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* **8**, 1099-110.

**Brazzolotto, X., Gaillard, J., Pantopoulos, K., Hentze, M. W. and Moulis, J. M.** (1999). Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J Biol Chem* **274**, 21625-30.

**Bulteau, A. L., Ikeda-Saito, M. and Szweda, L. I.** (2003). Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* **42**, 14846-55.

**Bulteau, A. L., Lundberg, K. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. and Szweda, L. I.** (2005). Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5987-91.

**Bulteau, A. L., O'Neill, H. A., Kennedy, M. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. and Swzeda, L. I.** (2004). Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**, 242-5.

**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**, 1771-80.

**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**, 1423-7.

**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.

**Cauchi, R. J. and van den Heuvel, M.** (2006). The fly as a model for neurodegenerative diseases: is it worth the jump? *Neurodegener Dis* **3**, 338-56.

**Cavadini, P., Gellera, C., Patel, P. I. and Isaya, G.** (2000). Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* **9**, 2523-30.

**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**, 217-27.

**Celotto, A. M. and Palladino, M. J.** (2005). Drosophila: a "model" model system to study neurodegeneration. *Mol Interv* **5**, 292-303.

**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**, 248-50.

**Chamberlain, S., Worrall, C. and Williamson, R.** (1988). Attempts to identify the chromosomal localization of the Friedreich's ataxia locus. *Adv Neurol* **48**, 257-60.

**Chantrel-Groussard, K., Geromel, V., Puccio, H., Koenig, M., Munnich, A., Rotig, A. and Rustin, P.** (2001). Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* **10**, 2061-7.

**Chappell, J. B. and Crofts, A. R.** (1965). Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J* **95**, 378-86.

**Chen, O. S., Crisp, R. J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D. R. and Kaplan, J.** (2004). Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 29513-8.

**Chen, O. S., Hemenway, S. and Kaplan, J.** (2002). Genetic analysis of iron citrate toxicity in yeast: implications for mammalian iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16922-7.

**Chernyak, B. V.** (1997). Redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Biosci Rep* **17**, 293-302.

**Chiang, A., O'Connor, M. B., Paro, R., Simon, J. and Bender, W.** (1995). Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development* **121**, 1681-9.

**Cho, S. J., Lee, M. G., Yang, J. K., Lee, J. Y., Song, H. K. and Suh, S. W.** (2000). Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8932-7.

**Clark, R. M., De Biase, I., Malykhina, A. P., Al-Mahdawi, S., Pook, M. and Bidichandani, S. I.** (2007). The GAA triplet-repeat is unstable in the context of the human FXN locus and displays age-dependent expansions in cerebellum and DRG in a transgenic mouse model. *Hum Genet* **120**, 633-40.

**Cook, J. D., Bencze, K. Z., Jankovic, A. D., Crater, A. K., Busch, C. N., Bradley, P. B., Stemmler, A. J., Spaller, M. R. and Stemmler, T. L.** (2006). Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry* **45**, 7767-77.

**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**, 337-8.

**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**, 1219-26.



**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**, 7452-7.

**Das, N., Levine, R. L., Orr, W. C. and Sohal, R. S.** (2001). Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* **360**, 209-16.

**Delatycki, M. B., Camakaris, J., Brooks, H., Evans-Whipp, T., Thorburn, D. R., Williamson, R. and Forrest, S. M.** (1999). Direct evidence that mitochondrial iron accumulation occurs in Friedreich ataxia. *Ann Neurol* **45**, 673-5.

**Delatycki, M. B., Williamson, R. and Forrest, S. M.** (2000). Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet* **37**, 1-8.

**Delaval, E., Perichon, M. and Friguet, B.** (2004). Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *Eur J Biochem* **271**, 4559-64.

**Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y. I., Ristow, M. and Shoelson, S. E.** (2000). Crystal structure of human frataxin. *J Biol Chem* **275**, 30753-6.

**Di Prospero, N. A. and Fischbeck, K. H.** (2005). Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *Nat Rev Genet* **6**, 756-65.

**Drysdale, R. A. and Crosby, M. A.** (2005). FlyBase: genes and gene models. *Nucleic Acids Res* **33**, D390-5.

**Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J. and Lutz, T.** (2002). A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet* **11**, 2635-43.

