

Universitat de Lleida

L'atàxia de Friedreich: estudi del dèficit de frataxina en miòcits cardíacs

Èlia Obis Monné

Dipòsit Legal: L.872-2015

<http://hdl.handle.net/10803/300437>



L'atàxia de Friedreich: estudi del dèficit de frataxina en miòcits cardíacs està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

(c) 2015, Èlia Obis Monné



Universitat de Lleida



L'ATÀXIA DE FRIEDREICH

Estudi del dèficit de frataxina en miòcits cardíacs

Èlia Obis Monné

2014



Universitat de Lleida



L'ATÀXIA DE FRIEDREICH

Estudi del dèficit de frataxina en miòcits cardíacs

Èlia Obis Monné

2014

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR PER LA
UNIVERSITAT DE LLEIDA

Directors de la Tesi

Jordi Tamarit Sumalla

Joaquim Ros Salvador

RESUM · RESUMEN · ABSTRACT

RESUM

L'atàxia de Friedreich és una malaltia neurodegenerativa hereditària que causa problemes en la marxa i el llenguatge i que sol anar associada a una miocardiopatia. Generalment els símptomes comencen durant la pubertat i solen ser neurològics. A vegades, però, els primers símptomes poden ser dolor toràcic, dificultat respiratòria i palpitations, que són resultat de la malaltia cardíaca. De fet, la miocardiopatia és la causa principal de mort dels pacients d'atàxia de Friedreich. Tot i així, hi ha pocs estudis que es centrin en els problemes cardíacs en comparació amb la gran quantitat d'estudis publicats sobre la patologia neuronal. La base genètica de la malaltia és la mutació del gen FXN al cromosoma 9, que dóna com a producte la frataxina. La frataxina és una proteïna mitocondrial que s'expressa en major quantitat en teixits amb una taxa metabòlica alta, com el cor. La funció de la frataxina és un tema que encara es debat, però s'ha relacionat amb el metabolisme del ferro i l'estrès oxidatiu.

Amb la finalitat d'estudiar quines eren les conseqüències del dèficit de frataxina en els cardiomiòcits, vam decidir posar a punt un model cel·lular cardíac. Per fer-ho, vam utilitzar miòcits ventriculars de cors de rates nounades i diferents vectors lentivirals per disminuir l'expressió de frataxina. Gràcies a la interferència d'RNA, vam assolir uns nivells de proteïna similars als que presenten els pacients d'aquesta malaltia. D'entrada vam analitzar la viabilitat dels cultius, que no es veia afectada per la deficiència en frataxina. Ara bé, si tractàvem les cèl·lules amb un agent oxidant, els miòcits deficients resultaven ésser més sensibles. A més, també mostraven signes de dany oxidatiu a les proteïnes i un augment dels enzims superòxid-dismutasa. Aquesta situació basal amb un lleu estrès oxidatiu podria estar causada per una sobrecàrrega de ferro. Ara bé, els nivells intracel·lulars de ferro i l'expressió dels mRNA que responen al contingut d'aquest metall eren semblants en els miòcits controls i els deficients en frataxina. També vam mesurar l'activitat i els nivells de la proteïna aconitasa, que conté un centre 4Fe-4S al centre actiu, però no es veia afectada per la manca de frataxina. Tanmateix, en estudiar la disposició i la funció mitocondrial, vam observar que les cèl·lules deficients en frataxina presentaven una distribució anòmala dels mitocondris. Alguns mitocondris, a més, exhibien un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) relativament baix. No obstant, l'anàlisi del

$\Delta\Psi_m$ general amb la sonda TMRM no va donar diferències significatives. Tampoc vam detectar cap dèficit en les activitats dels complexos de la cadena respiratòria ni en el contingut d'ATP. Per altra banda, vam observar una tendència a l'augment de l'ús de glucosa i un augment de metabòlits de rutes alternatives a la oxidació mitocondrial de la glucosa, com són la via de les pentoses fosfat i de la síntesi d'hexosamines. S'ha descrit que durant la hipertròfia cardíaca es dona un canvi en la preferència de substrats energètics i el cor passa d'oxidar àcids grassos a oxidar glucosa. És més, els cardiomiòcits deficientes en frataxina acumulaven gran quantitat d'àcids grassos (AG) en forma de gotes lipídiques (LD de lípid droplets). L'anàlisi metabolòmic revelava l'augment de diverses espècies lipídiques que indicaven l'activació de vies alternatives a la β -oxidació i vies de senyalització pro-fibròtiques, fets que concordaven amb certes dianes de l'estudi proteòmic. Per exemple, els DAG podrien alterar la via de les PKC i aquesta alterar les proteïnes contràctils del sarcòmer, com la miosina i la troponina. En un intent de trobar com la frataxina podria estar modificant aquest processos, vam analitzar si formava complexos amb altres proteïnes mitocondrials. Amb la tècnica electroforètica Blue-Native vam observar un possible complex de la frataxina amb membres del cicle de Krebs, de l'oxidació d'àcids grassos i de la cadena respiratòria. També formava part del complex la transhidrogenasa mitocondrial NNT que produeix NADPH a partir de NADH. Si la frataxina estigués afectant el metabolisme oxidatiu i la producció de NADPH al mitocondri, explicaria l'acumulació de LD i la disfunció bioenergètica així com un augment de l'estrès oxidatiu proteic, ja que el NADPH és un cofactor clau dels sistemes antioxidants.

En definitiva, segons els nostres resultats, la manca de frataxina en miòcits cardíacs alteraria la xarxa mitocondrial i el metabolisme oxidatiu provocant una disfunció contràctil i hipertròfia cardíaca als pacients d'atàxia de Friedreich.

RESUMEN

La ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria que produce problemas en la marcha y el lenguaje y que suele ir asociada a una cardiomiopatía. Generalmente, los síntomas empiezan durante la pubertad y suelen ser neurológicos. A veces, sin embargo, los primeros síntomas pueden ser dolor torácico, dificultad respiratoria y palpitaciones, que son el resultado de la enfermedad cardíaca. De hecho, la cardiomiopatía es la principal causa de muerte de los pacientes con ataxia de Friedreich. A pesar de todo, hay pocos estudios que se centren en los problemas cardíacos en comparación con la gran cantidad de estudios publicados sobre la patología neuronal. La base genética de la enfermedad es la mutación del gen FXN en el cromosoma 9, que da como producto frataxina. La frataxina es una proteína mitocondrial que se expresa en mayor cantidad en tejidos con una tasa metabólica alta, como el corazón. La función de frataxina es un tema controvertido, pero se la ha relacionado con el metabolismo del hierro y el estrés oxidativo.

Con la finalidad de estudiar cuales eran las consecuencias del déficit de frataxina en cardiomiocitos, decidimos poner a punto un modelo celular cardíaco. Para hacerlo, utilizamos miocitos ventriculares de corazones de ratas neonatales y diferentes vectores lentivirales para disminuir la expresión de frataxina. Gracias al empleo del RNA de interferencia, alcanzamos unos niveles de proteína similares a los que presentan los pacientes de esta enfermedad. De entrada analizamos la viabilidad de los cultivos, que no se veía afectada por la deficiencia de frataxina. Sin embargo, si tratábamos las células con un agente oxidante, los miocitos deficientes resultaron ser más sensibles. Además, también mostraron signos de daño oxidativo a las proteínas y un aumento de las enzimas superóxido dismutasa. Esta situación basal con un leve estrés oxidativo podría ser debida a una sobrecarga de hierro. No obstante, los niveles intracelulares de hierro y la expresión de los mRNA que responden al contenido de este metal eran parecidos en los miocitos control y en los deficientes en frataxina. También medimos la actividad y los niveles de la proteína aconitasa, que contiene un centro 4Fe-4S en su centro activo, pero no se veía afectada por la falta de frataxina. Por otra parte, en estudiar la disposición y la función mitocondrial, observamos que las células deficientes en frataxina presentaban una

distribución anómala de las mitocondrias. Algunas mitocondrias, además, exhibían un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) relativamente bajo. No obstante, el análisis del $\Delta\Psi_m$ general con la sonda TMRM no dio diferencias significativas. Tampoco detectamos ningún déficit en las actividades de los complejos de la cadena respiratoria ni en el contenido de ATP. Por otro lado, observamos una tendencia en el aumento de uso de glucosa y un aumento de metabolitos de rutas alternativas a la oxidación mitocondrial de la glucosa, como son la vía de las pentosas fosfato y de la síntesis de hexosaminas. Se ha descrito que durante la hipertrofia cardíaca se da un cambio en la preferencia de sustratos energéticos y el corazón pasa de oxidar ácidos grasos a oxidar glucosa. El análisis metabolómico y lipidómico revelaba el aumento de varias especies lipídicas que indicaban la activación de vías alternativas a la β -oxidación y vías de señalización profibróticas, hechos que concuerdan con ciertas dianas del estudio proteómico. Por ejemplo, los DAG podrían alterar la vía de las PKC y ésta alterar las proteínas contráctiles del sarcómero, como la miosina y la troponina. En un intento de encontrar cómo la frataxina podría estar modificando estos procesos, analizamos si formaba complejos con otras proteínas mitocondriales. Con la técnica electroforética Blue-Native observamos un posible complejo de frataxina con miembros del ciclo de Krebs, de la oxidación de los ácidos grasos y de la cadena respiratoria. También formaba parte del complejo la transhidrogenasa mitocondrial NNT que produce NADPH a partir de NADH. Si la frataxina estuviera afectando al metabolismo oxidativo y a la producción de NADPH en la mitocondria, explicaría la acumulación de lípidos y la disfunción bioenergética así como un aumento del estrés oxidativo proteico, ya que el NADPH es un cofactor clave en los sistemas antioxidantes.

En definitiva, según nuestros resultados, la falta de frataxina en miocitos cardíacos alteraría la red mitocondrial y el metabolismo oxidativo provocando una disfunción contráctil e hipertrofia cardíaca en los pacientes de ataxia de Friedreich.

ABSTRACT

Friedreich's ataxia is an inherited neurodegenerative disorder that causes problems in walking and speech and is often associated with cardiomyopathy. Symptoms usually begin during puberty and tend to be neurological. Sometimes, the first symptoms can be chest pain, shortness of breath and palpitations, which are the result of heart disease. In fact, cardiomyopathy is the leading cause of death in Friedreich's ataxia patients. Nevertheless, there are few studies that focus on heart problems compared with the large number of publications on the neural pathology. The genetic basis of the disease is a mutation in the FXN gene on chromosome 9, which gives frataxin as a product. The mitochondrial protein frataxin is expressed in greater amounts in tissues with high metabolic rate, such as the heart. The function of frataxin is controversial, but has been linked to iron metabolism and oxidative stress.

In order to study which are the consequences of frataxin deficiency in cardiomyocytes, we decided to develop a cardiac cell model. To do so, we used ventricular myocytes from neonatal rat hearts and different lentiviral vectors to reduce frataxin expression. By using RNA interference, we reached protein levels similar to those presented by patients having this disease. We first analyzed the viability of cell cultures, which was not affected by frataxin deficiency. Nevertheless, frataxin deficient myocytes were more sensitive to oxidizing agents. In addition, they showed signs of protein oxidative damage and increased levels of superoxide dismutase enzymes. This mild oxidative stress was not caused by iron overload because intracellular iron levels and expression of mRNAs that respond to this metal were similar in controls and frataxin deficient myocytes. Also, the activity and protein levels of aconitase, which contains a 4Fe-4S center in the active site, was not affected by frataxin deficiency. In contrast, when studying mitochondrial layout and function, we observed that frataxin deficient cells showed an abnormal distribution of mitochondria. Some mitochondria also exhibited a relatively low mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), but analysis of general $\Delta\Psi_m$ with TMRM probe gave no significant differences. Neither did we detect any deficit in the activities of respiratory chain complexes or ATP content. We also observed a trend towards the use of glucose and increased presence of metabolites from the pentose phosphate pathway and the

hexosamine biosynthetic pathway. Moreover, cardiomyocytes deficient in frataxin accumulated large amount of fatty acids (FA) in lipid droplets (LD). It has been reported that a shift in energy substrate preference occurs during cardiac hypertrophy, when the heart oxidizes glucose instead of fatty acids. Metabolomics and lipidomics analysis revealed an increase of several lipid species indicating an activation of alternative pathways to β -oxidation and pro-fibrotic signaling, consistent with certain targets detected in a proteomic study. For example, an increase in DAG could alter the PKC pathway which in turn would alter the contractile proteins of the sarcomere, such as myosin and troponin. In an attempt to find how frataxin could be modifying these processes, we analyzed whether it was forming a complex with other mitochondrial proteins. Using the Blue-Native electrophoretic technique we observed a possible complex of frataxin with members of Krebs cycle, fatty acid oxidation and the respiratory chain. NNT, a mitochondrial transhydrogenase that produces NADPH from NADH, could be a component of this complex too. If frataxin might be affecting mitochondrial oxidative metabolism and NADPH production, it would explain the accumulation of LD, the bioenergetic dysfunction and the increased protein oxidative damage, since NADPH is a key cofactor of antioxidant systems.

In short, and according to our results, the lack of frataxin in cardiac myocytes would alter the mitochondrial network and the oxidative metabolism leading to contractile dysfunction and cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia patients.

ÍNDEX

ÍNDIX

ABREVIATURES	3
INTRODUCCIÓ	7
1. L'atàxia de Friedreich	7
1.1. Història, característiques clíniques i genètica	7
1.2. Patologia i patogènesi	13
1.2.1. La neurodegeneració	13
1.2.2. La miocardiopatia	15
1.2.3. La diabetis mellitus	18
1.3. La proteïna frataxina i la seva funció	19
1.3.1. Isoformes	20
1.3.2. Estructura	22
1.3.3. Funció de la frataxina	28
1.4. Models de l'atàxia de Friedreich	38
1.4.1. Models de llevat	38
1.4.2. Models de cultius cel·lulars	39
1.4.3. Models d'animals invertebrats	40
1.4.4. Models de ratolí	41
1.5. Perspectives terapèutiques	44
1.5.1. Disminució de l'estrès oxidatiu i/o augment de la funció mitocondrial	45
1.5.2. Modul·lació de processos controlats per la frataxina	46
1.5.3. Estabilitzadors, estimuladors o substitució de la proteïna frataxina	48
1.5.4. Augment de l'expressió del gen de la frataxina	49
1.5.5. Teràpia gènica	50
1.5.6. <i>High-Throughput Screening</i> pel descobriment de nous fàrmacs	50
2. EL COR I ELS MIÒCITS CARDÍACS	51
2.1. Estructura i funció dels cardiomiòcits	55
2.1.1. Estructura i funció del sarcòmer cardíac	55
2.1.2. Estructura i funció dels mitocondris cardíacs	56
2.2. Cultiu de cardiomiòcits	62
3. EL METABOLISME ENERGÈTIC	64
3.1. Metabolisme de carbohidrats	66
3.2. Metabolisme de lípids	68
3.2.1. Metabolisme dels triacilglicèrids i les gotes lipídiques	73
3.3. Regulació del fenotip metabòlic	79
3.3.1. Regulació del fenotip metabòlic pels factors de transcripció	79
4. EL METABOLISME DEL FERRO	81
4.1. La importància del ferro a nivell biològic	81
4.2. L'homeòstasi del ferro	82
4.3. Metabolisme intracel·lular del ferro	84
4.3.1. Metabolisme mitocondrial del ferro	88

4.4.	Regulació del metabolisme del ferro intracel·lular	90
4.5.	Malalties associades al metabolisme mitocondrial del ferro	94
5.	L'ESTRÈS OXIDATIU	95
5.1.	Espècies reactives de l'oxigen i el nitrogen	96
5.2.	Dianes de les ROS i dany oxidatiu	100
5.3.	Senyalització i processos fisiològics mediatos per les ROS al cor	101
5.4.	Sistemes antioxidants	103
	OBJECTIUS	113
	MATERIALS I MÈTODES	117
1.	ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	117
2.	TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR	117
2.1.	Obtenció de plasmidis	117
2.1.1.	Plasmidis	117
2.1.2.	Cultiu d' <i>Escherichia coli</i>	118
2.1.3.	Transfecció d' <i>Escherichia coli</i>	118
2.1.4.	Expressió i obtenció de plasmidis	120
2.1.5.	Quantificació del plasmidi i gel analític	120
2.2.	Anàlisi de l'expressió gènica	121
2.2.1.	Extracció d'RNA	121
2.2.2.	Quantificació i control de qualitat	121
2.2.3.	Trancripció inversa	121
2.2.4.	<i>Real Time PCR</i> o RQ-PCR	122
3.	TÈCNiques DE BIOLOGIA CEL·LULAR	124
3.1.	Producció de lentivirus	124
3.1.1.	Cultius cel·lulars de la línia HEK293T	125
3.1.2.	Transfecció de la línia HEK293T	125
3.1.3.	Concentració i valoració del títol dels virus	127
3.1.4.	Control de transducció per GFP	128
3.2.	Cultiu de cardiomiòcits neonatals de rata	128
3.3.	Anàlisi de la viabilitat cel·lular	131
3.3.1.	<i>Live/Dead de Life Technologies</i>	131
3.3.2.	MTT	132
3.3.3.	Cristall violeta	133
3.3.4.	Roig Neutre	133
3.4.	Microscòpia	134
3.4.1.	Mitotracker	134
3.4.2.	JC-1	135
3.4.3.	Bodipy 493/503	135
3.4.4.	Immunofluorescència	136
4.	TÈCNiques DE BIOQUÍMICA	137
4.1.	Preparació de les mostres per estudis bioquímics	137

4.1.1.	Western blot	137
4.1.2.	Activitat aconitasa i citrat-sintasa	137
4.1.3.	Activitats de la cadena respiratòria i l'oxidació d'àcids grassos	137
4.1.4.	Obtenció de fraccions enriquides en mitocondris	137
4.1.5.	Detecció de carbonils amb anticossos contra DNP	138
4.1.6.	Isoelectroenfoc	139
4.1.7.	Quantificació de les mostres	139
4.2.	Proteòmica	140
4.2.1.	Tècniques d'electroforesi	140
4.2.2.	Western blot	143
4.2.3.	Tincions de gels	145
4.2.4.	Tinció de membranes	146
4.2.5.	Adquisició de la imatge i anàlisi dels gels i les membranes	146
4.3.	Espectrofotometria	147
4.3.1.	Ferro	147
4.3.2.	Glucosa, lactat i àcids grassos	148
4.3.3.	Activitats enzimàtiques	148
4.4.	Cromatografia líquida o HPLC	152
4.4.1.	Àcids grassos	152
4.4.2.	Nucleòtids fosfat	153
4.5.	Metabolòmica	154
4.6.	Anàlisi estadístic	155
RESULTATS		159
1.	MODEL DE CARDIOMIÒCITS DEFICIENTS EN FRATAXINA.	159
1.1.	Enriquiment de cardiomiòcits, transducció i <i>knock-down</i> de frataxina	159
1.2.	Anàlisi de la supervivència	161
2.	ANÀLISI DEL METABOLISME DEL FERRO	164
2.1.	Anàlisi del contingut i l'activitat de l'aconitasa	164
2.2.	Anàlisi de l'expressió dels mRNA que responen al ferro	166
2.3.	Anàlisi del contingut intracel·lular de ferro	167
3.	ANÀLISI DEL FUNCIONAMENT MITOCONDRIAL I EL METABOLISME ENERGÈTIC	168
3.1.	Mitocondris: disposició i potencial de membrana mitocondrial	168
3.1.1.	Mitotracker	168
3.1.2.	JC-1	170
3.1.3.	TMRM	171
3.2.	Anàlisi de la cadena de transport electrònic	172
3.3.	Mesura de l'activitat citrat-sintasa	174
3.4.	Mesures d'ATP, ADP i AMP	174
3.5.	Anàlisi de la preferència de substrats	175
3.5.1.	Preparació de medi suplementat amb àcids grassos	176
3.6.	Contingut de gotes lipídiques	177
3.7.	Anàlisi del metabolisme de lípids	179
3.7.1.	Consum de lípids	179
3.7.2.	Metabolisme lipídic	180
3.7.3.	Oxidació d'àcids grassos	182

4. ANÀLISI DEL ROL DE L'ESTRÈS OXIDATIU I ELS SISTEMES ANTIOXIDANTS	183
4.1. Anàlisi de la resistència a l'estrès oxidatiu	184
4.2. Anàlisi de la modificació oxidativa de proteïnes	184
4.2.1. Glutatiolació	185
4.2.2. 3-Nitrotirosina	185
4.2.3. Carbonilació	186
4.3. Anàlisi dels sistemes antioxidants	187
4.3.1. Superòxid dismutasa 1 i 2	188
5. ÒMIQUES	188
5.1. Anàlisi metabolòmica	189
5.2. Anàlisi proteòmica	202
5.3. Anàlisi de la interacció de la frataxina amb altres proteïnes	206
5.3.1. Aïllament de mitocondris cardíacs	206
5.3.2. Mobilitat de la frataxina en gels no desnaturalitzants	207
5.3.3. <i>Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> o BN-PAGE	208
DISCUSSIÓ	213
1. MODEL CEL·LULAR CARDÍAC DE L'ATÀXIA DE FRIEDREICH	213
2. EL METABOLISME DEL FERRO	214
3. MITOCONDRI I METABOLISME ENERGÈTIC	217
4. PREFERÈNCIA DE SUBSTRATS ENERGÈTICS	219
5. METABOLISME DE CARBOHIDRATS	220
6. METABOLISME DELS LÍPIDS	224
6.1. Les LD al cor en models d'atàxia de Friedreich	224
6.2. Les LD i alteracions en la xarxa mitocondrial	225
6.3. Lipotoxicitat cardíaca	227
6.3.1. Lipotoxicitat cardíaca i vies de senyalització	228
6.3.2. Lipotoxicitat i dèficit de la β -oxidació	230
6.3.3. Lipotoxicitat: altres lípids bioactius	232
7. PROTEÏNES QUE PODRIEN INTERACCIONAR AMB LA FRATAXINA AL COR	237
8. VIES AFECTADES SEGONS L'ESTUDI PROTEÒMIC	240
8.1. Citoesquelet i disfunció contràctil	240
8.2. Xaperones i resposta a estrès	241
8.3. Senyalització deguda a lípids i estrès	242
9. PAPER DE L'ESTRÈS OXIDATIU	243
CONCLUSIONS	253
REFERÈNCIES	257
ARTICLES	297

ABREVIATURES

ABREVIATURES

2,5-DHBA : Àcid 2,5-dihidroxibenzoic	EPO: Eritropoetina
AAV: Virus adeno-associats	ER: Reticle endoplasmàtic
ADP: Adenosina 5'-difosfat	ETC: Cadena de transport electrònic
AG: Àcids grassos	Eth: Homodimer d'etidi
ALA: Àcid 5-amino-levulinic	FAD: Dinucleòtid de flavina i adenina
AMP: Monofosfat d'adenosina	FBS: Sèrum fetal boví
ARE: <i>Antioxidant response element</i>	FC: <i>Fold change</i>
ATP: Trifosfat d'adenosina	FRDA: Atàxia de Friedreich
AVED: <i>Ataxia with vitamin E deficiency</i>	FXN: Frataxina
BN-PAGE: <i>Blue-Native polyacrylamide gel electrophoresis</i>	GABA: Àcid gamma-aminobutíric
BP: BODIPY 493/503	GFP: <i>Green fluorescent protein</i>
BPS: <i>Bathophenanthroline disulfonic acid</i>	GMP: Monofosfat de guanosina
BSA: Albúmina sèrica bovina	GSH: Glutatió reduït
CAM: <i>Calcein acetoxymethyl ester</i>	GSSG: Glutatió oxidat
CCCP: <i>Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone</i>	GTP: Trifosfat de guanosina
cDNA: DNA complementari	HBSS: <i>Hank's balanced salt solution</i>
cGMP: GMP cíclic	HCM: Miocardiopatia hipertròfica
CIA: <i>Cytosolic iron-sulfur cluster assembly</i>	HEPES: <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
CV: Cristall violeta	HFA: <i>Hydroxy fatty acids</i>
DDM: <i>n-Dodecyl-β-D-maltoside</i>	HH: Hemocromatosi hereditària
DFO: Deferoxamina	HIV-1: Virus de la immunodeficiència humana
DMSO: Dimetil sulfòxid	HPFA: <i>Hydroperoxy fatty acids</i>
DNA: Àcid desoxiribonucleic	HPLC: Cromatografia líquida d'alta precisió
DNP: Dinitrofenil	HS: <i>Horse serum</i>
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina	HSV: Herpes-virus
dNTP: Deoxinucleòtid	ICEU: Unitat energètica intracel·lular
DRG : <i>Dorsal root ganglia</i>	IEF: Isoelectroenfoc
DTNB: 5,5'-ditiobis(2-àcid nitrobenzoic)	IFM: <i>Interfibrillar mitochondria</i>
DTT: Ditiotreitòl	IMS: Espai intermembrana mitocondrial
EDTA: Àcid etilendiamina-tetracètic	IRE: <i>Iron-responsive elements</i>

IRP: <i>iron-responsive element-binding proteins</i>	PBS: Tampó fosfat salí
ISC: Centre ferro-sofre o <i>iron-sulfur cluster</i>	PCA: <i>Principal component analysis</i>
JC-1: <i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>	PCr: Fosfocreatina
KD: <i>Knock-down</i> o genominvat	PE: Fosfatidiletanolamina
KIKO: Heterozigot compost <i>KI- KO</i>	PLS-DA: <i>Partial least squares Discriminant Analysis</i>
KO: <i>Knock-out</i> o genoanul·lat	PUFA: Àcids grassos poliinsaturats
LB: Medi Luria-Bertani	PVDF: <i>Polyvinylidene difluoride</i>
LD: Gotes lipídiques o <i>lipid droplets</i>	RHB: Tampó de rehidratació
LIP: <i>Labile iron pool</i>	RNA: Àcid ribonucleic
LOESS: <i>Locally weighted scatterplot smoothing</i>	RNAi: RNA d'interferència
MALDI-TOF: <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer</i>	RNS: Espècies reactives del nitrogen
MC: Medi per cardiomiòcits estàndard	ROS: Espècies reactives de l'oxigen
MCO: Oxidació catalitzada per metalls	RT: <i>Room temperature</i>
MIM: Membrana mitocondrial interna	RyR: Receptors de rianodina
MOM: Membrana mitocondrial externa	SDS: Dodecilsulfat sòdic
MPTP: <i>Mitochondrial permeability transition pore</i>	SR: Reticle sarcoplasmàtic
MQR: Mitochondrial radical quenchers	SSM: <i>Subsarcolemmal mitochondria</i>
mRNA: RNA missatger	TAT: <i>Trans-activator of transcription</i>
MRS: Espectrometria de ressonància magnètica	TBA: Àcid tiobarbitúric
MS: Espectrometria de masses	TBS-T: Tampó tris salí amb Tween-20
MTT: Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol	TCA: Cicle dels àcids tricarbòxics
NAD: Nicotina adenina dinucleòtid	TEMED: N,N,N,N'-tetrametilnediamina
NAM: Nicotinamida	TFA: Àcid trifluoroacètic
NC: Nitrocel·lulosa	TMRM: <i>Tetramethylrhodamine methyl ester</i>
ncRNA: RNA no codificant	TSA: Tricostatina A
NR: Roig neutre	TTFA: Thenoiltrifluoroacetona
NRVM: <i>Neonatal rat ventricular myocytes</i>	VLDL: Lipoproteïna de molt baixa densitat
	VSV: <i>Vesicular stomatitis virus</i>
	$\Delta\Psi$: Gradient electroquímic

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. L'atàxia de Friedreich

1.1. Història, característiques clíniques i genètica

L'atàxia de Friedreich va ser descrita pel patòleg alemany Nikolaus Friedreich l'any 1863. El seu nom, atàxia, indica la incapacitat de coordinar els moviments musculars voluntaris. És una malaltia rara, que s'hereta de manera recessiva i que afecta individus d'origen europeu, nord-africà, i orient mitjà. La freqüència de portadors s'estima que és de 1:50 a 1:100 en les poblacions afectades. Es creu que la distribució restringida a caucàsics es deu a una única mutació fundadora que va ocórrer entre 500 i 800 generacions enrere (Colombo & Carobene, 2000; M Cossée, Schmitt, et al., 1997). La prevalença depèn de la regió, i és més alta en enclavaments. A l'Alsàcia a França, està estimada en 2 de cada 100.000 caucàsics (Anheim et al., 2010) i a Espanya encara és més alta, de 4,7 per cada 100.000 habitants (Berciano, Infante, Mateo, & Combarros, 2002; López-Arlandis, Vílchez, Palau, & Sevilla, 1995; López-Bastida, Perestelo-Pérez, Montón-Alvarez, & Serrano-Aguilar, 2008)

Normalment, els primers símptomes es fan evidents durant la pubertat (Harding, 1981), encara que l'edat d'inici pot variar molt, des dels 2 fins als 25 anys a l'anomenada *late-onset* FRDA (De Michele et al., 1994; Moschner, Perlman, & Baloh, 1994). Alguns pacients, però, no són diagnosticats fins als seixanta o setanta anys. La variabilitat de l'edat d'inici s'explica en part per la natura dinàmica de la mutació que provoca la malaltia. El primer símptoma sol ser la inestabilitat en caminar, tot i que la escoliosi pot aparèixer abans que els símptomes neurològics. Alguna vegada, la cardiomiopatia hipertròfica també és diagnosticada abans que comenci l'atàxia. El símptoma fonamental és l'atàxia mixta de tipus cerebel·lós i sensorial. Afecta el tronc; amb basculació, desequilibri i caigudes, i les extremitats; amb una dificultat creixent a l'hora de dur a terme les activitats diàries, com vestir-se, manejar estris i escriure. L'atàxia és progressiva però pot tenir períodes d'estabilitat a l'inici de la malaltia. Amb el temps, les pèrdues d'equilibri són més freqüents i requereixen suport, primer intermitent, i després constant. Les habilitats motores fines es deterioren amb el temps, i els pacients presenten dismetria (la manca de

control de l'amplitud del moviment muscular a causa d'una incapacitat de mesurar adequadament les distàncies) i tremolor d'intenció. També és comuna la debilitat a les extremitats i certa amiotròfia, sobretot a les mans. De mitjana, al cap de deu o quinze anys després de l'inici de la malaltia, els pacients perden l'habilitat de caminar, posar-se de peu o seure sense ajuda (Harding, 1981).

Tot i això, l'evolució també és molt variable i alguns pacients tenen símptomes lleus durant anys mentre que altres han d'usar la cadira de rodes ben aviat (Dürr et al., 1996; Harding, 1981). La disàrtria, o la incapacitat d'articular la parla, comença molt aviat i progressa fins que la parla és gairebé intel·ligible. La disfàgia, o dificultat de deglutir, apareix quan avança la malaltia, sobretot amb líquids, i cal usar dietes modificades i a vegades tubs nasogàstrics o gastrostomia (que consisteix en la introducció d'una sonda d'alimentació a l'estómac). Els pacients també poden desenvolupar nistagme, amb inestabilitat de la fixació de l'ull i moviments involuntaris alternats, oscil·lants i repetitius en diferents sentits (Moschner et al., 1994). Generalment, les funcions cognitives es preserven bé, però com que la malaltia comporta una discapacitat física important, el desenvolupament acadèmic i professional acaba afectat (Pandolfo, 2009).

La majoria dels pacients presenten una cardiomiopatia hipertròfica amb un engruiximent de la paret ventricular esquerra i del septe que es pot detectar amb una ecografia, però pot ser asimptomàtica. L'electrocardiograma gairebé sempre és diferent en la fase de repolarització, indicant que la malaltia cardíaca subclínica és universal en pacients d'FRDA. Quan es presenten, els primers símptomes solen ser palpitations i respiració superficial. Si progressen, poden causar fallida cardíaca o arítmies greus. Pel que fa a la musculatura general, el to és normal als braços però a les cames és variable i sovint pateixen espasmes o hiperreflèxia (Harding, 1981).

L'FRDA presenta sovint anormalitats esquelètiques com cifoscoliosi i peu buit (o *pes cavus* en llatí). Ambdós símptomes també són comuns en altres síndromes neuromusculars amb afectació mitocondrial com la malaltia de Charcot-Marie-Tooth. Aquests símptomes poden ser tractats quirúrgicament si agreugen els problemes cardiorespiratoris o la marxa.

La diabetis mellitus és molt més freqüent en pacients d'FRDA que en la població general. Presenten una combinació de resistència a la insulina i una resposta a la insulina inadequada, i es creu que pot ser deguda a la disfunció mitocondrial (Chamberlain et al., 1988).

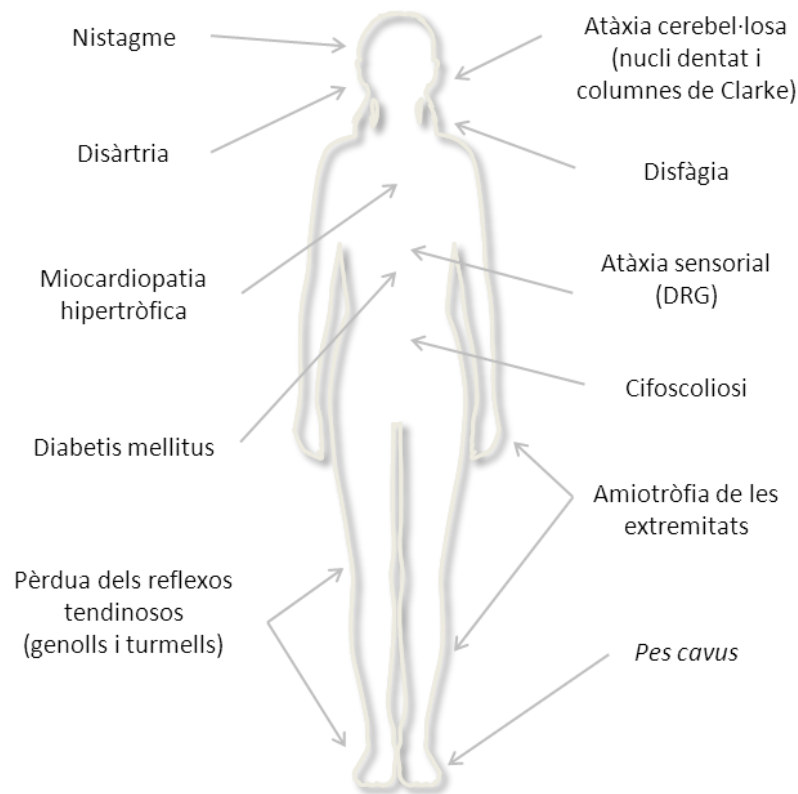


Figura 1. Afectacions més freqüents als pacients d'atàxia de Friedreich. Els símptomes neurològics característics de la malaltia són la degeneració dels ganglis de l'arrel dorsal (DRG), de les columnes de Clarke i del nucli dentat del cerebel. També són freqüents la miocardiopatia, les deformitats als peus, la cifoscoliosi, la disfàgia, la disàrtria, el nistagme i la diabetis mellitus.

La malaltia es deu a la mutació d'un gen al cromosoma 9 que es va anomenar *FRDA* o *X25* (Campuzano et al., 1996; Carvajal et al., 1996; Chamberlain et al., 1988). Anteriorment aquest locus s'anomenava *X25/STM7* i encara hi ha debat sobre si l'*X25* forma part de l'*STM7*, un gen que codifica per una fosfatidilinositol-4-fosfat 5-quinasa i sobre si aquesta podria estar afectada a l'atàxia de Friedreich (Bayot & Rustin, 2013; Bayot et al., 2013; Carvajal et al., 1996; Cossée, Campuzano, et al., 1997; Koeppen, 2011; Pook, Carvajal, Doudney, Hillermann, & Chamberlain, 1997). El primer intró del gen conté una sèrie de repeticions del triplet GAA·TTC enmig de la seqüència de poli(A) d'una seqüència Alu. La

seqüència de GAA·TTC està situada a 1,3 Kb *downstream* de l'inici de transcripció (TSS de *transcription start site*) i és polimòrfica. Així, mentre que la població normal té entre 8 i 33 repeticions, la majoria d'individus amb FRDA tenen 2 al·lels cadascun amb més de 90 repeticions, la majoria entre 600 i 900. Una minoria de pacients són heterozigots compostos, i tenen un al·lel amb més de 90 repeticions i l'altre amb una deleció petita o una mutació puntual (Campuzano et al., 1996; Clark et al., 2004). Per tant, l'FRDA es considera una malaltia d'expansió de triplets, i la patologia es deu a les conseqüències de l'herència d'al·lels per sobre d'un llindar patològic, que en aquest cas és d'aproximadament 90 repeticions. El mecanisme de l'expansió de la mutació no es coneix, encara que es creu que podria ser per problemes amb la replicació, la recombinació i la reparació del DNA.

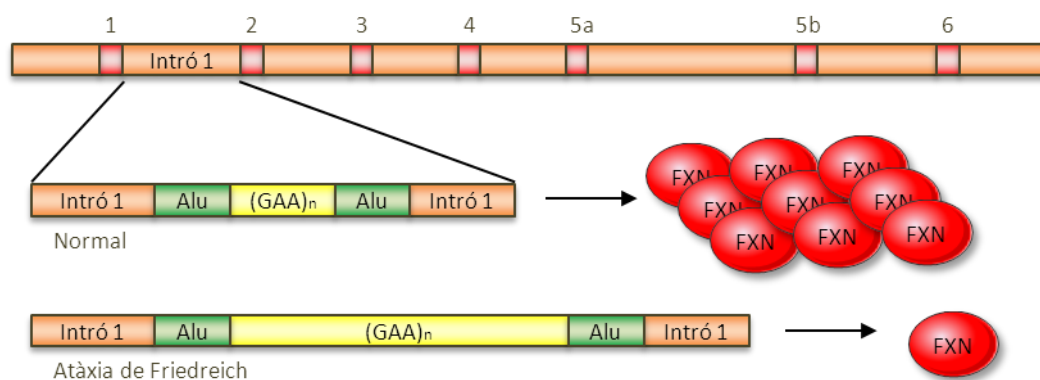


Figura 2. Expansió de triplets al gen FRDA. En l'atàxia de Friedreich l'augment del nombre d'expansions del triplet GAA del primer intró del gen FRDA provoca una disminució dels nivells de la proteïna frataxina (FXN). La majoria dels pacients tenen expansions als dos al·lels. Com més repeticions del triplet, menor expressió de frataxina i més sever és el fenotip (Gatchel & Zoghbi, 2005).

A causa d'aquesta expansió de triplets, els nivells d'expressió de l'mRNA de frataxina són baixos, entre un 4 i un 29 per cent dels normals. Hi ha una relació inversa entre el nombre de repeticions i la quantitat de l'mRNA produït. El producte d'aquest mRNA és la frataxina (FXN), una proteïna petita i àcida codificada al nucli però amb funció mitocondrial (Campuzano et al., 1997). El gen de la frataxina s'expressa a totes les cèl·lules del cos, tot i que l'expressió és més alta en cor, medul·la espinal, fetge, múscul esquelètic i pàncrees en humans. En ratolins, l'expressió també varia tant pel que fa al teixit com al desenvolupament. Els nivells més alts són a l'estadi embrionari 14,5 i durant el període postnatal. Pel que fa als teixits del ratolí, l'expressió és alta a la medul·la espinal,

particularment a nivell toracolumbar i als ganglis de l'arrel dorsal. També es troben nivells alts d'expressió al cervell, al cor, al fetge i al teixit adipós marró. Cal destacar que els teixits afectats a la malaltia són els que expressen més frataxina i tots tenen una taxa metabòlica molt alta (Campuzano et al., 1996; Jiralerspong, Liu, Montermini, Stifani, & Pandolfo, 1997; Koutnikova et al., 1997).

Hi ha diverses teories sobre per què les repeticions del triplet GAA·TTC provoquen una expressió baixa de l'mRNA de frataxina. La primera és que els triplets formarien una estructura secundària inusual de tríplex anomenada *sticky DNA* o DNA enganxós. Es creu que aquest tríplex de DNA, o de DNA i RNA, podria segrestar els factors de transcripció i l'RNA-polimerasa, o bé bloquejar l'RNA-polimerasa fent que el complex de transcripció no pogués desenrotllar el DNA (Kohwi & Kohwi-Shigematsu, 1991; Sakamoto, Ohshima, Montermini, Pandolfo, & Wells, 2001). Una altra hipòtesi afirma que l'augment del nombre de triplets provocaria la formació d'heterocromatina.

Malgrat que l'expansió no conté residus CpG susceptibles a metilació, sembla que la metilació podria expandir-se des de les seqüències Alu adjacents, ja que els pacients presenten més metilació en aquestes regions si es comparen amb individus no afectats. Igualment s'ha vist en cèl·lules de pacients que com més llargues són les repeticions més metilació de DNA hi ha i s'ha observat metilació del *locus* també al cor i al cervell del ratolí mutant amb repeticions del triplet (Al-Mahdawi et al., 2008; Castaldo et al., 2008; Greene, Mahishi, Entezam, Kumari, & Usdin, 2007). A més, es creu que la pèrdua del patró "normal" de metilació també podria provocar altres canvis a la cromatina perquè s'ha observat que els pacients presenten més modificacions d'histones característiques de gens silenciats, com l'hipoacetilació de l'H3 i l'H4 i la trimetilació de l'H3K9 (Greene et al., 2007; Herman et al., 2006). Els pacients també presenten més HP1 (*heterochromatin protein 1*) i menys unió del factor CTCF (*CCCTC-binding factor*) al promotor. D'aquesta manera, aquestes modificacions s'estendrien cap a la regió 5' i cap al promotor del gen de la frataxina (Al-Mahdawi et al., 2008; De Biase, Chutake, Rindler, & Bidichandani, 2009).

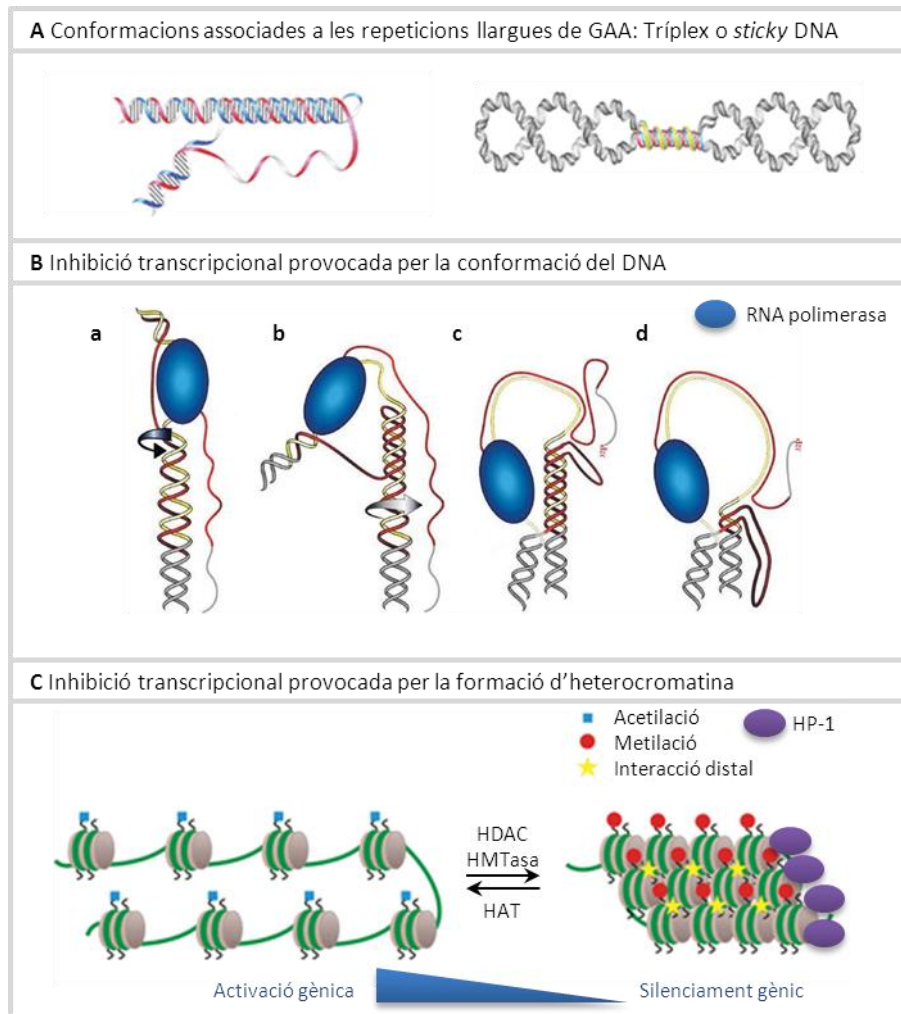


Figura 3. Mecanismes d'inhibició transcripcional provocats per les repeticions del triplet GAA.

(A) Models d'estructures intramoleculares formades pel DNA que conté expansions llargues de triplets; tríplex de DNA o *sticky DNA*. (B) Formació de l'híbrid d'RNA i de DNA causat per les repeticions de GAA. Model que provoca la formació d'un tríplex que atura l'RNA polimerasa. La cadena vermella conté les repeticions de GAA, la groga les de TTC i la grisa el DNA delimitant (*flanking*). a) L'RNA-polimerasa deixa el DNA superenrotllat a mesura que avança. La cadena motlle de DNA de la bombolla de transcripció es plega enrere interaccionant amb ella mateixa i la seva complementària. b) La rotació de l'hèlix fa que en plegar-se, el DNA superenrotllat es relaxi i deixi una seqüència de DNA motlle de cadena senzilla. c) L'RNA-polimerasa es bloqueja pel tríplex de DNA i el transcrit naixent pot hibridar amb la seqüència motlle de DNA de cadena senzilla. d) L'híbrid de DNA i RNA desplaça l'estructura de tríplex. (C) Model que mostra la formació d'heterocromatina al locus de FRDA. La cromatina al gen actiu (esquerra) conté nucleosomes amb histones acetilades. Als pacients, les repeticions de GAA provoquen la formació d'heterocromatina (dreta) amb histones metilades als nucleosomes compactats que afavoreix la interacció amb el DNA adjacent (interacció distal). La metilació de les histones afavoreix la unió del factor HP-1 (Chan et al., 2013; Festenstein, 2006; R. D. Wells, 2008).

Aquests canvis epigenètics poden ser causats per la unió de proteïnes que recluten factors de silenciament, per la reparació del DNA associada als triplets repetits o bé per la formació del tríplex explicat més amunt. Els nivells d'expressió de l'mRNA de frataxina

podrien ser menors pels canvis d'empaquetament de la cromatina al promotor, perquè el factor CTCF no s'uniria al promotor de manera convencional o perquè la metilació inhibiria l'elongació del transcrit (Kumari & Usdin, 2012).

1.2. Patologia i patogènesi

L'atàxia de Friedreich afecta teixits i tipus cel·lulars molt concrets, tal com passa amb altres malalties neurodegeneratives i també amb les malalties mitocondrials. El perquè de l'especificitat en l'afectació d'aquests tipus cel·lulars concrets és una qüestió que encara no s'ha resolt. En aquest apartat es resumeix l'afectació als diferents teixits a nivell anatòmic, histològic i bioquímic.

1.2.1. La neurodegeneració

A l'atàxia de Friedreich, com en moltes altres malalties neurodegeneratives, es dona una vulnerabilitat específica de tipus neuronals diferents (Koeppen, 2002). En aquest cas, s'afecta, de manera greu i aviat en el transcurs de la malaltia, el sistema somatosensorial que porta la informació propioceptiva al cervell i al cerebel. Les grans neurones primàries sensibles dels ganglis de l'arrel dorsal (o DRG de *dorsal root ganglion*) s'atrofien i degeneren provocant una neuropatia axonal sensorial perifèrica de les columnes posteriors de la medul·la, com ja indicava l'article original de Friedreich (Friedreich, 1863). Els pacients perden els sentits de vibració i posició, cosa que correspon al component sensorial de l'atàxia. Per altra banda, la pèrdua de neurones dels nuclis dorsals (també anomenats *Clarke's column* o *posterior thoracic nucleus*) provoca l'atròfia dels tractes espinocerebel·losos i la pèrdua de l'entrada propioceptiva al cerebel. Aquest fet, juntament amb l'atròfia severa del nucli dentat (la font principal de sortida de vies cerebel·loses) formen el component cerebel·lar de l'atàxia. La pèrdua de les cèl·lules de Purkinje i l'atròfia corticocerebel·losa són suaus o moderades i normalment ocorren tard. També es pot donar una alteració de les vies sensorials auditives i atròfia òptica, però és poc comú. Pel que fa a la part motora, hi ha una degeneració progressiva dels tractes corticoespinals, que és més evident a la zona distal, i que suggereix un procés de *dying-back* (Koeppen, 2002).

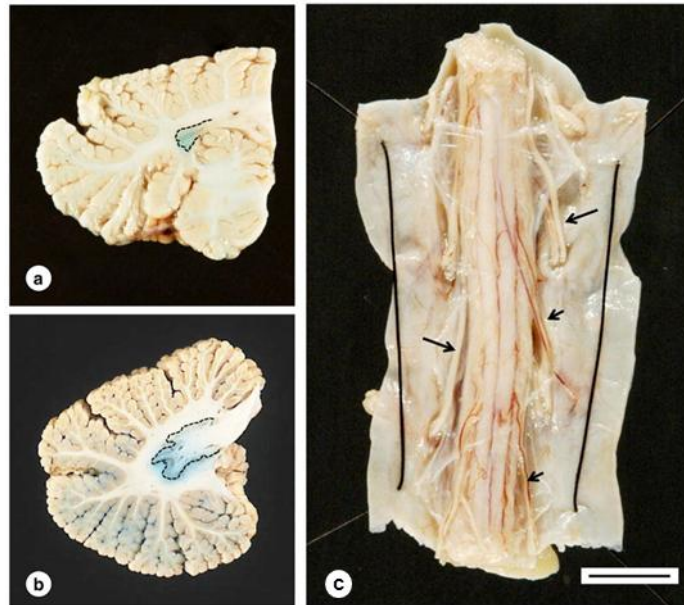


Figura 4. Afectacions neurològiques a l'atàxia de Friedreich. Aspecte macroscòpic del nucli dentat d'un pacient (a) i d'un individu no afectat (b). La línia de guions indica la localització aproximada de la substància grisa del nucli dentat. La mida petita del nucli en l'FRDA és més aparent amb una tinció de ferro (color blau). (c) Vista dorsal de la medul·la espinal toràcica d'un pacient d'FRDA. El diàmetre de la medul·la és inferior a 1 cm (escala). Les fletxes llargues assenyalen les arrels anteriors gruixudes que contrasten amb les arrels dorsals primes (fletxes curtes) (Koeppen, 2011).

A nivell histològic, disminueix la mida subcapsular de les neurones dels DRGs. També queden nòduls neurofàgics residuals (focus de cèl·lules satèl·lit que envolten i envaeixen el citoplasma de les neurones que degeneren). Les cèl·lules satèl·lit dels pacients són positives en tincions immunohistoquímiques de ferritina i de ferroportina, i aquesta última també dona positiu a les neurones dels DRG. Les columnes de Clarke dels pacients són més petites però el nombre d'axons és el mateix. La beina de mielina també és més prima, tot i que el percentatge de fibres mielinitzades és lleugerament major. Als nuclis dorsals de Clarke sovint hi ha una pèrdua total de les neurones grans propioceptives (Friedreich, 1863; Koeppen & Mazurkiewicz, 2013).

El nucli dentat del cerebel s'encarrega de planejar, iniciar i controlar els moviments voluntaris. La regió dorsal envia informació sobre la funció motora (pel moviment del múscul esquelètic) i la ventral envia informació no motora (com el pensament conscient o la funció visuoespacial). Les neurones grans del nucli dentat es perden als pacients d'FRDA i també es perden terminacions axonals riques en àcid gamma-aminobutíric (GABA) (Koeppen, 1998).

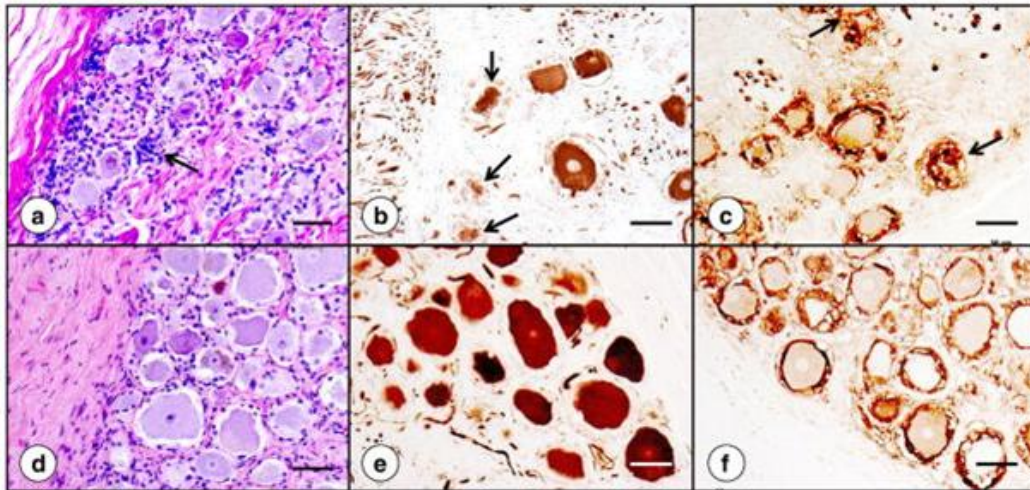


Figura 5. Histopatologia dels ganglis de l'arrel dorsal en l'FRDA. (a)–(c), FRDA; (d)–(f), control. La tinció d'hematoxilina i eosina (**a; d**) mostra la reducció general de la mida subcapsular de les neurones i alguns nòduls residuals (fletxa). La immunohistoquímica de β III-tubulina (neurones) (**b; e**) mostra la reducció de la mida i la destrucció del citoplasma neuronal (fletxes). La tinció immunohistoquímica d'S100 α (glia) (**c; f**) mostra productes més reactius a les cèl·lules satèl·lit al voltant de les neurones més petites en l'FRDA. Els nòduls residuals també són positius per S100 α (fletxa). Escala 50 μ m (Koeppen, 2011).

1.2.2. La miocardiopatia

La miocardiopatia és la principal causa de mort dels malalts d'atàxia de Friedreich. Les dades es mouen entre un seixanta i un vuitanta per cent dels afectats i tal com passa amb la severitat de la malaltia, hi ha una correlació entre la freqüència de la miocardiopatia, el gruix de la paret ventricular esquerra i la llargada de les repeticions (Andermann et al., 1976; Filla et al., 1996; Harding & Hewer, 1983; Isnard et al., 1997). Tot i que Friedreich ja va descriure detalladament l'afectació del cor, ho va atribuir a una altra causa. De fet, sovint la miocardiopatia és asimptomàtica però amb l'ajuda de l'electrocardiografia, l'ecardiografia, la ressonància magnètica i l'espectroscòpia amb ^{31}P s'ha acumulat més informació, i s'ha donat més importància a l'afectació del cor en l'FRDA (Alboliras et al., 1986; Lodi et al., 2001; Meyer et al., 2007).

Normalment la miocardiopatia és hipertròfica i concèntrica, i alguns casos presenten cardiomiopatia dilatada. També hi solen haver trombes al ventricle esquerre, i alguns pacients pateixen infarts embòlics (Koeppen, 2011). La miocardiopatia hipertròfica (HCM) és una malaltia estructural del miocardi amb una hipertròfia asimètrica del ventricle esquerre, amb desestructuració dels miòcits i fibrosi que pot tenir diferents causes. La

mortalitat en l'HCM és més gran en els pacients joves que en els adults i la primera manifestació de la malaltia pot ser precisament la mort sobtada mentre es practica esport. La miocardiopatia dilatada (DCM) es caracteritza per una dilatació ventricular que altera la funció sistòlica, principalment en el ventricle esquerre. Els pacients presenten signes d'insuficiència cardíaca, palpitations i mort sobtada. Pot ser deguda a una miocardiopatia hipertròfica.



Figura 6. Aspecte macroscòpic del cor de dos pacients amb miocardiopatia hipertròfica. A la imatge de l'esquerra la miocardiopatia és concèntrica i a la de la dreta la hipertròfia afecta només el ventricle esquerre, mentre que el ventricle dret està dilatat. La imatge de l'esquerra també mostra una decoloració del miocardi, descrita ja per Friedreich al seu article (Koeppen, 2011).

Patològicament, els cardiomiòcits estan hipertrofiats al principi. Després, quan progressa cap a fallida cardíaca i un estadi final de dilatació, aquests moren i són reemplaçats per teixit connectiu (el que s'anomena fibrosi o remodelació cardíaca). També es poden observar focus de necrosis i dipòsits de ferro als miòcits cardíacs (Lamarche, Côté, & Lemieux, 1980).

La remodelació del miocardi i la fibrosi són característiques distintives de la insuficiència cardíaca. En el cas de l'atàxia de Friedreich són secundàries a la hipertròfia. Els miòcits cardíacs estan units en una matriu de col·lagen fibril·lar de tipus I. Aquesta matriu té diverses funcions mecàniques que permeten la contracció del cor de manera eficient. Quan el cor està danyat, els cardiomiòcits moren de manera necròtica i unes cèl·lules fibroblast-like transformades fenotípicament (miofibroblasts) s'activen i inicien la fibrosi "reparativa". Els miofibroblasts reemplaçen els miòcits formant un teixit cicatritzat que

preserva la integritat estructural del miocardi tot i fer-lo més rígid. Els cardiomiòcits que han quedat aïllats s'atrofien pel desús o perquè no arriba prou oxigen a la zona i el teixit es torna més rígid i més propens a arítmies.

En teixit cardíac de pacients s'han observat cardiomiòcits desorganitzats, necrosi de les fibres musculars, inflamació reactiva i un augment del teixit connectiu endomisial (el teixit connectiu que envolta les fibres musculars). Algunes fibres contenen petits grànuls positius per ferro al voltant del nucli, ordenats en files entre les miofibril·les. Els mateixos grànuls reaccionaven també amb la ferritina citosòlica, la ferritina mitocondrial i la ferroportina. Ara bé, el ferro i la ferritina total del cor no augmenten. Les cèl·lules inflamatòries de l'endomisi presenten reactivitat per CD68 (expressada en macròfags), ferritina citosòlica i DMT1+IRE (un transportador de metalls divalents). Podria ser que les cèl·lules de l'endomisi ajudessin al recanvi cel·lular que hi ha en la fibrosi. No obstant això, no sembla que l'acumulació de ferro en alguns cardiomiòcits pugui explicar la cardiomiopatia perquè es tracta d'un nombre reduït de cèl·lules afectades i no es correlacionen amb altres característiques histològiques de la cardiomiopatia. A més no es dóna un augment de les cèl·lules afectades en comparar les biòpsies i l'autòpsia (Koeppen, 2011; Michael et al., 2006).

Dos estudis (Bunse et al., 2002; Lodi et al., 2001) amb 18 i 11 pacients d'FRDA respectivament, han relacionat la hipertròfia cardíaca amb els nivells energètics del cor fent servir la tècnica de ressonància magnètica espectroscòpica amb fósfor-31 (^{31}P -RME). La ^{31}P -RME serveix per estudiar el metabolisme energètic del múscul cardíac, ja que permet mesurar molècules com el fòsfor inorgànic (Pi), la fosfocreatina (PCr) i l'ATP de manera no invasiva. Van trobar una reducció de la ràtio PCr/ATP i un augment de la ràtio Pi/PCr en pacients, indicant que generaven menys energia. A més, ambdós índexs correlacionaven amb el gruix de la paret del septe, també en pacients que encara no tenien una cardiomiopatia hipertròfica diagnosticada. Per tant, la ràtio Pi/PCr podria ser un indicador precoç de la miocardiopatia. Es per això que el metabolisme energètic deficitari o la falta d'utilització d'energia podria ser la causa de la hipertròfia cardíaca en el cas de l'FRDA. Altres estudis a nivell bioquímic (Bradley et al., 2000; Rötig et al., 1997) han analitzat biòpsies i cors post mortem de pacients en els quals s'han trobat

deficiències en proteïnes que contenen centres ferro-sofre com l'aconitasa o els complexos I, II i III de la cadena respiratòria.

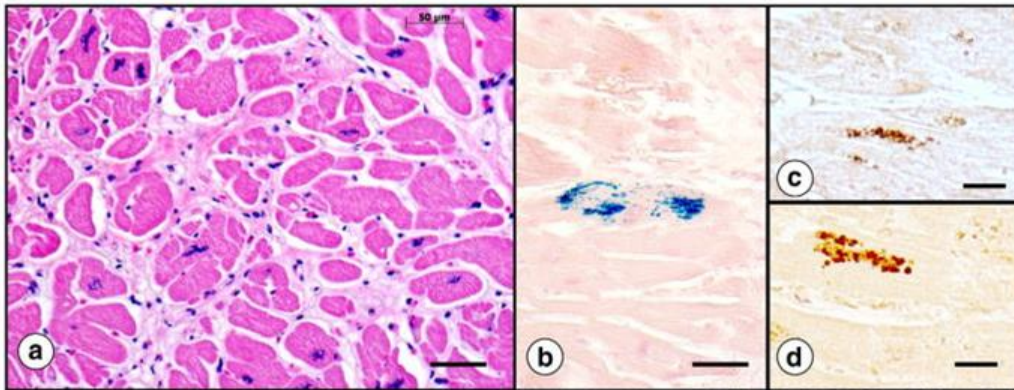


Figura 7. Histopatologia del cor a l'FRDA. (a) Tinció d'hematoxilina i eosina; (b) Tinció histoquímica del ferro; (c) Immunohistoquímica de la ferritina citosòlica; (d) Immunohistoquímica de la ferritina mitocondrial. (a) Mostra representativa del múscul cardíac que mostra fibres musculars de mida molt variable, augment de l'endomisi i nuclis sarcoplasmàtics estranys. (b) Tinció de ferro que mostra una fibra amb grànuls reactius, distribuïts en files, suposadament en paral·lel amb les miofibril·les. Tant la ferritina citosòlica (c) com la mitocondrial (d) mostren una freqüència i distribució similar als grànuls de ferro.

1.2.3. La diabetis mellitus

Diferents estudis han reportat un major risc de patir diabetis en pacients d'atàxia de Friedreich (Andermann et al., 1976; De Michele et al., 1996; Dürr et al., 1996; Filla et al., 1996; Harding, 1981; Hewer, 1968; Hewer & Robinson, 1968; Shapcott et al., 1976), amb una prevalença que s'estima entre el 8 i el 32%. Aquesta variabilitat es pot deure a el test usat pel diagnòstic i al fet que el criteri diagnòstic ha canviat al llarg del temps. Si es fa servir el test de tolerància oral a la glucosa sovint el nombre d'afectats és major, atès que molts pacients tenen nivells més alts de glucosa durant més temps. De fet, en un estudi molt recent, prop del 50% dels pacients sense diabetis diagnosticada, tenien alterada la glucosa en dejú i/o la tolerància a la glucosa, i un 12% tenien diabetis (Cnop et al., 2012). La hiperglucèmia, quan n'hi ha, no apareix al principi de la malaltia, sinó al cap d'uns 15 anys de mitjana (Harding, 1981) i a vegades quan es presenta ja és aguda o fulminant (Ashby & Tweedy, 1953; Bird, Turner, Sumi, & Bierman, 1978). La diabetis pot ser deguda a la manca de secreció d'insulina per part de les cèl·lules beta pancreàtiques, a la manca d'acció de la insulina o per una combinació d'aquestes dues. Sembla ser que la diabetis que pateixen els individus amb atàxia de Friedreich té els dos components, ja que s'ha

descriu tant deficiència d'insulina com resistència a la insulina. Per una banda, les cèl·lules beta no secreten tanta insulina com caldria per mantenir la tolerància a la glucosa normal (Cnop et al., 2007; Kahn, 2003), i alguns pacients presenten menys cèl·lules beta pancreàtiques (Cnop et al., 2012; Arnulf H Koeppen, 2011). Es creu, però, que no és per processos autoimmunes (Schoenle et al., 1989). D'altra banda, la resistència a la insulina s'ha demostrat tant a nivell cel·lular com general (Coppola et al., 2009; Fantus, Seni, & Andermann, 1993; Khan, Andermann, & Fantus, 1986).

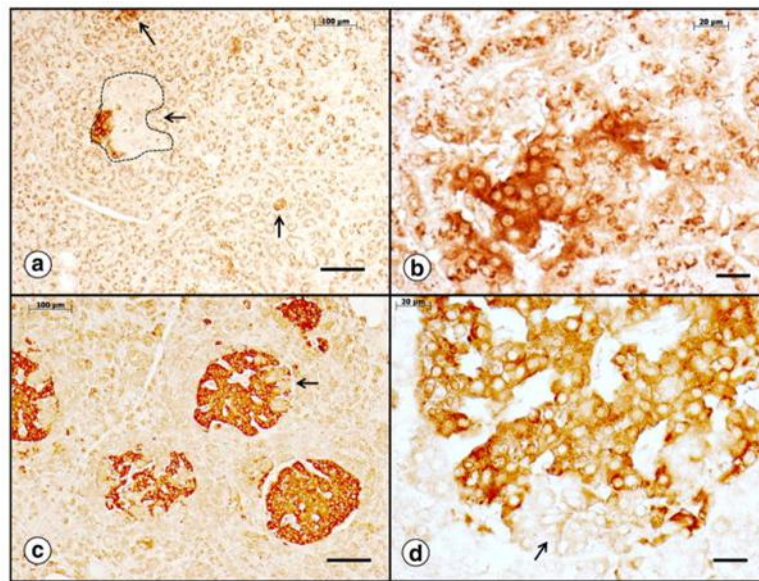


Figura 8. El pàncrees endocrí en l'FRDA. (a)–(b) Pacient diabètic; **(c)–(d)** Pacient no diabètic; Tinció immunohistoquímica de sinaptofisina (illes pancreàtiques). **(a)** Al pacient diabètic s'observen poques illes pancreàtiques (fletxes). La línia discontinua mostra la illa que ha perdut la tinció de sinaptofisina. **(c)** Les illes normals fan més de 200 µm de diàmetre. Les fletxes de **(c)** i **(d)** mostren les invaginacions del pàncrees exocrí normal dins de les illes que són negatives per la tinció amb sinaptofisina però diferents a la resta de teixit no reactiu. Escala (a i c) 100 µm; (b i d) 20 µm (Koeppen, 2011).

1.3. La proteïna frataxina i la seva funció

La frataxina és una proteïna petita, àcida (amb un punt isoelèctric al voltant de 4,9) i molt conservada al llarg de l'evolució, amb ortòlegs homòlegs a gairebé tots els organismes, incloent mamífers, bacteris, fongs i plantes. (Adinolfi, Trifuoggi, Politou, Martin, & Pastore, 2002; Campuzano et al., 1996; Gibson, Koonin, Musco, Pastore, & Bork, 1996; Koutnikova et al., 1997). Com s'ha comentat anteriorment, l'expressió de frataxina és més alta als teixits amb una taxa alta de metabolisme oxidatiu, que són

justament els afectats a la malaltia. Així, la deficiència en frataxina porta a la degeneració de les neurones dels DRG, dels miòcits cardíacs i de les cèl·lules beta pancreàtiques. Aquest fet sol, però, no acaba d'explicar la vulnerabilitat d'aquests tipus cel·lulars. La funció de la frataxina és encara un tema que genera controvèrsia. Se li han atorgat diferents funcions possibles i algunes d'elles explicarien la major vulnerabilitat dels teixits afectats. Entre aquestes trobem l'homeòstasi del ferro (Babcock et al., 1997), la biosíntesi dels centres ferro sofre (Huynen, Snel, Bork, & Gibson, 2001; Mühlhoff, Richhardt, Ristow, Kispal, & Lill, 2002), el metabolisme dels grups hemo (Lesuisse et al., 2003), l'emmagatzematge de ferro (Bulteau et al., 2004; Park et al., 2003), l'activació de la fosforilació oxidativa (Ristow et al., 2000), el control de l'estat redox i la protecció de les cèl·lules de l'estrès oxidatiu (Gakh et al., 2006; O'Neill et al., 2005; Park, Gakh, Mooney, & Isaya, 2002) i/o la senyalització per òxid nítric (Martin, Colman, Gómez-Casati, Lamattina, & Zabaleta, 2009; L. Ramirez, Zabaleta, & Lamattina, 2010).

1.3.1. Isoformes

S'han descrit diferents isoformes de la frataxina, a les quals s'han atribuït diferents propietats i funcions. Algunes d'aquestes isoformes són degudes a diferent inici/final de transcripció o bé a l'*splicing* alternatiu de l'mRNA. Altres, són degudes al processament que té la proteïna quan és importada al mitocondri.

Pel que fa als transcrits, podem trobar-ne tres de diferents al portal de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). El transcrit més gran, d'1,3Kb està compost per cinc exons (exons 1-4 i 5a) i codifica per una proteïna àcida de 210 aminoàcids, anomenada isoforma A o FXN-1 (NM_000144; NP_000135). També trobem un transcrit alternatiu menor, anomenat isoforma B o FXN-3 (NM_181425; NP_852090), que conté l'exó 5b en lloc del 5a i té 171 aminoàcids (Campuzano et al., 1996). Aquestes isoformes comparteixen un 93% d'identitat en la seqüència, i la diferència recau en la regió C terminal, la qual té 11 residus a FXN-3 i 48 a la FXN-1. El 2002, Pianese i col·laboradors van identificar una tercera variant, anomenada isoforma A1 o FXN-2 (NM_001161706; NP_001155178) (Pianese et al., 2002). Aquesta, com la FXN-1, està composta pels exons 1-4 i 5a, però té una inserció de 8 parells de bases degut a un *splicing* alternatiu a la regió 5' de l'intró 4. Aquesta inserció genera un canvi en la pauta de lectura que introdueix un

codó de terminació, donant una proteïna més petita de 196 aminoàcids. En ser descrits, els tàncrits minoritaris no van ser estudiats en detall i tampoc no hi havia dades a nivell funcional. Recentment però dos estudis han posat ènfasi en aquests tàncrits i altres de nous.

Abruzzo i col·laboradors publicaven el 2013 un estudi dut a terme en cèl·lules mononucleades de sang de pacients i d'individus control en que modificaven l'expressió de diferents isoformes de la frataxina. A l'article descriuen que les tres isoformes descrites al portal del NCBI poden interaccionar amb el complex NSF1/ISCU (de la maquinària de síntesi dels centres ferro-sofre). També mostren que tractant les cèl·lules amb tocotrienols (que són membres de la família de la vitamina E que es troben a la natura però en poca quantitat) augmenta l'expressió de la tercera isoforma. Tanmateix, com que la FXN-3 s'expressa en menys quantitat, aquest augment no és suficient per assolir els nivells de mRNA necessaris per permetre les funcions cel·lulars normals (Abruzzo et al., 2013).

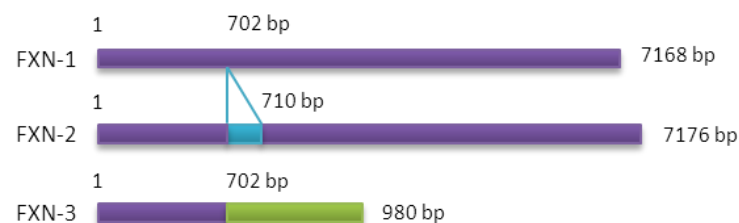


Figura 9. Esquema representatiu de les isoformes de cDNA de frataxina descrites per Abruzzo. La isoforma 1 (FXN-1) i la 2 (FXN-2) comparteixen la major part de la seqüència excepte per 8 bp de més a la FXN-2. La isoforma 3 (FXN-3) és un tàncrit alternatiu menor que conté l'exó 5b i difereix en la regió C terminal.

Xia i col·laboradors descriuen el 2012 set tàncrits diferents deguts a un inici de transcripció diferent, a l'*splicing* alternatiu o a l'*exon skipping*. Aquests tàncrits s'expressaven a diferents teixits, tenien localitzacions diferents i jugaven rols diferents, i els van agrupar en cinc classes. I) La isoforma canònica amb els exons 1A,2,3,4 i 5, expressada al cor i a tots els teixits, amb localització mitocondrial. II) Isoforma que comença amb l'exó 1B (en comptes de l'1A) i que pot tenir una deleció de 18 nucleòtids, de localització citoplasmàtica i nuclear, més expressada al cerebel. III) Isoforma canònica però sense l'exó 3, més expressada al cor i amb localització citosòlica i nuclear. IV)

Isoformes que combinen característiques de les classes II i III. V) Isoforma canònica sense 141 nucleòtids de la regió 3' de l'exó 1A, també més expressada al cor.



Figura 10. Esquema dels transcrits de frataxina descrits per Xia. El primer exó canònic és l'Exó 1A i l'exó 1AΔ141, aquest últim sense els últims 141 nucleòtids. L'exó 1B (descriu per l'autor) es troba al primer intró. A l'exó 1BΔ18 li falten 18 nucleòtids prop de l'inici de l'exó 1B. El ΔExó 3 és un transcrit que no té exó 3. Les isoformes s'expressen de manera diferencial en diferents teixits (Xia et al., 2012).

Segons Xia i col·laboradors, les isoformes codificades per la classe III estarien implicades en la biosíntesi dels centres ferro-sofre perquè en sobreexpressar-les veuen un augment en l'activitat de l'aconitasa mitocondrial. En canvi, la classe II tindria un paper de reparació dels centres ferro-sofre quan són danyats amb agents oxidants (Xia et al., 2012).

1.3.2. Estructura

1.3.2.1. Seqüència

Pel que fa a la seqüència d'aminoàcids, a la família de la frataxina es diferencien dues regions. Un bloc N terminal de 70-90 residus absent a procariotes i poc conservats en els eucariotes, amb les característiques típiques de les *intrinsically unfloded proteins* (Huynen et al., 2001; Musco et al., 2000; Prischi, Giannini, Adinolfi, & Pastore, 2009). La part C terminal està molt conservada i per això es creu que és la part de la molècula important a nivell funcional. Consta d'uns 100-120 aminoàcids i els residus més conservats són tres triptòfans, residus poc comuns en proteïnes. Segurament tenen un rol important a nivell estructural i/o funcional. També està semiconservat un tram de residus àcids (Pastore & Puccio, 2013).

1.3.2.2. Estructura 3D i estabilitat

L'estructura 3D de la frataxina consta de set fulles beta antiparal·leles que creen una plataforma plana que fa de suport d'un parell d'hèlixs alfa, formant un sandvitx $\alpha\beta$ compacte i globular. Un clúster de dotze residus acídics entre la primera hèlix i la primera cadena de fulla beta formen una superfície aniònica contínua a la proteïna. L'estructura global i la zona aniònica es conserven a tots els eucariotes, inclosos animals, plantes, llevats i procariotes. Les mutacions associades a la malaltia afecten les cadenes laterals que contribueixen a la zona aniònica, ajuden a crear l'estructura secundària conservada o apunten cap al cor hidrofòbic (Cho et al., 2000; Dhe-Paganon, Shigeta, Chi, Ristow, & Shoelson, 2000; Musco et al., 2000). Quan l'estructura de la frataxina va ser resolta per primera vegada, aquest plegament va ser reconegut com a novedós. Tot i la seva simplicitat, és gairebé únic. Només força més tard, es va veure un plegament similar al domini N3 de la proteïna Nqo15 del complex I de la cadena respiratòria de *thermus thermophilus*, però les dos proteïnes no tenen homologia de seqüència (Sazanov & Hinchliffe, 2006). Les tres estructures de frataxina més estudiades són la de bacteri (CyaY), la de llevat (Yfh1) i la humana (FXN). Tot i tenir el mateix plegament, tenen diferent estabilitat termodinàmica. La frataxina de llevat és molt inestable quan s'estudia a baixa força iònica. Aquest fet es deu a la diferència de llargada de la zona C terminal, la qual en la frataxina humana es plega enrera i s'insereix entre les dos hèlixs, protegint així el cor hidrofòbic. En bacteris, el C terminal és més curt però té un rol estructural similar, mentre que en llevat no hi és i per això és més inestable (Adinolfi et al., 2004).

1.3.2.3. Aminoàcids conservats i mutacions puntuals

El fet de conèixer l'estructura va permetre racionalitzar la funció dels residus conservats. Aquests indiquen les regions de la proteïna que són importants per l'estabilitat estructural i/o per la funció. Els residus conservats amagats normalment són parts importants del cor hidrofòbic, i qualsevol variació pot desestabilitzar el plegament. Per contra, els exposats a la superfície de la proteïna normalment estan involucrats en la funció. A la frataxina està semi-conservada la regió carregada negativament i altres residus exposats a la primera hèlix i al full beta (Musco et al., 2000).

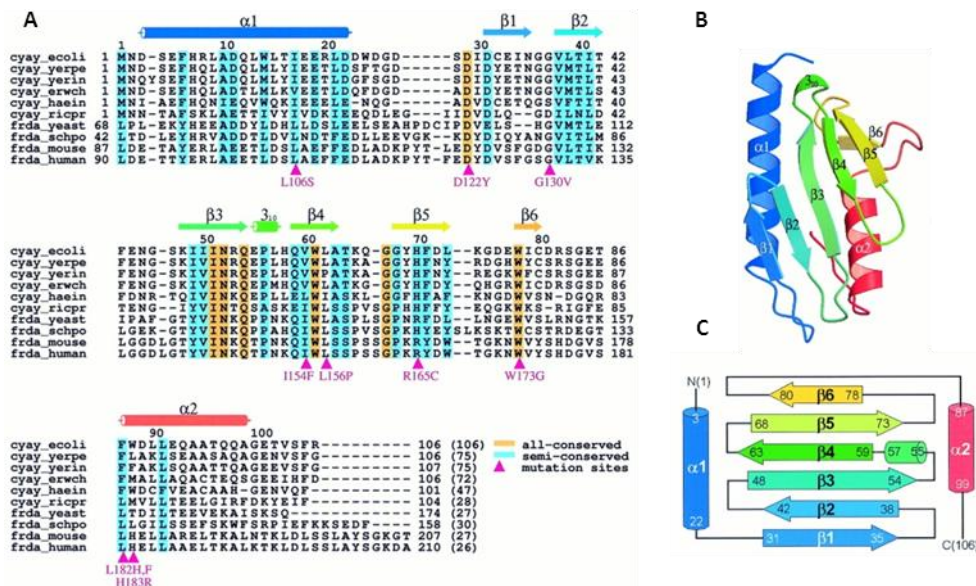


Figura 11. Seqüència i estructura de la frataxina. (A) Alineament de seqüències de 10 membres de la família de frataxina: *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Yersinia intermedia*, *Erwinia chrysanthemi*, *Haemophilus influenzae*, *Rickettsia prowazekii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Mus musculus*, i *Homo sapiens*. Els residus conservats en totes les seqüències estan ressaltats en daurat i els semiconservats en cyan. El nombre de residus idèntics comparats amb la CyaY de bacteri es dona entre parèntesis. Les mutacions associades a malalties estan marcades amb triangles magenta. Els elements de l'estructura secundària estan indicats damunt les seqüències. **(B)** Estructura secundària de la frataxina amb les fulles β i les hèlixs α marcades. **(C)** Diagrama topològic. Cal destacar que l'alineació de les frataxines eucariotes només mostra la part conservada evolutivament, és a dir, al domini globular C terminal i que manca la regió N terminal *intrinsically unfolded* (Cho et al., 2000; Prischi et al., 2009)

Entre aquests n'hi ha dos de molt conservats, un aspartat i un triptòfan molt conservat (W155 en la humana). Alguns pacients d'FRDA són heterozigots i tenen un al·lel amb una mutació puntual. Se'n coneixen com a mínim 15, i totes les importants a nivell clínic es donen en residus conservats (Cossée et al., 1999; Labuda, Poirier, & Pandolfo, 1999). Aquests mutants tenen un plegament normal però són més inestables a nivell termodinàmic i també tenen diferents dinàmiques proteiques, propensió a l'agregació i una tendència a la digestió proteica. Així, en els pacients heterozigots l'FRDA pot ser deguda a la combinació entre un plegament menys eficient i una degradació accelerada de la proteïna (Correia, Adinolfi, Pastore, & Gomes, 2006; Leidgens, De Smet, & Foury, 2010; Musco et al., 2000; Schmucker et al., 2011).

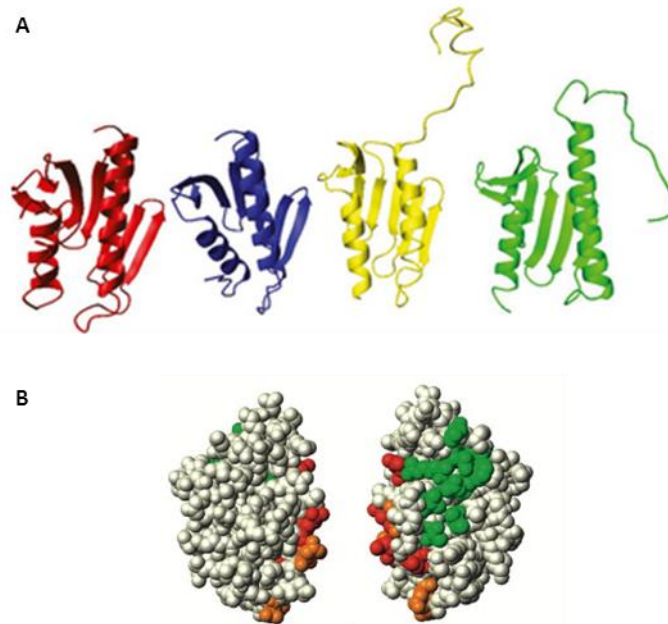


Figura 12. Estructura 3D de la frataxina i residus conservats. (A) Quatre estructures representatives de les entrades de frataxina al PDB (*Protein Data Bank*). Vermell: Estructura de raigs-X de la CyaY d'*E.coli* (1ew4); Blau: Estructura de raigs-X de la frataxina humana (1ekg); Groc: Estructura d'NMR de la Yfh1 de llevat (2ga5); Verd: Estructura de raigs-X de la Yfh1 (3oeq) (Pastore & Puccio, 2013). **(B)** Representació CPK de la CyaY mostrant els residus conservats a l'estructura tridimensional. Les dues vistes difereixen de 180 °C (la de l'esquerra és la mateixa vista que a la imatge de sobre). Els residus hidrofòbics i polars conservats (Val38, Thr40, Ile50, Asn52, Arg53, Gln54, Pro56, Gln59, i Trp61) estan indicats en verd i formen una zona conservada a la superfície formada per les fulles β (més visible a la imatge de la dreta). Els residus conservats i semiconservats amb càrrega negativa es mostren en vermell i taronja respectivament, i formen un clúster entre l' $\alpha 1$ i la $\beta 1$ (Nair et al., 2004).

1.3.2.4. Localització

En un principi ja es va pensar que la frataxina podria ser mitocondrial, gràcies a l'aliniament entre les seqüències de la família i les similituds clíniques amb l'atàxia lligada al dèficit de vitamina E (AVED) i les neuropaties amb inestabilitat de DNA mitocondrial causades per gens nuclears. També pel fet que la regió N terminal no està conservada en la majoria de procariotes i que hi ha homòlegs en bacteris *purple* i no en altres bacteris (Gibson et al., 1996). Aquesta hipòtesi es va confirmar quan es va veure que colocalitzava amb una proteïna mitocondrial (Koutnikova et al., 1997). La disfunció mitocondrial s'havia suggerit també des d'un principi perquè aquests orgànuls són especialment rellevants en els teixits més afectats (neurones, cor i pàncrees). Ara està acceptat que la frataxina està codificada al nucli, s'expressa al citoplasma i s'importa al mitocondri gràcies a una senyal a la regió N terminal. Això explica la menor conservació d'aquesta regió. Estudis en

cèl·lules HeLa sobreexpressant la frataxina humana mostraven que estava associada a la membrana i a les crestes mitocondrials (Campuzano et al., 1997). No sembla tenir cap motiu d'ancoratge a la membrana, així que la seva associació amb aquesta podria ser formant complexos amb proteïnes de membrana.

En relació amb la maduració de la frataxina i la seva importació al mitocondri, també hi ha força controvèrsia. Com s'ha dit, la frataxina està codificada pel DNA nuclear i es sintetitza com a un precursor de 210 aminoàcids (23 KDa) que conté una seqüència de localització mitocondrial. Aquesta seqüència de localització mitocondrial, en general, sol formar una hèlix alfa amfipàtica amb aminoàcids de càrrega positiva, té una llargada d'entre 10 i 80 aminoàcids, i es conserva en les proteïnes de matriu mitocondrial (von Heijne, Steppuhn, & Herrmann, 1989). Al citoplasma, aquesta pre-sequència és reconeguda per xaperones que la protegeixen de l'agregació i la degradació i direccionen la proteïna a la membrana mitocondrial externa (MOM de *outer mitochondrial membrane*). La maquinària de transport de la MOM, anomenada TOM (*translocase of the outer membrane*), conté residus àcids que reconeixen la seqüència de localització mitocondrial. La proteïna transloca a través del barril que forma el complex TOM a l'espai intermembrana (IMS) i allí és reconeguda pel complex TIM (*translocase of the inner membrane*). La proteïna és translocada a la matriu gràcies a la força motriu del gradient electroquímic ($\Delta\Psi$) i a la hidròlisi de l'ATP que du a terme la xaperona de la matriu mitocondrial Hsp70. Un cop a la matriu, l'MPP (*mitochondrial processing peptidase*) talla la pre-sequència de localització mitocondrial.

S'ha detectat que la subunitat beta de l'MPP interactua directament amb frataxina. Normalment, per a la majoria de proteïnes de matriu, només cal un tall de l'MPP, però s'ha descrit que la frataxina es torna a tallar (per la mateixa MPP) per formar la isoforma madura. En qualsevol cas, l'MPP talla la frataxina entre els aminoàcids 41 i 42 formant un intermediari de 19 KDa (aminoàcids 42-210). El segon lloc de tall encara és un tema de debat. De fet, només s'ha descrit un segon tall (en proteïnes de matriu) en la frataxina humana i de llevat i en una subunitat de l'ATPasa de *Neurospora crassa*. Cavadini i col·laboradors van identificar un lloc de tall entre els aminoàcids 55 i 56 que donava una proteïna de 17 KDa (Cavadini, Adamec, Taroni, Gakh, & Isaya, 2000). Condò i

col·laboradors en van identificar un al voltant de l'aminoàcid 81 (Condò et al., 2007) mitjançant la degradació d'Edman. Yoon i col·laboradors en van descriure un que començava a l'aminoàcid 78 per espectrometria de masses (Yoon, Dizin, & Cowan, 2007). Schmucker i col·laboradors descriuen al seu article que la frataxina madura amb dos passos, un primer tall entre els aminoàcids 41 i 42 i un segon tall al voltant de l'aminoàcid 81 (Schmucker, Argentini, Carelle-Calmels, Martelli, & Puccio, 2008). També diuen que si es muten els aminoàcids d'aquest dos punts es provoca la formació d'altres transcrits que donarien a les isoformes que comencen als aminoàcids 56 i 78 respectivament. Cal dir que hi ha mutacions naturals (com la I154F o la W173G) que afecten la interacció de la frataxina amb l'MPP i n'afecten el processament. A més, s'ha descrit que el segon lloc de tall és el més lent i, per tant, el que limita la producció de la proteïna madura, que és la que manca als pacients (Branda et al., 1999; Cavadini, Adamec, et al., 2000; Gordon, Shi, Dancis, & Pain, 1999; Koutnikova, Campuzano, & Koenig, 1998).