**Duffy, J. B.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.

**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**, 1169-75.

**Emond, M., Lepage, G., Vanasse, M. and Pandolfo, M.** (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* **55**, 1752-3.

- Engström, Y., Schneuwly S., Gehring, W.** (1992). Spatial and temporal expression of an Antennapedia/LacZ gene construct integrated into the endogenous Antennapedia gene of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **201**, 65-80.
- Fauvarque, M. O. and Dura, J. M.** (1993). polyhomeotic regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in *Drosophila*. *Genes Dev* **7**, 1508-20.
- Fortier, E. and Belote, J. M.** (2000). Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis* **26**, 240-4.
- Foury, F.** (1999). Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett* **456**, 281-4.
- 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**, 373-7.
- Friedreich, N.** (1863). Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* **27**, 1-26.
- Friedreich, N.** (1863). Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* **26**.
- Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A. M., Twesten, R. D., Owen, W. G. and Isaya, G.** (2002). Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* **41**, 6798-804.
- Gardner, P. R.** (1997). Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Biosci Rep* **17**, 33-42.
- Gardner, P. R. and Fridovich, I.** (1992). Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J Biol Chem* **267**, 8757-63.
- Gardner, P. R., Nguyen, D. D. and White, C. W.** (1994). Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12248-52.
- Gatchel, J. R. and Zoghbi, H. Y.** (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* **6**, 743-55.

**Gella, F. J., Olivella, M. T., Pegueroles, F. and Gener, J.** (1981). Colorimetry of diaphorase in commercial preparations and clinical chemical reagents by use of tetrazolium salts. *Clin Chem* **27**, 1686-9.

**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**, 906-11.

**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**, 465-8.

**Gille, J. J. and Joenje, H.** (1992). Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat Res* **275**, 405-14.

**Gimenez-Cassina, A., Lim, F. and Diaz-Nido, J.** (2006). Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res* **84**, 755-67.

**Gonzalez-Cabo, P., Vazquez-Manrique, R. P., Garcia-Gimeno, M. A., Sanz, P. and Palau, F.** (2005). Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet* **14**, 2091-8.

**Gordon, D. M., Kogan, M., Knight, S. A., Dancis, A. and Pain, D.** (2001). Distinct roles for two N-terminal cleaved domains in mitochondrial import of the yeast frataxin homolog, Yfh1p. *Hum Mol Genet* **10**, 259-69.

**Grabczyk, E. and Fishman, M. C.** (1995). A long purine-pyrimidine homopolymer acts as a transcriptional diode. *J Biol Chem* **270**, 1791-7.

**Grabczyk, E., Mancuso, M. and Sammarco, M. C.** (2007). A persistent RNA.DNA hybrid formed by transcription of the Friedreich ataxia triplet repeat in live bacteria, and by T7 RNAP in vitro. *Nucleic Acids Res* **35**, 5351-9.

**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**, 2815-22.

**Greene, E., Mahishi, L., Entezam, A., Kumari, D. and Usdin, K.** (2007). Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res* **35**, 3383-90.

- Hama, C., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1990). Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter. *Genes Dev* **4**, 1079-93.
- Harding, A. E.** (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* **104**, 589-620.
- Hause, A. O., Aggoun, Y., Bonnet, D., Sidi, D., Munnich, A., Rotig, A. and Rustin, P.** (2002). Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart* **87**, 346-9.
- He, Y., Alam, S. L., Proteasa, S. V., Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A. and Stemmler, T. L.** (2004). Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferrochelatase interaction. *Biochemistry* **43**, 16254-62.
- Horton, J. W. and Borman, K. R.** (1987). Possible role of oxygen-derived, free radicals in cardiocirculatory shock. *Surg Gynecol Obstet* **165**, 293-300.
- Huynen, M. A., Snel, B., Bork, P. and Gibson, T. J.** (2001). The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum Mol Genet* **10**, 2463-8.
- Irazusta, V., Cabiscol, E., Reverter-Branchat, G., Ros, J. and Tamarit, J.** (2006). Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *J Biol Chem* **281**, 12227-32.
- Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E. and Boveris, A.** (1986). The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* **48**, 703-19.
- Janero, D. R. and Hreniuk, D.** (1996). Suppression of TCA cycle activity in the cardiac muscle cell by hydroperoxide-induced oxidant stress. *Am J Physiol* **270**, C1735-42.
- Junakovic, N. and Ballario, P.** (1984). Circular extrachromosomal copia-like transposable elements in *Drosophila* tissue culture cells. *Plasmid* **11**, 109-15.
- Karthikeyan, G., Lewis, L. K. and Resnick, M. A.** (2002). The mitochondrial protein frataxin prevents nuclear damage. *Hum Mol Genet* **11**, 1351-62.
- Karthikeyan, G., Santos, J. H., Graziewicz, M. A., Copeland, W. C., Isaya, G., Van Houten, B. and Resnick, M. A.** (2003). Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Hum Mol Genet* **12**, 3331-42.