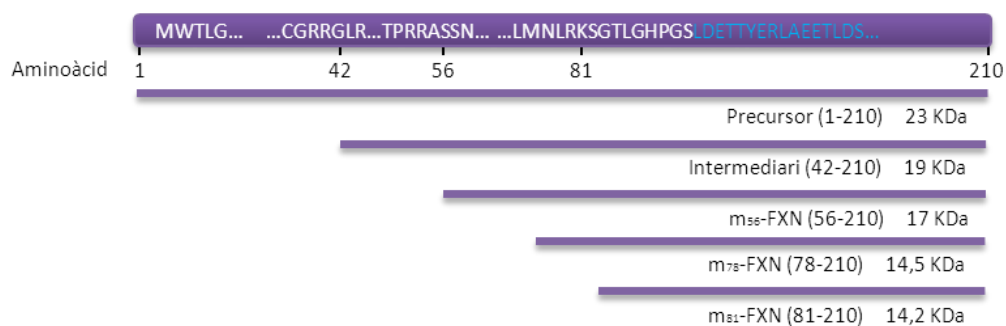


Figura 13. Representació esquemàtica de les isoformes de frataxina. El precursor (codificat pels aminoàcids 1-210) és dirigit al mitocondri i madura essent tallat dues vegades. També es representen l'intermediari i les altres tres isoformes madures descrites que comencen als aminoàcids 56 (m_{56} -FXN), 78 (m_{78} -FXN) o 81 (m_{81} -FXN). El domini globular conservat (que comença a l'aminoàcid 90) està indicat en color blau (Schmucker et al., 2008).

Per bé que la localització mitocondrial està més que acceptada, alguns grups han publicat estudis on descriuen un *pool* extramitocondrial de frataxina amb funcions complementàries. Acquaviva i col·laboradors han descrit que la frataxina es localitza al citosol en cèl·lules Caco-2 diferenciades, on interacciona amb IscU1, una proteïna citoplasmàtica de la maquinària de biosíntesi dels clústers ferro-sofre (Acquaviva et al., 2005). El grup de Testi també ha descrit un *pool* extramitocondrial en línies cel·lulars que evitaria l'acumulació de ROS i l'apoptosi provocades per ceramida (Condò, Ventura, Malisan, Tomassini, & Testi, 2006) i que també controla el canvi entre l'aconitasa

citòsica i IRP1 (Condò et al., 2010). També en un model induïble en línies cel·lulars, el grup de Cortopassi ha observat que en silenciar la frataxina, la forma citoplasmàtica disminueix abans que la mitocondrial gràcies al seu *turnover* més ràpid. Els nivells baixos de frataxina al citosol provocaven dany oxidatiu, un increment de SOD1, defectes en ISU1 i aconitasa i la inducció de la *unfolded protein response*. Molts grups (entre altres el nostre) han revocat aquestes dades demostrant que la frataxina es troba únicament al mitocondri (Martelli et al., 2007; Moreno-Cermeño et al., 2010).

1.3.3. Funció de la frataxina

Al llarg dels anys, els estudis en diferents models deficientes en frataxina han observat repetidament una deficiència en l'activitat aconitasa i altres proteïnes amb centres ferro-sofre (Puccio et al., 2001; Rötig et al., 1997). És per això que des d'un principi es va relacionar la frataxina amb la biosíntesi d'aquests cofactors. Així i tot, altres estudis no confirmen aquest "dogma" i donen un rol diferent a la frataxina. També és interessant el fet que diferents organismes, o fins i tot diferents tipus cel·lulars, responen d'una manera diferent a la deficiència de frataxina.

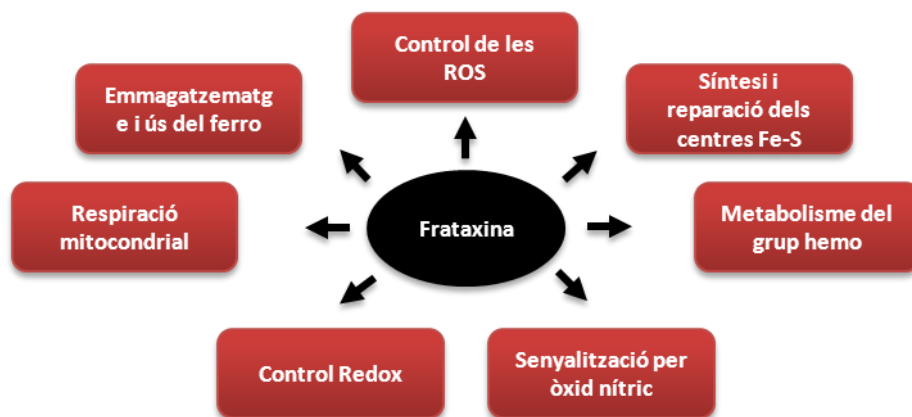


Figura 14. Funcions proposades per a la frataxina. La frataxina s'ha relacionat amb l'emmagatzematge de ferro, el control de l'estrès oxidatiu, la síntesi i la reparació dels centres ferro-sofre, el metabolisme del grup hemo, la senyalització per òxid nítric, el control redox i la respiració mitocondrial (Busi & Gomez-Casati, 2012).

1.3.3.1. Unió de ferro i funció de xaperona de ferro

En un principi, quan Musco i col·laboradors van descriure l'estructura de la frataxina, van tritar la proteïna amb ferro i no van veure-hi tendència a unir ferro ni a agregar-se. Deien,

a més, que l'estructura és compacta, sense solcs ni cavitats, que són característiques típiques de les molècules que uneixen ferro, i que per això la implicació de la frataxina amb el ferro havia de ser indirecta. Sí que descriuen, però, que la frataxina té una sèrie de residus conservats evolutivament i exposats. Aquests residus cobreixen una àrea àmplia i estan agrupats a les fulles beta, suggerint que és una superfície important per a la funció (Musco et al., 2000). Segons la majoria d'autors, aquesta zona aniònica és la que es considera important, tant en bacteris i llevats, com en humans, en la unió de ferro, en l'activitat ferroxidasa i en la interacció amb la ferroquelatasa i les proteïnes implicades en la biosíntesi dels centres ferro-sofre. Pel que fa a la unió a ferro, doncs, hi ha controvèrsia entre els diferents grups que estudien el tema. D'una banda, la coocurrència del gen de la frataxina amb gens que codifiquen per xaperones implicades en l'ensamblatge dels clústers ferro-sofre (dos en protobacteris i un en llevats) suggereix que la frataxina està involucrada en el metabolisme del ferro (Huynen et al., 2001). S'ha demostrat també que HSC20 (l'homòleg d'aquestes xaperones en mamífers) interacciona amb la frataxina (Shan & Cortopassi, 2012). D'altra banda, sembla ser que la unió de ferro per part de la frataxina depèn de les condicions en què s'estudia i de l'espècie de la qual prové la frataxina. Així mateix, la unió a ferro és dèbil i poc específica i també pot unir altres cations divalents o trivalents. A més, com s'ha dit, és una proteïna peculiar a l'hora de quelar metalls, ja que no té ni cavitats ni *pockets*, a més té glutamats i aspartats exposats, que són residus que normalment no quelen ferro sinó que ho fan les histidines i/o cisteïnes (Pastore, Franzese, Sica, Temussi, & Pastore, 2007).

La frataxina, amb la seva capacitat d'unir ferro, pot interaccionar amb diferents proteïnes de manera depenent de ferro per facilitar la síntesi de centres ferrosulfurats i grups hemo (Amela, Delicado, Gómez, Querol, & Cedano, 2013; Rouault, 2012; Schmucker et al., 2011; Wang & Craig, 2008).

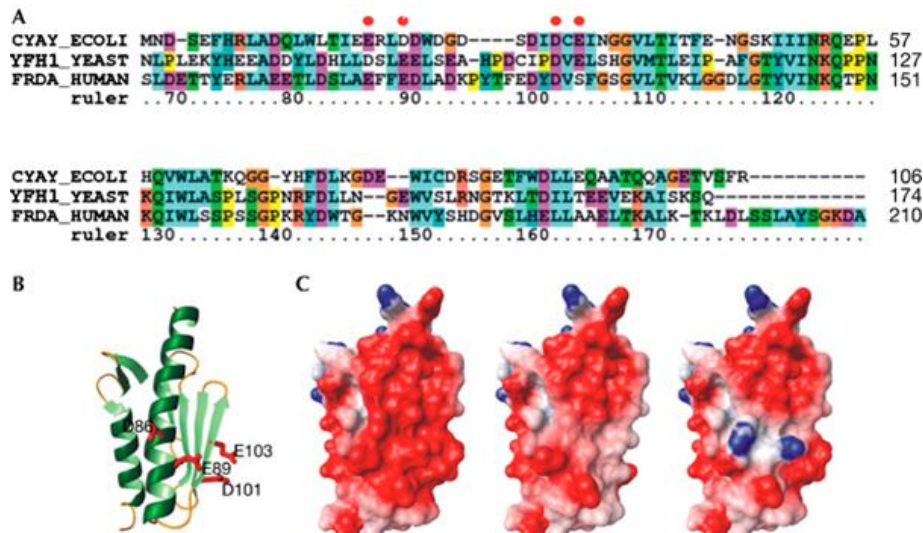


Figura 15. Superfície àcida i interaccions amb ferro i altres proteïnes. (A) Alineament de seqüències del domini conservat de les frataxines de bacteri (CyaY), llevat (Yfh1) i humans (FRDA). La numeració es refereix a la seqüència de llevat. Amb punts vermells estan marcats els aminoàcids àcids de la hèlix α de la regió N terminal que en mutar-se afecten la sensibilitat al ferro. **(B)** Representació de l'esquelet del domini conservat de (2ga5). Les cadenes laterals dels aminoàcids mutants es mostren en vermell. **(C)** Comparació de la superfície electrostàtica de la frataxina salvatge a l'esquerra, amb les mutacions que redueixen la unió a la maquinària de biosíntesi dels centres ferro-sofre (D86A/E89A/D101A/E103A) al mig i amb les mutacions D86K/E89K a la dreta (Françoise Foury, Pastore, & Trincal, 2007; Martelli & Puccio, 2014).

La biosíntesi dels centres ferro-sofre és un procés que requereix diverses proteïnes. Entre elles destaquen la cisteïna desufurasa Nfs1 (que aporta el sofre) i Isu1, la proteïna que actua com a motlle o plataforma on s'ensambla un centre ferro-sofre (ISCU en humans) que posteriorment es transfereix a les proteïnes que ho requereixen. Yoon i col·laboradors publicaven el 2003 un article afirmant que la frataxina actua com a donadora de ferro per a la biosíntesi de centres ferro-sofre. Explicaven que la frataxina uniria entre 6 i 7 àtoms de ferro formant la forma holo de la frataxina, més afí a Isu1 que la forma apo. D'aquesta manera, el ferro permetria o estabilitzaria la interacció entre ambdues proteïnes. També descrivien que la frataxina mediava la transferència de ferro als llocs de nucleació per a la formació dels clústers a Isu1, i que l'addició de sofre inorgànic o de Nfs1 com a donador era suficient per obtenir un lligand alt de formació d'aquests cofactors. Com que usant els diferents donants de sofre obtenien la mateixa cinètica, van concloure que l'alliberament de ferro de la frataxina és el pas limitant per l'ensamblatge dels clústers (Yoon & Cowan, 2003). S'ha descrit també que frataxina ajuda a exposar els llocs d'unió a la cisteïna que dona sofre per a la síntesi dels clústers (Pandey

et al., 2013). Diferents grups han descrit que la zona àcida que uneix ferro també és el lloc d'interacció amb Isu1 (Foury et al., 2007; Huang, Dizin, & Cowan, 2008).

Igualment, es creu que la frataxina pot ser el donant de ferro per a la síntesi de grups hemo, ja que la forma holo frataxina interacciona amb la ferroquelatasa. La ferroquelatasa és una proteïna associada a la membrana interna mitocondrial que facilita el pas final de la biosíntesi dels grups hemo al mitocondri, inserint ferro (II) a la protoporfirina IX. A més d'interaccionar-hi, la frataxina estimula l'activitat de la ferroquelatasa i és necessària per a la metal·lació correcta de la protoporfirina en llevat, perquè en absència de frataxina es forma zinc protoporfirina en lloc d'hemo (He et al., 2004; Lesuisse et al., 2003; Yoon & Cowan, 2004).

1.3.3.2. Oligomerització, emmagatzematge i detoxificació de ferro

S'ha descrit que la frataxina de llevat té un comportament *ferritin-like* in vitro. Això significa que en presència de ferro en gran excés (1:20), la proteïna incorpora ferro i forma grans agregats esfèrics de pes molecular alt. L'ensamblatge es produeix seqüencialment a mesura que s'afegeix ferro, començant per trímers i agrupant-se per acabar formant multímers (Adamec et al., 2000; Nichol et al., 2003; Park et al., 2003). Aquests agregats són capaços de segrestar ferro en un estat redox inactiu i poden mobilitzar-lo amb quelants fisiològics com el citrat (Adamec et al., 2000; Park et al., 2003). Pel que fa a la frataxina humana, però, no s'ha observat una unió de ferro directa en condicions similars (Musco et al., 2000), tot i que sí s'expressa en *Escherichia coli*, una fracció petita de la frataxina humana recombinant forma espècies de pes molecular alt que incorporen ferro (Cavadini, 2002). Adinolfi i col·laboradors van comparar les tres proteïnes (de bacteri, llevat i humana) i van observar un plegament igual però diferents estabilitats tèrmiques i diferents propietats a l'hora d'unir ferro. Mentre que la frataxina humana no té tendència a unir ferro, CyaY forma agregats dependents de ferro de manera similar a la frataxina de llevat. Tot i així, l'agregació es preveu amb quelants o amb elevada força iònica. A condicions fisiològiques de sals, gairebé no es formen agregats perquè els nivells mitocondrials de calci/magnesi estabilitzen la frataxina monomèrica unida a ferro (Adinolfi et al., 2002). Si es muten alguns residus del fragment amb càrrega negativa de la frataxina de bacteri, esdevé una proteïna amb característiques

similars a la humana, fent que no agregui de manera depenent de ferro. Si es muta la superfície exposada a la fulla beta, amb els aminoàcids més conservats, no s'afecta l'agregació, cosa que suggereix que la unió al ferro és una part no conservada d'una funció cel·lular més complexa de les frataxines (Adinolfi et al., 2002). De fet, hi ha una proteïna mitocondrial, FTMT, que emmagatzema ferro (Cavadini, 2002; Drysdale et al., 2002).

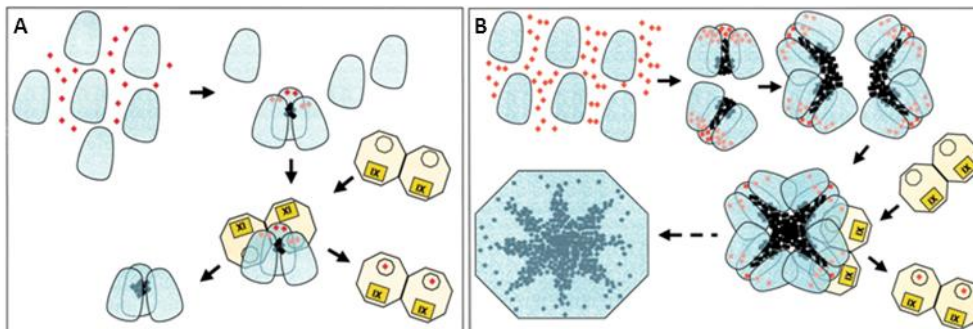


Figura 16. Model del mecanisme d'oligomerització de la frataxina de llevat (Yfh1). (A) Ensamblatge de Yfh1 amb poc ferro (sense que excedeixi la capacitat del trímer de Yfh1). (B) Assemblatge a concentracions saturants de Fe(II)/Yfh1. Els punts vermells i negres representen el Fe (II) i el Fe (III) respectivament. La ferroquelatasa es representa en forma de dímer amb un anell de protoporfirina IX i un domini d'unió al ferro per subunitat. L'oligomerització de la frataxina es donaria per dos passos seqüencials. La primera reacció ferroxidasa, catalitzada per Yfh1, indueix la formació del trímer. La segona reacció d'autooxidació, més lenta, provocaria l'oligomerització amb la unió de 50-75 àtoms de ferro per subunitat. La frataxina pot transferir el ferro unit a la ferroquelatasa en presència de citrat i, si no es transfereix, s'oxida, mineralitza i es torna menys accessible. Segons aquest model la frataxina pot actuar com a xaperona i com a magatzem de ferro (Park et al., 2003).

El grup d'Isaya defineix la frataxina com un detoxificador de ferro que protegeix les cèl·lules de l'estrès oxidatiu provocat per aquest metall gràcies a la capacitat d'oligomeritzar. El 2005 publicaven un article on mutaven residus clau per a l'activitat de ferroxidació o de mineralització de la frataxina de llevat. Van veure que eren funcions necessàries per a l'ensamblatge i la detoxificació de ferro però que no afectaven les funcions de xaperona de ferro de la frataxina (com a donadora de ferro a la ferroquelatasa i a Isu1). Malgrat això, la disminució d'aquestes activitats (ferroxidasa i mineralització) no afectava el creixement del llevat en condicions normals, només si se'ls privava d'enzims detoxificadors d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) (O'Neill et al., 2005).

1.3.3.3. Sensor de ferro i canvi metabòlic

Una altra possibilitat és que la frataxina sigui un sensor de ferro i detecti perturbacions en els nivells cel·lulars de ferro. Aquesta teoria es basa en el fet que CyaY inhibeix la síntesi de centres ferro-sofre quan la quantitat de ferro excedeix la capacitat dels apo acceptors, en comptes d'accelerar-la. Aquest paper seria consistent amb la baixa afinitat que té pel ferro (Adinolfi et al., 2009). També s'ha vist que els nivells de frataxina disminueixen quan hi ha un augment de la síntesi de grups hemo durant la diferenciació eritroide (Becker, Greer, Ponka, & Richardson, 2002), i que la síntesi d'hemo disminueix si augmenta la ràtio molar entre la frataxina i la ferroquelatasa (Yoon & Cowan, 2004). Ara bé, si la frataxina actués com a control cinètic de la formació de centres ferro-sofre, quan no hi fos hi hauria un excés d'aquests cofactors. Però fisiològicament el que passa és el contrari, i amb el dèficit de frataxina s'observa una disminució de les proteïnes que els contenen (Chen, Hemenway, & Kaplan, 2002). Per això, en eucariotes superiors sembla que la frataxina no exerceixi aquesta funció, o bé que aquesta depèn de la relació entre els nivells de frataxina i els de les proteïnes amb què interacciona. Sobre aquest punt és interessant un article on identificaven una mutació a la proteïna *scaffold* de llevat Isu1 que podia suprimir els efectes de la manca de frataxina. Aquesta mutació és l'intercanvi d'un aminoàcid, la metionina 107, per una isoleucina i, de fet, tots els eucariotes presenten metionina, incloent mamífers, mosques, cucs, plantes i protists. En canvi, els procariotes com *Escherichia*, *Shigella* i *Salmonella* presenten una isoleucina en aquesta posició (Yoon et al., 2012). De fet, els procariotes presenten un fenotip suau quan manca de frataxina, sense mostrar una alteració de l'homeòstasi del ferro ni sensibilitat a oxidants (Li, Ohshima, Jiralerspong, Bojanowski, & Pandolfo, 1999). En eucariotes, que presenten un fenotip més greu a la manca de frataxina, si es muta aquest residu es recupera la normalitat (o gairebé) pel que fa al creixement cel·lular, la síntesi de proteïnes amb centres ferro-sofre i hemo i l'homeòstasi del ferro (Yoon et al., 2014).

1.3.3.4. Activadora del metabolisme i supressor tumoral

La frataxina, com hem dit, s'ha vist associada a la membrana interna mitocondrial (Koutnikova et al., 1997) i el grup de Palau ha descrit que pot interactuar amb subunitats del complex II de la cadena respiratòria. Al mateix article també mostren la interacció amb una altra flavoproteïna implicada en la cadena de transport electrònic, ETF (*electron*

transfer flavoprotein). De fet, suplementant els llevats o els cucs deficientes en frataxina amb FAD, aquests recuperen part del fenotip associat al dèficit de frataxina (Gonzalez-Cabo, Ros, & Palau, 2010; González-Cabo, Vázquez-Manrique, García-Gimeno, Sanz, & Palau, 2005). També s'ha descrit que els pacients expressen menys quantitat d'algunes subunitats del complex I, sobretot les mitocondrials (Salehi et al., 2014). A més, es pot detectar un dèficit en el contingut energètic (mesurat amb MRS) del múscul esquelètic cardíac en pacients abans i tot de presentar la disfunció cardíaca (Lodi et al., 2001), cosa que mostra que en la malaltia es dona una afectació primària de la producció d'energia.

El dèficit de frataxina provoca una reducció de l'activitat de la cadena respiratòria en llevats i mamífers. Alguns models de llevat, de fet, no poden créixer en fonts de carboni oxidables (Babcock et al., 1997; Irazusta, Cabiscol, Reverter-Branchat, Ros, & Tamarit, 2006; Koutnikova et al., 1997; Puccio et al., 2001; Wilson & Roof, 1997). En un principi, aquest dèficit de respiració s'ha explicat per la impossibilitat de produir centres ferro-sofre *de novo* quan hi ha dèficit de frataxina. Però, com s'ha dit, algunes dades no quadren amb aquesta visió. En primer lloc, perquè l'estructura de la frataxina no sembla tenir llocs específics d'unió al ferro (Dhe-Paganon et al., 2000) i perquè els indicis d'augment de ferro en pacients no són evidents (Wilson, Lynch, & Fischbeck, 1998). En segon lloc, perquè els símptomes de l'atàxia de Friedreich són molt diferents dels pacients amb dèficits de proteïnes involucrades en el metabolisme del ferro (Camaschella et al., 2007; Pagon, Bird, Detter, & Pierce, 1985) i, en canvi, són quasi indistingibles dels que tenen deficiència de vitamina E (Harding et al., 1985). En tercer lloc, perquè s'ha descrit recentment que els enzims amb centres ferro-sofre disminueixen no per la falta dels cofactors sinó per culpa d'una remodelació de l'expressió d'aquests (Gabrielli, Ayté, & Hidalgo, 2012; Moreno-Cermeño, Alsina, Cabiscol, Tamarit, & Ros, 2013). De fet, alguns d'ells es recuperen amb el sol fet de disminuir l'estrès oxidatiu (Irazusta, et al., 2010). Finalment, la sobreexpressió de frataxina no pot recuperar l'activitat de l'aconitasa (Tan, 2001). Per tant, la frataxina podria tenir un paper important dins de la cadena de transport electrònic que afecti el metabolisme energètic i la producció d'energia.

D'altra banda, Ristow i col·laboradors descriuen com la sobreexpressió de frataxina provoca un augment en l'oxidació de la glucosa mitjançant l'augment del calci

mitocondrial, l'activació de la fosforilació oxidativa i l'increment del potencial de membrana que permeten un augment de la producció d'ATP (Ristow et al., 2000). També s'ha vist que els hepatòcits deficients en frataxina desenvolupen tumors hepàtics, indicant que podria actuar com un supressor tumoral mitocondrial (Thierbach et al., 2005). De fet, l'any següent el mateix Ristow demostrava que la sobreexpressió de frataxina disminuïa el creixement d'aquestes cèl·lules, la seva capacitat de formar colònies en agar i la producció de tumors en ratolins nus. Hipotetitzava, doncs, que podria actuar contrarestant l'efecte Warburg que descriu que les cèl·lules proliferants o canceroses presenten un augment del flux glucolític (anaeròbic o cap a lactat) tot i la presència d'oxigen (Schulz et al., 2006). S'ha descrit també que gliomes astrocítics malignes tenen menys frataxina comparats amb els gliomes no neoplàstics (Kirches et al., 2011). Així, la frataxina podria tenir un rol de supressor tumoral gràcies a la seva implicació en la regulació del metabolisme.

1.3.3.5. Reguladora de l'estrès oxidatiu

Tenint en compte les funcions esmentades anteriorment, la frataxina podria protegir les cèl·lules enfront l'estrès oxidatiu en diferents nivells. Podria quelar el ferro formant oligòmers o inhibir la formació en excés de centres ferro-sofre i així evitar la reacció de Fenton (Adinolfi et al., 2009; O'Neill et al., 2005). També podria actuar a nivell de la cadena respiratòria, el lloc principal on es generen les ROS, si l'activitat dels complexos amb centres ferro-sofre és deficient i hi ha fuga d'electrons (Armstrong, Khmour, & Hecht, 2010; Napoli, Taroni, & Cortopassi, 2006; Wallace, 1999; Douglas C Wallace, 2005). Inicialment, les conseqüències cel·lulars de la manca de frataxina van ser descrites com a falta de maneig del ferro, dèficit de síntesi de centres ferro-sofre i augment de les espècies reactives de l'oxigen (Rötig et al., 1997). En un principi es va hipotetitzar que es donava un cercle viciós entre l'augment de ferro intramitocondrial i la formació deficient de centres ferro-sofre que provocaven la reacció de Fenton augmentant la producció de ROS i l'estrès oxidatiu, fet que alhora danyava encara més els centres ferro-sofre (Bayot, Santos, Camadro, & Rustin, 2011). Però el fet és que l'acumulació de ferro és un event que succeeix tard, almenys en mamífers (Puccio et al., 2001; Sturm et al., 2005) i en moltes condicions, la deficiència de frataxina no afecta les proteïnes amb centres ferro-sofre, com en fibroblasts o limfòcits de pacients (Rötig et al., 1997). De fet, en llevats i

bacteris la biosíntesi de centres ferro-sofre en cèl·lules deficientes en frataxina continua si es mantenen a condicions de poc oxigen, pel que la frataxina podria actuar potser protegint aquests cofactors de les ROS (Bulteau et al., 2007; Gibson et al., 1996).

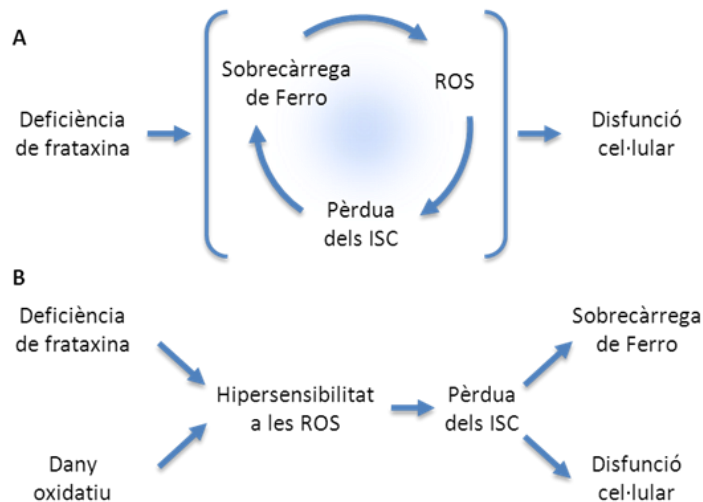


Figura 17. Diferents hipòtesis dels mecanismes alterats en l'atàxia de Friedreich. (A) Segons la hipòtesi del cercle viciós, el dèficit de frataxina resulta en un dèficit de síntesi o estabilitat dels centres ferro-sofre, amb acumulació de ferro mitocondrial i estrès oxidatiu. El ferro provoca la producció de més ROS a través de la reacció de Fenton que inactiven encara més els centres ferro-sofre. **(B)** Les cèl·lules deficientes en frataxina tenen un dèficit en la senyalització de les defenses antioxidants cosa que fa més sensibles els centres ferro-sofre d'aquestes cèl·lules a les ROS. Aquesta hipersensibilitat i sensibilització provoca una acumulació de ferro intramitocondrial, en forma de precipitats amorfes (Bayot et al., 2011).

Així, alguns grups apunten a un paper principal de l'estrès oxidatiu (i no secundari a la manca de centres ferro-sofre) en la fisiopatologia de l'atàxia de Friedreich. S'han trobat diferents marcadors d'estrès oxidatiu en mostres de pacients, com l'augment dels nivells de malondialdehid en sang (Emond, Lepage, Vanasse, & Pandolfo, 2000) i de 8-hidroxi-2-desoxiguanoisna en orina (Schulz et al., 2000). Els pacients també presenten menys glutatió lliure (Piemonte et al., 2001) i més activitat glutatió S-transferasa (Tozzi et al., 2002). A més, en fibroblasts i limfòcits de pacients d'FRDA es detecten nivells alts de peròxid d'hidrogen i de glutatió oxidat i una major sensibilitat a agents oxidants (Napoli et al., 2006; Santos et al., 2010). Tot i aquestes evidències, encara hi ha molt debat sobre si la deficiència de frataxina porta a un increment de les ROS (Seznec et al., 2005). Una explicació ha estat suggerida pel grup de Rustin. El dèficit de centres ferro-sobre, el dany oxidatiu i a la hipersensibilitat a l'estrès oxidatiu observat en models i en pacients d'FRDA, podria ser degut a que les cèl·lules deficientes en frataxina tinguessin les defenses

antioxidants disminuïdes, cosa que sensibilitzaria els centres ferro-sofre enfront les ROS. Així ho descriuen a l'article de Paupe, on mostren que les cèl·lules deficientes en frataxina no poden induir les defenses antioxidants per una alteració a la via de l'NRF2 (Paupe et al., 2009). Aquesta observació s'ha repetit en motoneurons amb la frataxina silenciada (D'Oria et al., 2013) i els *arrays* amb el model YG8R també hi donen suport, ja que mostren una regulació a la baixa dels enzims antioxidants depenents d'NRF2 (Shan et al., 2013).

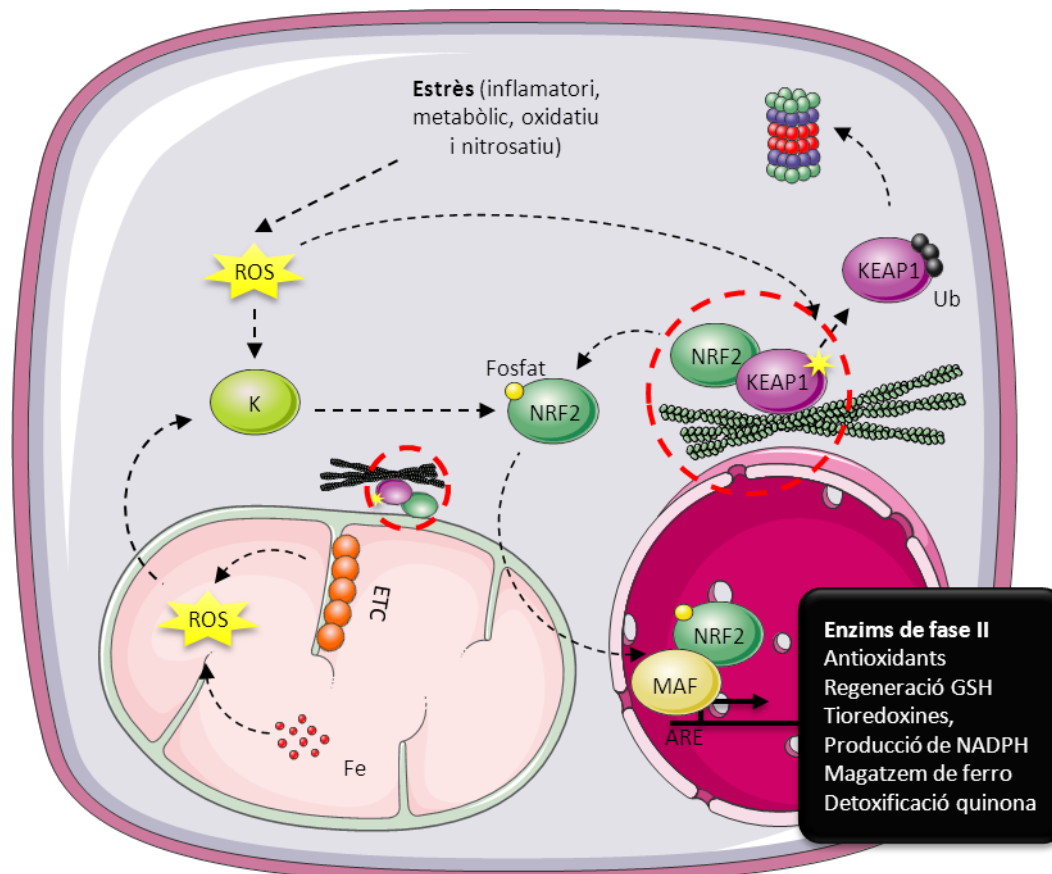


Figura 18. Senyalització per NRF2 sota condicions basals o d'estrès. En condicions basals normals el complex NRF2-KEAP1 es troba unit a la membrana externa mitocondrial (a través de PGAM5) i a les fibres d'actina d'estrès. En cèl·lules deficientes en frataxina la via està alterada perquè hi ha una situació basal de més estrès oxidatiu. Si es provoca un dany oxidatiu addicional, les cèl·lules control activaran una resposta que desestabilitza el complex actina-KEAP1-NRF2, (mitjançant la modificació de cisteïnes de KEAP1), s'alliberarà NRF2 i es fosforilarà per quinases (K). Després NRF2 trasloca al nucli on s'uneix amb coactivadors per promoure la transcripció dels enzims antioxidants de fase II. Les cèl·lules deficientes en frataxina, en canvi, no poden augmentar els enzims antioxidants mitjançant aquesta via perquè el complex NRF2-KEAP1-Actina està desorganitzat. Com a conseqüència, les cèl·lules deficientes en frataxina són més sensibles a l'oxidació.

1.4. Models de l'atàxia de Friedreich

El desenvolupament i l'ús de models per a l'estudi de l'atàxia de Friedreich és bàsic per entendre els mecanismes implicats en la malaltia i per analitzar estratègies terapèutiques potencials. Després d'identificar la mutació que causava la malaltia i el producte gènic, s'ha fet molt esforç per part de la comunitat científica per entendre i descriure la patofisiologia de la malaltia. Al llarg dels últims vint anys, s'han desenvolupat diferents models per estudiar la malaltia. El fet d'usar diferents organismes i estratègies ha permès recapitular característiques de la malaltia, descriure els diferents mecanismes patofisiològics implicats i s'han obert nous fronts per al tractament de l'atàxia de Friedreich.

1.4.1. Models de llevat

El fet que la frataxina sigui una proteïna molt conservada al llarg de l'evolució, amb ortòlegs a gairebé tots els organismes, ha permès l'ús d'organismes eucariotes unicel·lulars per estudiar-la. Els estudis en llevat han contribuït molt al coneixement sobre la malaltia i la funció de la frataxina. En el llevat de cervesa *Saccharomyces cerevisiae*, la deleció del gen homòleg de la frataxina *yeast frataxin homolog 1 (yfh1)* provoca la incapacitat de créixer en fonts de carboni no fermentables, cosa que suggereix que no pot dur a terme la fosforilació oxidativa. Aquest fenotip, però, no es dona en totes les soques. Els llevats mutants, a més, presenten acumulació de ferro mitocondrial i sensibilitat a l'estrès oxidatiu. Cal dir que la inserció de la frataxina humana en llevat recupera el fenotip, indicant que són homòlegs funcionals, a més d'estructurals (Babcock et al., 1997; Cavadini, Gellera, Patel, & Isaya, 2000; Foury & Cazzalini, 1997; Koutnikova et al., 1997; Wilson & Roof, 1997).

Al nostre grup s'han investigat els efectes de la manca de frataxina en mutants delecionats i en mutants amb expressió condicional sota un promotor controlat per tetraciclina. S'ha descrit que en els mutants delecionats ($\Delta yfh1$) augmenten els nivells de l'enzim antioxidant SOD2, mentre que la seva activitat es veu reduïda perquè presenten un dèficit en manganès. En suplementar els cultius de llevats amb manganès (cofactor de l'enzim SOD2) i també amb coure (cofactor de l'enzim citosòlic SOD1), es recupera l'activitat d'aquestes defenses antioxidants així com l'activitat d'enzims que contenen

centres ferro-sofre (Irazusta et al., 2006, 2010). Així mateix, el mutant presenta un dany oxidatiu selectiu, concretament a les proteïnes que uneixen magnesi. Per això, sembla que l'acumulació de ferro faria que aquest desplaçés el magnesi, i provoqués un augment de l'estrès oxidatiu en aquestes cèl·lules. Aquest fenotip es recuperava quelant el ferro en excés i suplementant amb els cofactors de les defenses antioxidants. Amb el mutant condicional, s'ha vist que la inactivació de l'aconitasa (i per tant dels enzims amb centres ferro-sofre) és secundària i més tardana en el temps. De fet, l'excés de ferro provoca una remodelació de l'expressió gènica de proteïnes de l'homeòstasi del ferro i d'altres metalls. També són secundàries a l'augment de ferro, la inactivació de les superòxid dismutases i la disminució del manganès. L'estudi demostra igualment que el llevat canvia l'expressió de gens del metabolisme energètic gràcies a l'activació del factor de transcripció Atr1 que podria ser deguda a l'estrès oxidatiu (Moreno-Cermeño et al., 2010, 2013). En el llevat de fissió *Schizosaccharomyces pombe* també s'ha demostrat que si es delecta l'homòleg de la frataxina (*pfh1* de *pombe frataxin homolog*), les cèl·lules responen amb una remodelació dels gens implicats en el metabolisme del ferro comparable amb la situació que es dona si hi ha manca de ferro al citosol (Gabrielli et al., 2012). En conjunt, aquestes dades descarten que la frataxina tingui un rol directe en la biosíntesi dels centres ferro-sofre.

1.4.2. Models de cultius cel·lulars

Entre els models cel·lulars usats per estudiar la malaltia trobem diferents línies cel·lulars, com les HeLa, oligodendrogloma, neuroblastoma, T-Rex-293 i carcinoma, en els quals s'ha reduït els nivells de frataxina gràcies a l'RNAi o ribozims (Calmels et al., 2009; Lu & Cortopassi, 2007; Napoli, Morin, Bernhardt, Buckpitt, & Cortopassi, 2007; Palomo, Cerrato, Gargini, & Diaz-Nido, 2011; Santos, Ohshima, & Pandolfo, 2001; Stehling, Elsässer, Brückel, Mühlhoff, & Lill, 2004; Zanella et al., 2008). Entre altres observacions, aquests models han descrit l'acumulació de ferro, la interacció de la frataxina amb els components de la maquinària de biosíntesi dels centres de ferro-sofre, la inducció d'enzims antioxidants o la mort apoptòtica de les cèl·lules afectades.

També s'han usat cultius de cèl·lules derivades de pacients (limfòcits i fibroblasts), els quals són models cel·lulars rellevants, ja que presenten el locus de frataxina complet, amb

els triplets i les seqüències reguladores. En aquestes cèl·lules s'ha descrit, entre d'altres, l'afectació del citoesquelet (Bayot et al., 2013), del metabolisme (Coppola et al., 2009; Heidari, Houshmand, Hosseinkhani, Nafissi, & Khatami, 2009), i dels nivells de glutatió i les ROS (Bulteau et al., 2012; Napoli et al., 2006). Tot i ser accessibles, aquestes cèl·lules no mostren el fenotip associat a l'atàxia de Friedreich (Rötig et al., 1997; Sturm et al., 2005) i per la qual cosa seria més interessant estudiar neurones, cèl·lules beta o cardiomiòcits, però aquests tipus cel·lulars no són tant accessibles. Una estratègia més novedosa és usar els fibroblasts de pacients per convertir-los en cèl·lules mare pluripotents (iPSC de *induced pluripotent stem cells*) que després es poden diferenciar a cardiomiòcits i neurones, però tampoc aquestes mostren les característiques descrites en pacients (Du et al., 2012; Hick et al., 2013; Ku et al., 2010; Liu et al., 2011). Hi ha estudis fets amb cèl·lules del lligament periodontal de pacients que milloren la resposta a l'estrès oxidatiu quan són cultivades amb medi condicionat provinent de cèl·lules mare, gràcies sobretot als factors tròfics (Jones, Estirado, Redondo, Bueno, & Martínez, 2012).

Recentment, el nostre grup ha desenvolupat un model amb cultius primaris de neurones dels DRG en les quals s'ha silenciat la frataxina. En aquestes cèl·lules es dona una despolarització mitocondrial, una degeneració de les neurites i apoptosi, amb una clara alteració del calci (Mincheva-Tasheva, Obis, Tamarit, & Ros, 2013).

1.4.3. Models d'animals invertebrats

Els estudis en models de mosca han caracteritzat amb detall diferents aspectes fisiopatològics i poden resultar molt útils per investigar nous compostos per contrarestar la manca de frataxina. Després d'identificar el gen homòleg a la mosca (*fh* de *frataxin homolog*) (Cañizares et al., 2000) es van fer diferents mutants *knock-down* (KD) sistèmics i específics de teixit combinant el sistema UAS-GAL4 i l'RNAi. En mosques, una disminució de la frataxina fins a nivells del 30% provoca un desenvolupament embrionari normal, però la longevitat disminueix i perden capacitat d'escalar. A nivell bioquímic, el silenciament de frataxina disminueix l'activitat d'enzims amb centres ferro-sofre i les mosques mutants són hipersensibles al ferro i a la hiperòxia (Anderson, Kirby, Hilliker, & Phillips, 2005; Llorens et al., 2007). Si es sobreexpressen enzims detoxificadors de ROS quan el silenciament es dona al sistema nerviós perifèric, les mosques viuen més i són

menys sensibles al peròxid d'hidrogen (Anderson, Kirby, Orr, Hilliker, & Phillips, 2008). La sobreexpressió de frataxina provoca una millora de la capacitat antioxidant, de la resistència a agents oxidants i augmenta la longevitat (Runko, Griswold, & Min, 2008), però si l'aument dels nivells és encara major, les mosques moren (Llorens et al., 2007; Navarro et al., 2011). El silenciament sistèmic també provoca peroxidació lipídica i acumulació d'àcids grassos, tot i que s'observa si es disminueixen dràsticament els nivells de frataxina. La deleció de la frataxina a la glia provoca un fenotip similar, amb acumulació de gotes lipídiques a les cèl·lules gials i un dèficit locomotor entre altres símptomes. La coexpressió de l'ortòloga de l'apolipoproteïna D de mosca té efectes protectors, ja que disminueix la peroxidació lipídica, indicant que les cèl·lules gials i la peroxidació lipídica juguen un paper important en la malaltia (Navarro et al., 2010).

En el model del cuc nemàtode *Caenorhabditis elegans* s'han generat diferents KD transients del gen homòleg de la frataxina (*frh-1* de *frataxin homolog*), mitjançant l'RNAi. Mentre alguns autors han detectat un augment de la longevitat (Ventura et al., 2005), altres l'han vista reduïda de manera significativa (Vázquez-Manrique et al., 2006). La disminució de la longevitat del model de nemàtode s'ha explicat per una afectació de la respiració (Zarse, Schulz, Birringer, & Ristow, 2007). En l'article de Vázquez-Manrique també descriuen un augment de la sensibilitat a l'estrès oxidatiu, un comportament letàrgic (amb menys activitat fisiològica), una disminució de la mida i un creixement lent entre altres fenotips del cuc. Aquests models podrien ser molt útils per a l'*screening* de nous fàrmacs.

1.4.4. Models de ratolí

La deleció completa de la frataxina en mamífers és inviable, i els ratolins, per exemple, moren a l'estadi embrionari E6,5 (Cossée et al., 2000). No se sap per què és letal, però s'ha postulat que si la frataxina participés en la biosíntesi dels centres ferro-sofre, explicaria una replicació, transcripció i traducció gènica deficient, perquè moltes proteïnes que participen en aquests processos essencials contenen aquests centres (Perdomini, Hick, Puccio, & Pook, 2013). El fet que la deleció de frataxina en mamífers sigui letal embrionària ha provocat que s'abordés la creació de ratolins mutants des de diferents aproximacions. Un dels abordatges és la deleció total del gen però de manera

condicional en teixit o en el temps. L'altre és la incorporació del gen humanitzat als ratolins.

Pel que fa als models condicionals, els primers ratolins *knock-out* (KO) condicionals específics de teixit van ser creats amb el sistema *Cre-loxP*. Aquests mutants presenten cardiomiopatia hipertròfica, atàxia espinocerebel·lar i sensorial, i algunes característiques típiques de la diabetis. El KO específic cardíac expressa la recombinasa Cre sota el promotor de la creatina-quinasa muscular (MCK). Aquest presenta hipertròfia cardíaca a les 5 setmanes després de néixer, dèficit d'enzims amb centres ferro-sofre i acumulació de ferro a les 7 setmanes, juntament amb una alteració de proteïnes del metabolisme cel·lular del ferro. No s'han detectat indicis de dany oxidatiu en aquest mutant, per bé que la cadena respiratòria està molt afectada. Estudis d'expressió amb *arrays* també mostren una alteració del metabolisme, de la localització dels components cel·lulars, i de gens implicats en l'apoptosi (Huang et al., 2009; Puccio et al., 2001; Seznec et al., 2004, 2005). El KO específic neuronal es va generar amb el promotor de l'enolasa específica neuronal (NSE), però a més de les neurones, la deleció afecta també el cor i el fetge. Aquest mutant també presenta atàxia progressiva amb pèrdua de propiocepció i cardiomiopatia dilatada. A nivell histològic presenta acumulació de ferro i fibrosi al cor. El problema és que té un fenotip molt greu i mor molt aviat. També presenta lesions al còrtex que no s'han vist en humans (Puccio et al., 2001). S'ha descrit que l'alteració de la cadena respiratòria dels dos mutants (NSE i MCK) causa l'hiperacetilació de proteïnes cardíques per l'inhibició de la sirtuïna mitocondrial SIRT3 (Wagner, Pride, Babbey, & Payne, 2012).

També s'ha generat un mutant condicional induïble, amb la recombinasa Cre sota el control del promotor de la proteïna prió de ratolí (PRP) sota l'acció del tamoxifèn, el que permet el control espacial i temporal de la deleció de frataxina. Aquest model de ratolí desenvolupa atàxia mixta (cerebel·lar i sensorial) amb una pèrdua de la propiocepció i sense defectes motors. Deu setmanes després de la injecció s'observa el primer fenotip, que és la degeneració de les neurones grans sensorials a les DRG, amb presència de vacúols, acumulació de lipofuscina i alteració de l'autofàgia. També s'afecten les neurones motores de la banya ventral de la medul·la espinal, tal com succeeix als

pacients. Un fet no específic de l'FRDA i que contribueix a l'atàxia cerebel·lar és la degeneració de les cèl·lules granulars del cerebel (Koeppen, 2011; Simon et al., 2004).

Per abordar el problema de la diabetis i la intolerància als glúcids, es va generar un KO específic de les cèl·lules beta pancreàtiques amb el transgèn *Ins2-Cre*. Aquests ratolins tenen alterada la tolerància a la glucosa i desenvolupen diabetis a llarg termini, causada per la pèrdua de cèl·lules beta (Ristow et al., 2003). També s'ha generat un mutant de fetge o el paper fonamental d'aquest òrgan en la regulació sistèmica de l'homeòstasi del ferro. Aquest mutant té la recombinasa *Cre* sota el control del promotor de l'albumina (ALB), provocant la formació de lòbuls al fetge, primer identificats com a tumors però que gràcies a la generació d'un mutant nou també específic de fetge (i sota el mateix promotor) s'ha descrit que podrien ser deguts a la regeneració (Martelli et al., 2012; Thierbach et al., 2005).

L'altra estratègia que s'explica més amunt és la incorporació del gen humanitzat als ratolins per generar models amb nivells residuals de frataxina. El problema és que és difícil inserir repeticions de GAA llargues a aquests ratolins. Un dels models es va generar el 2002 amb la inserció de 230 repeticions del triplet GAA al primer intró del locus de frataxina, designat com a KIKI (de *knock-in knock-in*) (Miranda et al., 2002) que després va ser creuat amb un *knock-out* de frataxina (heterozigot) per obtenir un ratolí heterozigot compost, designat com a KIKO (de *knock-in knock-out*). Aquests presenten, respectivament, un 70% i un 30% d'expressió de frataxina residual al cor. El ratolí KIKO no presenta dipòsits de ferro al cor, però sí una fibrosi lleu i falta de coordinació. Tampoc no presenta neurodegeneració, però als *arrays* s'ha vist que hi ha canvis d'expressió gènica a la medul·la espinal, i que la majoria de gens afectats corresponen a components mitocondrials (Coppola et al., 2006). Al cor i al múscul esquelètic, presenta canvis estructurals i metabòlics, amb una afectació important del metabolisme lipídic i la via de PPAR γ (Coppola et al., 2009).

Un altre model amb la inserció de la frataxina sense expansió (amb 9 repeticions) va ser generat amb la inserció del cromosoma de llevat artificial humà (YAC) contenint el gen humà FRDA clonat en un fons KO per frataxina (Pook et al., 2001). Aquest mateix

cromosoma YAC es va usar per fer altres mutants. Es van inserir repeticions del triplet GAA al YAC que finalment van donar dos línies de ratolí mutant, l'YG8 amb dos còpies del gen amb 190 i 90 repeticions del triplet i l'YG22 amb una sola seqüència de 190 repeticions que presentaven inestabilitat genòmica (Al-Mahdawi et al., 2004). Tots dos ratolins es van creuar amb heterozigots KO de frataxina per tenir els YG8R i YG22R (on R es deu a *rescue*). Aquests tenien una expressió de frataxina menor a la frataxina endògena de ratolí salvatge i també menor als mutants originals. L'expressió variava entre teixits, en alguns era del 30% comparada amb els originals, però en el cor era d'un 50-60%. Malgrat això, cal tenir en compte que mesurar i comparar els nivells de frataxina humana en un ratolí és complicat (Al-Mahdawi et al., 2006). Els dos models tenen un fenotip suau amb dificultat en la coordinació i la locomoció. També s'observen vacúols, cromatolisi i lipofuscina a les neurones grans dels DRG. Al cor s'han trobat dipòsits de ferro, lipofuscina i glicogen però només en ratolins de més de 14 mesos encara que a nivell funcional no es veu afectat. L'activitat de la cadena respiratòria no està afectada però hi ha una lleu disminució de l'activitat aconitasa i signes d'estrès oxidatiu en ratolins de 6 mesos (Al-Mahdawi et al., 2006).

El problema de la deleció completa de frataxina és que els pacients sí que tenen una quantitat de frataxina residual, i una deleció completa pot donar fenotips severos o que no recapitulen els símptomes dels afectats. De fet, s'ha demostrat que totes les cèl·lules són sensibles a la deleció total de la frataxina, mentre que només els tipus cel·lulars afectats a la frataxina són més vulnerables als nivells baixos de frataxina. Així, sembla essencial estudiar la patofisiologia provocada quan hi ha nivells residuals de frataxina. Ara bé, els mutants condicionals mostren un fenotip molt sever mentre que els basats en l'expansió de GAA presenten un fenotip molt lleu. Per això s'estan intentant construir nous clons i creuaments, també amb la possibilitat de generar línies amb control temporal del silenciament gènic mitjançant shRNA (Dow & Lowe, 2012; Perdomini et al., 2013).

1.5. Perspectives terapèutiques

Com que encara no hi ha cap tractament per a l'atàxia de Friedreich que estigui aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*), s'estan dedicant molts esforços en trobar nous fàrmacs i en fer assaigs clínics. Hi ha molts projectes en fases inicials, i d'entre els

diferents candidats, la *Research Friedreich's ataxia alliance* (FARA) dels Estats Units d'Amèrica en tria uns quants com a prioritaris. Per complementar la informació que es cita a continuació es poden consultar dues revisions generals i una a nivell cardíac recents sobre teràpies usades en l'atàxia de Friedreich (Lynch, Regner, et al., 2012; Richardson, Kelly, Yu, & Simpkins, 2013; Robert Wilson, 2012), i també una revisió dels assaigs clínics (Perlman, 2012). Les estratègies terapèutiques es poden agrupar en diferents grups, que es detallen a continuació.

1.5.1. Disminució de l'estrès oxidatiu i/o augment de la funció mitocondrial

Com a antioxidants, trobem la idebenona, aprovada per al tractament de l'FRDA al Canadà i que molts països prescriuen com a medicament d'ús compassiu. La idebenona és una parabenzoquinona amb una estructura molt semblant al coenzim Q₁₀. Tal com ho fa el coenzim Q₁₀, la idebenona transfereix electrons entre els complexos I, II i III de la cadena respiratòria (Sugiyama, Fujita, Matsumoto, Okamoto, & Imada, 1985), té propietats antioxidants (Sunò & Nagaoka, 1984), i teòricament tindria una millor biodisponibilitat gràcies al menor pes molecular i al fet de ser més soluble en aigua. S'han realitzat assaigs clínics de fase III amb pacients d'atàxia de Friedreich (Lagedrost et al., 2011; Lynch, Perlman, & Meier, 2010). Els assajos mostren una certa millora de la hipertròfia cardíaca, sobretot si es dona en pacients joves i lleus a alta dosi, i una tendència (no significativa) a millorar en l'atàxia (Buyse et al., 2003; Di Prospero et al., 2007; Hausse et al., 2002; Lagedrost et al., 2011; Lynch et al., 2010; Mariotti et al., 2003; Meier, Perlman, Rummey, Coppard, & Lynch, 2012; Pineda et al., 2008). Com que ja fa temps que s'estudia i les millores no són significatives, la FARA l'ha tret aquest any de les línies de recerca prioritàries. És interessant, d'altra banda, que un estudi que valorava la millora qualitat de vida va donar resultats positius (Brandsema, Stephens, Hartley, & Yoon, 2010). Hi ha una revisió sobre l'ús de la idebenona i el coenzim Q₁₀ del 2013 que té en compte els diferents assaigs i n'analitza els pros i els contres (Parkinson, Schulz, & Giunti, 2013). També s'han fet assaigs clínics amb altres compostos que actuarien en un sentit similar: el coenzim Q₁₀, la vitamina E, l'N-acetil cisteïna, el seleni, l'àcid lipoic i la riboflavina (Arpa et al., 2014; Bavarsad Shahripour, Harrigan, & Alexandrov, 2014; Cooper & Schapira, 2003; Melancon et al., 1982; Yang et al., 1984).

A més a més, trobem els antioxidants d'última generació. L'alfa-tocoferolquinona (EPI-A0001), que millora la funció neurològica mesurada per la *Friedreich's Ataxia Rating Scale* (FARS), va acabar la fase II el 2011 (Lynch et al., 2012). Un compost "germà" (EPI-743) s'usa per millorar la funció mitocondrial i sincronitzar la generació d'energia contrarestant l'estrès oxidatiu. És una benzoquinona, i ha sorgit d'investigacions anteriors amb el coenzim Q₁₀ i la idebenona. Pot creuar la barrera hematoencefàlica fàcilment i té un potencial redox diferent. Té com a diana la NADPH:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) que redueix les quinones a hidroquinones evitant la producció de radicals lliures. L'assaig que es durà a terme evaluarà la visió i també la funció neurològica. Ja s'ha provat en altres síndromes amb afectació òptica i en un pacient d'FRDA (Enns et al., 2012). L'àcid indol-3-propionic (o OX1) és un compost que conté un indol (com la melatonina) i actua com a antioxidant gràcies a la seva capacitat d'eliminar radicals lliures i quelar metalls (Karbownik et al., 2001; Qi et al., 2000).

Altres compostos amb possibilitats són els àcids grassos poliinsaturats (PUFA de *polyunsaturated fatty acids*), molt importants per al funcionament mitocondrial i del sistema nerviós. Els PUFA són molt susceptibles a l'oxidació, cosa que pot provocar una disfunció mitocondrial que es creu que ocorre en varies malalties neurològiques (Brenna & Diau, 2007; Harper, Bevilacqua, Hagopian, Weindruch, & Ramsey, 2004). L'estratègia és estabilitzar-los reemplaçant els hidrogens pel deuteri, un isòtop de l'hidrogen, que ha demostrat que protegeix les cèl·lules del dany oxidatiu en un model cel·lular d'atàxia de Friedreich (Cotticelli, Crabbe, Wilson, & Shchepinov, 2013).

També ls *mitochondrial radical quenchers* (MQR) són compostos que tenen els mitocondris com a diana, on són capaços de quelar els radicals lliures. Aquests estan essent desenvolupats pel laboratori de Hecht a Arizona i els estan començant a provar al laboratori de Pensilvània de Rob Wilson (Khdour, Lu, & Hecht, 2011; Wilson, 2012).

1.5.2. Modul·lació de processos controlats per la frataxina

Tal com ha passat amb la idebenona, la deferiprona també ha estat retirada aquest any de les prioritats de recerca terapèutica de FARA. La deferiprona és un quelant de ferro soluble en lipids (així pot atravesar la barrera hematoencefàlica i les membranes

cèl·lulars). Com que a l'atàxia de Friedreich el ferro s'acumula al mitocondri, els quelants han de ser capaços de penetrar fins a aquest orgànul, i redistribuir-lo als altres compartiments cel·lulars. Per tant, a més de soluble en lípids, també hauria de tenir poca afinitat pel ferro (com és el cas de la deferiprona, que té menys afinitat pel ferro que la transferrina). S'ha usat en molts països com a alternativa a la deferoxamina, ja que aquesta, com la majoria de quelants de ferro, només poden quelar el ferro del medi extracel·lular. Amb dosis baixes de deferiprona, alguns assaigs clínics suggereixen una millora a nivell cardíac i neurològic, altres no veuen efectes i altres veuen un empitjorament de la postura. Alguns assaigs, però, usen doble teràpia amb idebenona i triple amb riboflavina (Arpa et al., 2014; Boddaert et al., 2007; Pandolfo & Hausmann, 2013; Velasco-Sánchez et al., 2011). L'ús de dosis més altes pot empitjorar la situació, ja que l'FRDA és més una condició de dèficit de ferro que de sobrecàrrega, com ho demostren la inactivació dels centres ferro-sofre, l'activació de les IRP i l'augment de la captació de ferro. Això fa que els pacients potser hagin de prendre suplementes de ferro juntament amb la deferiprona. També provoca efectes secundaris com són l'agranulocitosi i la disminució dels neutròfils, i els pacients han d'estar monitoritzats setmanalment durant el tractament (Pandolfo & Hausmann, 2013).

Una manera d'abordar els problemes metabòlics seria activar el PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- alpha*), que regula el metabolisme energètic cel·lular i la resposta a l'estrès oxidatiu. S'ha descrit que PGC1 α està inactivat en cèl·lules deficientes de frataxina (Marmolino et al., 2010) i el grup de Robert Wilson de Pennsylvania treballen en augmentar l'activitat de PGC1 α amb diferents nutrients. El Pioglitazone, és un lligand de PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) que també controla el metabolisme energètic i la resposta a l'estrès oxidatiu (Paupé et al., 2009). S'ha vist una afectació de la via de PPAR γ en models d'FRDA (Coppola et al., 2009), i que aquest és capaç d'augmentar l'expressió de frataxina (Marmolino et al., 2009). D'altra banda, ja s'està usant en pacients amb diabetis mellitus tipus II, cosa que accelera el procés d'evaluació del medicament. Cal dir que no és recomanable en pacients amb cardiopatia congestiva o diabetis tipus I (Schernthaner, Currie, & Schernthaner, 2013). El laboratori de Rustin ha acabat un assaig clínic amb aquest medicament però encara no s'ha publicat.

En la mateixa línia, una aproximació més nova és la d'activar l'NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), que ajuda a la defensa antioxidant cel·lular, la qual està afectada en cèl·lules deficientes en frataxina (Paupe et al., 2009; Shan et al., 2013). El grup de Cortopassi i de Perlman estan validant compostos per activar NRF2.

1.5.3. Estabilitzadors, estimuladors o substitució de la proteïna frataxina

L'eritropoetina (EPO) és una hormona que té efectes neuro- i cardioprotectors, i un grup d' Austràlia ha provat que augmenta els nivells de frataxina tant en cèl·lules com en estudis amb pacients (Boesch et al., 2007, 2008; Sturm et al., 2005). Els pacients tractats amb EPO milloren clínicament, però l'EPO afecta alguns paràmetres bioquímics i cel·lulars sanguinis, així com el metabolisme del ferro. Altres grups han descrit efectes similars, i s'estan duent a terme nous assaigs clínics (Acquaviva et al., 2008; Saccà et al., 2011). En la mateixa línia, es volen provar mimètics de l'EPO desenvolupats per la companyia farmacèutica STATegics.

Una altra estratègia és evitar la degradació de la proteïna. El grup de Testi va descriure que la frataxina es degradava al proteasoma i el residu on es donava la majoria d'ubiquitinització que mediava la degradació. Aquest aminoàcid es troba en una fenadura que es forma a la superfície de la proteïna i és accessible per compostos que n'inhibirien l'ubiquitinització i la degradació, augmentant així els nivells de frataxina. El grup està evaluant l'eficàcia d'aquests compostos que en un futur podrien ser candidats per assaigs clínics (Rufini et al., 2011).

Una altra aproximació és usar una proteïna de fusió, que seria la frataxina unida a un fragment proteic anomenat TAT (*trans-activator of transcription*) el qual és permeable a les membranes. Aquesta proteïna podria "substituir" la proteïna nativa als mitocondris. S'ha provat en un model animal d'FRDA on han observat un augment de la longevitat i la millora de la funció cardíaca (Payne, 2011).

1.5.4. Augment de l'expressió del gen de la frataxina

Els inhibidors de les desacetilases d'histones (HDACi) impedeixen que la cromatina es mantingui empaquetada i silenciada. Els primers a descriure el potencial d'aquests compostos en l'FRDA van ser el grup de Gottesfeld (Herman et al., 2006), i ara treballen per dissenyar inhibidors nous que augmentin l'expressió de frataxina en cèl·lules de pacients i en models animals. Els compostos que s'han provat en assaigs clínics han demostrat que poden augmentar l'expressió de la frataxina quan es prenen oralment, tot i que a llarg termini formen metabòlits que poden ser perillosos pel cos, per això ara s'estan generant nous compostos més estables (Gottesfeld, Rusche, & Pandolfo, 2013; Soragni et al., 2011, 2012). La nicotnamida, una forma de vitamina B3, també regula les desacetilases d'histones, i s'ha provat que pot augmentar l'expressió de la frataxina en un model de ratolí i en limfòcits de pacients (Chan et al., 2013). S'està duent a terme un assaig clínic per evaluar les dosis de nicotinamida per augmentar els nivells de frataxina en pacients (<http://www.clinicaltrials.gov>).

El resveratrol s'ha estudiat per la seva capacitat de millorar la funció mitocondrial. Investigadors d'Austràlia han vist que pot augmentar els nivells de frataxina, segurament mitjançant l'activació de la sirtuina 1 que modulant l'activitat de PPAR γ i PGC-1 α augmentaria l'expressió de frataxina. S'ha dut a terme un assaig en humans i, tot i que els nivells de frataxina en limfòcits sanguinis no ha mostrat una millora, si que ho ha fet la parla i l'evaluació amb les escales neurològiques. Tot i així també té efectes adversos com diarrees i dolor abdominal (Li et al., 2013).

L'interferó gamma (IFN γ) juga un paper clau en el sistema immune i també regula l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme del ferro. S'ha demostrat que és capaç d'augmentar els nivells cel·lulars de frataxina i millorar la coordinació i l'activitat motora d'un model de ratolí (Tomassini et al., 2012). Actualment s'usa per altres malalties, i s'estan duent a terme dos estudis pilot de seguretat i tolerabilitat coordinats per Testi i Lynch.

L'expressió de frataxina es veu afectada per diferents factors epigenètics, i entre aquests s'han identificat RNA no codificants (ncRNA). Si es degraden els ncRNA específics de

frataxina es permet una reversió de l'heterocromatina parcial i s'augmenten els nivells de frataxina. RaNA és l'empresa encarregada d'aquest estudi. També s'han destinat diners a la recerca que estudia el control de la transcripció del gen de la frataxina, per poder augmentar els nivells residuals d'expressió del gen en pacients (<http://www.curefa.org/>).

1.5.5. Teràpia gènica

Diferents grups treballen amb la idea de reemplaçar el gen usant diferents vectors virals. Entre ells trobem els virus adeno-associats (AAV) que utilitzen al laboratori de Puccio, els quals presenten especificitat pels teixits afectats i han demostrat revertir el fenotip cardíac en un model de ratolí (Perdomini et al., 2014). El grup de Matilla també vol generar virus AAV per a la teràpia de l'atàxia de Friedreich, i han començat un projecte de micromescenatge per al finançament (<http://www.stop-fa.org>). També per micromescenatge s'està finançant un projecte per desenvolupar un virus de l'herpes simple (HSV) liderat pel grup de Diaz-Nido (<http://www.genefa.org>). Lim i els seus col·laboradors també estan treballant des de fa temps en generar vectors HSV per al gen de la frataxina (<http://www.lablife.org/labs/3599>). També hi ha un projecte per desenvolupar nanopartícules per transportar el DNA del gen de la frataxina mitjançant pèptids a la superfície que puguin creuar la barrera hematoencefàlica i les membranes cel·lulars, i que tinguin especificitat per les cèl·lules afectades (<http://www.stop-fa.org>).

1.5.6. *High-Throughput Screening* pel descobriment de nous fàrmacs

S'han finançat també diferents projectes per testar compostos o bé que augmentin l'expressió del gen de la frataxina (Lufino et al., 2013; Soragni et al., 2008), o bé que augmentin els nivells de frataxina (grup d'Oglesbee) o millorin alguns dels paràmetres bioquímics afectats a la malaltia (grup de Cortopassi) (<http://www.curefa.org>).

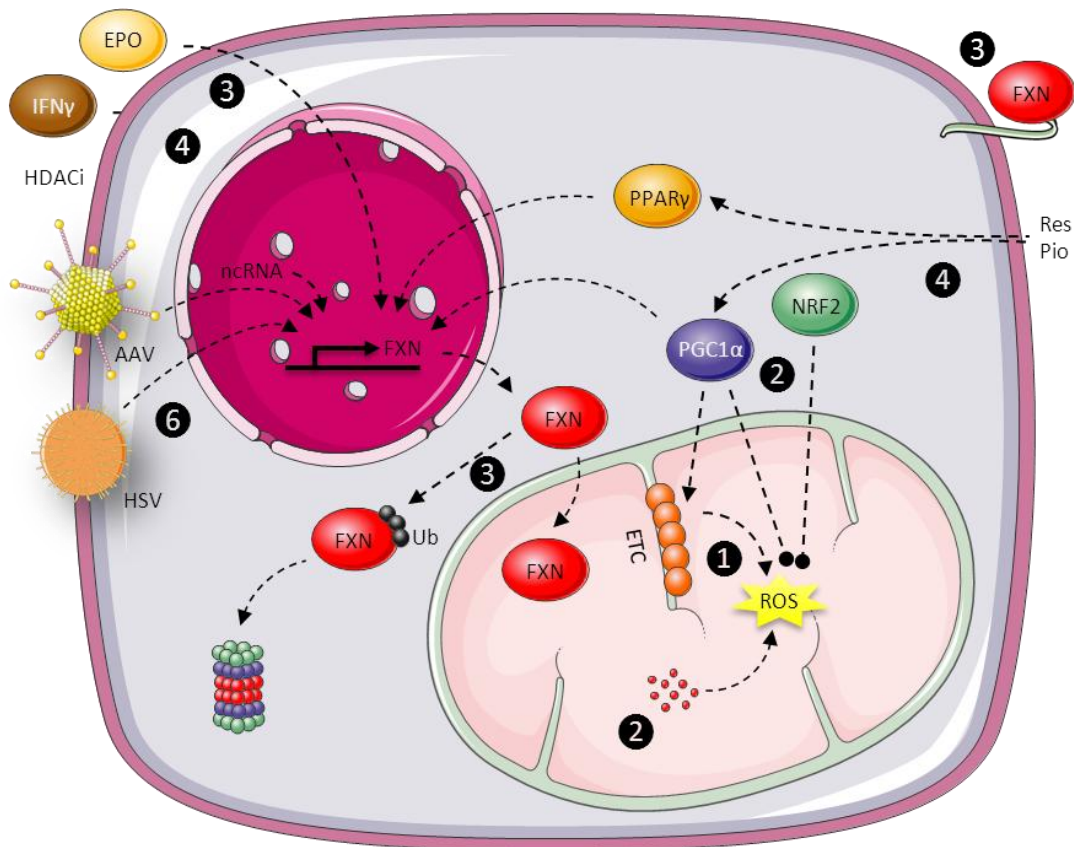


Figura 19. Estratègies terapèutiques per l'atàxia de Friedreich. (1) Disminució de l'estrès oxidatiu i/o augment de la funció mitocondrial: idebenona, Q₁₀, vitamina E, seleni, àcid lipoic, riboflavina, antioxidants d'última generació, àcids grassos poliinsaturats deuterats i quelants de radicals lliures mitocondrials **(2)** Modulació dels processos controlats per frataxina: quelants de ferro (deferiprona i deferoxamina) i moduladors del metabolisme energètic i l'estrès oxidatiu (activadors de PGC1α i NRF2) **(3)** Estimuladors, estabilitzadors o substitutius de la proteïna frataxina (EPO, compostos per evitar la ubiquitinització i la degradació, substitució proteica amb TAT-Fxn) **(4)** Augment de l'expressió del gen de frataxina: HDACi (NAM), resveratrol, EPO **(5)** Teràpia gènica: AAV i HSV. ETC (cadena de transport electrònic), Res (resveratrol), Pio (pioglitazone), Ub (ubiquitina).

2. EL COR I ELS MIÒCITS CARDÍACS

El cor humà és l'òrgan central i motor de l'aparell circulatori. Fa la funció de bomba que atreu la sang venosa i la impulsa a tota la xarxa capilar mitjançant les artèries aorta i pulmonar. És el primer òrgan que es forma durant el desenvolupament embrionari. La morfogènesi, el creixement i la funció cardíaca són essencials per a la supervivència de l'embrió, ja que si es donen anomalies durant el desenvolupament es pot desenvolupar una cardiopatia congènita. De fet, aquest és el defecte de naixement més freqüent en humans. De manera paral·lela, les cardiopaties adultes són la causa de mort més comú al món desenvolupat, i tot i els avenços en teràpies i dispositius mecànics, només una

minoria dels pacients viu més de 5 anys després de patir una fallida cardíaca (Olson & Schneider, 2003).

El cor consta de quatre cavitats, les aurícules dreta i esquerra i els ventricles dret i esquerre. La massa contràctil s'anomena miocardi, i està coberta per dues capes; a l'interior per l'endocardi, i a l'exterior pel pericardi. L'endocardi és una membrana serosa constituïda d'endoteli i teixit connectiu, amb fibres elàstiques, fibres de col·lagen, vasos sanguinis i fibres musculars especialitzades anomenades fibres de Purkinje. Aquestes últimes condueixen l'estímul elèctric que permet que el cor es contregui de manera coordinada. El miocardi està format pels cardiomiòcits, unes cèl·lules especialitzades autoexcitables que es contrauen de manera involuntària i rítmica sense necessitat d'estimulació nerviosa voluntària. També hi trobem teixit connectiu, capil·lars limfàtics, fibres nervioses i una xarxa abundant de capil·lars sanguinis per satisfer les necessitats energètiques cel·lulars. L'epicardi és una capa fina serosa mesotelial que envolta el cor, amb capil·lars i fibres nervioses. El cor conté més teixit connectiu que el múscul esquelètic, segurament per prevenir la ruptura muscular i el sobreestirament, poc tolerat pel cor.

Per exercir la funció de bomba del sistema circulatori cal que les cèl·lules musculars cardíques es contraguin de manera organitzada. Aquestes es connecten entre elles per formar un sinciti (cèl·lula multinucleada) elèctric, mitjançant connexions elèctriques i mecàniques entre les cèl·lules cardíques adjacents. Això permet que el potencial d'acció generat a una regió especialitzada del cor (el nòdul sinoauricular) pugui travessar ràpidament tot el cor per facilitar una contracció sincronitzada. De la mateixa manera, també cal una relaxació sincronitzada. Cal dir que tot i ser ambdós músculs estriats, el cardíac i l'esquelètic difereixen en punts com l'organització, l'acoblament elèctric i mecànic, l'acoblament entre excitació i contracció, i els mecanismes que en regulen la contracció (Koeppen & Stanton, 2009).

El múscul cardíac és involuntari i conté un "marcapàs" intrínsec (unes cèl·lules especialitzades al nòdul sinoauricular a l'aurícula dreta) que experimenta despolaritzacions espontànies i genera potencials d'acció. El potencial d'acció es propaga per les aurícules i travessa el nòdul auriculoventricular, després els ventricles a través de

vies de conducció especialitzades (el feix de His i les fibres de Purkinje) i a través dels miòcits. La contracció ventricular tarda uns 220 ms i l'auricular uns 70 ms, com que la contracció del cardiomiòcit dura uns 300 ms, la conducció ràpida del potencial d'acció permet la contracció quasi sincrònica de totes les cèl·lules del cor. Per contra, al múscul esquelètic unes cèl·lules recluten les altres mecànicament. El potencial d'acció del múscul cardíac dura entre 150 i 300 ms mentre que el del múscul esquelètic només dura uns 5 ms. Al múscul cardíac dura més perquè l'entrada de Ca^{2+} es dona a través dels canals de calci regulats per voltatge de tipus L del sarcolemma (LTCC de *L-type calcium channel*). Primer entra poc Ca^{2+} de fora, i aquest serveix d'estímul per a que s'alliberi el Ca^{2+} del RS. Sense Ca^{2+} fora es dona el potencial d'acció però no la contracció; el cor per bategar necessita que hi hagi calci a l'exterior, així la sang i el líquid extracel·lular contenen Ca^{2+} a una concentració de 1-2 mM. Igualment, en un cor *ex vivo*, si la solució de perfusió no conté calci, tampoc no podrà bategar. El múscul esquelètic, en canvi, pot bategar sense Ca^{2+} a l'exterior. Les regions terminals de l'SR estan enriquides amb receptors de rianodina (RyR), els quals estan controlats pel Ca^{2+} i alliberen Ca^{2+} . Aquests receptors alliberen molt més Ca^{2+} que no pas n'entra de fora. Així, per a bategar el miocardi necessita un acoblament electroquímic que implica un alliberament de Ca^{2+} induït per Ca^{2+} , mentre que al múscul esquelètic cal un acoplament electromecànic.

La contracció muscular està regulada pels filaments fins, que necessiten calci per potenciar les interaccions entre l'actina i la miosina. Quan la concentració de Ca^{2+} és baixa, l'actina i la miosina no es poden unir perquè la tropomiosina en bloqueja els llocs d'unió. Quan augmenta la concentració de Ca^{2+} (perquè aquest és alliberat per l'SR), el Ca^{2+} s'uneix a la troponina c i es dona un canvi conformacional entre la troponina i la tropomiosina, que deixa accessibles els llocs d'unió de miosina a la molècula d'actina. Si la concentració de calci es manté alta, la miosina s'uneix a l'actina i es dona un moviment anomenat "acció de cremallera" que es va repetint i permet la contracció de la cèl·lula cardíaca. En repòs, la miosina hidrolitza l'ATP i adopta una estructura superenrotllada. Amb l'augment de calci, la miosina s'uneix a l'actina, l'atrau cap al centre i allibera ADP i Pi. Després, el cap de la miosina es desplaça 70 nm en cada "acció de cremallera". La unió d'ATP de nou a la miosina redueix l'afinitat entre ambdós filaments, cosa que fa que es

desenganxi de l'actina, hidrolitzi l'ATP de forma parcial i es torni a "donar corda" per repetir el mateix procés.

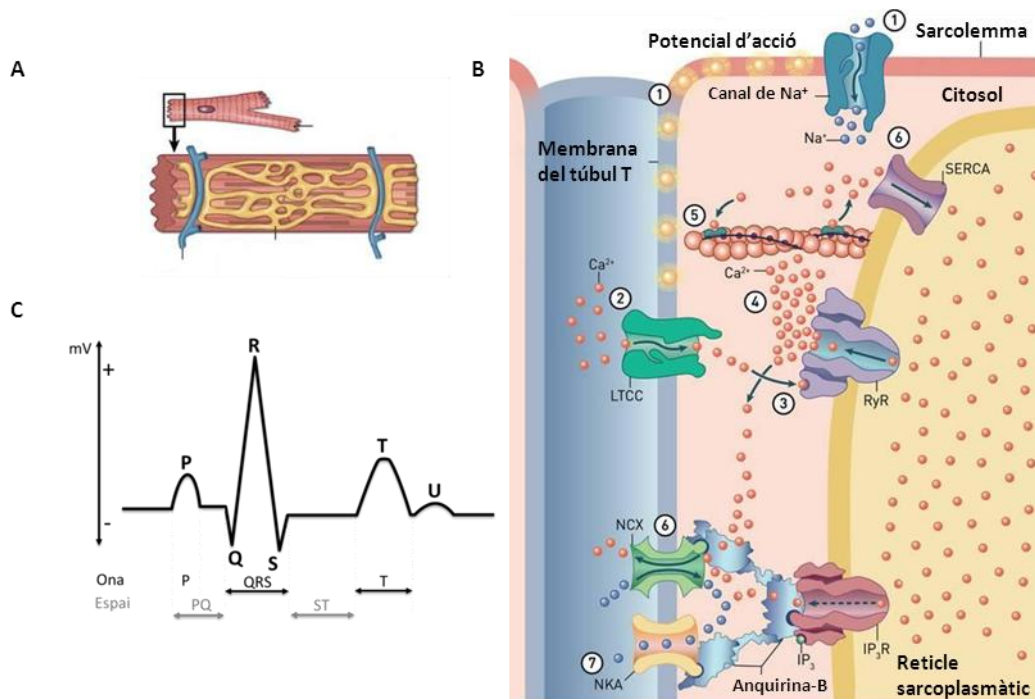


Figura 20. Contracció muscular al cor. (A) Esquema d'un cardiomiòcit, amb l'ampliació d'una miofibril·la mostrant el reticle sarcoplasmàtic (SR) i el túbul T. (B) Corrents de calci que permeten la contracció cardíaca. (1) El potencial d'acció s'estén ràpidament per la membrana sarcoplasmàtica. La despolarització ràpida es deu a l'obertura dels canals de sodi. (2) La despolarització obre els canals de calci de tipus L (LTCC) de la membrana del túbul T i entra una petita quantitat de calci al citosol. (3) El calci s'uneix als canals de rianodina (RyR) del reticle sarcoplasmàtic. (4) Aquest fet permet que s'alliberi una gran quantitat de calci. (5) El calci alliberat s'uneix a les proteïnes contràctils. (6) En la fase de relaxació, part del calci es bombeja cap a l'interior del reticle per l'ATPasa de calci del SR (SERCA), i part es transporta fora de la cèl·lula per l'intercanviador de sodi i potassi (NCX). (7) L'NCX regula el sodi i el calci de manera local interaccionant amb l'ATPasa de sodi i potassi de la membrana cel·lular (NKA). La unió de la proteïna anquirina-B provoca aquesta interacció unint tant l'NCX com l'NKA i creant un microdomini que també inclou el receptor del trifosfat d'inositol (IP₃R de *inositol triphosphate receptor*) de l'SR (Stokke, Rivelsrud, Sjaastad, Sejersted, & Swift, 2012). (C) Representació d'un electrocardiograma.

El ritme cardíac té diferents components. Cada batec comença amb una ona P, que representa una activitat normal, i continua amb un complex QRS, que representa la despolarització ventricular. La repolarització ventricular es representa a l'electrocardiograma amb l'interval QT, que dura des del moment que comença l'ona QRS fins al final de l'ona de repolarització (T). Durant certes circumstàncies calen canvis en la freqüència i la força de contracció, i això es fa gràcies a processos que augmenten les

respostes al calci. En condicions fisiològiques, aquests canvis es controlen per nervis simpatètics que alliberen norepinefrina. La norepinefrina s'uneix als receptors β -adrenèrgics, sobretot a la isoforma β_1 , que després fosforilarà diferents proteïnes que regulen la contracció i els canals de calci.

2.1. Estructura i funció dels cardiomiòcits

Les cèl·lules musculars cardíques són molt més petites que les esquelètiques, normalment mesuren uns 10 μm de diàmetre i uns 100 μm de longitud. Es connecten entre si mitjançant discos intercalars que exerceixen de connexions mecàniques i elèctriques. Les connexions mecàniques impedeixen que les cèl·lules es separin quan es contrauen; són les unions adherents i els desmosomes. Les connexions elèctriques són les unions gap i permeten la propagació del potencial d'acció a tot el cor. La disposició dels cardiomiòcits forma un sinciti elèctric i mecànic que permet que un sol potencial d'acció generat al nòdul sinoauricular es propagui per tot el cor i així es contragui de manera sincronitzada, com si fés una onada.

2.1.1. Estructura i funció del sarcòmer cardíac

La organització bàsica del sarcòmer és similar a la del múscul esquelètic. Al microscopi òptic es reconeixen bandes clares i fosques alternants, conegudes com a bandes I i A, per això tant l'esquelètic com el cardíac s'anomenen músculs estriats. La línia Z talla la banda I i és on s'insereixen els filaments fins del citoesquelet. La regió entre dues línies Z és el sarcòmer, la unitat contràctil del cardiomiòcit. Els filaments fins contenen l'actina, la tropomiosina i la troponina, i s'extenen fins a la banda A. La banda A està formada pels filaments gruixuts amb cert solapament dels filaments fins. Els filaments gruixuts estan formats majoritàriament per miosina i s'extenen des del centre del sarcòmer fins a les línies Z. Els filaments de miosina estan polaritzats i orientats de manera que estiren els filaments d'actina cap a dins del sarcòmer. Cada filament gruixut queda rodejat de sis filaments fins i cada filament fi rep insercions creuades de tres filaments gruixuts. Hi ha altres proteïnes que formen part del sarcòmer. La meromiosina i la proteïna c fan com de bastida per organitzar els filaments gruixuts. La nebulina actua de manera similar i s'exté al llarg del filament d'actina. L' α -actinina ancla el filament d'actina amb la línia Z. La

tropomodulina es troba al final del filament d'actina i regula la longitud del filament. Els filaments gruixuts s'anclen a la línia Z gràcies a la titina.

Envoltant les miofibril·les del sarcòmer hi ha el reticle sarcoplasmàtic (SR), una xarxa interna de membranes, que al múscul cardíac és menys densa i menys ramificada que al múscul esquelètic. El sarcolemma (la membrana plasmàtica de la cèl·lula muscular) també té unes invaginacions a nivell de les línies Z que s'anomenen túbuls T. Les regions terminals de l'SR que toquen el túbul T o el sarcolemma juguen un paper clau en l'augment de calci intracel·lular durant el potencial d'acció.

Una característica distintiva dels cardiomiòcits adults és que tenen dos nuclis separats. La síntesi de DNA es dona en dos fases, una associada amb la proliferació, o citocinesi, que es dona durant la vida fetal, i una segona associada a la binucleació, o cariocinesi sense citocinesi, que ocorre durant el període postnatal (Soonpaa, Kim, Pajak, Franklin, & Field, 1996). Després de nàixer, els miòcits cardíacs perden la capacitat de dividir-se i el creixement cardíac es deu a l'augment de mida dels miòcits sense gaire increment del nombre de cèl·lules. Aquest fenomen s'anomena hipertròfia fisiològica (Dorn, 2005). El fet que els cardiomiòcits adults no tinguin capacitat proliferativa determina que la pèrdua de miòcits al cor adult es compensi amb un augment de la càrrega de treball dels miòcits remanents. Tot i així, el cor manté certa capacitat regenerativa perquè conté cèl·lules mare que poden ser estimulades per formar la majoria de cèl·lules del cor (Messina et al., 2004).

2.1.2. Estructura i funció dels mitocondris cardíacs

Els cardiomiòcits són molt rics en mitocondris, i prop d'un 30% del volum cel·lular està ocupat per aquests orgànuls (Schaper, Meiser, & Stammler, 1985). Els mitocondris cardíacs es divideixen en diferents subpoblacions: *subsarcolemmal mitochondria* (SSM), *interfibrillar mitochondria* (IFM) i *perinuclear mitochondria* i es creu que cada població aporta l'energia necessària pels processos veïns. Els IFM estan alineats entre les miofibril·les i l'SR i produeixen l'ATP necessari per a la contracció. Els SSM s'organitzen just sota del sarcolemma i es creu que mantenen l'homeòstasi iònica i les vies de senyalització. Els perinuclears estan al voltant del nucli i probablement participen en la

transcripció i la translocació nuclear. Les diferents subpoblacions responen també de diferent manera a estímuls i estressos. Per exemple, els SSM són més vulnerables al dany isquèmic i a la sobrecàrrega de calci (Hoppel, Tandler, Fujioka, & Riva, 2009; Kuznetsov, Hermann, Saks, Hengster, & Margreiter, 2009; Palmer, Tandler, & Hoppel, 1977, 1985; Riva, Tandler, Loffredo, Vazquez, & Hoppel, 2005; Segretain, Rambourg, & Clermont, 1981; Vendelin et al., 2005).

Els mitocondris dels cardiomiòcits estan disposats d'una manera molt concreta i organitzada, formant una estructura regular de quadrícula amb files de mitocondris entre les miofibril·les, que s'ha descrit com a organització *crystal-like*. Aquesta organització està vinculada a la funció contràctil, ja que connecta, per una banda, els orgànuls i estructures que consumeixen energia (com el reticle sarcoplasmàtic i les miofibril·les), i per l'altra, els que produeixen energia (com és el cas dels mitocondris). Molts estudis han observat interaccions funcionals entre els mitocondris, el reticle sarcoplasmàtic i les miofibril·les (Kaasik et al., 2001; Saks et al., 2001; Seppet et al., 2001) i es creu que aquestes interaccions regulen l'intercanvi energètic i iònic que permeten la contracció muscular. D'acord amb la teoria clàssica del control de la respiració, l'augment d'ADP citosòlic (degut a l'acció de les ATPases) actua de senyal per estimular la respiració cel·lular (Chance & Williams, 1956; Chance et al., 1985). Ara bé, al múscul cardíac, que es caracteritza per una relació linial entre el treball i la respiració, no es detecten canvis en la concentració d'ADP, ATP, PCr i/o creatina. Així doncs, com s'activa la respiració mitocondrial als cardiomiòcits? Hi ha dues teories diferents que ho expliquen.

La primera es basa en que l'augment temporal del calci citoplasmàtic pot activar simultàniament l'aparell contràctil i els mitocondris, fent coincidir així l'augment de la demanda energètica amb l'augment de la producció d'ATP (Balaban, 2002; Korzeniewski, 1998; McCormack & Denton, 1990). Aquesta teoria es basa en que el calci activa tant els enzims mitocondrials (les deshidrogenases i l'ATP-sintasa) com els complexos d'actomiosina del sarcòmer. Però el fet és que el múscul cardíac pot augmentar de 15 a 20 vegades la respiració en certes condicions i les concentracions de calci no poden explicar aquest augment tant gran (Seppet et al., 2005). La segona concepció considera que les cèl·lules cardíques tenen un grau molt alt d'organització estructural i funcional

que permet una canalització metabòlica (o *metabolic channelling*) dels sistemes de transferència de fosfats. Això constituiria un mecanisme per vincular els mitocondris i les ATPases en estructures específiques denominades unitats energètiques intracel·lulars (ICEU). Aquesta compartimentació (que s'explica per restriccions locals de difusió) fa que la funció mitocondrial d'una regió concreta es reguli pels nivells d'ATP i d'ADP de la pròpia ICEU, que poden ser diferents de l'ICEU adjacent (Saks et al., 2003).