**Kassis, J. A., Noll, E., VanSickle, E. P., Odenwald, W. F. and Perrimon, N.** (1992). Altering the insertional specificity of a *Drosophila* transposable element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1919-23.

**Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**, 896-8.

**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**, 3981-9.

**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**, 18389-93.

**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**, 345-51.

**Kroemer, G.** (1998). The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ* **5**, 547.

**Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M.** (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**, 619-42.

**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**, 389-96.

**Lee, M. G., Cho, S. J., Yang, J. K., Song, H. K. and Suh, S. W.** (2000). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Escherichia coli* CyaY, a structural homologue of human frataxin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 920-1.

**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**, 879-89.

**Levi, S. and Arosio, P.** (2004). Mitochondrial ferritin. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1887-9.

**Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-89.

**Lill, R. and Muhlenhoff, U.** (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 457-86.

**Llorens, J. V., Navarro, J. A., Martinez-Sebastian, M. J., Baylies, M. K., Schneuwly, S., Botella, J. A. and Molto, M. D.** (2007). Causative role of oxidative stress in a Drosophila model of Friedreich ataxia. *Faseb J* **21**, 333-44.

**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**, 11492-5.

**Martinek, S. and Young, M. W.** (2000). Specific genetic interference with behavioral rhythms in Drosophila by expression of inverted repeats. *Genetics* **156**, 1717-25.

**McGuire, S. E., Roman, G. and Davis, R. L.** (2004). Gene expression systems in Drosophila: a synthesis of time and space. *Trends Genet* **20**, 384-91.

**Miranda, C. J., Santos, M. M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossee, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J. et al.** (2002). Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett* **512**, 291-7.

**Miranda, C. J., Santos, M. M., Ohshima, K., Tessaro, M., Sequeiros, J. and Pandolfo, M.** (2004). Frataxin overexpressing mice. *FEBS Lett* **572**, 281-8.

**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**, 4815-25.

**Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G. and Lill, R.** (2002). The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* **11**, 2025-36.

**Munujos, P., Coll-Canti, J., Gonzalez-Sastre, F. and Gella, F. J.** (1993). Assay of succinate dehydrogenase activity by a colorimetric-continuous method using iodonitrotetrazolium chloride as electron acceptor. *Anal Biochem* **212**, 506-9.

**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* **8**, 695-707.

**Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P. and Pastore, A.** (2004). Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure* **12**, 2037-48.

**Navarro, J. A.** (2005). Obtención y caracterización de mutantes funcionales del gen frataxin homologue (fh) en *Drosophila*. *Tesis Doctoral*.

**Nie, G., Sheftel, A. D., Kim, S. F. and Ponka, P.** (2005). Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis. *Blood* **105**, 2161-7.

**O'Neill, H. A., Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S. M., Sampson, M., Ferreira, G. C. and Isaya, G.** (2005). Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry* **44**, 537-45.

**Pandolfo, M.** (2006). Iron and Friedreich ataxia. *J Neural Transm Suppl*, 143-6.

**Pandolfo, M.** (2008). Drug Insight: antioxidant therapy in inherited ataxias. *Nat Clin Pract Neurol* **4**, 86-96.

**Park, S., Gakh, O., Mooney, S. M. and Isaya, G.** (2002). The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J Biol Chem* **277**, 38589-95.