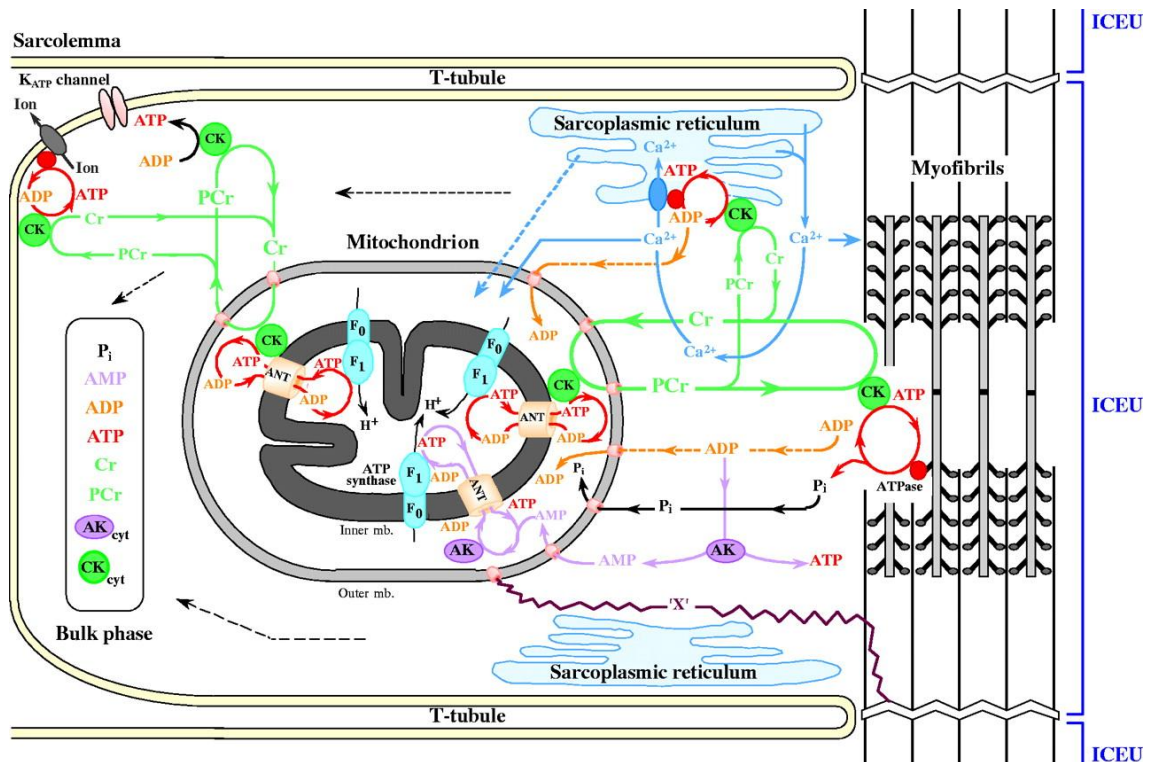


Figura 21. Esquema del funcionament de les ICEU a les cèl·lules cardíaques. Gràcies a la interacció amb el citoesquelet, els mitocondris i el reticle sarcoplasmàtic (SR) estan fixats de manera precisa respecte al sarcòmer entre les dues línies Z i els dos túbuls T. El calci alliberat de l'SR a l'espai de l'ICEU prop dels mitocondris i els sarcòmers activa la contracció i les deshidrogenases mitocondrials. Els nucleòtids d'adenina dins l'ICEU no s'equilibren ràpidament amb la majoria de nucleòtids de la fase aquosa. Els mitocondris, l'SR i l'MgATPasa de les miofibril·les i els sistemes sensibles a l'ATP del sarcolemma es connecten per un procés anomenat *metabòlic channelling* que consta de reaccions d'intermediaris i de la transferència d'energia dins l'ICEU. La transferència d'energia es dona gràcies al sistema format per la creatina-quinasa (CK), la fosfocreatina (PCr) i l'adenilat-quinasa (AK). Certs factors proteïcs marcats amb una X i conectats al citoesquelet fixen la posició dels mitocondris i segurament controlen la permeabilitat dels canals VDAC a l'ADP i l'ATP. La sincronització de la funció de les ICEU es donaria per metabòlits que puguin difondre més ràpid que la creatina o la fosfocreatina, com per exemple el fosfat inorgànic i/o per l'alliberament sincronitzat de calci durant el cicle de la contracció muscular (Saks et al. 2001; Andrienko 2003).

Les ICEU són doncs “compartiments” funcionals i estructurals dins el cardiomiòcit i necessiten sistemes eficients de producció i utilització d’energia. Un d’ells és la creatina quinasa, que transfereix el fosfat entre la creatina i l’ATP. L’isoenzim mitocondrial es troba unit a la part exterior de la MIM així l’ATP generat per la fosforilació oxidativa dins el mitocondri s’usa per produir fosfocreatina (PCr). A l’alte costat, la CK citosòlica es troba associada a les miofibril·les i a l’Sr i pot usar la PCr per tornar a fosforilar l’ADP produït per les ATPases i proveir energia per a la contracció o la captació de calci (Kaasik et al., 2001; Minajeva, Ventura-Clapier, & Veksler, 1996; Rossi, Eppenberger, Volpe, Cotrufo, & Wallimann, 1990; Ventura-Clapier, Veksler, & Hoerter, 1994; Wallimann & Eppenberger, 1985).

2.1.2.1. Dinàmica mitocondrial i la seva relació amb situacions patològiques

El conjunt de mitocondris de la cèl·lula formen una xarxa mitocondrial, que es manté per un procés dinàmic regulat per un balanç entre la fissió i la fusió (Collins, Berridge, Lipp, & Bootman, 2002) que respon a diferents situacions fisiològiques o patològiques que afecten la funció cel·lular. Els mitocondris modulen la contracció dels cardiomiòcits proveint ATP i participant en l’homeòstasi del calci i una alteració de la morfologia mitocondrial pot modular la funció cardíaca durant situacions d’estrès (Papanicolaou et al., 2011; Piquereau et al., 2012). Per exemple, en condicions d’hipòxia, els mitocondris cardíacs es poden fusionar i formar mitocondris “gegants” (Sun, Dhalla, & Olson, 1969). Els mitocondris “gegants” o “megamitocondris” s’han descrit en diferents cardiopaties. L’augment de la mida es deu probablement a dos processos, l’augment de volum dels mitocondris individuals i/o la fusió de mitocondris contigus (Hoppel et al., 2009).

El *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) també juga un paper important en la dinàmica mitocondrial. Aquest és un canal no selectiu que es forma a la membrana mitocondrial interna. És permeable a soluts de fins a 1,5 kDa i altera el potencial de membrana mitocondrial. L’excés de ROS i de calci a la matriu fan que es dissipï el gradient electroquímic de protons i que s’obri l’MPTP. Això provoca un desacoblament de la fosforilació oxidativa que produeix encara més ROS, resultant en una disminució de l’ATP i la ruptura mitocondrial. Després, s’alliberen proteïnes proapoptòtiques com el citocrom c, Smac/DIABLO i l’endonucleasa G (endoG) que activen les caspases que acaben induint

l'apoptosi o la necrosi cel·lular (Baines, 2009; Crow, Mani, Nam, & Kitsis, 2004; Hausenloy & Yellon, 2003). Moltes malalties cardíques estan relacionades amb l'MPTP, com el dany causat per isquèmia/reperfusió, les miocardiopaties induïdes per calci, la miocardiopatia diabètica i la cardiotoxicitat provocada per fàrmacs contra el càncer (Hwang & Kim, 2013). La fusió i la fissió mitocondrial també s'han relacionat amb l'apoptosi de les cèl·lules cardíques. Així, la pèrdua de la proteïna mitofusina 2 (MFN2) provoca apoptosi mediada per ceramida que inclou la fragmentació mitocondrial, el reclutament de DRP1 (*dynamain related protein 1*) i l'alliberament del citocrom c en cardiomiòcits de rates nounades (Parra et al., 2008). L'MFN2 també podria estar involucrada en l'obertura del MPTP i l'apoptosi mediada per l'estrès oxidatiu, ja que augmenta en condicions d'estrès i suprimeix la via de la PI3K/Akt (Shen et al., 2007). En cors en fallida, la integritat de la xarxa mitocondrial està alterada i també s'observa una disminució del nombre i la mida de mitocondris. A més, es creu que l'OPA1 (*optic atrophy protein 1*) intervé en la resposta antioxidant, perquè quan falta provoca el dèficit de transcrits antioxidants, l'augment de les ROS, la fragmentació i disfunció mitocondrial, i cardiopatia d'inici tardà (Chen et al., 2012; Chen, Gong, Stice, & Knowlton, 2009).

La permeabilitat del porus (o la restricció en la difusió dels fosfometabòlits) i la respiració mitocondrial es regulen també per interaccions amb el citoesquelet, en concret per la tubulina i el seu estat de polimerització (Varikmaa et al., 2014). La restricció de la difusió dels nucleòtids d'adenina a través de la MOM es supera a les cèl·lules per la difusió lliure de la PCr, que transporta el flux d'energia gràcies al sistema de compartimentació dels isoenzims de CK. També s'ha descrit que la VDAC, un dels components de l'MPTP que forma un canal tipus porina a la membrana interna, és permeable a ATP, ADP i PCr si està en una membrana formada només per fosfolípids. Per tant, la permeabilitat del canal depèn també dels lípids (sobretot de la cardiolipina, la fosfatidiletanolamina i el colesterol). També depèn de la isoforma específica cel·lular de la VDAC (al cor és la 2 i sembla ser que és més restrictiva, per això l'ADP pot difondre menys i es donen les ICEU (Anflous-Pharayra, Lee, Armstrong, & Craigen, 2011)). Les interaccions amb altres proteïnes també regulen l'obertura del porus (regulat per cascades de senyalització, polimerització o modificacions postraduccional). També regulen l'obertura les mateixes propietats biofísiques del propi canal i de les molècules que l'atravessen. Tots els

components que formen el porus i les ICEU són part d'una organització cel·lular funcional i estructural del metabolisme energètic, que permet donar el suport als processos amb una demanda energètica específica, com són la contracció del sarcòmer o el creixement ràpid de les cèl·lules canceroses (Rostovtseva, Gurnev, Chen, & Bezrukov, 2012; Varikmaa et al., 2014)

Un altre component dels mitocondris que pot experimentar canvis dinàmics són les membranes internes. Aquestes formen invaginacions anomenades crestes (*cristae* en llatí) que són microcompartiments que s'obren cap a l'interior mitocondrial a través de segments tubulars prims de la regió perifèrica de la membrana interna. El diàmetre intern de les *cristae junctions* (el punt d'unió entre la cresta i la resta de la MIM) és més petit i també restringeix la difusió interna dins l'espai intermembrana mitocondrial (IMS). Aquests punts, ancorats gràcies a proteïnes de la MIM i de la MOM, són regulables i la remodelació de la membrana interna mitocondrial incideix en la cinètica de difusió dels metabòlits i les proteïnes solubles entre els diferents compartiments, permetent una regulació local de la fosforilació oxidativa en l'apoptosi, per exemple (Mannella, 2008).

Així, els mitocondris poden canviar entre dos estats morfològics, un "contret", amb la matriu densa i les crestes amples, i una anomenat "ortodox", amb la matriu estesa i les crestes més compactes. Aquest canvi es pot observar en mitocondris aïllats, com a resposta a la pressió osmòtica del medi extern o l'addició d'ADP. S'ha vist que la forma condensada té crestes llargues i pleiomòrfiques amb múltiples *cristae junctions* entre unes i altres i la regió perifèrica. La forma ortodoxa sol tenir només una *junction* a la membrana perifèrica i les crestes són més aplanades o tubulars. Per aconseguir el canvi, la MIM ha d'experimentar fusió i fissió, que es regulen per estats metabòlics i/o osmòtics. (Mannella, 2008). Les proteïnes que regulen la morfologia de les crestes són l'OPA1 i l'ATP-sintasa. La mutació d'OPA1 provoca la formació de vesícules de la membrana interna no unides que no poden fer fissió. Pel que fa a l'ATP-sintasa, si no se'n permet la dimerització deixa de formar unes estructures en forma d'angle que donen forma a la membrana i es formen crestes sense *cristae junctions* tubulars. Aquest mateix fenotip s'observa si falta la proteïna mitofilina (Mannella, 2008).

2.2. Cultiu de cardiomiòcits

L'ús de cultius cel·lulars, en comparació amb els experiments amb animals, té l'avantatge d'estar format per una població homogènia de cèl·lules individuals, que a més són fàcils de visualitzar i manipular. Les propietats d'aquestes cèl·lules es poden analitzar en un ambient controlat, sense interferència d'altres cèl·lules o d'influències humorals. A més, són cultius versàtils i econòmics, ja que es poden fer experiments bioquímics, fisiològics, farmacològics i morfològics sense les restriccions pràctiques i ètiques del nombre d'animals, cosa que també redueix el temps i la despesa. Pel que fa als miòcits cardíacs, a més d'in vivo, també hi ha la possibilitat d'estudiar-los tot just després de ser aïllats, però només es mantenen en bones condicions entre 8 i 12 hores, mentre que en cultiu es poden mantenir durant dies i mesos. A més, si es mantenen en cultiu es poden manipular l'expressió gènica i proteica i els permet reparar el dany provocat per la digestió mecànica i enzimàtica (poden tornar a expressar receptors i canals iònics del sarcolemma, per exemple) (Borg & Terracio, 1990).

Es poden usar diferents mamífers de mida petita per obtenir els cultius de cardiomiòcits (rata, ratolí, hámster, pollastre, conillet d'Índies, conill i gat). Les rates, en concret, són fàcils d'obtenir, econòmiques i no necessiten recursos exagerats d'animalari o manteniment, a més de tenir una bibliografia extensa a l'abast (Chlopcíková, Psotová, & Míketová, 2001). El cultiu de miòcits ventriculars de rata nounada (NRVM de *neonatal rat ventricular myocytes*) permet l'estudi de moltes de les característiques del cor i és un cultiu ben establert per estudiar la relació entre el metabolisme, el dany cel·lular provocat per les espècies reactives de l'oxigen i els mitocondris (Dedkova & Blatter, 2012; Durot et al., 2000; Murray, Ahmad, & Brewer, 2014). També és un model molt útil per a trobar possibles biomarcadors (Stastna, Chimenti, Marbán, & Van Eyk, 2010; Stastna & Van Eyk, 2012) i per provar compostos terapèutics (Chlopcíková et al., 2001; Ek, Hallberg, Sjögren, & Hjalmarson, 1994).

Els miòcits cardíacs es poden obtenir de rates nounades o adultes. La majoria d'estudis a llarg termini amb cultiu de cardiomiòcits usen cèl·lules de cors embrionaris o neonats, ja que els cardiomiòcits adults en cultiu no es contrauen espontàniament, perden viabilitat, i també la forma característica en menys de set dies. Pel que fa al cultiu de cardiomiòcits

neonats, es poden obtenir entre 10 i 20 cries d'un sol part, d'on s'obté material suficient per diferents experiments. A més, el cultiu de miòcits cardíacs embrionaris o neonats resulta menys car i tediós que l'aïllament de cèl·lules de cor d'adult. S'ha descrit també que el fenotip dels cardiomiòcits neonats és molt estable i que es contrauen de manera espontània, cosa que no succeeix amb els cardiomiòcits adults (Yamashita et al., 1994).

Hi ha dues maneres bàsiques d'obtenir cultius de miòcits cardíacs adults, descrites ja el 1986 (Jacobson & Piper, 1986) i que després s'han revisat i modificat per altres grups (Mitcheson, Hancox, & Levi, 1998). El primer mètode usa medi de cultiu amb sèrum, i els cardiomiòcits resten en suspensió i arrodonits. Al cap de 2-4 dies s'adhereixen a la superfície i s'extenen amb una mena de pseudopodis (per això aquesta tècnica s'anomena de "rediferenciació"). Aquests cardiomiòcits es poden mantenir durant setmanes i mesos (Claycomb, Burns, & Shepherd, 1984). El segon mètode s'anomena "d'adhesió ràpida". S'usa medi sense sèrum i es tracta la superfície de cultiu amb un substrat on les cèl·lules s'adhereixen al cap de 3 hores. Aquests miòcits retenen l'aparença *rod-shaped* (o rectangular) i estriada dels miòcits acabats d'aïllar. Poden durar una o dues setmanes en cultiu. Tot i així, com que no tenen sèrum, es perd massa proteica (s'atrofien els miofilaments i es perd l'organització d'actomiosina), les cèl·lules s'acaben arrodonint i disminueix la supervivència en menys d'una setmana (Mitcheson, Hancox, & Levi, 1996). Una altra manera de cultivar-los, és usant matrius 3D. D'aquesta manera els miòcits mantenen l'aparença rectangular tot i ser en medi de cultiu amb sèrum, ara bé, també disminueix el volum de miofilaments i tampoc no es contrauen (Decker et al., 1991).

L'aïllament de miòcits ventriculars de rata nounada (NRVM) es pot dur a terme amb rates d'entre un i cinc dies per a que les cèl·lules s'adhereixin bé i esdevinguin contràctils espontàniament. L'aïllament es basa en una digestió enzimàtica seguida de l'agitació mecànica del teixit ventricular. S'han descrit molts protocols, però tots són modificacions de l'original descrit per Harary i Farley (Harary & Farley, 1963). En general, els animals es decapiten, es treuen els cors, s'escindeixen els atris i es trocegen en tampó ADS. La solució amb el teixit es transfereix a un tub on s'afegeix l'enzim (normalment tripsina o col·lagenasa). Després s'agita i es centrifuga per separar les cèl·lules individuals dels

troços de teixit i es posa solució enzimàtica nova i es repeteix el procés de nou varies vegades. Per inactivar l'enzim de la solució de cèl·lules s'afegeix medi amb sèrum. Es poden enriquir els cardiomiòcits respecte la resta de cèl·lules cardíques amb un gradient de Percoll o mitjançant sembres preliminars de poca durada per a que s'hi adhereixin només els fibroblasts. Després, es poden afegir també antimetabòlics per evitar el creixement de cèl·lules no musculars. Els substrats, a més de facilitar l'adhesió, fan de matriu extracel·lular. S'han usat laminina, fibronectina, poli-D-lisina i pèptids sintètics. També s'usen substrats tipus gel, com l'agarosa, el col·lagen, la gelatina o gels sintètics per afavorir la morfologia i la funció normal de la cèl·lula. A l'hora de triar el medi, cal tenir en compte la composició iònica, el tamponament, els suplementos nutricionals i el sèrum. Els cultius, es poden transfectar o transduir amb virus (Athias, Vandroux, Tissier, & Rochette, 2006; Chlopčíková et al., 2001; Louch, Sheehan, & Wolska, 2011; Mitcheson et al., 1998; Salameh & Dhein, 2005; Woodcock & Matkovich, 2005).

Existeixen també diferents línies cel·lulars que també s'usen per estudiar els cardiomiòcits. Entre elles es troben la línia H9c2, derivada de cors embrionaris de rata, la línia HL-1, derivada d'un tumor atrial on les cèl·lules cardíques havien estat transformades amb l'antigen T del virus SV40, o les cèl·lules mare derivades a cardiomiòcits (Mummery et al., 2012; Zhu, Van Biber, & Laflamme, 2011).

3. EL METABOLISME ENERGÈTIC

A nivell fisiològic, el cor té una demanda energètica molt alta. En els adults, el cor obté l'energia en forma d'ATP principalment de l'oxidació dels àcids grassos i també de la glucosa. El cor fetal, en canvi, usa majoritàriament carbohidrats (glucosa i lactat) com a font principal d'energia. A mesura que madura el cor, l'oxidació d'àcids grassos (AG) augmenta i esdevé el substrat energètic més important en la majoria d'espècies de mamífer, i aquest procés es dona durant els primers dies després de naixement (Onay-Besikci, 2006). A nivell patològic, l'alteració del metabolisme dels diferents substrats contribueix a una disfunció contràctil i a una remodelació del ventricle típics de la insuficiència cardíaca, i al revés, la insuficiència cardíaca provoca una alteració en el metabolisme de substrats energètics. En estadis avançats d'insuficiència cardíaca hi ha una disminució de l'oxidació d'AG, una disminució de l'activitat de la cadena respiratòria, un augment de la

glucòlisi i l'oxidació de la glucosa, i una alteració de les reserves pel flux oxidatiu mitocondrial, com són el glicogen o els triacilglicèrids.

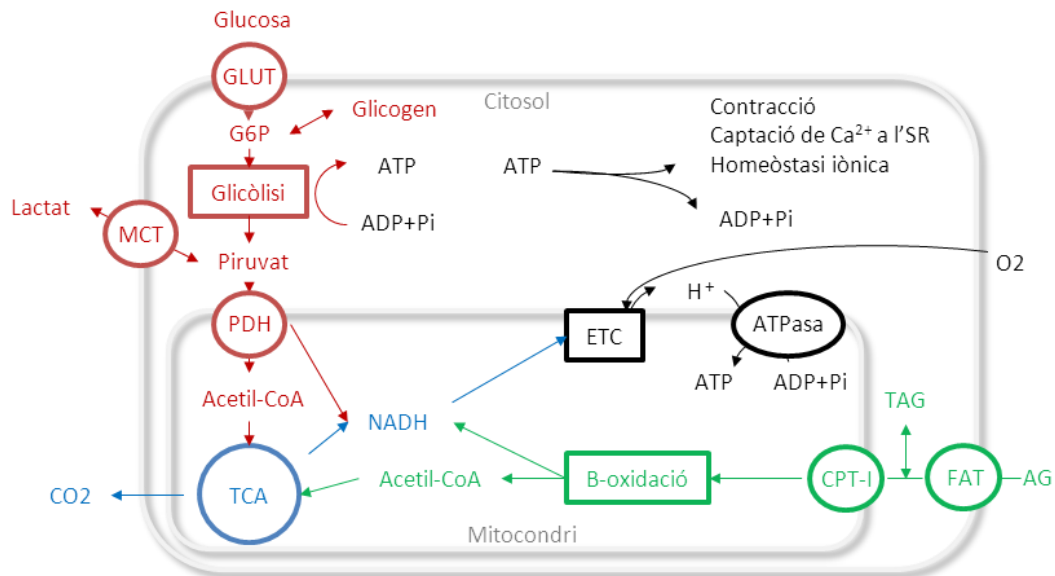


Figura 22. Vies principals i punts de regulació del metabolisme cardíac. Els miòcits cardíacs poden utilitzar diferents substrats com a font d'energia, essent la glucosa i els àcids grassos (AG) els més importants. CPT-I, carnitina-palmitoiltransferasa-I; FAT, *fatty acid translocase/CD36*; G6P, glucosa 6-fosfat; GLUT, *glucose transporters*; MCT, *monocarboxylic acid transporters*; PDH, piruvat-deshidrogenasa (Stanley et al., 2005).

La regulació del metabolisme al cor va associada a la concentració arterial de substrats energètics i d'hormones, al flux coronari, a l'estat ionotròpic i a l'estat nutricional del teixit. En condicions no isquèmiques, més del 95% de l'ATP generat prové de la fosforilació oxidativa mitocondrial. La resta ve de la glucòlisi al citosol i de la formació de GTP al TCA. El cor té relativament poc ATP en repòs, un *pool* de 5 $\mu\text{mols/g}$ de teixit humit, però aquest *pool* es renova cada 10 segons, ja que té una taxa molt alta d'hidròlisi d'ATP, de 0,5 $\mu\text{mols/g}$ de teixit humit/segon. El 60-70% de la hidròlisi de l'ATP s'usa per a l'escurçament del sarcòmer, és a dir per a la contracció, i el 30-40% per a la bomba de calci de l'SR i altres bombes iòniques. En un cor sa, les taxes d'hidròlisi d'ATP i de formació d'ATP (és a dir de fosforilació oxidativa) estan vinculades de manera exquisita per a que el contingut d'ATP romangui constant encara que hi hagi un augment de la demanda de potència cardíaca (deguda a un exercici agut o a un estrès catecolamínic, per exemple). Les ràtios de flux a través de les diferents vies es controlen pel grau d'expressió de les proteïnes metabòliques claus (enzims i transportadors), per regulacions al·lostèriques i/o per ràtios entre substrat i producte. Quan el treball cardíac és màxim, es consumeix

oxigen a un 80-90% de la capacitat oxidativa màxima mitocondrial, mentre que en repòs el cor opera a un 15-25%. Aquests canvis es poden donar en condicions normals d'exercici, d'isquèmia o dejú i es poden fer gràcies a modificacions al·lostèriques d'enzims reguladors, a canvis en la concentració de metabòlits inhibidors o estimuladors, i a la translocació de proteïnes metabòliques al seu lloc funcional (Stanley, Recchia, & Lopaschuk, 2005).

L'acetil-CoA (el metabòlit energètic central) prové majoritàriament de la β -oxidació (un 60-90%) i del piruvat, que prové de la glucòlisi i l'oxidació del lactat.

3.1. Metabolisme de carbohidrats

Pel que fa al metabolisme de carbohidrats, els substrats glucolítics són la glucosa exògena i les reserves de glicogen. La glucosa es transporta a través del sarcolemma a favor de gradient pel transportador GLUT4 (*glucose transporter*) i, en menor grau, pel GLUT1 i el GLUT3. La insulina provoca la translocació de més transportadors GLUT al sarcolemma mitjançant vesícules. També ho poden provocar l'augment de la demanda energètica, la isquèmia i l'activació de la proteïna quinasa activada per AMP (AMPK de *AMP activated kinase*). El *pool* de glicogen és relativament petit (30 μ mols/g de teixit humit enfront dels 150 del múscul esquelètic) i té una taxa de renovació ràpida. Les reserves de glicogen incrementen en augmentar els substrats exògens, en hiperinsulinèmia i en situacions d'activació constitutiva de l'AMPK (com ocorre quan es pateix hipertròfia cardíaca). En canvi, el glicogen disminueix quan hi ha una estimulació adrenèrgica (per cAMP i calci), quan disminueix l'ATP o augmenta el fosfat inorgànic (en isquèmia o exercici intens) i quan s'activa de manera aguda l'AMPK. Els enzims clau en la regulació de la glucòlisi són les fosfofructoquinasa 1 i 2 (PFK-1 i PFK-2 de *phosphofructokinase*) i la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH de *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Gràcies a estudis de fraccionament cel·lular i dades *in silico* s'ha observat que els enzims de la glucòlisi formen clústers prop del reticle sarcoplasmàtic i el sarcolemma. L'ATP generat per la glucòlisi, doncs, és usat preferencialment com a combustible per a la bomba de calci del reticle i per mantenir l'homeostàsi iònica al sarcolemma, processos que ocorren a la perifèria de la cèl·lula. A més, en inhibir la glucòlisi s'altera la relaxació durant la reperfusió, així aquest ATP és essencial per una relaxació diastòlica òptima.

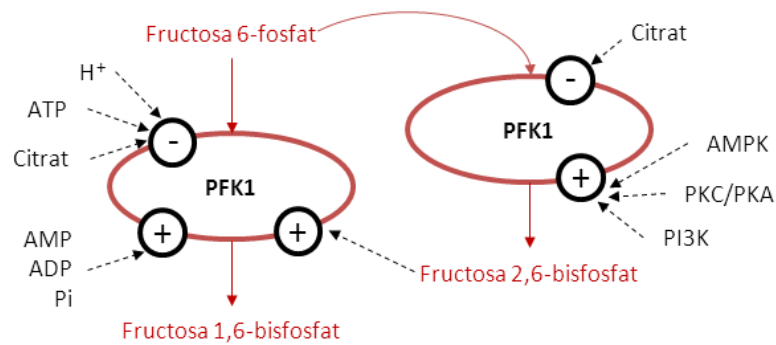


Figura 23. Regulació de la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1). Un dels punts claus de la glucòlisi és la regulació mitjançant el sistema fosfofructoquinasa-1 i 2 (PFK1 i PFK2). Diferents metabòlits i quinases regulen aquests enzims. PKA (proteïna quinasa A), PKC (proteïna quinasa C), PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) (Stanley et al., 2005).

El piruvat que es forma a la glucòlisi té tres destins: la descarboxilació a acetil-CoA, la conversió a lactat o la carboxilació a oxalacetat/malat. El complex de la piruvat-deshidrogenasa (PDH o PDC de *pyruvate dehydrogenase complex*) catalitza la reacció que dona acetil-CoA i NADH, i forma un multienzim a la matriu mitocondrial regulat per fosforilació. Els reguladors principals de la PDH són l'acetil-CoA i el NADH, però també el piruvat i l'ADP. Tal com s'explica més endavant la PDH és sensible també als lípids circulants i als nivells intracel·lulars d'àcids grassos de cadena llarga, ja que aquests activen el receptor PPAR α , cosa que augmenta la PDK4 (*pyruvate dehydrogenase kinase 4*), que fosforil·la la PDH i en disminueix l'activitat. Els AG circulants, i la seva oxidació, també inhibeixen la glucòlisi (augmentant el citrat i inhibint així els enzims PFK1 i PFK2) i la conversió del piruvat a lactat. Aquest fenomen va ser descrit per Philip Randle el 1960 i es coneix com el cicle de la glucosa i els àcids grassos.

El piruvat també pot entrar al TCA essent carboxilat a malat o oxalacetat, en una reacció anapleròtica per mantenir el *pool* d'intermediaris i la funció del TCA. Aquesta via representa entre un 2 i un 6% del flux del TCA en condicions aeròbiques normals. Una altra font anapleròtica és la transaminació del glutamat a α -cetoglutarat, demostrada per la captació cardíaca baixa però persistent de glutamat. Una última ruta anapleròtica, que en condicions normals contribueix molt poc al cicle però pot ser important en pacients amb dèficits en l'oxidació d'AG de cadena llarga, és l'aportació de succinil-CoA des del propionil-CoA generat d'AG de cadena llarga i imparella. Els pacients amb aquest dèficit milloren la disfunció cardíaca amb suplementes d'heptanoat, ja que la seva oxidació dona acetil-CoA i propionil-CoA i a més evita el sistema de la CPT. El piruvat també pot

contribuir formant α -cetoglutarat gràcies a la transaminació amb el glutamat per fer alanina, però és una via poc important al cor.

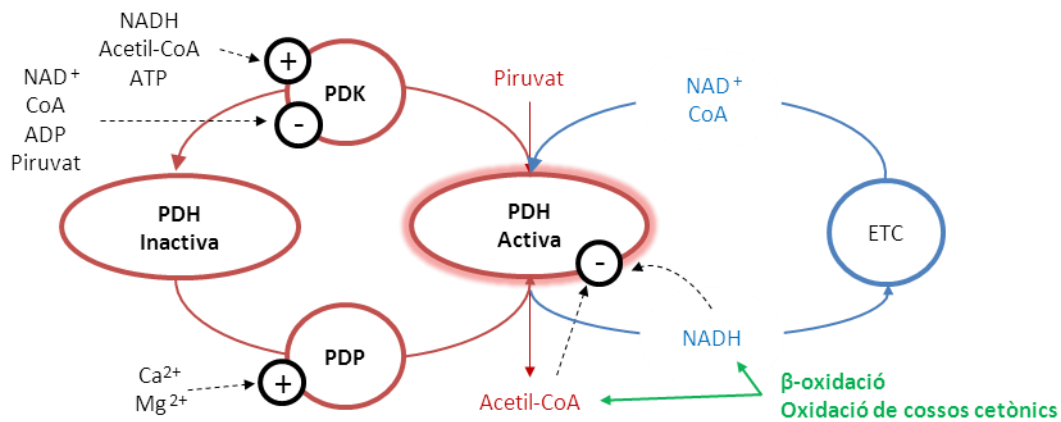


Figura 24. Regulació de l'oxidació de la glucosa i el lactat per la piruvat-deshidrogenasa (PDH). L'activitat de la PDH es regula pels productes de la reacció (acetil-CoA i $NADH$) i mitjançant fosforilació i desfosforilació per part de la piruvat-deshidrogenasa quinasa (PDK) i la piruvat-deshidrogenasa fosfatasa (PDP) (Stanley et al., 2005).

El cor és un consumidor net de lactat, només n'és productor net en isquèmia o en diabetis poc controlada. En condicions normals obté un 10% de l'energia del lactat però si la demanda energètica és superior a l'aportació d'oxigen sanguini, passa a ser un substrat energètic principal. El transport de lactat es facilita pel transportador de monocarboxilats específic (MCT-1). El lactat es converteix a piruvat reduint el NAD gràcies a la lactat-deshidrogenasa (LDH). Hi ha dos tipus de subunitats d'LDH, anomenades M (perquè predomina al múscul esquelètic) i H (de l'anglès *heart*, perquè predomina al cor). Les diferents combinacions entre aquestes dues subunitats en forma de tetràmers donen lloc a cinc isoformes diferents d'LDH. L'LDH-1 (4H) i l'LDH-2 (3H1M) són les isoformes específiques de cor i afavoreixen l'oxidació de lactat a piruvat. El piruvat passarà a ser substrat del TCA, essent usat com a font d'energia aeròbica.

3.2. Metabolisme de lípids

El ritme de captació d'àcids grassos al cor ve determinat per la concentració d'AG al plasma, que pot variar molt al llarg del dia (de 0,2 a 0,8 mM) i que en condicions d'estrès metabòlic (com la isquèmia, la diabetis o el dejú) pot augmentar fins a 1 mM. Els AG són hidrofòbics i sempre van units a proteïnes, coenzim A o carnitina. Al plasma es transporten units a albúmina o esterificats en triacilglicèrids (TAG) dins de quilomicrons

(QM) o lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL de *very low-density lipoprotein*). La concentració d'AG al plasma depèn de l'alliberament net des dels adipòcits i de l'equilibri entre la hidròlisi per la lipasa sensible a hormones i la síntesi per la glicerofosfat aciltransferasa. Els cardiomiòcits i les cèl·lules endotelials també poden promoure la hidròlisi dels TAG de QM i VLDL gràcies a la lipoproteïna lipasa (LPL) unida als capil·lars. Els AG poden entrar a la cèl·lula per difusió passiva, o bé ser transportats gràcies al transportador FAT (de *fatty acid translocase*) i les proteïnes FABP (de *fatty acid binding proteins*) del sarcolemma. La isoforma de FAT anomenada CD36 és la que predomina al cor i és la que regula el flux d'entrada d'AG. Un cop transportats a través del sarcolemma, els AG s'uneixen a la FABP i s'activen per esterificació a acil-CoA gràcies a la sintasa d'àcids grassos FACS (de *fatty-acyl-coA synthase*). Les FABP són molt abundants al citoplasma i s'han vist associades a la part citoplasmàtica de la membrana, al transportador CD36 i a l'FACS, cosa que fa pensar que els AG s'activen just en entrar. Els transportadors FAT/CD36 es transloquen a la membrana quan la cèl·lula es contrau, quan hi ha demanda energètica, i per l'acció de la insulina, tal com ho fan els transportadors GLUT.

Un cop al citoplasma, l'acil-CoA pot ser destinat a l'emmagatzematge en forma de TAG gràcies a la glicerofosfat aciltransferasa (GFAT) o convertit a acil-carnitina per la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1). En un cor sa, el 70-90% dels AG que entren són oxidats via la CPT1 i el 10-30% formen el *pool* de TAG, tot i que, com es parla més endavant, aquest tema genera controvèrsia.

L'oxidació dels AG es dona en gran part al mitocondri, tot i que una petita part ocorre als peroxisomes. L'entrada d'AG al mitocondri es fa mitjançant el transport dependent de carnitina. La CPT1 de la MOM és la que regula el flux d'entrada al mitocondri. La isoforma CPT1 β del cor és 30 vegades més sensible a la inhibició pel malonil-CoA del citosol que la hepàtica. De fet, al cor, el malonil-CoA és el regulador clau de l'oxidació d'AG i té una taxa de renovació molt gran. El malonil-CoA es forma al citosol per la carboxilació de l'acetil-CoA citosòlic gràcies a l'acetil-CoA carboxilasa (ACC). Pel que fa a l'acetil-CoA, la majoria és mitocondrial, però el *pool* citosòlic prové del citrat (de l'ATP-citrat liasa), de l'exportació d'acetilcarnitina o de la β -oxidació peroxisomal (on es donen pocs cicles

perquè els AG de 12 o 14 carbonis ja entren al mitocondri). L'ACC s'inactiva per la fosforilació dependent de l'AMPK, cosa que disminueix el malonil-CoA i augmenta el catabolisme d'AG. La malonil-CoA descarboxilasa (MCD) degrada el malonil-CoA, i per tant permet l'augment de l'oxidació d'AG. Si els nivells d'MCD baixen o s'inhibeix, disminueix el recanvi de malonil-CoA i augmenta l'oxidació de glucosa, tal com passa quan s'inhibeix la CPT1.

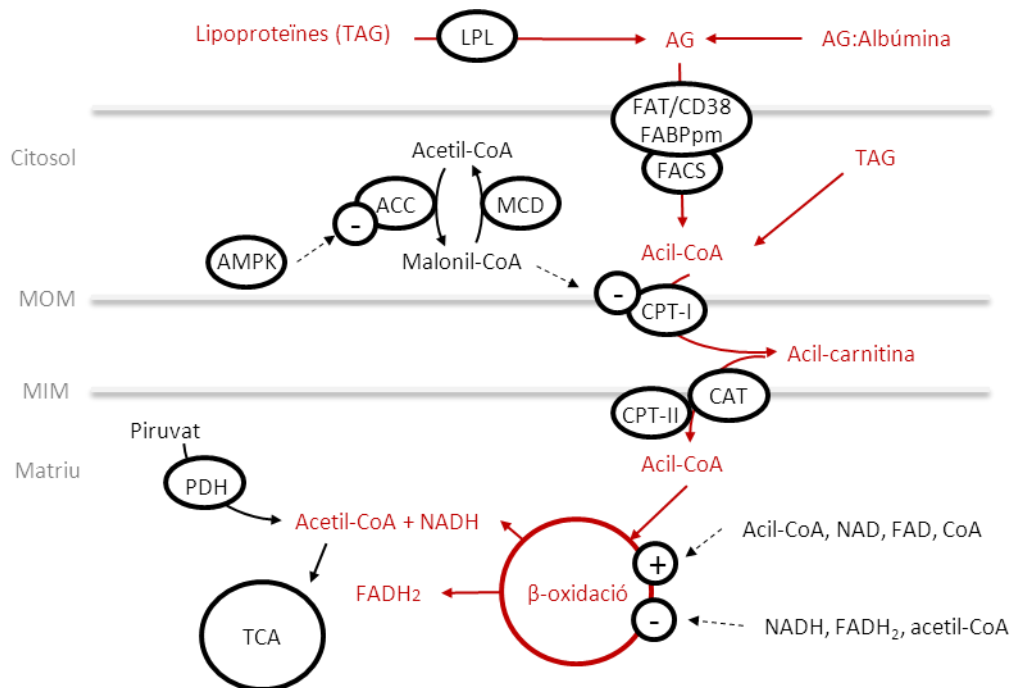


Figura 25. Esquema del metabolisme cardíac d'àcids grassos. Punts clau en la regulació de l'oxidació dels àcids grassos a les cèl·lules cardíaques. ACC, acetil-CoA-carboxilasa; AMPK, *AMP-activated protein kinase*; CAT, carnitina-aciltranslocasa; CPT-I, carnitina-palmitoiltransferasa-I; CPT-II, carnitina-palmitoiltransferasa-II; FABPpm, *plasma membrane fatty acid binding protein*; FAT, *fatty acid transporter*; AG, àcids grassos; LPL, lipoproteïna lipasa; MCD, malonil-CoA-descarboxilasa; TAG, triacilglicèrids (Stanley et al., 2005).

En general, els AG es degraden per diferents mecanismes, que inclouen l' α , la β o l' ω -oxidació. L' α -oxidació es dona només als peroxisomes, mentre que tant peroxisomes com mitocondris són capaços de β -oxidar els àcids grassos.

La β -oxidació mitocondrial forma acetil-CoA, NADH i FADH₂ gràcies a 4 reaccions dutes a terme per diferents enzims. L'acil-Coa deshidrogenasa (que dona FADH₂) té quatre isoformes, les quals són específiques per diferents mides d'AG; la VLCAD, l'LCAD, l'MCAD i l'SCAD (*very long-chain, long-chain, medium-chain* i *short-chain acyl-CoA dehydrogenase*).

Els electrons que provenen del grup prostètic FADH_2 de l'acil-CoA-deshidrogenasa reduïda es transfereixen a una segona flavoproteïna anomenada ETF (*electron-transferring flavoprotein*). Aquesta flavoproteïna, al seu torn, cedeix els electrons a una proteïna ferrosulfurada, l'ETF:ubiquinona-oxidoreductasa (ETFQO). La ubiquinona es redueix aleshores a ubiquinol, que lliura els electrons al complex III de la cadena respiratòria i aquest bombeja protons. Així, de cada molècula de FADH_2 produïda per aquesta deshidrogenació es generen 1,5 molècules d'ATP, tal com succeeix en l'oxidació del succinat a fumarat. Les tres reaccions següents les du a terme un multienzim anomenat proteïna trifuncional (TFP, MTP o TP de *mitochondrial trifunctional protein*). Aquest enzim està unit a la MIM i és un heterooctàmer format per 4 subunitats alfa i quatre subunitats beta (HADHA i HADHB). Les tres reaccions que du a terme són la 2-enoil-CoA hidratasa, la 3-hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa (que dóna NADH) i la 3-ceto-acil-CoA tiolasa, que dóna acetil-CoA i regenera l'acil-CoA per començar una altra ronda.

Hi ha molts trastorns genètics que provoquen deficiència d' α - i β -oxidació. El tractament per aquestes malalties és limitat però es creu que estimulants l' ω -oxidació es podria contrarestar els efectes perjudicials associats a l'acumulació d'AG i els seus derivats, els quals són la base dels signes i símptomes clínics d'aquestes malalties (Wanders, Komen, & Kemp, 2011). La β -oxidació és la via preferida per oxidar els AG. Els àcids grassos poden ser β -oxidats tant si són linials o ramificats o mono- o poliinsaturats. L'única excepció és pels AG que contenen metil o algun altre grup funcional al carboni 3. En aquest cas, han de ser degradats per ω -oxidació. L' ω -oxidació es catalitza per proteïnes de la família del citocrom P450 (CYP450). Les dues famílies més destacades són la CYP4A (de la qual CYP4A11 i A22 són els més importants) i la CYP4F (de la qual CYP4F2 i CYP4F3 juguen un paper important). Aquests enzims es regulen a nivell d'expressió per receptors nuclears com els PPAR o el RAR i depenen del coactivador SERBP. Les citocines inflamatòries també en poden regular l'expressió. El 5-10% de l'oxidació d'AG es fa per aquesta via. Si hi ha dèficits d'algun enzim de les altres dues vies, s'acumula un perfil determinat d'AG i d'èsters d'AG amb carnitina o coenzim A. És possible que incentivant l' ω -oxidació es pogués millorar les patologies provocades per dèficits d'enzims d'oxidació d'àcids grassos.

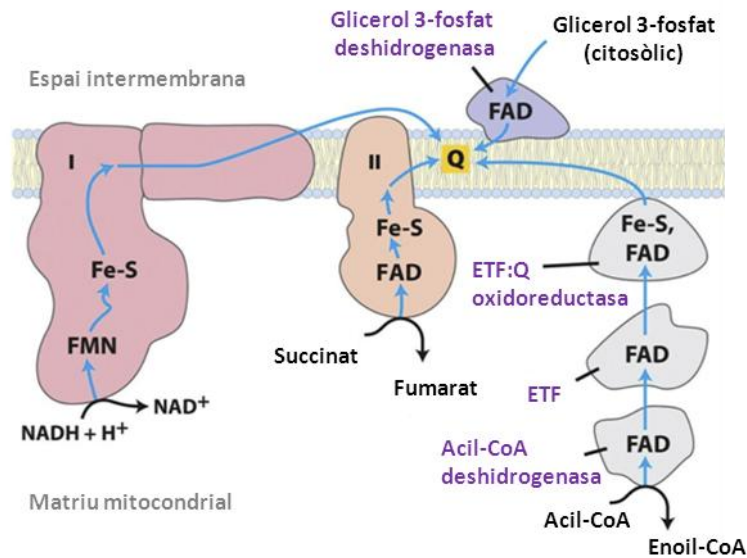


Figura 26. Representació de l'aportació de poder reductor a la cadena de transport electrònic. Els àcids grassos aporten electrons a través del NADH i el FAD₂ produïts durant la β-oxidació i el cicle de Krebs, i a través de les acil-CoA deshidrogenases a les proteïnes ETF i ETF:QO. També el glicerol 3-fosfat dóna electrons directament a la ubiquinona a través de la glicerol 3-fosfat deshidrogenasa.

Pel que fa a l'ω-oxidació mitocondrial no hi ha gaire literatura. Ara bé, cal mencionar que el citocrom P450 és el responsable d'ω-hidroxilar la cua fitil dels tocoferols i tocotrienols (vitamina E). De fet l'ω-oxidació és el pas inicial per la degradació de la vitamina E, que després es degrada via β-oxidació.

El metabolisme dels cossos cetònics aporta una part important de l'energia al cor. El cor capta i oxida β-hidroxibutirat i acetoacetat depenent de la seva concentració al plasma. Normalment la concentració de cossos cetònics en sang és baixa, però durant el dejú i la diabetis poc controlada esdevenen un substrat important pel miocardi. L'oxidació de cossos cetònics també inhibeix l'oxidació d'àcids grassos, de glucosa i de lactat, tal com passa amb l'oxidació d'AG. Sembla que l'augment de TAG al cor de pacients diabètics es podria deure, en part, a aquest fenomen.

L'eficiència contràctil depèn de l'elecció del substrat energètic i, contràriament al que sembla, s'ha observat que el cor és més eficient quan oxida glucosa i lactat, i menys quan oxida AG (a un consum d'oxígen determinat). Una possible explicació seria pel fet que els àcids grassos provoquen un desacoblament mitocondrial. Els AG es transloquen cap a fora de la matriu via la UCP3 (de *uncoupling protein 3*) en forma aniònica, s'associen a un

protó a l'espai intermembrana mitocondrial (IMS) i tornen a entrar amb càrrega neutra pel mecanisme conegut com a “flip-flop” provocant així una fuga de protons i la consegüent pèrdua d'energia. D'altra banda, també poden activar els canals de calci de la membrana, augmentant l'entrada de calci extracel·lular i gastar ATP citosòlic per mantenir el cicle de calci normal.

3.2.1. Metabolisme dels triacilglicèrids i les gotes lipídiques

Tal com s'ha comentat a la secció anterior, un cop dins la cèl·lula els AG s'esterifiquen a acil-CoA per entrar al mitocondri i ser oxidats o bé poden ser reesterificats en TAG per ser emmagatzemats temporalment en gotes lipídiques citoplasmàtiques (LD de *lipid droplets*). Les LD estan prop dels mitocondris i així els lípids poden ser hidrolitzats quan hi ha demanda energètica. La síntesi i la hidròlisi de les reserves de TAG és un procés molt dinàmic i regulat que contribueix al funcionament cardíac. L'alteració del metabolisme o del contingut de TAG s'associa a un mal funcionament cardíac. Així, la dieta, l'envelliment i algunes malalties (com la diabetis, el síndrome metabòlic o algunes cardiomiopaties) poden provocar esteatosi cardíaca. L'augment de TAG al miocardi es correlaciona amb la disfunció cardíaca per un mecanisme que encara no es coneix, però es creu que es deu a l'acumulació de metabòlits lipotòxics d'AG (Kienesberger, Pulnikunnil, Nagendran, & Dyck, 2013).

El cor és l'òrgan que presenta una taxa de renovació més gran de TAG (més que el fetge i el teixit adipós) i es creu que, en certes condicions patològiques, incentivar la renovació i l'oxidació de TAG pot ser profitós pel funcionament cardíac. S'ha observat que en teixit cardíac sa, la taxa de renovació d'AG dins els TAG és més alta que la taxa d'oxidació, cosa que suggereix que la majoria d'AG captats pels cardiomiòcits es transporten a través del *pool* de TAG intracel·lular abans de ser oxidats. Això implica que el metabolisme de TAG ha de ser molt flexible i ha de poder adaptar la lipòlisi a la demanda energètica. Es creu que aquesta flexibilitat es manté gràcies a una lipòlisi incompleta i a una reesterificació dels intermediaris derivats dels TAG en condicions basals que, quan augmenta la demanda energètica, canviaria a una lipòlisi completa.

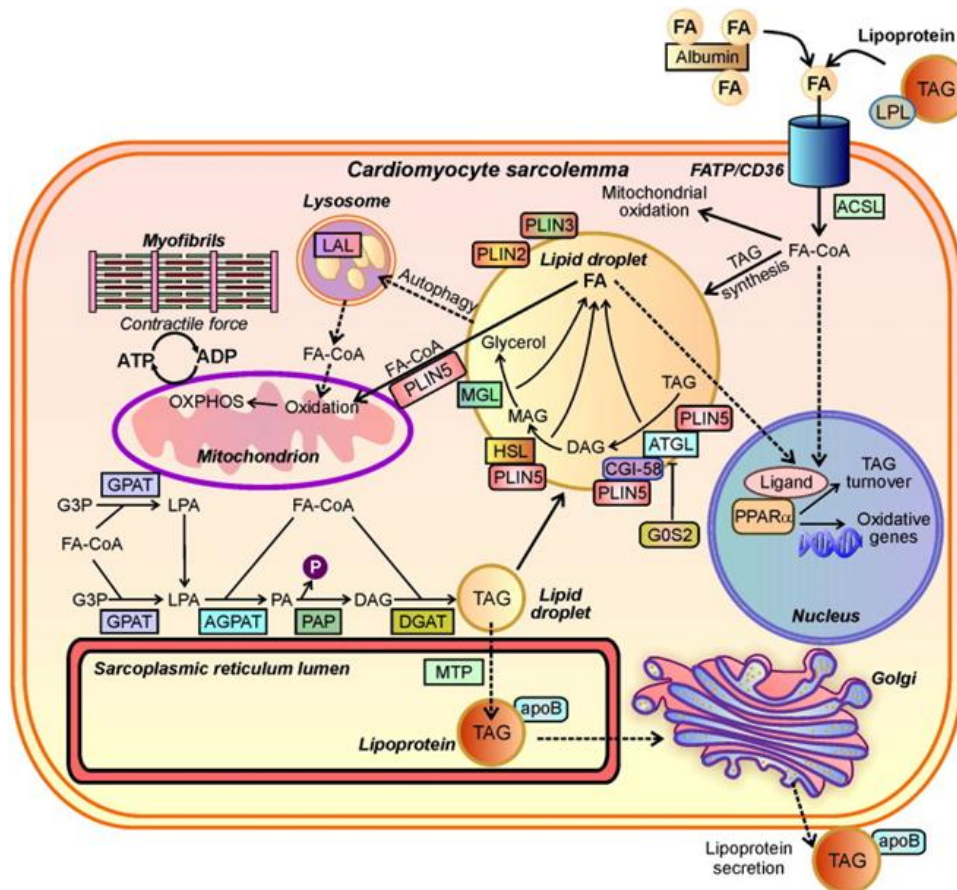


Figura 27. Metabolisme dels TAG als cardiomiòcits. Els AG (FA) captats pel cardiomiòcits provenen dels TAG de les lipoproteïnes (que hidrolitza l'LPL) o dels AG conjugats amb l'albumina. Els AG entren al cardiomiòcits majoritàriament a través de proteïnes transportadores (FATP i CD36) i s'esterifiquen amb coenzim A (FA-CoA) per les *long-chain acyl-CoA synthetases* (ACSL). La majoria d'aquests AG "actius" s'oxiden al mitocondri o s'incorporen en TAG per ser emmagatzemats temporalment. La síntesi de TAG de novo s'inicia a la membrana mitocondrial i del reticle sarcoplasmàtic per la glicerol-3-fosfatiltransferasa (GPAT). Els TAG sintetitzats de novo s'empaqueten en *lipid droplets* que estan envoltats de proteïnes *scaffold* de la família de la perilipina (PLIN). El catabolisme dels TAG es dona a la superfície de la LD i els AG hidrolitzats són usats de manera preferent al mitocondri per obtenir energia mitjançant la β -oxidació i la fosforilació oxidativa (OXPHOS). Tant els AG internalitzats com els que es produeixen a la lipòlisi poden actuar de lligands o de precursors de lligands per al PPAR α , que estimula la transcripció de gens involucrats en l'oxidació d'àcids grassos i el recanvi de TAG. Els TAG també poden ser degradats per autòfagia al lisosoma. El transport revers de lipoproteïnes també regula part de l'homeòstasi de TAG que es dona a través de la via secretora del Golgi (Kienesberger et al., 2013).

Les cèl·lules de mamífer sintetitzen els TAG mitjançant enzims localitzats al reticle sarcoplasmàtic i als mitocondris, després els TAG s'empaqueten en forma d'LD citosòliques (per a l'emmagatzematge) o de lipoproteïnes (per a la secreció). Els TAG emmagatzemats a les LD es produeixen majoritàriament per la via del glicerol fosfat i de la síntesi de glicerolípids de novo a la membrana del reticle sarcoplasmàtic. Pel que fa al catabolisme dels TAG emmagatzemats a les LD, aquest requereix la hidròlisi seqüencial

dels enllaços èster entre els AG i el glicerol. En teixits oxidatius com el cor, la majoria dels AG derivats dels TAG s'usen per produir energia, però també serveixen com a molècules de senyalització i com a components de membranes i de lípids complexes. La hidròlisi de TAG és un procés complex controlat per lipases i proteïnes reguladores. Així mateix també cal esmentar que el cor és un òrgan que secreta lipoproteïnes, com el fetge i l'intestí, tant en ratolins com humans. Aquest procés s'anomena "transport revers de TAG" i pot contribuir a l'homeòstasi de TAG del cor. L'apolipoproteïna B (apoB) i la MTP (microsomal triglyceride transfer protein) ensamblen les lipoproteïnes de baixa densitat al lúmen del reticle sarcoplasmàtic i després es secreten per la via de secreció de l'aparell de Golgi.

3.2.1.1. Les LD al miocardi

Les LD són orgànuls dinàmics que consisteixen en un nucli de lípids neutres (TAG i èsters de colesterol) envoltat d'una monocapa de fosfolípids, colesterol lliure i proteïnes *scaffold* específiques de cada tipus cel·lular. Les LD dels cardiomiòcits són relativament petites, d'acord amb el seu paper d'emmagatzematge, perquè d'aquesta manera s'augmenta la ràtio entre superfície i volum i se'n facilita la lipòlisi. Les proteïnes més abundants associades a les LD són membres de la família de la perilipina de les que se n'han descrit 5 diferents (perilipines 1-5). Com que cada teixit té un patró específic d'expressió, és provable que juguin un paper important estabilitzant les LD i regulant l'hidròlisi dels TAG de manera diferencial en teixits diferents. En cardiomiòcits s'ha descrit la presència de les isoformes 2,3,4 i 5, i sembla que la perilipina-5 és la més important en regular l'emmagatzematge i la hidròlisi de TAG. L'expressió de la perilipina-5 és més abundant en teixits oxidatius, i es regula a l'alça pel PPAR α . També es regula per fosforilació (via la PKA) i per interaccions amb enzims lipolítics. En mutants deficientes en perilipina, el cor acumula menys LD i augmenta l'oxidació d'AG, fet que condueix a una major producció de ROS i a una disminució de la funció cardíaca amb l'edat. A més de regular la lipòlisi, s'ha observat que pot reclutar els mitocondris a la superfície de les LD, facilitant la interacció física entre els dos orgànuls. La perilipina-5, doncs, juga un rol únic en el metabolisme de TAG dels cardiomiòcits i en l'oxidació d'AG, controlant la degradació de les LD i el flux al mitocondri d'AG derivats de la lipòlisi per a la producció d'energia. Les perilipines 2 i 3 semblen ser redundants i inhibeixen el recanvi de TAG i

n'augmenten l'acumulació. També interaccionen amb proteïnes associades a la lipòlisi, com la *adipose triglyceride lipase* (ATGL) o la *hormone-sensitive lipase* (HSL), però no promouen la interacció dels mitocondris amb les LD (Kienesberger et al., 2013).

3.2.1.2. Enzims de síntesi de TAG al miocardi

Les glicerol-3-fosfa- aciltransferases (GPAT) comencen la síntesi esterificant el glicerol-3-fosfat amb un AG i formant àcid lisofosfatídic. De les quatre GPAT expressades al cor, la 1 i la 2 es troben a la membrana mitocondrial i la 3 i la 4 al SR. La GPAT1 és la més estudiada tot i que la seva contribució no és majoritària (10-30% del total de l'activitat GPAT). El pas següent és l'esterificació de l'àcid lisofosfatídic amb un altre AG, catalitzat per les LPAAT (de *lysophosphatidic acid acyltransferase*) també anomenades AGPAT (*sn-1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferases*). S'han identificat tres isoformes de la família (1, 2, i 3) que s'expressen en cor, però el seu paper al miocardi no s'ha estudiat. El tercer pas és una desfosforilació per generar el diacilglicerol (DAG) que duen a terme les fosfatidat fosfatases (PAP, de *phosphatidic acid phosphatase*) també conegudes com a lipines. Els tres enzims de lipina (lipina 1-3) s'expressen al cor però la lipina-1 sembla ser la isoforma predominant. Al fetge s'ha observat que la lipina-1 actua com a enzim bifuncional, el qual promou tant la síntesi de glicerolípid/TAG, gràcies a la seva activitat PAP, i alhora incentiva l'oxidació d'AG, actuant com a coactivador transcripcional de PPAR α . La seva expressió augmenta per l'acció de PGC1 α i PPAR α , mentre que l'expressió és baixa en pacients amb diabetis tipus 2 tot i que augmenta amb el tractament d'insulina. Tot i així, els nivells d'acumulació de TAG i d'oxidació d'AG dels cors no canvien en el mutant de ratolí deficient per lipina-1. Ara bé, sí que presenten una acumulació d'àcid fosfatídic i estrès de reticle endoplasmàtic al miocardi. Per tant, la lipina-1 tindria un paper en la senyalització però seria dispensable per la síntesi/acumulació de TAG i l'oxidació d'AG al cor, cosa que es podria compensar per les altres dues isoformes. L'últim pas de la via és l'acilació del DAG que catalitzen les DAG-aciltransferases (DGAT). N'existeixen dues isoformes i ambdues s'expressen al cor. Aquest enzim augmenta en ratolins degut a l'exercici, la sobreexpressió de PPAR α i la diabetis. La sobreexpressió condicional en cardiomiòcits duplica el contingut de TAG perquè n'augmenta la síntesi. La sobreexpressió de DGAT també provoca un augment del *turnover* de TAG, cosa que fa que en creuar-la amb sobreexpressors de l'ACSL1 o PPAR γ (amb cardiomiopatia lipotxica)

en millori els símptomes. Aquesta idea fa pensar que el fet d'emmagatzemar l'excés d'AG que capta el cardiomiòcit al *pool* de TAG pot ser protector enfront la cardiomiopatia lipotòxica. D'altra banda, augmenta l'oxidació d'AG al mutant ACSL1 i redueix l'acumulació de metabòlits d'AG potencialment lipotòxics als dos models. També disminueix l'apoptosi del ACSL1 transgènic. El KO general de DGAT no presenta menys dipòsits de TAG, però sí menor oxidació i captació de lípids i menor expressió de gens d'ús d'AG i lipòlisi. Sí que provoca però un augment de la captació de glucosa del cor. La remodelació metabòlica s'acompanya d'hipertròfia cardíaca però no s'afecta la funció cardíaca. En general doncs redueix l'utilització d'AG i provoca un canvi compensatori cap al metabolisme de glucosa que contribueix a una remodelació hipertròfica fisiològica (Kienesberger et al., 2013).

3.2.1.3. Enzims del metabolisme de TAG al cor

L'ATGL comença la hidròlisi de TAG alliberant el primer AG dels TAG i produint DAG. La seva expressió al cor es regula a l'alça en situacions de dejú, exercici, dieta alta en greixos i diabetis, totes elles condicions que augmenten l'ús i el metabolisme de TAG. L'activació de l'ATGL depèn de la interacció amb la proteïna CGI-58 (que també interacciona amb la lipina-5) i el reclutament a la superfície de la LD. Aquestes interaccions s'han estudiat poc en cardiomiòcits, però en altres cèl·lules es regula per la proteïna quinasa A (PKA). L'ATGL és el pas limitant per la lipòlisi dels TAG i els ratolins deficientes en ATGL mostren menys lipòlisi i més deposició de TAG als teixits, inclòs el cor, provocant fallida cardíaca i mort. També els pacients amb mutacions al gen de l'ATGL desenvolupen cardiopaties. El que no se sap és si l'alteració en la funció cardíaca es deu a l'excés de TAG o a alteracions en les vies de senyalització. El dèficit d'ATGL provoca una disminució dràstica de l'activitat de PPAR α que alhora contribueix a una excessiva deposició de TAG i a la fallida cardíaca. L'ATGL podria, doncs, produir senyals lipídics o precursors d'aquests per l'activació de PPAR α que a la vegada crearien un mecanisme de *feed-forward* on l'increment del recanvi de TAG estimularia també l'oxidació dels AG alliberats.

La hidròlisi dels DAG és el següent pas i és catalitzat per la lipasa sensible a hormones (HSL). El dèficit global d'HSL en ratolins provoca una acumulació de DAG al cor i a altres teixits. L'HSL es regula bàsicament per modificacions postraduccionals. De la regulació de

l'expressió d'HSL en cor hi ha poca informació, però s'ha observat que augmenta en dejú i en diabetis i que segueix oscil·lacions circadianes (com també ho fa el metabolisme de TAG). El GMP cíclic (cGMP) i la guanilat ciclasa també en regulen l'expressió; el cGMP és protector enfront la hipertròfia cardíaca, pel que l'HSL també hi podria jugar un paper important. Pel que fa a la regulació postraducciona, diferents quinases fosforilen l'HSL i en modulen l'activitat i la translocació a la superfície de les LD, però la majoria dels estudis realitzats són en teixit adipós. Entre elles hi ha la PKA (activada per l'AMP cíclic), que s'antagonitza amb l'acció de degradar l'AMP cíclic per part de la insulina. Aquest sistema es dona al cor, provocant la lipòlisi i l'oxidació d'AG per obtenir energia en condicions d'estrès metabòlic agut. També en cardiomiòcits, les quinases ERK1/2 (*Extracellular regulated kinase 1/2*) estimulen l'activitat de l'HSL fosforilant-la a la Ser600. La fosforilació per l'AMPK (ser565) en canvi, inhibeix l'activitat de l'HSL, fet que es contraposa amb l'activació de l'ATGL. La sobreexpressió condicional d'HSL en cors de ratolí no provoca una acumulació de TAG però sí que els protegeix de l'augment de TAG provocat pel dejú, fet que s'associa amb una regulació a l'alça de gens involucrats en l'oxidació d'AG. A més, també protegeix els cors de la remodelació fibròtica que es dona quan se'ls indueix diabetis i presenten menys peroxidació lipídica. Com que l'HSL també pot hidrolitzar TAG no se sap si és un mecanisme associat a la hidròlisi dels TAG, dels DAG, per un mecanisme preventiu per la reesterificació dels DAG en TAG o per un augment de l'oxidació d'AG. La monoacilglicerol (MAG)-lipasa (MGL) facilita l'últim pas de la lipòlisi, hidrolitzant els MAG a glicerol i AG. S'expressa al miocardi però no se'n coneix la regulació ni el fenotip cardíac del ratolí *knock-out* (Kienesberger et al., 2013).

3.2.1.4. Secreció de lipoproteïnes

La sobreexpressió d'apoB provoca la secreció de més lipoproteïnes i la disminució del contingut de TAG, mentre que la deficiència d'MTTP suprimeix la secreció de lipoproteïnes i augmenta la deposició de TAG al miocardi. L'MTTP augmenta en el dejú, la diabetis i l'obesitat produïda per una dieta alta en greix. Tant l'MTTP com l'apoB augmenten en el cor sota hipòxia, que també està associada a l'esteatosi cardíaca. L'estimulació de la secreció de lipoproteïnes sobreexpressant l'apoB és suficient per reduir els TAG al miocardi de cors en condicions d'obesitat, diabetis, sobreexpressió d'LPL activada o deficiència d'LCAD (Kienesberger et al., 2013).

3.3. Regulació del fenotip metabòlic

El fenotip metabòlic del miocardi es definiria com la preferència de substrat del cor en un entorn concret. L'entorn comprèn els aspectes metabòlics (concentracions arterials de nutrients, hormones i oxigen), les condicions hemodinàmiques (ritme cardíac i flux coronari) i l'estat ionotròpic (ions com el calci, hormones, neurotransmissors i fàrmacs). El fenotip depèn del contingut de proteïnes (enzims i transportadors) que faciliten el flux cap a les diferents vies metabòliques, i també de la integritat i l'estructura dels orgànuls clau com els mitocondris. Molts enzims hi són en excés, i canvis grans d'expressió o d'activitat no tenen per què indicar un fenotip concret. A més, cal tenir en compte la velocitat del flux a través de les vies metabòliques, l'expressió i l'activitat de les proteïnes reguladores, i els metabòlits reguladors que s'han explicat anteriorment. El canvi de fenotip metabòlic que es dona quan hi ha hipertròfia cardíaca o insuficència cardíaca s'ha estudiat des dels diferents nivells i hi ha molt interès en saber quins mecanismes regulen els canvis en l'expressió dels gens codificants per proteïnes que regulen el metabolisme de substrats i que afecten la funció cardíaca (Stanley et al., 2005).

3.3.1. Regulació del fenotip metabòlic pels factors de transcripció

En general, la capacitat oxidativa de la cèl·lula depèn del volum, la densitat i la composició de mitocondris. La capacitat d'oxidar AG al mitocondri està regulada per diferents factors transcripcionals, els seus coactivadors i inhibidors i els lligams i metabòlits que els regulen.

Els PPAR (*peroxisome proliferation-activated receptors*) són uns factors de transcripció que formen un heterodímer amb els receptors de retinoic (RXR) i s'uneixen als elements de resposta a PPAR (PPRE) que es troben als promotors de molts gens que codifiquen per enzims metabòlics. El coactivador PGC1 α (*PPAR gamma coactivator 1-alpha*) regula positivament el complex PPAR/RXR, i augmenta l'expressió de gens mitocondrials així com la biogènesi mitocondrial, gens d'oxidació d'AG i la PDK4 (que inhibeix la PDH). La unió dels cofactors COUP (que regulen la diferenciació i el metabolisme) i SP1 (regulat per insulina) inhibeix aquest efecte. Els AG i els eicosanoids activen el dímer PPAR/RXR. El dímer actua així com de sensor i com més AG hi ha, més catabolisme d'AG es dona.

Hi ha diferents isoformes de PPAR. La isoforma PPAR α s'expressa més en teixits amb taxes altes d'oxidació d'àcids grassos on regula l'expressió de components clau en la captació, l'esterificació i l'oxidació d'AG. Al cor juga un paper similar: augmenta l'expressió d'enzims d'oxidació d'àcids grassos, la taxa d'oxidació d'àcids grassos, i l'expressió de l'UCP3 i la tioestearasa 1, és a dir, l'extrusió d'àcids grassos dels mitocondris. La isoforma PPAR β/δ també s'expressa en cardiomiòcits i té una funció semblant a PPAR α , activant l'oxidació d'àcids grassos. Si es delectona, els mutants acumulen lípids al miocardi. El PPAR γ genera controvèrsia, segons alguns autors (Gilde et al., 2003) té una expressió molt lleu als cardiomiòcits i només regula l'alliberament d'AG a la sang al teixit adipós però altres estudis (Krishnan et al., 2009) indiquen que és el principal regulador del canvi metabòlic que es dona en la hipertròfia cardíaca.

L'ERR α (*Estrogen related receptor α*) és un altre factor de transcripció important en la regulació del metabolisme lipídic, del qual no se'n coneix el lligand endogen (forma part del grup de receptors òrfans). L'ERR α interacciona amb el PGC1 α i s'uneix als PPRE i augmenta l'expressió de gens regulats per PPAR α implicats en la captació, l'acumulació i l'oxidació d'àcids grassos. També augmenta l'expressió de gens no regulats per PPAR α com enzims del metabolisme de glúcids, de la respiració mitocondrial i de la transducció energètica. També regula l'expressió de proteïnes contràctils i del metabolisme del calci (Dufour et al., 2007; Huss, Kopp, & Kelly, 2002; Huss, Torra, Staels, Giguère, & Kelly, 2004). A més, juntament amb PGC1 α també regula la biogènesi i la dinàmica mitocondrial (Martin et al., 2014; Ramjiawan, Bagchi, Albak, & Czubryt, 2013; Zhang et al., 2011)

Els factors de transcripció COUP (de *chicken ovalbumin upstream promoter*) i SP1/3 (de *specific protein*) també regulen el canvi de substrat energètic d'AG a glucosa que es dona durant la hipertròfia o la fallida cardíaca. La seva activació fa que els cors hipertròfics tinguin menys capacitat d'utilitzar àcids grassos. Els factors COUP (que també pertanyen a la família dels receptors nuclears orfes) tenen una funció proadipogènica. Al cor, s'ha observat que COUP disminueix l'expressió de l'MCAD en unir-se al promotor del seu gen, i al múscul esquelètic, a més de l'MCAD, també disminueix l'expressió de gens involucrats en la mobilització de lípids i l'oxidació d'àcids grassos. S'ha descrit que SP1 reprimeix

l'expressió d'MCAD al cor hipertròfic (Lin, Qin, Tang, Tsai, & Tsai, 2011; Myers, Wang, & Muscat, 2006; Sack, Disch, Rockman, & Kelly, 1997; Tian, 2003).

4. EL METABOLISME DEL FERRO

El ferro és essencial per a la vida ja que participa en reaccions enzimàtiques claus per al funcionament de la cèl·lula i l'organisme. Els seus nivells s'han de regular a nivell cel·lular i sistèmic per evitar tant el dèficit (que provocaria, per exemple, la pèrdua d'algunes activitats enzimàtiques) com l'excés (per evitar la producció de radicals lliures, dany oxidatiu i fins i tot la mort). El seu paper clau en el metabolisme i en l'estrès oxidatiu fa que sigui imprescindible a nivell mitocondrial, perquè és on es produeix l'energia gràcies a la cadena respiratòria, formada per complexos enzimàtics que contenen ferro. La riquesa en mitocondris i la gran demanda energètica al cor, fan que el ferro tingui un paper clau en el funcionament cardíac.

4.1. La importància del ferro a nivell biològic

Els metalls són components essencials dels sistemes biològics. El sodi (Na), el potassi (K), el magnesi (Mg) i el calci (Ca) són la base per a moltes funcions, entre elles la conducció nerviosa, la contracció muscular i l'estabilització dels àcids nucleics (Bleackley & Macgillivray, 2011). La importància biològica dels metalls és tal, que prop d'un terç de les proteïnes està associada a algun metall (Shi & Chance, 2008). Sovint, però, els metalls incorporats a les proteïnes no són tant abundants com els citats anteriorment, sinó elements traça que inclouen els metalls de transició. Els metalls de transició són el ferro (Fe), el coure (Cu), el manganès (Mn), el zinc (Zn), el seleni (Se), el crom (Cr), el níquel (Ni) i el cobalt (Co). D'aquests, el zinc i el ferro són els més freqüents (Shi & Chance, 2008). La majoria dels metalls de transició tenen la particularitat de poder canviar fàcilment i ràpidament entre els estats reduïts i oxidats, cosa que els permet actuar com a cofactors d'un gran nombre d'enzims cel·lulars.

El ferro té estats d'oxidació que van de $-II$ a $+IV$, però els més rellevants biològicament són el Fe (II) i el Fe (III). El ferro té la particularitat de tenir un potencial redox variable, sobretot quan està influenciat pels enllaços coordinats amb proteïnes. La transferència d'electrons per part del ferro és reversible dins el rang dels oxidants i reductants biològics

(Aisen, Enns, & Wessling-Resnick, 2001). Aquestes propietats químiques, juntament amb el fet de ser un metall abundant a l'atmosfera i oceans primitius van fer que el ferro s'incorporés als sistemes biològics. Però amb l'aparició dels cianobacteris fotosintètics, l'atmosfera primitiva va començar a ser rica en oxigen, el qual va oxidar el Fe^{2+} dels oceans a Fe^{3+} . L'atmosfera actual també provoca que el Fe^{2+} (soluble) s'autooxidi a Fe^{3+} (insoluble) espontàniament, cosa que el fa menys biodisponible. La presència de l'oxigen, que per ell mateix ja és tòxic, i la baixa biodisponibilitat del ferro van causar un esdeveniment d'extinció massiva. Els organismes que van sobreviure van desenvolupar mecanismes per captar i solubilitzar el ferro mentre també havien de combatre el nou problema de les espècies reactives de l'oxigen, un problema que s'agreuja amb la presència de metalls de transició com el ferro (Bleackley & Macgillivray, 2011).

El ferro (i també el zinc) és essencial per a la gran majoria d'organismes. La incorporació a les proteïnes es dona fonamentalment de tres maneres diferents. Una és la inserció del Fe^{2+} dins de la protoporfirina IX que forma el grup prostètic hemo. La segona és la combinació del ferro i el sofre, formant els centres ferro-sofre, uns cofactors inorgànics. La tercera és la unió del ferro per residus d'altres aminoàcids que no són cisteïnes, com succeeix a les ribonucleòtid reductases, l'enzim limitant de la síntesi del DNA, o les oxigenases i oxidases que catalitzen entre altres la síntesi d'antibiòtics.

Les mateixes propietats que fan el ferro tan útil per a la biologia també fan que pugui formar radicals lliures en presència d'oxigen. Per això les cèl·lules han desenvolupat un sistema regulat i coordinat de captació, d'ús, d'emmagatzematge i de transport amb molts dels components conservats des de llevats fins a humans.

4.2. L'homeòstasi del ferro

El cos humà conté entre 3 i 5 g de ferro (Wang & Pantopoulos, 2011). La major part es troba en forma d'hemo dins de la hemoglobina als eritròcits (més de 2 g) o la mioglobina dels músculs (més de 300 mg). Altres òrgans rics en ferro són els macròfags de la melsa, el fetge, la medul·la òssia (uns 1.600 mg). La resta de proteïnes i enzims cel·lulars que contenen ferro s'estima que n'uneixen uns 8 mg. El ferro es transporta per la circulació unit a transferrina (TF), que s'estima que porta uns 3 mg en un moment determinat, però com que la renovació és de més de 10 vegades al dia, representa el *pool* de ferro més

dinàmic. El ferro s'obté dels macròfags reticuloendotelials (que l'obtenen de l'eritrofagocitosi) i de la dieta (gràcies als enteròcits que internalitzen el grup hemo o el ferro inorgànic).

Per absorbir el ferro inorgànic cal que abans sigui reduït de Fe^{3+} a Fe^{2+} per reductors com l'ascorbat i/o per les ferrereductases com la DCYTB (*duodenal cytochrome B*) (McKie, 2008). La reducció s'acoba a transportadors de membrana com el DMT1 (*divalent metal transporter 1*, també anomenat SLC11A2 de *solut carrier family 11 member 2*, NRAMP2, de *natural resistance-associated macrophage protein 2* o DCT1 *divalent cation transporter 1*). La internalització de l'hemo no es coneix del tot però podria ser per transport directe o per endocitosi mediada per receptors (West & Oates, 2008). Les hemo-oxigenases catabolitzen l'hemo per alliberar el ferro dins els macròfags (Ryter, 2006). Tant enteròcits com macròfags tenen un transportador transmembrana per exportar el Fe^{2+} al plasma, la ferroportina (FPN o SLC40A1). Altra vegada el procés va lligat a l'acció de les ferroxidases; la ceruloplasmina o la seva homòloga hefaestina (expressada a la membrana basolateral dels enteròcits) (Hentze, Muckenthaler, Galy, & Camaschella, 2010; J. Wang & Pantopoulos, 2011).

El ferro exportat s'uneix a la transferrina plasmàtica, que el manté en un estat redox inert i el reparteix als diferents teixits. S'ha descrit que les gastrines, uns polipèptids que estimulen la secreció d'àcid gràstic, podrien fer de xaperones de ferro i ajudar a la unió del ferro a l'apo-TF (Kovac, Anderson, & Baldwin, 2011). La TF té dos llocs d'unió al ferro i només està saturada parcialment en condicions fisiològiques (la concentració de TF difèrrica és de prop de $5 \mu\text{M}$, essent un 10% del total de la TF circulant). Això permet que actui de tampó quan hi ha un augment de ferro al plasma per evitar la formació del *non-transferrin bound iron* (NTBI), com per exemple en l'hemocromatosi hereditària (HH), una malaltia que acumula ferro a les cèl·lules parenquimàtiques dels teixits i hi provoca dany oxidatiu (Brissot, Ropert, Le Lan, & Loréal, 2012; Gkouvatsos, Papanikolaou, & Pantopoulos, 2012).

La regulació del ferro a nivell sistèmic en mamífers respon a una hormona peptídica anomenada hepcidina que es sintetitza al fetge i a altres cèl·lules. L'augment de ferro

(sanguini o hepàtic) i la inflamació (i per tant les infeccions) fan que augmenti l'hepcidina i que s'uneix a la ferroportina d'enteròcits, macròfags i hepatòcits provocant la seva internalització i degradació. D'aquesta manera el ferro sistèmic disminueix perquè se n'inhibeix l'absorció a la mucosa i es reté als macròfags. La hipòxia, via l'EPO, i l'anèmia, via l'HIF1 α , també regulen els nivells d'hepcidina. Mutacions en el gen de l'hepcidina o dels seus reguladors *upstream* provoquen hemocromatosis juvenil (Ganz, 2011; Pantopoulos, Porwal, Tartakoff, & Devireddy, 2012).

4.3. Metabolisme intracel·lular del ferro

La majoria de les cèl·lules obtenen el ferro de la TF circulant. La transferrina uneix el ferro amb una afinitat que depèn del pH: a pH neutre el ferro s'uneix fortament, mentre que a pH àcid la unió s'anul·la (Dautry-Varsat, Ciechanover, & Lodish, 1983). L'holo-TF uneix el receptor de TF (TFR1) a la superfície cel·lular i el complex s'endocita gràcies als *clathrin-coated pits*. L'expressió del TFR1 depèn dels nivells de ferro que es necessiten a cada cèl·lula. El TFR1 és una glicoproteïna en forma d'homodímer unit per un pont disulfur, on cada subunitat uneix una molècula de TF. La interacció del lligand amb el receptor depèn del contingut de ferro de la transferrina, i com més ferro té, més afinitat. És per això que la captació de ferro depèn de la concentració de ferro a la sang (Aisen, 1998). A l'endosoma s'hi troba també una bomba de protons que l'acidifica, cosa que allibera el Fe³⁺, aquest es redueix a Fe²⁺ per la metal·loreductasa STEAP3 (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3*) (Ohgami, Campagna, McDonald, & Fleming, 2006). El Fe²⁺ es transporta a través de la membrana endosòmica al citosol pel DMT1. L'apo-TF es recicla de nou a la superfície cel·lular i el TFR1 de la membrana repeteix un altre cicle. El ferro captat per la cèl·lula passa a formar part del LIP (*labile iron pool*) citosòlic, que és actiu en termes redox. El LIP es quela per sideròfors intracel·lulars que faciliten el transport als mitocondris a través d'un receptor desconegut. Als mitocondris, el ferro s'usa per diferents processos metabòlics (com la síntesi d'hemo i de centres ferrosulfurats). El ferro cel·lular que no s'utilitza s'emmagatzema a la ferritina o s'exporta gràcies a la ferroportina. Les cèl·lules també poden exportar (i captar) el ferro en forma de ferritina o hemo.

S'han descrit altres possibles transportadors de ferro. Uns són els Zip8 i Zip14/SLC39A14 (*Zrt- and Irt-like protein*), descrits en un principi com a transportadors de zinc, que faciliten l'entrada de ferro (i d'altres metalls divalents com el zinc, el manganès i el cadmi) en cèl·lules en cultiu (Jenkitkasemwong, Wang, Mackenzie, & Knutson, 2012; Liuzzi, Aydemir, Nam, Knutson, & Cousins, 2006). Uns altres són els canals de calci tipus L dependents de voltatge (LTCC de *L-type calcium channels*). Aquests canals poden jugar un paper important en els miòcits cardíacs en situacions d'acumulació de ferro perquè s'ha vist que en bloquejar-los disminueix l'acumulació de ferro, l'estrès oxidatiu, la supervivència i l'estructura i la funció cardíaca (Oudit et al., 2003; Oudit, Trivieri, Khaper, Liu, & Backx, 2006; Tsushima et al., 1999).

El moviment i transport del ferro dins la cèl·lula es coneix poc. Es creu que el ferro arriba al mitocondri passant abans pel citoplasma i el LIP però no es coneixen quins són els transportadors mitocondrials. El LIP també es descriu a la literatura com el ferro "intercanviable", "regulatori" o "quelable" i representa una fracció minoritària del ferro cel·lular total (entre un 3-5 per cent del total). Aquest prové de la captació de ferro i de la degradació de proteïnes que contenen ferro o hemo. Es creu que el ferro del LIP està en un estat estacionari d'equilibri i que uneix diferents molècules de baix pes molecular que el quelen. Aquestes molècules poden ser anions orgànics (fosfats, citrats i carboxilats) i lligams polifuncionals (polipèptids i sideròfors). Recentment s'ha suggerit que el glutatió seria el principal quelant de ferro del LIP (Hider & Kong, 2013). Els orgànuls també contenen LIP (6-16 μM) (Kruszewski, 2003). Els mitocondris són els consumidors principals de ferro i, tot i que la majoria del ferro està unit a proteïnes o a l'hemo, s'ha detectat ferro quelatable dins els mitocondris d'hepatòcits i cardiomiòcits (Glickstein, El, Shvartsman, & Cabantchik, 2005).

El LIP és el ferro més factible de contribuir a la reacció de Fenton i també pot mediar apoptosi (si es quela amb quelants com la DFO) (Kruszewski, 2003; D. R. Richardson, 2005). Els mitocondris han evolucionat a partir dels bacteris aeròbics i generen energia per la cèl·lula "hoste" de manera dependent d'oxigen. El ferro forma part de diferents subunitats de totes les proteïnes involucrades en la cadena respiratòria. Així, tal com passa als bacteris, els mitocondris contenen molècules similars als sideròfors i enzims

homòlegs als bacterians. Un d'aquests és el l'acid 2,5-dihidroxibenzoic (2,5-DHBA), sintetitzat per l'enzim BDH2 en ratolins, un homòleg de l'EntA bacterià. En cèl·lules deficientes per BDH2 es dona una acumulació de ferro al citosol, amb la subsquent producció de ROS, i un dèficit de ferro mitocondrial (Devireddy, Hart, Goetz, & Green, 2010). Existeixen altres xaperones citosòliques que transporten el ferro, com les glutaredoxines GRX3 i GRX4. El seu dèficit altera el transport mitocondrial de ferro als mitocondris (Mühlenhoff et al., 2010). Els transportadors o receptors que faciliten l'entrada al mitocondri, però, encara no es coneixen.

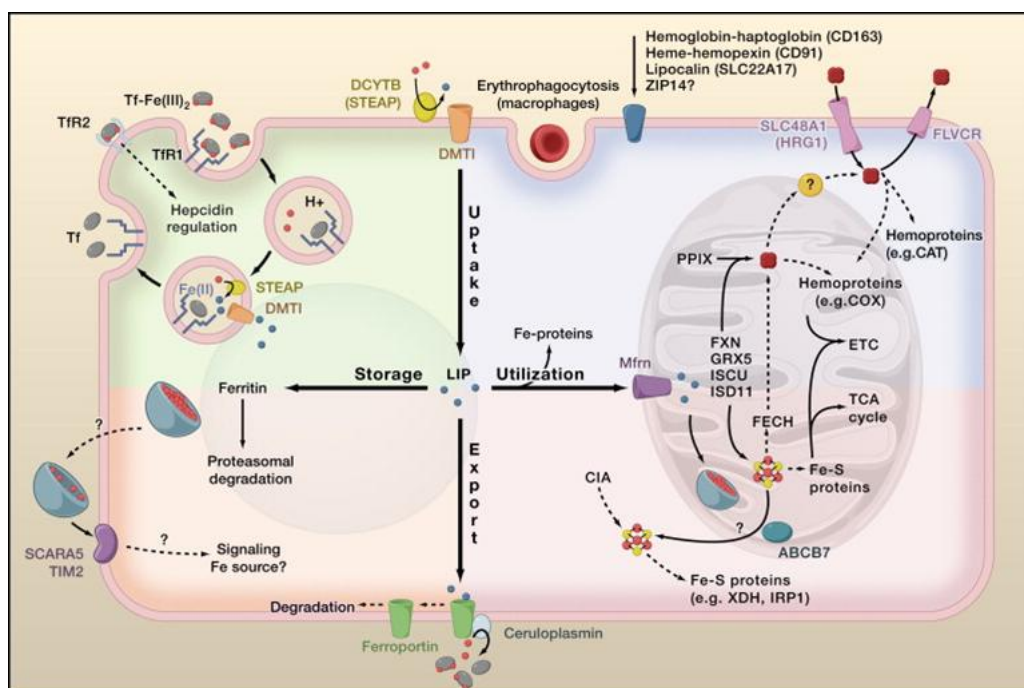


Figura 28. Metabolisme intracel·lular del ferro. La majoria de cèl·lules capten el ferro gràcies al receptor de transferrina (TFR1) mitjançant endocitosi. Als endosomes el ferro s'allibera de la transferrina i les metal·loreductases STEAP el redueixen a ferro (II) abans de ser transportat al citosol pel transportador de metalls divalents (DMT1). El TFR1 retorna a la membrana plasmàtica per ser usat de nou. El ferro captat per la cèl·lula passa a formar part del LIP (*labile iron pool*), que després es fa servir per incorporar-lo a les proteïnes o es transporta al mitocondri per la mitoferrina (MFRN) o pel mecanisme "kiss and run". Al mitocondri, el ferro pot inserir-se al grup hemo o ser usat per sintetitzar els centres Fe-S. El ferro del LIP que no s'utilitza es pot exportar via la ferroportina (que treballa conjuntament amb les ferroxidases) o emmagatzemar dins dels escuts de ferritina. La ferritina també pot ser alliberada però no se'n coneix el mecanisme. Algunes cèl·lules també contenen una ferritina mitocondrial. Els nivells de ferro del LIP venen determinats per la taxa de captació de ferro, l'ús, l'emmagatzematge i l'exportació, i es coordinen i regulen per evitar-ne la deficiència i prevenir-ne l'acumulació (Hentze et al., 2010).

Mitjançant estudis computacionals s'han identificats diferents candidats de la MOM, com l'SLC25a39, l'SLC22A4 i el TMEM14C. Aquests es coexpressen amb gens de la síntesi de

grups hemo i el *knock-down* en peix zebra porta a un dèficit d'hemo. Pel que fa a la MIM, s'han descrit l'SLC25A37 o Mitoferrina-1 (MFRN1) i l'SLC25A38 o Mitoferrina 2 (MFRN2). Tot i que ambdues són homòlogues, no són redundants a nivell funcional, perquè la sobreexpressió de l'MFRN2 no rescata la deficiència mitocondrial de ferro provocada quan hi ha dèficit d'MFRN1 (Paradkar, Zumbrennen, Paw, Ward, & Kaplan, 2009). Una possibilitat pel transport de ferro al mitocondri, alternativa a la mediada per xaperones o sideròfors, és el model de "*kiss-and-run*". Segons aquest model, basat en dades cinètiques i d'imatge, el ferro unit a la TF dels endosomes es transporta directament als mitocondris (sense passar pel citosol ni el LIP) gràcies al contacte dels endosomes amb els mitocondris. No es coneixen els factors que ho facilitarien (Sheftel, Zhang, Brown, Shirihai, & Ponka, 2007; Zhang, Sheftel, & Ponka, 2005).

L'excés de ferro s'emmagatzema dins la ferritina (FT) en forma d'òxid de ferro. La ferritina és una proteïna ubíqua conservada evolutivament que pot encabir fins a 4500 àtoms de ferro. En mamífers forma un heterodímer de dues cadenes, la H (*heavy*) i la L (*light*), que s'ensamblen formant un escut (*shell*) esfèric. La cadena L predomina en teixits amb grans magatzems de ferro, i la cadena H en cèl·lules que alliberen ferro. La subunitat L glicosilada es troba circulant i augmenta si hi ha augment de ferro sistèmic o infecció. Es creu que podria regular els nivells de ferro durant canvis en el contingut d'aquest metall. L'escut de ferritina forma uns canals que permeten l'entrada (i potser la sortida) de ferro. La subunitat H, que està a la part externa, té activitat ferroxidasa i converteix el Fe^{2+} a Fe^{3+} , cosa que permet que es dipositi a l'interior, on predomina la subunitat L.

Es creu que la xaperona *Poly(rC)-binding protein 1* (PCBP1) ajuda a l'emplenament de la ferritina. L'alliberament del ferro, a nivell fisiològic, sembla que es dona gràcies a la degradació de la ferritina. L'expressió de la ferritina depèn del sistema IRE/IRP (que es descriu més endavant) i de factors transcripcionals i citocines, que actuen principalment durant estadis d'inflamació i infecció, els quals alteren molt el contingut de ferro. L'expressió de la ferritina també s'activa per l'estrès oxidatiu perquè té un element ARE (*antioxidant response element*) al promotor. Per contra, el peròxid d'hidrogen extern inhibeix la traducció de l'mRNA missatger activant el sistema regulador IRE/IRP. Pel fet de segrestar el ferro actiu a nivell redox, la FT confereix resistència a l'estrès oxidatiu, ja que

disminueix el LIP i la generació de ROS (Chasteen & Harrison, 1999; Omiya et al., 2009; Pantopoulos et al., 2012; Shi, Bencze, Stemmler, & Philpott, 2008).