**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**, 31340-51.

**Pianese, L., Busino, L., De Biase, I., De Cristofaro, T., Lo Casale, M. S., Giuliano, P., Monticelli, A., Turano, M., Criscuolo, C., Filla, A. et al.** (2002). Up-regulation of c-Jun N-terminal kinase pathway in Friedreich's ataxia cells. *Hum Mol Genet* **11**, 2989-96.

**Pianese, L., Turano, M., Lo Casale, M. S., De Biase, I., Giacchetti, M., Monticelli, A., Criscuolo, C., Filla, A. and Coccozza, S.** (2004). Real time PCR quantification of frataxin mRNA in the peripheral blood leucocytes of Friedreich ataxia patients and carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**, 1061-3.

**Piccin, A., Salameh, A., Benna, C., Sandrelli, F., Mazzotta, G., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C. P. and Costa, R.** (2001). Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res* **29**, E55-5.

**Prabhu, H. R. and Krishnamurthy, S.** (1993). Ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. *Indian J Biochem Biophys* **30**, 289-92.

- 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**, 265-9.
- 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**, 181-6.
- 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**, 215-20.
- Rea, S. L., Ventura, N. and Johnson, T. E.** (2007). Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* **5**, e259.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E.** (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* **11**, 1114-25.
- Ristow, M., Mulder, H., Pomplun, D., Schulz, T. J., Muller-Schmehl, K., Krause, A., Fex, M., Puccio, H., Muller, J., Isken, F. et al.** (2003). Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J Clin Invest* **112**, 527-34.
- 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**, 12239-43.
- 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**, 215-7.
- Rubin, G. M. and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W. et al.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-15.



**Runko, A. P., Griswold, A. J. and Min, K. T.** (2008). Overexpression of frataxin in the mitochondria increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *FEBS Lett* **582**, 715-9.

**Rustin, P., von Kleist-Retzow, J. C., Chantrel-Groussard, K., Sidi, D., Munnich, A. and Rotig, A.** (1999). Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* **354**, 477-9.

**Sakamoto, N., Ohshima, K., Montermini, L., Pandolfo, M. and Wells, R. D.** (2001). Sticky DNA, a self-associated complex formed at long GAA\*TTC repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription. *J Biol Chem* **276**, 27171-7.

**Sambrook, J. and Russell, D.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. . New York, USA, Cold Spring Harbour Press.

**Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.

**Santos, M. M., Ohshima, K. and Pandolfo, M.** (2001). Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum Mol Genet* **10**, 1935-44.

**Sarsero, J. P., Holloway, T. P., Li, L., McLenachan, S., Fowler, K. J., Bertencello, I., Voullaire, L., Gazeas, S. and Ioannou, P. A.** (2005). Evaluation of an FRDA-EGFP genomic reporter assay in transgenic mice. *Mamm Genome* **16**, 228-41.

**Sarsero, J. P., Li, L., Wardan, H., Sitte, K., Williamson, R. and Ioannou, P. A.** (2003). Upregulation of expression from the FRDA genomic locus for the therapy of Friedreich ataxia. *J Gene Med* **5**, 72-81.

**Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z. and Festenstein, R.** (2003). DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* **422**, 909-13.

**Sazanov, L. A. and Hinchliffe, P.** (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430-6.

**Schulz, J. B., Dehmer, T., Schols, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., Burk, K., Matson, W., Dichgans, J., Beal, M. F. et al.** (2000). Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* **55**, 1719-21.

**Schulz, T. J., Thierbach, R., Voigt, A., Drewes, G., Mietzner, B., Steinberg, P., Pfeiffer, A. F. and Ristow, M.** (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* **281**, 977-81.

**Seznec, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., Procaccio, V., Patel, M., Drapier, J. C., Koenig, M. et al.** (2005). Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum Mol Genet* **14**, 463-74.

**Shoichet, S. A., Baumer, A. T., Stamenkovic, D., Sauer, H., Pfeiffer, A. F., Kahn, C. R., Muller-Wieland, D., Richter, C. and Ristow, M.** (2002). Frataxin promotes antioxidant defense in a thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation in vitro. *Hum Mol Genet* **11**, 815-21.