4.3.1. Metabolisme mitocondrial del ferro

El ferro importat al mitocondri s'utilitza per la síntesi de grups hemo i centres ferrosulfurats, i l'excés de ferro s'emmagatzema a la ferritina mitocondrial o mitoferritina (FTMT) (Pantopoulos et al., 2012; Richardson et al., 2010).

La síntesi de grups hemo comença i acaba al mitocondri però alguns passos intermediaris ocorren al citosol. El primer pas és la condensació del succinil-CoA i la glicina a la matriu mitocondrial per formar l'àcid 5-amino-levulínic (ALA), catalitzat per l'enzim ALA-sintasa (ALAS). L'ALAS té dues isoformes, l'ALAS2 expressada a les cèl·lules eritroides i l'ALAS1, que es troba a la resta de cèl·lules. L'ALA s'exporta del mitocondri al citosol però no se'n coneixen els transportadors. Al citosol, l'ALA es converteix en coproporfirinogen en una sèrie de reaccions. L'intermediari d'hemo resultant es transporta a través de la MOM gràcies a l'ABCB6, un membre de la família dels *ATP-binding cassette*. L'últim pas és la inserció del ferro a la protoporfirina, que catalitza la ferroquelatasa (FECH). Tampoc no es coneix el procés pel qual l'hemo amb ferro travessa les membranes mitocondrials per associar-se amb les globines i els citocroms al citosol (Ajioka, Phillips, & Kushner, 2006).

La síntesi dels centres ferro-sofre (ISC de *iron-sulfur clusters*) també es dona a la matriu mitocondrial. Els ISC són uns cofactors formats per ferro i anions sulfur (S^{2-}) ensamblats per formar clústers $[2Fe-2S]$ i $[4Fe-4s]$. Aquests clústers formaran grups prostètics de proteïnes que tenen funcions essencials a la cadena de transport electrònic, a les reaccions redox i al catabolisme entre d'altres. Existeixen més de 20 components que faciliten la síntesi i la maduració dels centres ferro-sofre al mitocondri, al citosol i al nucli.

Durant la síntesi de novo, el primer pas es facilita pel complex desulfurasa (NFS1-ISD11) que converteix la cisteïna a alanina alliberant sofre que queda unit transientment en un residu de cisteïna conservat d'NFS1 en forma de grup persulfur. Després aquest grup es transfereix a la proteïna *scaffold* ISCU i es redueix a sulfur per permetre la formació dels centres ferro-sofre. La reducció del sulfur està mediada per la ferredoxina 2 (FDX2), la

ferredoxina reductasa (FDXR) i el NAD(P)H. La dació de ferro a ISCU1 es creu que podria involucrar la frataxina. El segon pas és l'alliberament del cofactor de la proteïna ISCU que involucra un sistema de xaperones (HSPA9/GRP75/mortalina i HSCB), intercanviadors de nucleòtids (GRPEL 1/2) i la glutaredoxina GRX5, que juntament amb el glutatió, uneix el clúster.

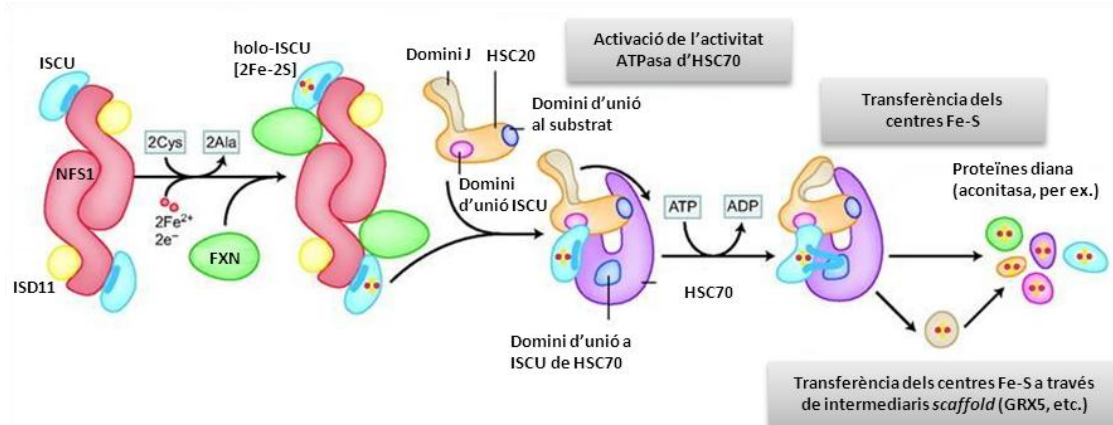


Figura 29. Esquema general de la síntesi dels centres ferro-sofre. La cisteïna-desulfurasa NFS1 forma un dímer on s'hi uneixen els monòmers de la proteïna *scaffold* ISCU. Als organismes eucariotes l'ISD11 és imprescindible per la formació dels clústers. L'NFS1 uneix també el cofactor piridoxal fosfat (no es mostra). Diferents estudis suggereixen que la frataxina forma part del complex inicial de síntesi dels clústers Fe-S. L'NFS1 dona el sofre inorgànic i les cisteïnes de l'ISCU aporten els lligands que uneixen el ferro dels centres Fe-S naixents. Els electrons provenen d'alguna proteïna molt reduïda, probablement la ferrixosina. Un cop format, el Fe-S es transfereix a les diferents apo-proteïnes. Els estudis en bacteris i llevats suggereixen que en aquest pas actuen un parell de xaperones (HSC20 i HSC70 en humans) però encara està per determinar el mecanisme concret. Es creu que la xaperona HSC70, mitjançant la hidròlisi d'ATP, provocaria un canvi de conformació a ISCU de manera que un pèptid amb els centres Fe-S seria transferit a l'HSC70, mentre que l'HSC20 protegiria el centre Fe-S. La mateixa energia alliberada per la hidròlisi de l'ATP permetria que les xaperones ajudessin a transferir el centre a les proteïnes diana. Entre les proteïnes diana també hi ha altres proteïnes intermediàries que funcionen com a *scaffold* per donar els centres a un conjunt específic de proteïnes (Rouault, 2012).

El tercer pas és la incorporació dels grups prostètics a les diferents apoproteïnes, que inclouen ISCA1/2, IBA57, NFU1, BOLA3 i IND1 (aquest últim està involucrat en la maduració del complex I). El clúster format o els seus precursors també es poden exportar del mitocondri (gràcies al transportador ABCB7) cap a la maquinària citosòlica d'ensamblatge (CIA de *cytosolic iron-sulfur cluster assembly*) (Pantopoulos et al., 2012; D. R. Richardson et al., 2010; Stehling & Lill, 2013; Stehling, Wilbrecht, & Lill, 2014).

La ferritina mitocondrial (FTMT) es codifica per un gen diferent al de la ferritina. La Ftmt també té activitat ferroxidasa, però només s'expressa en certs teixits (testicles, cervell,

cor, medul·la espinal, ronyó i illes β -pancreàtiques) i no es regula per ferro (Gebauer & Hentze, 2004; Levi et al., 2001; Levi & Arosio, 2004; Santambrogio et al., 2007). És interessant el fet que ratolins mutants per la FTMT es mostren més sensibles a la cardiotoxicitat (Maccarinelli et al., 2014).

4.4. Regulació del metabolisme del ferro intracel·lular

L'equilibri del ferro intracel·lular es regula majoritàriament per mecanismes postranscripcionals. Les proteïnes citoplasmàtiques IRP (*iron-responsive element-binding proteins*) determinen el destí de diferents mRNA en unir-se a unes estructures presents en aquests anomenades IRE (*iron-responsive elements*).

Els IRE són uns motius que es troben a les regions UTR dels RNA involucrats en el metabolisme del ferro. Aquests formen un *stem-loop* conservat de 25-30 nucleòtids reconegut per les IRP. Els mRNA que tenen l'IRE a la regió 3'UTR (com el TFR1) s'estabilitzen amb la unió de les IRP, fent que n'augmenti la traducció. Els que el tenen a la regió 5'UTR (com la ferritina H/L), després d'unir les IRP, es bloquegen a nivell de la traducció. Quan hi ha deficiència de ferro, les IRP s'hi uneixen amb una afinitat molt alta, i això resulta en l'estabilització del TFR1 (amb múltiples IRE a 5'UTR) provocant que hi hagi més captació de ferro de la TF circulant. Amb la ferritina passa el contrari, la unió de les IRP bloqueja la traducció i fa que el ferro no s'emmagatzemi deixant-lo disponible per a l'ús metabòlic. Quan hi ha excés de ferro, la resposta és la contrària. Les IRP s'inactiven, i fa que el mRNA del TFR1 es degradi mentre que es permet la traducció de la ferritina. Això minimitza la internalització del ferro via el TFR1 i promou l'emmagatzematge de l'excés de ferro intracel·lular dins la ferritina.

Altres mRNA amb motius IRE són els transportadors de ferro (DMT1 i ferroportina), enzims de la síntesi d'hemo (ALAS2), i altres mRNA relacionats amb l'homeòstasi de ferro (aconitasa mitocondrial, HIF2 α , MRCK α , precursor β -amiloide i α -sinucleïna). També és important el fet que alguns mRNA clau en el metabolisme del ferro no tenen IRE, com el TFR2, la FTMT, l'ALAS1, i alguns transcrits provinents de l'*splicing* del DMT1 i la ferroportina. Això confereix una regulació versàtil i depenent de teixit. Per exemple, la ferroportina sense IRE a l'mRNA és prevalent en enteròcits i cèl·lules precursoras

eritroides, cosa que en permet l'expressió durant el dèficit de ferro evitant el bloqueig de les IRP. També en cèl·lules eritroides, les quals necessiten molt ferro per a l'hemoglobina, l'expressió de TFR1 s'indueix per mecanismes transcripcionals i també escapa de la regulació per ferro/IRP (Pantopoulos et al., 2012; Wang & Pantopoulos, 2011).

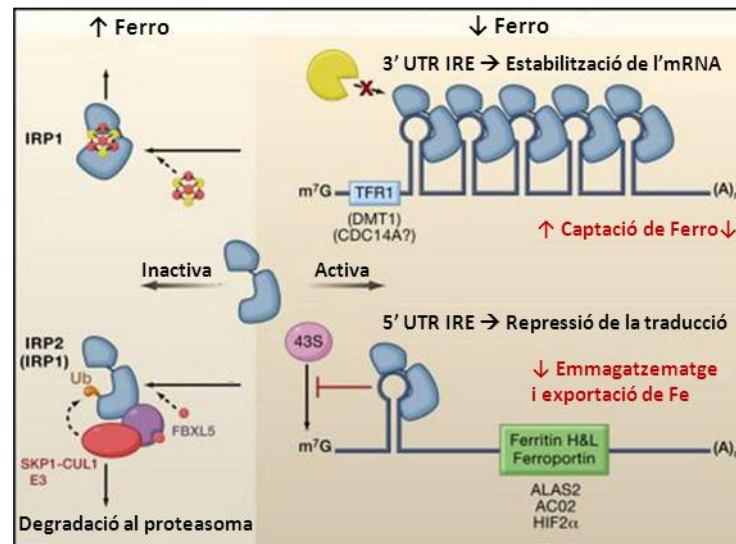


Figura 30. Regulació del ferro intracel·lular. Les cèl·lules deficientes en ferro (dreta) tenen les IRP actives, que s'uneixen als IRE de les regions UTR dels mRNA que codifiquen per proteïnes involucrades en el transport i l'emmagatzematge de ferro. La unió de l'IRP a l'únic IRE de la regió 5'UTR dels mRNA diana n'inhibeix la traducció, mentre que la unió de les IRP als múltiples IRE de la regió 3'UTR del transcrit del receptor de transferrina (TFR1) n'augmenta l'estabilitat. Com a conseqüència augmenta la captació del ferro facilitada pel TFR1 mentre que disminueix l'emmagatzematge a la ferritina o l'exportació a través de la ferroportina. En conjunt es provoca un augment del LIP. A les cèl·lules amb ferro en abundància, el domini F-box de la FBXL5 (una proteïna que es modifica i actua de sensor de ferro i oxigen) interacciona amb IRP1 i IRP2 i juntament amb SKP1-CUL1 E3 provoca l'ubiquitinització i la degradació de les IRP al proteasoma. L'IRP1 es regula, sobretot, per una altra via, on la unió d'un centre ferro-sofre li dona una conformació diferent que li permet tenir activitat aconitasa. Les IRP també modulen l'mRNA de l'ALAS2 (un enzim específic eritroide de síntesi d'hemo), l'aconitasa mitocondrial (ACO2) i l'HIF2 α (factor que s'indueix amb la hipòxia). Els mRNA que tenen un únic IRE a la regió 3'UTR són el DMT1 i el CDC14A, però el seu rol i mecanisme d'acció no es coneix del tot (Hentze et al., 2010).

Les IRP1/2 són dues proteïnes homòlogues a l'aconitasa mitocondrial i a altres isomerases d'ISC que contenen elles mateixes un centre ferrosulfurat. En cèl·lules amb ferro suficient, l'IRP1 conté un ISC i funciona com a aconitasa citosòlica, catalitzant la conversió de citrat a isocitrat passant per cis-aconitat). L'ISC manté l'IRP1 en una conformació tancada que bloqueja l'accés als IRE. El dèficit de ferro fa que l'IRP1 no uneixi cap ISC i provoca un canvi estructural que li permet la unió als IRE. Així, actua com una proteïna bifuncional regulada per l'intercanvi d'un ISC. Tot i l'homologia amb l'IRP2, aquesta última no uneix

cap ISC i es regula per un mecanisme diferent. L'IRP2 es manté estable en cèl·lules amb dèficit de ferro o en hipòxia mentre que en resposta al ferro o oxigen, s'ubiquitina i es degrada al proteasoma. Aquest mecanisme funciona gràcies a la lligasa d'ubiquitina (Ub) E3 FBXL5 que conté un domini sensible al ferro i a l'oxigen. Aquest domini conté un pont Fe-O-Fe que es perd si hi ha falta de ferro o oxigen. Si aquest pont falta, es desestabilitza l'FBXL5 i l'IRP2 no uneix Ub i no es degrada. Es creu que aquest mecanisme podria funcionar també per l'IRP1 quan hi ha dèficit d'ISC.

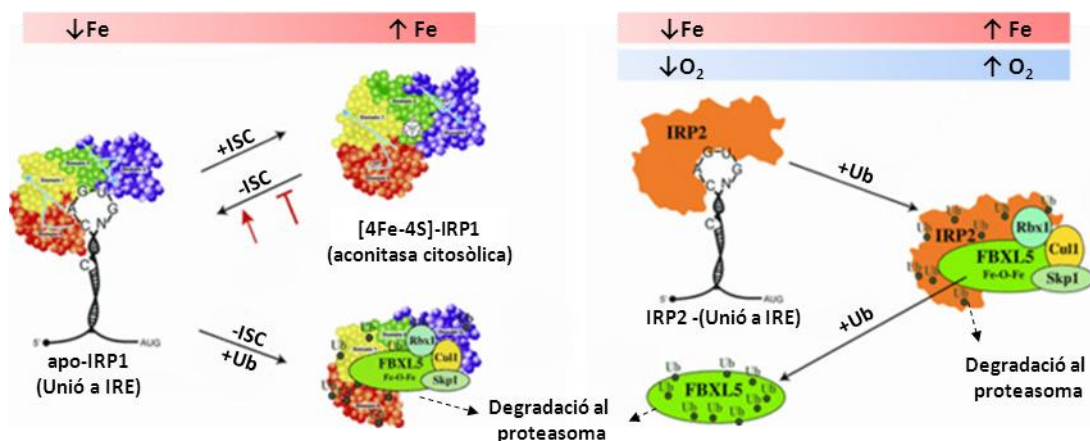


Figura 31. Regulació de les proteïnes IRP1 i IRP2. Esquerra: en condicions fisiològiques, la deficiència de ferro provoca la pèrdua de l'ISC i es dona un canvi de conformació que fa que l'aconitasa citosòlica es converteixi en una proteïna d'unió als IRE. L'ISC es regenera quan les cèl·lules tenen ferro suficient. La hipòxia afavoreix el manteniment de l'ISC, mentre que el peròxid d'hidrogen o l'NO en promouen la pèrdua. Quan la biosíntesi d'ISC no és operativa, el ferro porta a la ubiquitinització de l'IRP1 (apo) per part del complex FBXL5 E3 lligasa (format per SKP1, CUL1 i RBX1) fent que es degradi al proteasoma. Dreta: l'IRP2 és estable a concentracions baixes de ferro i d'oxigen perquè l'FBXL5 l'està ubiquitinitzat i aquesta es degrada al proteasoma. Un augment de ferro i/o d'oxigen estabilitzen l'FBXL5 formant un centre Fe-O-Fe al domini hemoeritrina que fan que s'hi uneixi el complex ubiquitina-ligasa E3 amb SKP1, CUL1 i RBX1. Aquest complex uneix ubiquitines a l'IRP2 fent que sigui reconeguda i degradada pel proteasoma (Wang & Pantopoulos, 2011).

La regulació redox del metabolisme del ferro també s'associa a les proteïnes IRP. L'IRP1 pot perdre l'ISC degut a concentracions micromolars de peròxid d'hidrogen. S'ha observat in vitro que el peròxid d'hidrogen provoca la pèrdua d'un ió de ferro, fent que l'ISC deixi de ser funcional. També l'òxid nítric (NO) regula l'IRP1, possiblement també descomponent l'ISC. També pot provocar la sortida de ferro de les cèl·lules, suggerint que actua com a resposta a la manca de ferro. L'NO i l'estrès oxidatiu també regulen l'IRP2,

estabilitzant-la, i el tractament amb antioxidants com l'ascorbat, l' α -tocoferol o l'*N*-acetilcisteïna promouen la degradació al proteasoma d'IRP2.

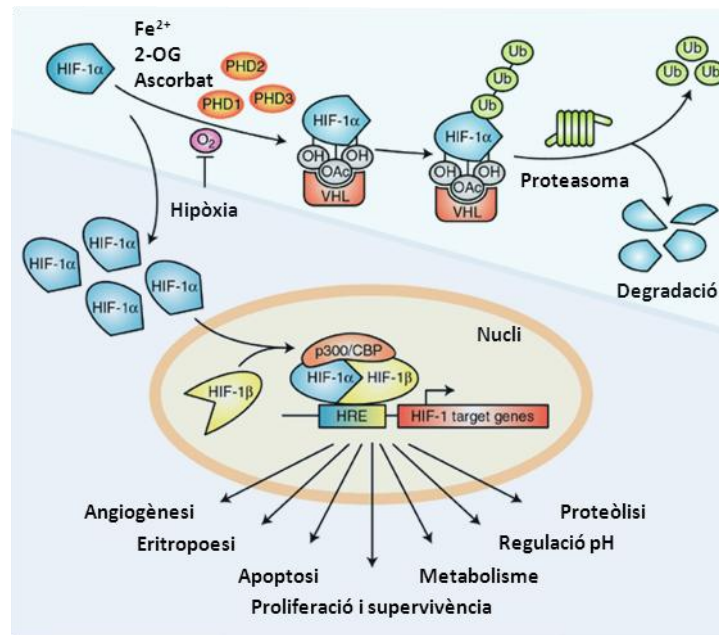


Figura 32. Regulació de HIF1. En situacions de normòxia (dalt), les prolinas-hidroxilases (PHD1,2,3) hidroxilen el factor HIF1 α en presència d'oxigen, 2-oxoglutarat (2-OG) i ascorbat. L'HIF1 α hidroxilat és reconegut per les proteïnes VHL (de von Hippel-Lindau), que juntament amb un complex ubiquitina-ligasa, uneix ubiquitines a l'HIF1 α , cosa que en permet el reconeixement i la degradació al proteasoma. L'acetilació d'HIF1 α (OAc) també permet la unió de les VHL. En situacions d'hipòxia o amb quelants de ferro (baix), l'hidroxilació de les prolines està inhibida (perquè les VHL necessiten ferro i oxigen per ser actives). Així, les VHL no s'uneixen a HIF1 α , aquest no es degrada i s'acumula. HIF1 α trasloca al nucli on dimeritza amb HIF1 β (expressat constitutivament) i s'uneixen als elements de resposta a la hipòxia (HRE) dels promotors dels gens. Allí recluten diferents coactivadors transcripcionals com el p300/CBP (de *CREB-binding protein*). Diferents funcions cel·lulars es regulen per HIF1 (Carroll & Ashcroft, 2005).

Les ROS, a més, també poden oxidar una cisteïna de l'IRP2 i formar un pont disulfur que n'inhibeix la unió als IRE disminuint així la quantitat de TFR1 (Wang & Pantopoulos, 2011). L'estrès oxidatiu indueix l'IRP1 inhibint transientment la síntesi de ferritina, augmentant els nivells de TFR1, i augmentant el contingut de ferro de la ferritina (tot i la disminució dels nivells de proteïna). Ara bé, l'estrès oxidatiu pot regular el metabolisme de ferro de manera independent de les IRP, ja que concentracions no tòxiques d'H₂O₂ mantingudes (superiors a 5 μ M) estimulen la traducció del TFR1. A dosis més altes, el peròxid d'oxigen també promou la degradació de la ferritina. Aquesta via podria estar mediada per les subunitats HIF-1 α , que s'estabilitzen amb les ROS perquè oxiden el Fe²⁺ a Fe³⁺, disminuint

el cofactor de les prolil-hidroxilases, les quals són les encarregades de degradar HIF-1 α en condicions de normòxia. Aquesta regulació és molt important a nivell metabòlic, tant pel ferro (perquè el HIF regula transcripcionalment DMT1, DCYTB, TF, TFR1, ceruloplasmina, HO-1 i l'ALAS-2) com per la interacció amb altres rutes metabòliques regulades per HIF (Wang & Pantopoulos, 2011).

4.5. Malalties associades al metabolisme mitocondrial del ferro

Els nivells de ferro al mitocondri s'han de controlar especialment perquè poden provocar ROS i perquè també en depèn la regulació citosòlica. De fet, les desregulacions del metabolisme mitocondrial del ferro tenen conseqüències patològiques. Entre aquestes trobem l'atàxia de Friedreich, que s'ha explicat en detall al primer capítol de la introducció. Altres malalties es descriuen breument a continuació (Richardson et al., 2010; Sheftel & Lill, 2009; Stehling & Lill, 2013).

Les anèmies siderobàstiques també estan causades per mutacions en gens del metabolisme del ferro. Aquesta malaltia es caracteritza perquè els eritroblasts presenten un anell sideroblàstic (una organització en forma d'anell de grànuls de ferro als mitocondris envoltant el nucli). Es creu que almenys una part del ferro pot ser dins la ferritina mitocondrial. La mutació del gen *ALAS2*, per exemple, provoca l'anèmia sideroblàstica lligada al cromosoma X (XLSA), que és una anèmia microcítica hipocròmica. L'anèmia sideroblàstica també pot ser un símptoma, entre d'altres, d'algunes malalties causades per diferents defectes hereditaris; l'XLSA amb atàxia (XLSA/A), el dèficit de glutaredoxina 5 (*GRX5*), l'anèmia megaloblàstica que respon a tiamina (TRMA), la miopatia mitocondrial amb acidosi làctica i anèmia sideroblàstica (MLASA) i altres malalties hereditàries que no s'han descrit encara. L'XLSA/A està causada, entre altres defectes, per mutacions al transportador ABCB7. El dèficit de GRX5 provoca una anèmia microcítica amb acumulació de ferro i anells de sideroblasts. Mutacions en el transportador de glicina *SLC25A38* també provoquen una forma rara d'anèmia sideroblàstica, perquè es bloqueja la síntesi del grup hemo.

El dèficit dels transportadors mitocondrials de ferro MRS3/4 o de la mitoferrina provoquen una variant de la protoporfíria eritropoiètica. El dèficit d'ISCU provoca una

miopatia amb intolerància a l'exercici, on els pacients presenten dèficit en la fosforilació oxidativa al múscul, acidosi làctica, menor activitat de la succinat deshidrogenasa i l'aconitasa, una disminució general de les proteïnes amb ISC i dipòsits de ferro al múscul esquelètic.

Cal dir que les malalties neurodegeneratives acumulen sovint ferro, però no se sap quina és la seva contribució a la patologia. Entre aquestes es troben nou malalties, anomenades en conjunt NBIA (*neurodegeneration with brain iron accumulation*), i sovint es troben associades a distonia i problemes en la marxa. Només dues d'aquestes malalties estan relacionades directament amb el ferro, com és l'aceruloplasminèmia i la neuroferritinopatia. La resta són la neurodegeneració associada a la pantotenat-quinasa (PKAN), la neurodegeneració associada a PLA2G6 (PLAN), la neurodegeneració associada a la membrana mitocondrial (MPAN), la neurodegeneració associada a la hidroxilasa d'AG (FAHN), la malaltia de Kufor-Rakeb, el síndrome de Woodhouse-Sakati i la neurodegeneració associada a la proteïna β -propeller (Rouault, 2013).

Finalment, el ferro també pot contribuir a la progressió d'altres patologies com les malalties cardiovasculars, el càncer o diversos processos infecciosos. Les raons podrien incloure mecanismes com l'estrès oxidatiu o la capacitat de promoure la proliferació cel·lular (Lapice, Masulli, & Vaccaro, 2013; Prentice, 2008).

5. L'ESTRÈS OXIDATIU

Les ROS són moduladors crucials de les funcions cel·lulars. A concentracions baixes, les ROS participen en la senyalització cel·lular, mentre que un excés de ROS pot desestabilitzar la funció cel·lular normal i promoure dany als lípids, àcids nucleics i proteïnes (Forman, Maiorino, & Ursini, 2010; Paulsen & Carroll, 2010; Winterbourn & Hampton, 2008). És per això que l'equilibri entre la producció i l'eliminació de les ROS permet el funcionament cel·lular normal. Si l'equilibri no es manté, es dona el que s'anomena estrès oxidatiu i pot tenir conseqüències patològiques.

5.1. Espècies reactives de l'oxigen i el nitrogen

Les espècies reactives de l'oxigen són una família de molècules que es generen, es transformen i es consumenixen contínuament en tots els organismes com a conseqüència de la vida aeròbica. El terme ROS agrupa diferents radicals primaris: el superòxid ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxil (OH^{\cdot}) i el radical de l'anió diòxid de carboni ($CO_2^{\cdot-}$); diferents espècies no radicals: el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), l'àcid hipoclorós ($HOCl$), el monòxid de carboni (CO), l'oxigen singlet (1O_2) i l'ozó (O_3); i també els radicals lliures produïts en reaccions secundàries d'aquestes ROS amb proteïnes, lípids i àcids nucleics. A més, les proteïnes poden ser modificades amb aldehids i cetones produïts per l'oxidació de lípids i proteïnes glicades mediada per ROS (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991; Monnier, 1990; Uchida & Stadtman, 1993). L' $O_2^{\cdot-}$ es forma de la reducció de l' O_2 per un electró. La dismutació de dues molècules d' O_2 , juntament amb la reducció per dos electrons, porta a la formació de l' H_2O_2 . L' OH^{\cdot} és el més reactiu i es pot formar a partir de la fissió homolítica de l'aigua o per la reacció de Fenton, catalitzada per metalls. L' $O_2^{\cdot-}$ també pot participar en la formació de l' OH^{\cdot} per una dismutació de l' H_2O_2 i per la reducció del Fe^{3+} a Fe^{2+} , el que es coneix com a reacció de Haber-Weiss.

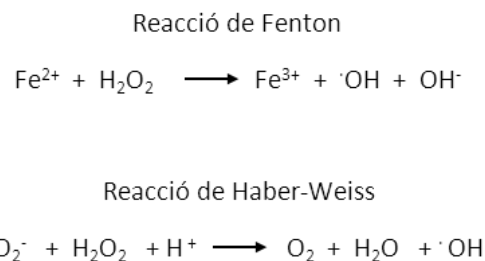


Figura 33. Reaccions de Fenton i Haber-Weiss. Reacció de Fenton i reacció de Haber-Weiss en les quals es produeix el radical hidroxil.

Les espècies reactives del nitrogen (RNS) també són capaces de provocar dany a les estructures cel·lulars. El terme RNS fa referència als radicals primaris del nitrogen: al radical de l'òxid nítric (NO^{\cdot}), al peroxinitrit ($ONOO^{\cdot}$), a l'adducte peroxinitrit- CO_2 ($ONOCO_2^{\cdot-}$); i a altres espècies no radicals: el triòxid de dinitrogen (N_2O_3) i el diòxid de nitrogen (NO_2). En general per formar RNS calen radicals que reaccionin amb l'òxid nítric, però també es pot formar diòxid de nitrogen en ambients hidrofòbics reaccionant amb l'oxigen molecular, ja que ambdues espècies es concentren en aquests ambients (Denicola et al.,

2002; Liu, Miller, Joshi, Thomas, & Lancaster, 1998). Les RNS es generen com a subproducte de la respiració aeròbica i en resposta a estrès, i com les ROS, també tenen funcions de senyalització a nivells baixos, mentre que nivells alts provoquen dany a les diferents molècules. Per exemple, l'NO pot modular les cascades de senyalització o la resposta immune, però també es veu implicat en el dany tissular i la progressió de diferents malalties inflamatòries (Ischiropoulos, 1998; Moncada, Palmer, & Higgs, 1991; Wink & Mitchell, 1998).

Un fet important de les ROS i les RNS és que es generen en punts concrets de la cèl·lula i els microambients dicten quines dianes tenen. Com que la formació de RNS requereix la presència d'oxidants com el radical superòxid, el peròxid d'hidrogen i els metalls de transició, les ROS i les RNS comparteixen aquesta compartimentació. Els fagosomes, de les cèl·lules immunes per combatir els patògens, i els peroxisomes, on es donen reaccions oxidatives catabòliques del metabolisme energètic, són orgànuls on es produeixen moltes ROS. També ho són els mitocondris i el reticle endoplasmàtic. Com que tant les RNS com les ROS depenen de l'oxigen es farà servir el terme ROS en un sentit general.

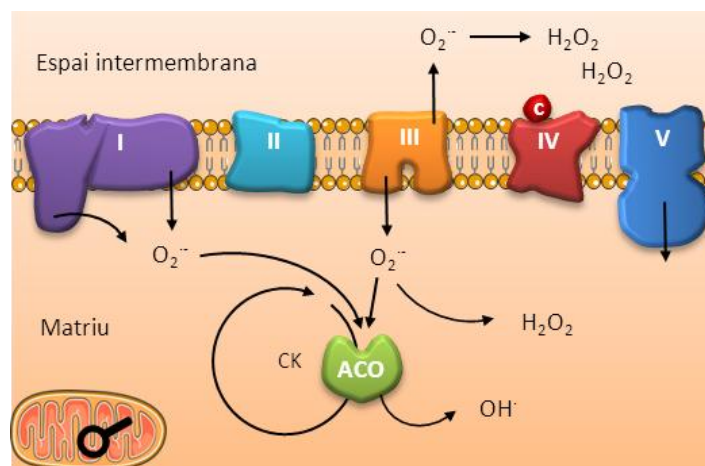


Figura 34. Representació esquemàtica dels punts de generació de superòxid als mitocondris. Els llocs principals de generació de l'anió superòxid són els complexos I i III. L'H₂O₂ derivat del radical superòxid que es genera a la matriu mitocondrial i a l'espai intermembrana pot difondre al citosol i provocar respostes fisiològiques. El superòxid generat a la matriu pot alterar els centres ferrosofre de les proteïnes com l'aconitasa (ACO).

Els mitocondris es consideren com un dels llocs on es generen més ROS. Aquests contenen la cadena de transport electrònic, que transfereix electrons des del NADH, el FADH₂ i el succinat fins a l'oxigen, que es redueix donant H₂O i permet la síntesi d'ATP. O

bé per accident o bé de manera deliberada, el flux d'electrons a través de l'ETC és un procés imperfecte, i algunes molècules d'oxigen es redueixen en un o dos electrons formant ROS, sobretot H_2O_2 i $\text{O}_2^{\cdot-}$. Els llocs principals on es dona la reducció parcial de l'oxigen són el complex I, on s'autooxida la semiquinona flavina, i el complex III, on es produeix una ubisemiquinona (Cadenas, Boveris, Ragan, & Stoppani, 1977; Loschen, Azzi, & Flohé, 1973; Sun & Trumpower, 2003; Turrens & Boveris, 1980).

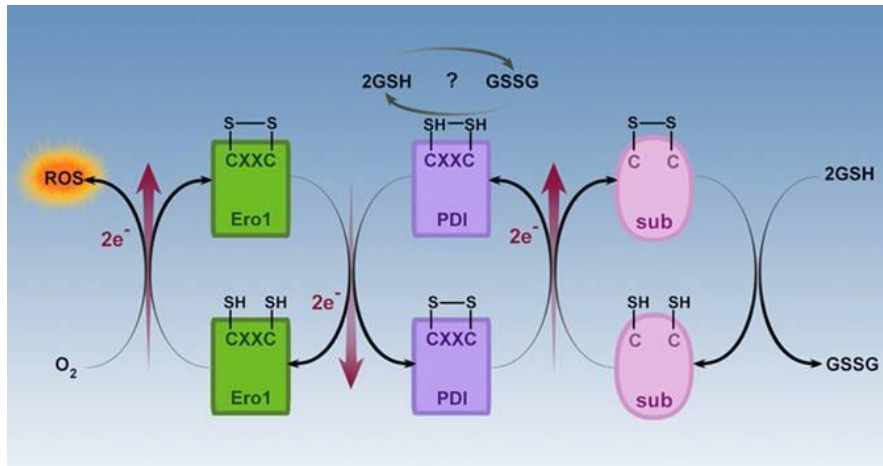


Figura 35. Producció de ROS al reticle endoplasmàtic. La formació de ponts disulfur a les proteïnes al reticle endoplasmàtic (ER) està regulada pels enzims PDI i ERO1. L'ERO1 opera associada amb FAD. La PDI accepta els electrons de l'oxidació dels grups tiol (SH) dels residus de cisteïnes de les proteïnes que es pleguen formant, així, ponts disulfur. L'ERO1 usa un FAD (sintetitzat al citosol però que entra ràpidament al lumen de l'ER) per transferir els electrons de la PDI a l'oxigen molecular (O_2), cosa que resulta en la producció de ROS en forma de peròxid d'hidrogen (H_2O_2). El glutatió reduït (GSH) pot ajudar a reduir els ponts disulfur formats quan hi ha una acumulació de proteïnes per plegar o una acumulació de proteïnes mal plegades, cosa que provoca l'acumulació de glutatió oxidat (GSSG). La PDI pot també reduir els ponts disulfur formats que no són nadius, funcionant com a isomerasa. Com que l'activitat ERO1 està modulada per la quantitat de FAD, la formació de ponts disulfur està lligada a l'estat nutricional i/o metabòlic de la cèl·lula (Pandol, Gorelick, & Lugea, 2011; Zhang & Kaufman, 2008).

Al reticle endoplasmàtic, la font primària de ROS resulta de la formació dels ponts disulfur pel plegament de proteïnes al lúmen. La formació de ponts disulfur depèn de les proteïnes ERO1 (*endoplasmàtic reticulum oxidoreductin 1*) i PDI (*protein disulfide isomerase*). En estat oxidat, la PDI (amb un domini semblant a la tioredoxina) introdueix ponts disulfur a altres proteïnes per intercanvi de tiols-disulfur. No se sap del cert quin paper juga el glutatió en la formació d'aquests ponts disulfur però es creu que podria jugar un paper en la formació dels ponts no nadius. L'ERO1 (que conté un FAD) usa oxigen com a acceptor per reoxidar la PDI, provocant un flux de ROS. El fet que el FAD i el GSH participin en la formació de ponts disulfur i el plegament de proteïnes suposa que el

procés està associat a l'estat nutricional i/o metabòlic de la cèl·lula (Chakravarthi, Jessop, & Bulleid, 2006; Zhang & Kaufman, 2008). També es generen ROS a l'ER per la NADPH oxidasa 4 (NOX4), que també s'associa a les xaperones involucrades en el plegament proteic. La producció de ROS per part de la NOX4 pot afectar la traducció proteica, l'autofàgia o l'alliberament de calci del RE (Laurindo, Araujo, & Abrahão, 2014; Sciarretta et al., 2013; Sciarretta, Volpe, & Sadoshima, 2014).

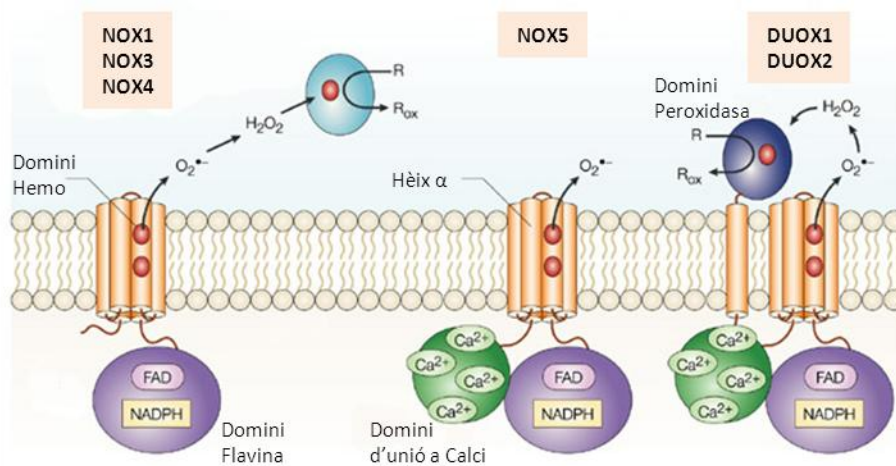


Figura 36. Estructura dels enzims NOX i DUOSX. La NADPH oxidasa 1 (NOX1), la NOX3 i la NOX4 són semblants tant en mida com en estructura. Contenen un domini transmembrana amb histidines que uneixen dos grups hemo. La regió carboxi-terminal es plega formant un domini citosòlic que conté llocs d'unió pels coenzims FAD i NADPH. Les NOX catalitzen la reducció dependent de NADPH de l'oxigen a superòxid, que a la vegada pot reaccionar amb si mateix per formar peròxid d'hidrogen. La NOX5 a més dels dos dominis esmentats, conté un domini amino-terminal extra que uneix calci. Les DUOX (oxidases duals) tenen una estructura similar però amb una hèlix α transmembrana addicional a l'N terminal seguida d'un domini peroxidasa. Aquest domini peroxidasa està localitzat fora de la membrana, així que podria estar oxidant substrats extracel·lulars (R) (Lambeth, 2004).

A nivell de la membrana cel·lular es troben altres NADPH oxidases (NOX) i les oxidases duals (DUOX), que poden formar tant $O_2^{\cdot -}$ com H_2O_2 . Les Nox es coneixen de fa temps per la seva importància en la fagocitosi i la destrucció de patògens durant la resposta immune. Ara bé, la descoberta de diferents NOX i DUOX presents a quasi tots els tipus cel·lulars suggereix que tenen un rol més general. Els receptors tirosina-quinasa, i molts altres lligands-receptors, poden activar les NOX i la producció de ROS a la membrana plasmàtica. A nivell cardiovascular, són una de les fonts més importants de ROS i juguen un paper clau en el dany i la remodelació cardíaca (Maejima, Kuroda, Matsushima, Ago, & Sadoshima, 2011; Matsushima, Tsutsui, & Sadoshima, 2014). Les més importants són la

NOX2 i la NOX4. Aquesta última es troba a diferents localitzacions subcel·lulars com el nucli, el reticle endoplasmàtic i els mitocondris. L'activitat de les NOX també es regula per FAD i NADPH (Burgoyne, Mongue-Din, Eaton, & Shah, 2012; Gupte et al., 2006).

Les sintases d'òxid nítric (NOS) també són una font important d'espècies radicals. Els cardiomiòcits expressen la isoforma neuronal (nNOS) i l'endotelial (eNOS) de manera constitutiva, mentre que la induïble (iNOS) s'expressa en situacions patològiques. Els enzims NOS canvien la producció de NO a $O_2^{\cdot-}$ quan s'esgota el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) o per la S-glutatiolació de l'eNOS. Aquestes situacions es donen quan hi ha estrès oxidatiu i la producció de ROS per part de les NOS actua com un mecanisme amplificador (Chen et al., 2010; Pacher, Beckman, & Liaudet, 2007).

5.2. Dianes de les ROS i dany oxidatiu

Un cop les ROS específiques són generades en un lloc i moment determinat, poden mediar una sèrie de reaccions reversibles o irreversibles provocant modificacions a les molècules. La reactivitat química de les ROS vé dictada per si prefereixen l'oxidació d'un o dos electrons. A més, com que la majoria dels oxidants reactius tenen vides mitjanes molt curtes, l'oxidació de molècules concretes també es regula per la proximitat d'aquestes molècules al lloc de generació de les ROS.

Les proteïnes són una de les dianes dels radicals lliures i poden patir diferents modificacions: l'oxidació de grups aromàtics i cadenes laterals d'aminoàcids alifàtics, la nitració d'aminoàcids aromàtics, la nitrosilació de grups tiol, la sulfoxidació de la metionina, la clorinació de grups aromàtics i grups amino primaris, la conversió d'alguns aminoàcids a derivats carbonil, la fragmentació de la cadena polipeptídica i la formació d'agregats de proteïnes amb enllaços creuats. Un altre tipus de modificació de proteïnes és la que es dona entre els sucres reductors i els grups amino (presents en proteïnes, fosfolípids i DNA) i que produeix les bases de Schiff i els productes de Maillard o d'Amadori (Dalle-Donne, Scaloni, & Butterfield, 2006).

Els àcids grassos poliinsaturats (PUFA) de les membranes són els lípids més susceptibles a ser oxidats perquè les insaturacions augmenten la susceptibilitat d'una molècula a ser

oxidada i perquè l'oxigen i les ROS són més solubles a la bicapa lipídica hidrofòbica que en un entorn aquós. L'oxidació dels lípids pot ser mediada per ROS o per enzims. L'oxidació per ROS té tres etapes, iniciació, propagació i terminació. La propagació és el que es coneix com la peroxidació lipídica i es va prolongant pel pas d'un electró desaparellat d'una molècula a una altra. La reacció acaba quan es consumeix una de les molècules reactives (l'àcid gras o l'oxigen), quan es forma un radical poc reactiu o quan dos radicals reaccionen i formen un parell no radical. Els hidroperòxids també poden progressar fins a fragmentar els PUFA i generar compostos intermediaris com alcanals, alquenals, hidroxialquenals, glioxal, malonaldehid (MDA) i hidroxinonenal (HNE). Aquests compostos amb grups carbonil lliures poden tenir una vida mitjana més llarga i, com que no tenen càrrega, poden migrar a través de la membrana o de medis hidrofílics a gran distància. Això els fa susceptibles de reaccionar i modificar les proteïnes i el DNA. La lisina és un dels aminoàcids que es modifica d'aquesta manera. Els fosfolípids, molt abundants, són sensibles a l'oxidació pel fet de contenir PUFA. El colesterol també és força susceptible a ser oxidat i formar oxisterols (Niki, Yoshida, Saito, & Noguchi, 2005; Pryor et al., 2006). A nivell enzimàtic, els principals oxidants d'àcids grassos són les lipooxigenases, les ciclooxigenases i la citocrom c oxidasa (Schneider, Pratt, Porter, & Brash, 2007). A part del seu paper a l'hora de generar dany, els lípids oxidats també són clau en la senyalització cel·lular (Ceaser et al., 2004; Zmijewski et al., 2005)

El dany de l'estrès oxidatiu pot afectar també els àcids nucleics, cosa que pot ser molt perjudicial pel fet de provocar mutacions o alteracions irreversibles de la informació gènica. L'oxidació del DNA es pot donar a les bases dels àcids nucleics, als residus de desoxiribosa o a l'esquelet fosfodièster. El radical hidroxil és un dels oxidants més freqüents del DNA, però també l'òxid nítric i l'hipoclorit (Muftuoglu, Mori, & Souza-Pinto, 2014).