**Son, L. S., Bacolla, A. and Wells, R. D.** (2006). Sticky DNA: in vivo formation in *E. coli* and in vitro association of long GAA\*TTC tracts to generate two independent supercoiled domains. *J Mol Biol* **360**, 267-84.

**Stehling, O., Elsasser, H. P., Bruckel, B., Muhlenhoff, U. and Lill, R.** (2004). Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum Mol Genet* **13**, 3007-15.

**Taillebourg, E. and Dura, J. M.** (1999). A novel mechanism for P element homing in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6856-61.

**Thierbach, R., Schulz, T. J., Isken, F., Voigt, A., Mietzner, B., Drewes, G., von Kleist-Retzow, J. C., Wiesner, R. J., Magnuson, M. A., Puccio, H. et al.** (2005). Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* **14**, 3857-64.

**Tong, W. H. and Rouault, T. A.** (2006). Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab* **3**, 199-210.

**Turrens, J. F. and Boveris, A.** (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* **191**, 421-7.

**Turrens, J. F., Freeman, B. A. and Crapo, J. D.** (1982). Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys* **217**, 411-21.

**Turrens, J. F., Freeman, B. A., Levitt, J. G. and Crapo, J. D.** (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* **217**, 401-10.

**Vasquez, K. M. and Wilson, J. H.** (1998). Triplex-directed modification of genes and gene activity. *Trends Biochem Sci* **23**, 4-9.

**Vazquez-Manrique, R. P., Gonzalez-Cabo, P., Ros, S., Aziz, H., Baylis, H. A. and Palau, F.** (2006). Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *Faseb J* **20**, 172-4.

**Ventura, N., Rea, S., Henderson, S. T., Condo, I., Johnson, T. E. and Testi, R.** (2005). Reduced expression of frataxin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **4**, 109-12.

**Vivas, E., Skovran, E. and Downs, D. M.** (2006). *Salmonella enterica* strains lacking the frataxin homolog CyaY show defects in Fe-S cluster metabolism in vivo. *J Bacteriol* **188**, 1175-9.

**Vorgerd, M., Schols, L., Hardt, C., Ristow, M., Epplen, J. T. and Zange, J.** (2000). Mitochondrial impairment of human muscle in Friedreich ataxia in vivo. *Neuromuscul Disord* **10**, 430-5.

**Wang, Y. H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R. D. and Griffith, J. D.** (1994). Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* **265**, 669-71.

**Wells, R. D.** (2008). DNA triplexes and Friedreich ataxia. *Faseb J* **22**, 1625-34.

**Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Muller, H., Lohaus, C., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Meisinger, C., Muhlenhoff, U., Lill, R. et al.** (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *Embo J* **25**, 184-95.

**Williams, G. J., Stephens, M. R. and Muir, J. R.** (1974). Proceedings: Influence of acidosis on ATP hydrolysis by contractile proteins of cardiac muscle. *Br Heart J* **36**, 401.

**Wilson, R. B.** (2003). Frataxin and frataxin deficiency in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* **207**, 103-5.

**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**, 352-7.

- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. and Cortopassi, G.** (1999). The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet* **8**, 425-30.
- Yan, L. J., Levine, R. L. and Sohal, R. S.** (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11168-72.
- Yarian, C. S., Rebrin, I. and Sohal, R. S.** (2005). Aconitase and ATP synthase are targets of malondialdehyde modification and undergo an age-related decrease in activity in mouse heart mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 151-6.
- Yarian, C. S. and Sohal, R. S.** (2005). In the aging housefly aconitase is the only citric acid cycle enzyme to decline significantly. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 91-6.
- Yarian, C. S., Toroser, D. and Sohal, R. S.** (2006). Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mech Ageing Dev* **127**, 79-84.
- 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**, 6078-84.
- Yoon, T. and Cowan, J. A.** (2004). Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 25943-6.
- Zahavi, M. and Tahori, A. S.** (1965). Citric acid accumulation with age in houseflies and other Diptera. *J Insect Physiol* **11**, 811-6.
- Zarse, K., Schulz, T. J., Birringer, M. and Ristow, M.** (2007). Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in *Caenorhabditis elegans* models of Friedreich Ataxia. *Faseb J* **21**, 1271-5.