5.3. Senyalització i processos fisiològics mediat per les ROS al cor

La senyalització redox es pot definir com una modificació d'oxidació/reducció específica, normalment reversible, a components de les vies de senyalització cel·lulars exercida per les ROS. Aquesta senyalització pot participar en molts processos fisiològics i patològics. Les ROS més importants involucrades en la senyalització redox són l'anió superòxid i el

peròxid d'hidrogen. Com a RNS les que destaquen són l'òxid nítric i el peroxinitrit. Els sensors proteics que responen a alteracions en l'estat redox local poden canviar la conformació, l'estabilitat, les interaccions moleculars i/o l'activat i serveixen com a transductors de senyals. Les modificacions més freqüents són l'oxidació, l'hidroxilació o la nitració d'aminoàcids. La selectivitat ve donada per la pròpia molècula i per la localització subcel·lular. Per exemple, els tiols de les cisteïnes sensibles a oxidació solen tenir un pKa baix, pel que a pH fisiològic existeixen com a anions tiolats i n'augmenta la reactivitat amb oxidants com l' H_2O_2 . A nivell de localització, la proteïna sensora i la font de ROS han de compartir el mateix entorn (Burgoyne et al., 2012).

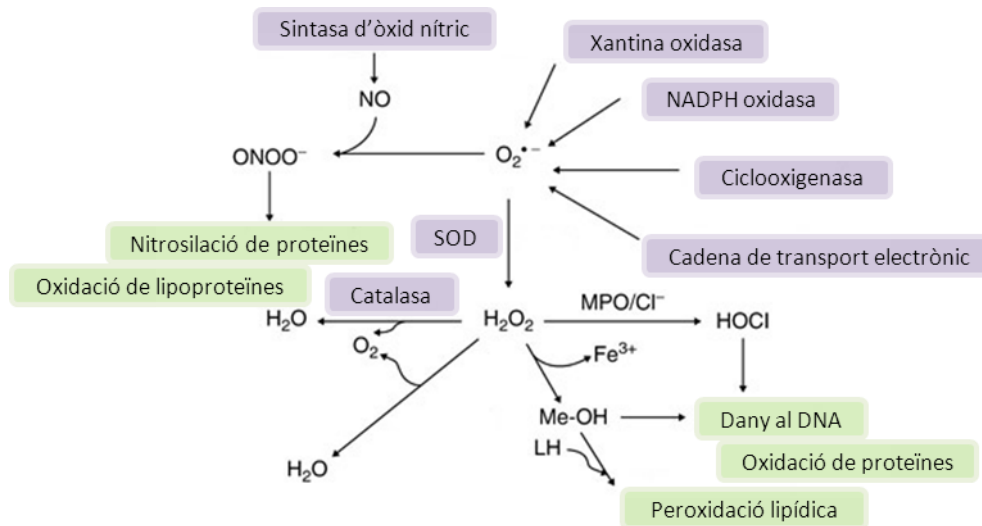


Figura 37. Diances de les diferents ROS. Les espècies reactives de l'oxigen i el nitrogen provenen de diferents enzims i vies cel·lulars (violeta) i poden reaccionar amb diferents molècules (verd).

Entre les diances de ROS que s'han descrit en diferents tipus cel·lulars trobem les fosfatases PTP1B (de *protein-tyrosine phosphatase 1B*) i PTEN (de *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*); proteïnes G petites (Ras de *rat sarcolemma*); i els factors de transcripció AP1 (de *activator protein 1*), NF- κ B (de *nuclear factor- κ B*) i HIF1. També són importants a nivell cardíac les quinases CaMKII (de *Ca/Calmodulin-dependent kinase II*), PKA (de *cAMP-dependent protein kinase A*), PKG (de *cGMP-dependent protein kinase G*) i PKC (de *protein kinase C*); el transportadors i receptors de ions Ryr (de *ryanodine receptor*), SERCA (de *sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*), Na^+ - K^+ ATPasa, LTCC (de *L-type Ca^{2+} channels*), Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmàtica, intercanviador de

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, canals de K^+ i de Na^+ ; les desacetilases d'histones HDAC4 i SIRT1; la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) i la mateixa tioredoxina.

A nivell fisiològic la senyalització redox media la diferenciació, la proliferació, l'acoblament entre l'excitació i la contracció, i el flux sanguini. A nivell patològic pot provocar una regulació anormal del calci, disfunció contràctil i arítmies. També pot conduir a la mort cel·lular, la hipertròfia cardíaca i participar en la remodelació de la matriu extracel·lular i la fibrosi. A nivell de cardioprotecció (com a preconditionament enfront de la isquèmia) també juguen un paper important (Burgoyne et al., 2012; Santos, Anilkumar, Zhang, Brewer, & Shah, 2011).

5.4. Sistemes antioxidants

Les defenses antioxidants es poden sintetitzar in vivo o obtenir de la dieta. Aquestes inclouen enzims que poden eliminar els ROS (superòxid dismutases, superòxid reductases, catalases i peroxidases), enzims que disminueixen la formació de ROS (proteïnes desacobllants mitocondrials, transferrines, albúmina, haptoglobina, hemopexina, hemo-oxigenases, metaolotioneïnes i poliamines), proteïnes que protegeixen les molècules del dany oxidatiu (xaperones), i molècules que extingeixen els ROS i són oxidades de manera preferent per preservar molècules més importants (carotenoids, glutatió, α -tocoferol, bilirubina, ascorbat, urats, albúmina i plasmalògens). També es podrien classificar com a antioxidants els sistemes de reparació del DNA i dels centres Fe-S o els que degraden els lípids i les proteïnes.

La superòxid dismutasa que conté coure i zinc (CuZn SOD o SOD1) va ser aïllada el 1938 per Mann i Keilin els quals la van anomenar hemocupreïna pel seu color blau/verd. Fins el 1970 McCord i Fridovich no van descriure que podia catalitzar l'eliminació de l'anió superòxid. La SOD1 és un enzim molt resistent; es pot aïllar amb etanol i cloroform, precipitar amb acetona i és molt resistent a la calor i a la desnaturalització. L'enzim s'ha detectat al citosol, els lisosomes, els peroxisomes, el nucli i l'espai intermembranós mitocondrial. Un altre tipus de SOD amb Cu i Zn s'ha detectat a l'espai extracel·lular, i s'anomena SOD3. La SOD1 és dimèrica i té la funció d'accelerar la dismutació de O_2^- gràcies al zinc (que estabilitza) i al coure (que catalitza) del centre actiu. La His61Bt/63Hs

podria donar els protons. La superfície té càrrega negativa i repel l'O^{•-}, excepte per uns "camins o vies" positius que porten al centre actiu. Una altra SOD es va aïllar primer de bacteri va resultar ser de color rosa i més sensible a la purificació. Era la SOD2 o la MnSOD, que sol ser més sensible i conté Mn al centre actiu. Aquesta sol ser tetramèrica en mamífers i es troba als mitocondris. La seqüència d'aminoàcids no està relacionada amb la CuZnSOD (Fridovich, 1995). El ratolí KO de SOD2 viu només deu dies i presenta anormalitats cardíaques, acumulació de greix al fetge i el múscul esquelètic i acidosi metabòlica (Hinerfeld et al., 2004). Amb interferència d'RNA s'ha vist que les mosques amb la MnSOD silenciada tenen menys activitat aconitasa i succinat-deshidrogenasa (Kirby, Hu, Hilliker, & Phillips, 2002). Es creu que el Mn per si sol podria reemplaçar la SOD actuant com a quelant d'O^{•-} (Al-Maghrebi, Fridovich, & Benov, 2002; Lapinskas, Cunningham, Liu, Fink, & Culotta, 1995).

La catalasa descomposa l'H₂O₂ en H₂O i O₂ i està present a tots els òrgans. És molt abundant al fetge i als eritròcits i menys abundant al cor i al cervell. La catalasa consta de quatre subunitats, cada una amb un Fe (III)-hemo al centre actiu que queda a l'interior i es connecta per canals estrets que permeten només el pas d'H₂O₂. Cada subunitat conté també un NADPH. La major part de catalasa es troba als peroxisomes (excepte als eritròcits). Els mitocondris de cor de rata contenen catalasa a la matriu (Antunes, Han, & Cadenas, 2002; Lardinois, 1995; Reid et al., 1981).

Les glutatió peroxidases (GPX) neutralitzen l'H₂O₂ acoblant la seva reducció a H₂O amb l'oxidació del glutatió reduït (GSH). A més del peròxid d'hidrogen, poden reduir a alcohol altres peròxids, com els hidroperòxids d'AG. Hi ha com a mínim quatre tipus de GPX. La GPX1 és citosòlica i també s'anomena "clàssica". El plasma conté, sobretot GPX3, que també es troba en altres fluids extracel·lulars però no se sap si hi té activitat perquè la concentració del GSH en plasma és baixa. La GPX2 es troba al tracte gastrointestinal. La GPX4 (o fosfolípid hidroperòxid glutatió peroxidasa) té l'habilitat de reduir els hidroperòxids d'AG i el colesterol esterificat però la seva activitat és baixa a la majoria de teixits. Les GPX1, 2 i 3 estan formades per quatre subunitats que contenen cada una un àtom de seleni (Se) al centre actiu. La GPX4 actua com a monòmer i conté només un àtom de seleni. El seleni pertany al grup VI de la taula periòdica i s'assembla molt al sofre en la

seva química. Al centre actiu s'hi troba en forma de selenocisteïna, una cisteïna on el sofre s'ha reemplaçat per un seleni (R-SeH).

Traces de seleni són essencials a la dieta per proveir selenocisteïnes a la família de les GPX. Si es depriven els rosegadors de seleni, l'activitat de la GPX1 disminueix molt ràpid mentre que la GPX2 i 4 es mantenen, potser perquè tenen un paper més important in vivo. A més, el seleni deu jugar un paper clau al cervell, perquè és l'últim òrgan on s'esgota si els animals es depriven de seleni (Brigelius-Flohé, 1999). Altres proteïnes essencials que contenen seleni són enzims de la síntesi de l'hormona tiroïdal, la selenoproteïna P (que es troba al plasma transportant seleni als teixits i podria actuar com a antioxidant), la selenoproteïna W (que és intracel·lular i també podria tenir propietats antioxidants), la tioredoxina-reductasa i la metionina sulfòxid-reductasa (Burk & Hill, 2005; Jeong, Kim, Chung, Lee, & Kim, 2002). El dèficit de seleni sol ser similar al dèficit d' α -tocoferol i afecta el cor, el múscul i la fertilitat. De fet, normalment es pot contrarestar amb suplementes de l' α -tocoferol (Brigelius-Flohé & Traber, 1999; Tramer, Rocco, Micali, Sandri, & Panfili, 1998).

Les ràtios de glutatió reduït i oxidat es mantenen gràcies a les glutatió-reductases, que catalitzen la reacció gràcies al NADPH. Aquests enzims tenen dues subunitats, cada una amb un FAD al centre actiu (Berkholz, Faber, Savvides, & Karplus, 2008; Deponte, 2013). El NADPH s'obté per diferents vies, essent majoritària l'aportació de la via de les pentoses fosfat. El flux d'aquesta via es controla per l'aportació de NADP^+ , així, si disminueix la ràtio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ la via s'accelera. Una altra font (al citosol i, sobretot, als mitocondris) és la isocitrat-deshidrogenasa depenent de NADPH, enzim que a la vegada és diana de les ROS (Maeng et al., 2004).

A més d'actuar com a cofactor pels enzims GPX, el GSH està involucrat en molts altres processos metabòlics, com en el metabolisme de l'ascorbat, en mantenir la comunicació entre cèl·lules a través de les unions *gap*, i en evitar l'oxidació i l'entrecreuament dels grups tiol de les proteïnes. Com que la concentració de glutatió és alta, la parella GSH/GSSG contribueix de manera important a l'estat redox de la cèl·lula. Si s'assumeix que hi ha una concentració de 10 mM, amb l'1% d'aquest en estat oxidat, el potencial de

reducció és de -250 mV (major al reticle endoplasmàtic perquè hi ha més GSSG i diferent al mitocondri perquè té un pH més alt gràcies al gradient de protons). El glutatió també podria ser el donant de coure a la CuZnSOD. El GSH pot reaccionar amb molts radicals lliures i, com que es troba en concentració molt alta a la cèl·lula, és un dels principals “neutralitzador” de les ROS. A més, com que se sap que pot quelar Cu (i potser també Fe), disminueix la generació de ROS catalitzada per metalls. El GSH es sintetitza al citosol de totes les cèl·lules animals. Els mitocondris contenen entre un 10 i un 20% de glutatió, que es transporta a través de la membrana interna (Fernandez-Checa & Kaplowitz, 2005). La γ -glutamilcisteïna-sintetasa (γ -GCS) catalitza la primera i limitant reacció de la síntesi del glutatió. El dipèptid que es forma es converteix a GSH després gràcies a la glutatió-sintetasa. La γ -GCS s'inhibeix per GSH i no està saturada a concentracions normals de cisteïna, així, com més cisteïna, més síntesi de GSH hi ha. El glutatió reduït es troba en un estat constant de renovació, amb una vida mitjana d'uns 3 dies a la sang i de 3 hores al fetge. L'enzim γ -glutamiltranseptidasa (γ GGT) pot trencar el glutatió i transfereix el glutamat a un altre residu de cisteïna, metionina i glutamina extracel·lulars. El dipèptid cys-gly pot ser digerit per les dipeptidases.

Les glutatió-S-transferases (GST) acostumen a catalitzar la conjugació del glutatió amb els xenobiòtics per detoxificar-los. Sembla ser que moltes GST serveixen com a proteïnes transportadores d'hemo, bilirubina, pigments de la bilis i hormones tiroïdals i esteroïdals. Les GST citosòliques formen dímers de diferents subunitats codificades per diferents gens (com a mínim se n'han identificat set en mamífers). Les subclasses alfa, mu i pi són les més abundants i augmenten quan s'exposen els animals a xenobiòtics a través dels elements de resposta antioxidant (ARE). Algunes GST tenen activitat semblant a les GPX i poden catalitzar les reaccions amb peròxids orgànics i GSH formant GSSG i alcohols. Es creu que algunes GST podrien jugar un paper protector en la peroxidació lipídica i metabolitzar els productes finals tòxics com el 4-hidroxinonenal (Hayes, Flanagan, & Jowsey, 2005). La majoria del glutatió està lliure però també pot estar formant disulfurs mixtes amb altres compostos que continguin tiols com les cisteïnes, el coenzim A o residus amb tiols de proteïnes (entre elles la CuZnSOD). Si els tiols de proteïnes reaccionen amb el GSSG s'anomena S-glutatiolació proteica, la qual, a vegades, pot inactivar les proteïnes. Entre aquestes es troben la G3PDH, l'enolasa, l'isocitrat-

deshidrogenasa, la fosfofructoquinasa i l'adenilat-ciclasa. El complex I també pot ser glutatiolat provocant l'augment de producció d' O_2^- (Beer et al., 2004). L'acumulació de GSSG també pot inhibir la síntesi proteica. En cèl·lules exposades a estrès oxidatiu, els disulfurs mixtes de glutatió amb proteïnes i altres tiols s'acumulen tant a mitocondris com a citosol. Per una banda, el GSSG es podria mantenir baix pel fet de ser tòxic, però per l'altra es pot mirar com una modificació protectora, ja que en ser reversible, pot protegir els grups tiols de les proteïnes d'oxidacions més greus. Així, la cèl·lula podrà recuperar les proteïnes usant GSH quan l'equilibri redox es restauri. Les glutaredoxines (GRX) són les encarregades d'accelerar la "desglutatiolació". Aquestes es troben a mitocondris, nucli i citosol i poden reduir-se directament per GSH (Ghezzi, Bonetto, & Fratelli, 2005; Shelton, Chock, & Mielal, 2005).

Els enzims proteïna disulfur isomerasa (PDI) que s'han tractat anteriorment són xaperones que assisteixen a les proteïnes durant el plegament. Es troben a l'ER a concentracions prop de mM i catalitzen la formació de ponts disulfur nous o la reorganització dels ja existents. La ràtio GSH/GSSG és menor al ER per afavorir la formació de ponts disulfur (Gruber, Cemazar, Heras, Martin, & Craik, 2006).

Les tioredoxines (TRX) funcionen reduïnt la ribonucleòtid reductasa (l'enzim que catalitza la formació de deoxiribonucleòtids des de ribonucleòtids) i les metionina sulfòxid reductases (enzims que reparen el dany oxidatiu als residus de metionina de les proteïnes). Les TRX són polipèptids de baix pes molecular i n'hi ha de diferents, essent més estudiades la TRX1 (citosòlica) i la TRX2 (mitocondrial). Aquestes contenen dos grups -SH que formen un disulfur quan s'oxida i redueix la proteïna oxidada que li fa de substrat. Moltes proteïnes tenen dominis similars a les TRX, com per exemple les GPx, les GST i les PDI. In vivo, les TRX es redueixen gràcies a les tioredoxina-reductases (TRR), enzims que contenen seleni (com a selenocisteïna) i FAD, i usen NADPH per a reduir-se (Nordberg & Arnér, 2001; Rhee, Yang, Kang, Woo, & Chang, 2005).

Les peroxiredoxines (PRX) són una família de peroxidases que redueixen el peròxid d'hidrogen i altres peròxids orgànics. Són homodímers i no contenen grups prostètics, així que la reacció redox depèn de les cisteïnes dels centres actius. N'hi ha tres tipus, les

típiques amb 2-cys, les atípiques amb 2-cys i les d'1-cys. En tots els casos, el peròxid oxida un grup –SH de la peroxiredoxina i forma un àcid sulfènic que reacciona amb un altre grup –SH per formar un disulfur. En les PRX típiques el segon tiol és de la segona subunitat i en les atípiques de la mateixa subunitat. En les PRX d'1-cys no se sap qui és el reductant que regenera el grup –SH. Sembla que les PRX són més importants a l'hora d'eliminar els peròxids que la catalasa o la GPX1 i poden arribar a ser l'1% de la proteïna soluble total de les cèl·lules de mamífer. S'en coneixen fins a sis tipus, les PRX1, 2 i 6 són citosòliques, la PRX3 és mitocondrial, la PRX4 extracel·lular i d'ER, i la PRX5 és mitocondrial i peroxisomal (Rhee et al., 2005).

Altres compostos que contenen sofre també actuen d'antioxidants. En mamífers trobem l'ergotioneïna (d'origen vegetal i fúngic) que té una funció desconeguda però que in vitro pot quelar ferro i coure, a més de reaccionar amb diferents espècies radicals (Akanmu, Cecchini, Aruoma, & Halliwell, 1991).

Una altra estratègia de defensa antioxidant és “segrestar” els metalls de transició més reactius amb les espècies radicals, que són el coure i el ferro. Les proteïnes que participen en el control del ferro són la transferrina, la lactoferrina i les ferritines. Pel coure existeixen la ceruloplasmina, la transcupreïna, la mateixa albúmina i altres xaperones (Prohaska & Gybina, 2004; Walter et al., 2002). També les metal·lotioneïnes (MT) poden segrestar coure (també zinc i magnesi). Aquestes tenen un pes molecular molt baix i es troben al nucli i al citosol de les cèl·lules eucariotes. Existeixen tres isoformes, l'MT-I i l'MT-II, que són ubiques, i l'MT-III, que es troba al cervell i al ronyó. Aquestes tenen moltes cisteïnes que poden lligar els metalls amb enllaços tiolats (Conrad, Grabowski, Walter, Sabia, & Richardson, 2000; Tapia et al., 2004). Les hemooxigenases (HO) es troben a l'ER i catalitzen la descomposició del grup hemo en biliverdina, alliberant ferro i CO. La biliverdina es converteix a bilirubina gràcies a l'enzim-biliverdina-reductasa del citosol. Hi ha tres isoformes, l'HO-2 és constitutiva, l'HO-1 és induïble en resposta a l'estrès, i l'HO-3, que té poca activitat i actua més aviat de proteïna que uneix hemo. No són ben bé antioxidants perquè descomposen el grup hemo que és pro-oxidant generant un antioxidant (bilirubina) i un altre pro-oxidant (ferro) (Morse & Sethi, 2002). Cal dir que el cor és particularment sensible a l'NTBI, potser perquè té poques defenses antioxidants

(l'activitat catalasa cardíaca és lleu i les activitats de les SOD i les GPx només moderades). També ho són les cèl·lules β -pancreàtiques (Halliwell & Gutteridge, 2007).

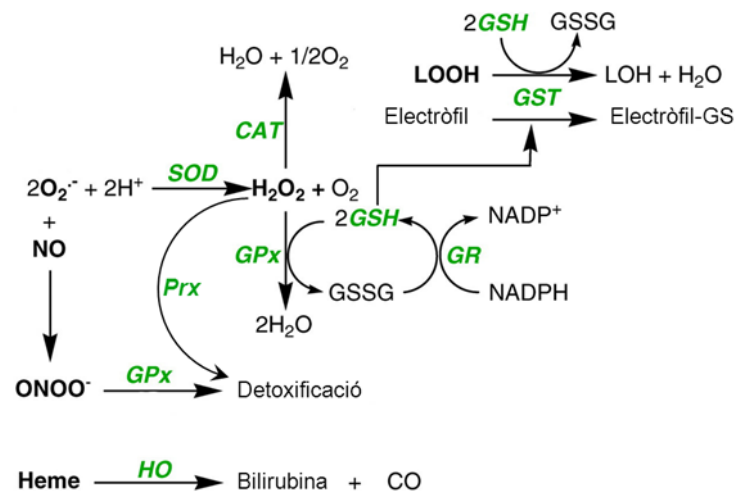


Figura 38. Esquema dels diferents enzims antioxidants. Principals enzims que detoxifiquen les espècies radicals de l'oxigen i el nitrogen. CAT (catalasa), SOD (superòxid dismutasa), GPx (glutatió peroxidasa), GR (glutatió-reductasa), GST (glutatió-S-transferasa), PRx (peroxiredoxina), HO (hemo-oxigenasa) (H. Zhu, Zhang, Amin, & Li, 2008).

Moltes molècules de baix pes molecular, a més a més del glutatió, i altres compostos amb sofre poden actuar d'antioxidants. Algunes es sintetitzen in vivo i altres s'obtenen de la dieta. Entre aquestes hi ha la taurina i la hipotaurina, les poliamines, els plasmalògens i els productes derivats del triptòfan. També la bilirubina, els α -cetoàcids (piruvat, glioxilat i α -cetoglutarat poden reaccionar amb el peròxid), la melatonina, l'àcid lipoic (component de la piruvat i la α -cetoglutarat-deshidrogenasa que pot reaccionar amb diferents radicals i unir ferro i coure), el coenzim Q (que a més de participar a l'ETC es troba en membranes i lipoproteïnes, inhibeix la peroxidació lipídica i pot regenerar l' α -tocoferol), l'àcid úric (que com a urats està present en altres dosis i fa de *scavenger* de diversos radicals) i els dipèptids que contenen histidina (que es troben a concentracions altes en múscul i que poden quelar coure amb l'anell imidazol a més de diferents radicals, peròxids i aldehids). Dels compostos provinents de la dieta destaquen l'àcid ascòrbic (o vitamina C), la vitamina E, els carotenoids (o vitamina A) i els fenols vegetals (Halliwell & Gutteridge, 2007).

OBJECTIUS

Per una banda, la miocardiopatia és un dels problemes més importants en l'FRDA i la pateixen gairebé tots els malalts en graus diferents (Harding, 1981). Tot i que la fallida cardíaca és la causant de la majoria de les morts (Hanley, Corrigan, Mohammad, & MacMahon, 2010), es troba poca literatura, ja que la majoria de publicacions es centren en la neuropatologia. Des de 1966, hi ha menys de 200 publicacions sobre el cor, en canvi n'hi ha més de 2500 sobre aspectes neurològics de la malaltia (Payne, 2011). D'altra banda, els models animals d'FRDA han estat molt importants per entendre la biologia bàsica i les implicacions clíniques de la malaltia, tot i que cadascun d'ells té les seves limitacions. El primer ratolí model va ser creat al laboratori de Puccio: KO condicional dependent de Cre restringit a cor i cervell o a cor i múscul esquelètic (Puccio et al., 2001). L'excisió de l'exó 4 provoca una reducció total de frataxina, fet que difereix dels humans malalts, els quals tenen un nivell residual baix i variable d'expressió de la proteïna frataxina. Aquests ratolins tenen un fenotip molt fort i el 80 per cent moren abans de 30 dies. L'altra estratègia utilitzada ha estat generar ratolins KI amb el gen humà que conté les expansions del trinucleòtid GAA. S'ha fet servir als laboratoris de Pook (Al-Mahdawi et al., 2008) i de Pandolfo (Miranda et al., 2002). Tot i que el genotip s'assembla més al de la malaltia, el fenotip d'aquests animals és menys sever, i al cap d'un any de vida encara no tenen una patologia clara a nivell cardíac. A més, pel que fa a la investigació in vitro amb cultius cel·lulars, no s'ha estudiat el dèficit de frataxina en miòcits cardíacs. Malgrat que recentment s'han publicat treballs que usen iPSC derivades a cardiomiòcits, l'eficiència de diferenciació és baixa i les cèl·lules no adopten del tot les propietats típiques dels cardiomiòcits (Hick et al., 2013; J. Liu et al., 2011). Tenint en compte aquests antecedents, els objectius d'aquest estudi són els següents:

OBJECTIUS

1. Analitzar el metabolisme del ferro i dels centres ferro-sofre en aquest model
2. Estudiar la funció mitocondrial i el metabolisme energètic d'aquests miòcits
3. Analitzar l'estat oxidatiu i les defenses antioxidants d'aquestes cèl·lules
4. Estudiar les vies metabòliques i de senyalització afectades pel dèficit de frataxina

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Per aquest estudi s'utilitzen rates de la soca Sprague Dawley de l'espècie *Rattus norvegicus* mantingudes en condicions estàndars i amb menjar i aigua disponibles *ad libitum*. Les condicions de cria segueixen la normativa de la Generalitat de Catalunya (DECRET 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a l'experimentació i per a altres finalitats científiques) pel que fa a la temperatura, la humitat, els cicles de llum/foscor controlats, la higiene, el menjar i la beguda. Els procediments d'experimentació han estat evaluats i aprovats pel Comitè Ètic d'Experimetació Animal (CEEAA) de la Universitat de Lleida (UdL). Els animals nounats es sacrifiquen per decapitació d'acord amb la guia *American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*.

2. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.1. Obtenció de plasmidis

Un plasmidi és una molècula d'ADN circular de doble cadena pròpia dels procariotes, que pot existir i replicar-se independentment del cromosoma o estar-hi integrada. Un plasmidi s'hereta de forma estable, però no és necessari pel creixement ni per la reproducció de la cèl·lula hoste.

2.1.1. Plasmidis

Per produir els lentivirus calen tres plasmidis, un per l'embolcall, un per l'envoltori i un que contingui el transgèn que es vol deliberar a les cèl·lules diana. Per aquest estudi s'han usat dos plasmidis que permeten l'empaquetament (p627) i l'embolcall (p628) dels lentivirus, dos plasmidis pels controls de transducció (GFP) i per l'activació de la infecció i la maquinària d'interferència (shscr), i tres plasmidis amb els diferents shRNA contra frataxina (sh34, sh37 i sh80). Els plasmidis per l'empaquetament dels lentivirus són d'Addgene mentre que els controls i els shRNA contra frataxina de SIGMA.

ID	Nom	Insert
627	pVSV-G	CMV gag pol tat rev rer (Addgene 12260)
628	pCMV-DR8.2	CMV vsvg (Addgene 12259)
GFP	SHC003	GFP
shscr	SHC002	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTTTCATCTTGTT GTTTTT
sh37	TRCN00000 06137	CCGGGCAGACGCCAAACAAGCAAATCTCGAGATTTGCTTGTTTGGCGTCTG CTTTTT
sh34	TRCN00001 97534	CCGGCAAACCTGGACTTGTCTTCATTCTCGAGAATGAAGACAAGTCCAGTTT GTTTTTTG
sh80	TRCN00001 78380	CCGGGACTTGTCTTCATTGGCCTATCTCGAGATAGGCCAATGAAGACAAGT CTTTTTTG

Taula 1. Plasmidis utilitzats per fer els lentivirus.

2.1.2. Cultiu d'Escherichia coli

Els cultius bacterians es creixen en medi LB (Luria-Bertani) (extret de llevat 5 g/l, Triptona 5 g/l, NaCl 10 g/l) (Bertani, et al., 1951, Ausubel et al, 1989). Si és necessari s'hi afegeix ampil·lina a 0,05-0,01 mg/ml. Les cèl·lules creixen en un agitador orbital a 200 rpm i 37 °C. Per a mantenir els bacteris per períodes llargs de temps es congelen a -80 °C en un 20% de glicerol; es barregen 900 µl de cultiu amb antibiòtic crescut entre 12-14h amb 600 µl de glicerol al 50% estèril, es divideix en dos tubs amb tap de rosca i es congela a -80 °C.

2.1.3. Transfecció d'Escherichia coli

Existeixen tractaments, com és l'exposició a concentracions iòniques elevades, que faciliten la transformació les cèl·lules bacterianes, és quan s'anomenen "bacteris competents". El procés de transformació es basa en la introducció de DNA exogen a una cèl·lula permeabilitzant la membrana d'aquestes amb diferents compostos.

En el nostre cas, s'utilitza la soca DH5α sotmesa a clorur de calci per a obtenir les cèl·lules competents (Sambrook et al 1989), i es facilita l'entrada del DNA amb un xoc tèrmic. També s'usen cèl·lules competents comercials de Life Technologies.

2.1.3.1. Bacteris competents

Protocol

1. El dia abans es preparen els materials i el tampó per a esterilitzar-los a l'autoclau i tenir-los a 4 °C. Solució de CaCl₂: 60 mM CaCl₂, 15% glicerol, 10 mM HEPES, pH 7.
2. Es fa una estria de la cepa de bacteris en una placa LB agar sense antibiòtic.
3. S'incuba ON a 37 °C.
4. Es prepara un precultiu de 3-4 ml d'LB a partir d'una colònia aïllada.
5. S'incuba ON a 37 °C 170rpm
6. Es dilueix el cultiu 1/100 en LB fresc i es deixa créixer 3-4 h fins a una OD de 0,4
7. Es refreda el cultiu 10 minuts a 4°
8. Es centrifuguen 250 ml del cultiu a 3.000 rpm 7 min (Centrífuga SORVALL)
9. Es resuspenen els pellets en 59 ml del tampó de CaCl₂ (1/5)
10. Es centrifuga a 4.000 rpm 5 min a 4 °C
11. S'incuba 30 min en gel
12. Es centrifuga a 4.000 rpm 5min a 4 °C
13. Es resuspen el pellet en 10 ml de tampó (1/25) i immediatament es fan alíquotes de 200 µl (en gel). Es guarden ràpidament a -80 °C
14. Control d'eficiència: el rendiment hauria de ser de 10⁵-10⁷ unitats formadores de colònia per µg de DNA plasmídic transformat

2.1.3.2. Transformació de les *E.coli*

Protocol

1. Es descongelen les cèl·lules competents en gel uns 10 minuts
2. Es descongela el DNA plasmídic
3. Es fan servir entre 5 i 10 ng de DNA plasmídic (fins a 50 ng), tenint en compte que no s'ha de superar el 5% (v/v) de cèl·lules competents.
4. Es barreja fent copets a l'ependorf amb els dits
5. S'incuba 20 minuts en gel
6. Es fa un xoc tèrmic de 45 segons a 42 °C
7. S'incuba 2 minuts en gel
8. S'afegeix a la mescla LB pre-escalfat a 37 °C fins arribar a 1 ml per afavorir la recuperació de les cèl·lules

9. S'incuba de 45 min a 1 h a 37 °C amb agitació de 170 rpm
10. Es sembra un 15-20% del volum una placa de LB (si és plasmidi té resistència, amb l'antibiòtic). En el nostre cas són 100 µg/ml ampicil·lina
11. L'endemà es recuperen les colònies que han crescut

2.1.4. Expressió i obtenció de plasmidis

Per obtenir una quantitat gran de plasmidi es sembra una única colònia d'*E. Coli* crescuda en plaques d'LB amb antibiòtic en un pre-cultiu de 2-10 ml d'LB amb antibiòtic. Aquest es deixa créixer unes 8 hores. Després es preparen els cultius diluint els pre-cultius de 500 a 1.000 vegades en medi selectiu (250 ml en el nostre cas) en un recipient amb un volum de com a mínim 4 vegades el volum del medi. Els cultius es deixen créixer unes 12-16 h fins a saturar-se amb agitació a 300 rpm.

Per extreure el DNA plasmídic del cultiu d'*E.coli* s'utilitza el kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit seguint el protocol descrit per la casa comercial. L'extracció del DNA es basa en una lisi alcalina de les cèl·lules bacterianes en presència d'SDS, la unió del DNA a una columna d'intercanvi iònic, diferents rentats per treure els contaminants i l'elució final del DNA.

2.1.5. Quantificació del plasmidi i gel analític

Per determinar la concentració del DNA es mesura l'absorbància a 260, 230 i 280 nm i la relació entre aquestes per saber-ne la qualitat a l'espectofotòmetre NanoDrop ND-1000. Després es corre el DNA plasmídic en un gel d'agarosa.

Protocol

1. Es prepara el gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE (Tris-HCl 20mM, àcid acètic 11,4% (v/v), EDTA 1 mM, pH 8)
2. Es preparen les mostres amb tampó de càrrega (Ficoll 3% (w/v), EDTA 20 mM pH 8, 0,05% blau de bromofenol (v/v))
3. Es corre l'electroforesi a 80 V durant aproximadament 1 hora
4. S'adquireix la imatge al Gel Doc EZ de BioRad

2.2. Anàlisi de l'expressió gènica

En aquest estudi s'ha mirat l'expressió gènica relativa usant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa en temps real (RQ-PCR o *Real Time PCR*), que consta de diferents passos explicats a continuació.

2.2.1. Extracció d'RNA

Els cultius es creixen en plaques p35 i es fan dos rentats amb PBS fred abans de recollir les cèl·lules amb 350 µl del tampó RLT (RNeasy Mini Kit QIAGEN) amb l'ajuda d'un *scraper*. Les mostres es guarden en tubs lliures d'RNases a -80 °C. L'extracció de l'RNA de cultius cel·lulars es du a terme segons les instruccions del mateix kit comercial usant també DNAsa I (QIAGEN) per digerir el DNA genòmic de la mostra.

2.2.2. Quantificació i control de qualitat

L'RNA es quantifica amb el NanoDrop ND-1000 i es verifica que no hi hagi degradació mitjançant un gel d'agarosa (tal com s'explica a l'apartat de plasmidis, però en fred).

2.2.3. Transcripció inversa

Un cop es té l'RNA total, s'utilitza 1 µg de mostra per a sintetitzar 1 µg de cDNA mitjançant una reacció de transcripció reversa (RT-PCR, *Reverse transcription-polymerase chain reaction*) duta a terme per l'enzim DNA-polimerasa dirigida per RNA. D'aquesta manera, el cDNA es pot utilitzar per a analitzar l'expressió gènica. El protocol segueix aproximadament el del kit de la transcriptasa reversa (RT) SuperScript® II de Life Technologies.

Protocol

1. Es descongela tot en gel
2. Es prepara la Mix1 (volum/tub)
 - a. 2 µl d'hexanucleotids Roche 10x per a que facin d'encebadors
 - b. 1 µl de DNTP 10 mM de Sigma
 - c. Es mescla fent copets al tub
3. Es preparen eppendofs RNase *free* per cada mostra

- a. 1 µg d'RNA. Es prepara també un tub control amb aigua (NTC de *non-template control*) i un altre tub amb RNA al que després no s'afegirà enzim (NEC de *non-enzyme control*)
 - b. S'afegeix aigua milliQ fins a 9 µl
 - c. S'afegeixen 3 µl de la Mix1
 - d. Es mescla fent copets al tub
4. 65 °C 5 min
 5. 4 °C 15 min
 6. Es prepara la Mix2 (volum/tub)
 - a. 4 µl de BFS5x
 - b. 2 µl de DTT 0,1 M
 - c. 1 µl de RNase OUT de QIAGEN
 - d. Es mescla fent copets al tub
 7. S'afegeix la Mix2 (7 µl per mostra)
 8. Es mescla fent copets al tub i si cal es fa un *spin*
 9. 25 °C 10 min (per a que hibridin els hexanucleòtids encebadors aleatoris)
 10. 42 °C 2 min
 11. S'afegeix 1 µl de l'enzim RT per mostra (*Superscript II* de Life Technologies)
 12. Es mescla fent copets al tub i si cal es fa un *spin*
 13. 42 °C 50 min
 14. 70 °C 15 min (per inactivar l'enzim)
 15. Com que només es fa una reacció, la concentració de cDNA queda a 50 ng/µl
 16. Es conserva a 4°C o a -20 °C fins a fer-ho servir.
 17. Si es necessita més quantitat de DNA es poden fer fins a 5 µg amb el mateix protocol.

2.2.4. *Real Time PCR* o RQ-PCR

Aquesta tècnica utilitza unes sondes específiques que inclouen dos encebadors o *primers* i una sonda marcada amb un fluoròfor i un extintor (*quencher*) per a cada cDNA a analitzar. Aquestes sondes hibriden amb el cDNA de la mostra i la polimerasa amplifica el fragment limitat pels dos encebadors, alliberant l'extintor i permetent que el fluoròfor emeti llum en ésser excitat. Les sondes utilitzades són de *TaqMan* d'Applied Biosystems.

Gen	Nom	UniGene	Referència	Lloc	Amplicó	Exons
Actb	<i>Actin, beta</i>	Rn. 94978	Rn00667869_m1	884	91	4-5
Fxn	<i>Frataxin</i>	Rn. 13133	Rn01501404_g1	378	63	3-4
Tfrc	<i>Transferrin receptor</i>	Rn. 98672	Rn01474701_m1	570	101	4-5
Slc11a2	<i>Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2</i>	Rn. 11418	Rn00565927_m1	64	69	1-2
Fth1	<i>Ferritin, heavy polypeptide 1</i>	Rn. 54447	Rn00820640_g1	243	95	1-2
Epas1	<i>Endothelial PAS domain protein 1, Hif2a</i>	Rn. 55138	Rn00576515_m1	968	70	7-8
Cpt1b	<i>Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle</i>	Rn. 6028	Rn00682395_m1	1387	83	11-12

Taula 2. Sondes usades per a a l'RQ-PCR.

Protocol

1. Es preparen reaccions de 20 µl (3 repeticions per gen i mostra)
2. Es preparen tubs per cada mostra
3. Es posa 1 µl del cDNA obtingut tal com s'explica a l'apartat anterior (50 ng)
4. S'afegeixen 8 µl d'aigua milliQ
5. S'afegeixen 10 µl de *Universar PCR MasterMix* de Biorad
6. Es barreja donant copets al tub
7. Es preparen tubs per cada gen a analitzar i per mostra
8. Es divideix la mix anterior de cada mostra en els gens a analitzar (66,5µl)
9. S'afegeixen 3,5 µl de cada assaig de TaqMan
10. Es barreja donant copets al tub
11. Es posen 20 µl per pou a la placa
12. Es tapa bé la placa amb el film Microseal® 'B' Adhesive Seals Optical de BioRad
13. Es centrifuga 1 minut
14. Es posa al termociclador CFX96 de BioRad
15. Es du a terme la PCR amb el programa següent:
 - a. Xoc termic (*hold*) 95 °C 3 min
 - b. 40 Cicles d'amplificació i detecció:
 - i. 95 °C 10 segons per desnaturalitzar
 - ii. 55 °C 30 segon per hibridar i estendre el transcrit

El resultat s'obté en forma de Ct (*Cycle threshold*), que és un valor que correspon al cicle en que comença el creixement exponencial de la fluorescència (i per tant del producte de la PCR). Per tant, com més cDNA es tingui de partida, més aviat creuarà el llindar de detecció de fluorescència i menor serà el Ct. La quantitat relativa d'mRNA es calcula amb el mètode DDct. La ràtio o l'expressió relativa és el resultat d'aplicar la fórmula $(2^{\Delta Ct_{diana}}(\text{control-mostra})/2^{\Delta Ct_{ref}}(\text{control-mostra}))$. On Ct és *Cycle threshold*, el control és l'shscr, la mostra és un l'shFXN, el gen *diana* és el gen que es vol investigar i el gen *ref* és el de referència (ACTB en el nostre cas). Els assajos comercials tenen una eficiència d'amplificació propera a 2, que és el valor que es mostra a la fórmula anterior.

3. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

3.1. Producció de lentivirus

Els vectors lentivirals s'usen per a l'enviament, la integració i l'expressió (estable o controlada) de transgens o d'shRNAs en cèl·lules (que es divideixen o no) tant in vitro com in vivo. Les partícules lentivirals es generen co-transfectant plasmidis que codifiquen pel sistema d'empaquetament del virió, d'un envoltori i del que porta el gen o l'shRNA d'interès. Els components estructurals del virió provenen del virus de la immunodeficiència humana (HIV-1), i l'envoltori del *vesicular stomatitis virus* (VSV) per de la seva proteïna G, que és més estable i té més tropisme. El vector lentiviral té només el material genètic que serà transferit a la cèl·lula diana. El transgèn està flanquejat pel elements *cis* necessaris per la seva encapsidació, transcripció reversa i integració. Els controls usats van ser una seqüència desordenada (shscr) que no interfereix en cap seqüència coneguda d'humà, ratolí ni rata, i un altre vector amb GFP per controlar l'eficiència de la transducció.

La interferència d'RNA és un sistema natural de regulació de l'expressió gènica que es dona en cèl·lules vives de manera natural. L'efecte robust i selectiu de l'RNAi en l'expressió gènica l'ha convertit en una eina freqüent per als cultius cel·lulars. El vector lentiviral que introduïm a la cèl·lula conté una seqüència anomenada shRNA amb una estructura específica i també codifica pel complex de transcripció reversa. Així, la seqüència que introduïm serà convertida a DNA i s'integrarà a la cèl·lula diana. Quan aquest shRNA s'expressa (l'expressió està controlada per un promotor fort i s'expressa en

gran quantitat) es transcriu l'shRNA. Aquest conté dues seqüències complementàries d'RNA separades per un *loop*, que es plega dins la cèl·lula i forma una estructura secundària reconeguda per la maquinària d'RNAi. Les proteïnes Drosha i DICER processaran l'shRNA tallant el *loop* convertint-lo en un siRNA (*small interference RNA*) que és reconegut per RISC-AGO2 hibridant amb l'mRNA diana. Si l'siRNA és del tot complementari, el complex RISC-AGO2 tallarà l'mRNA degradant-lo. Si no és del tot complementari, es reprimerà la transcripció. D'ambdues maneres, la introducció de l'shRNA provoca el silenciament de l'expressió del gen diana.

3.1.1. Cultius cel·lulars de la línia HEK293T

Aquesta línia cel·lular prové de cèl·lules de ronyó embrional humà (HEK de *human embryonic kidney*). La línia HEK293T, a més, expressa l'antígen T de l'SV40, cosa que permet la replicació episomal de plasmidis que contenen la regió promotora SV40. El cultiu es manté amb medi DMEM (*Dulbecco's modified Eagles medium*) amb 10% (v/v) FBS (GIBCO, Invitrogen) inactivat amb calor (65 °C durant 30 minuts), i P/S (20 U/ml de penicil·lina i 20 µg/ml d'estreptomicina) en un incubador a 37 °C, humificat i al 5% de CO₂. Quan s'han de transfectar, les cèl·lules es sembren en plaques pretractades amb col·lagen. Per mantenir la línia, les cèl·lules es creixen en plaques p100 i es desenganxen mecànicament quan la placa arriba a un 70% de confluència. La suspensió de cèl·lules es centrifuga a 1.000 rpm 5 minuts i es dilueixen 20 vegades per tornar-les a sembrar cada 3-4 dies. Per mantenir-les a llarg termini es congelen 2 milions de cèl·lules en criotubs en FBS amb 10% de DMSO, deixant-les d'1 a 3 dies a -80 °C i després en nitrogen líquid durant períodes més llargs.

3.1.2. Transfecció de la línia HEK293T

Per produir els vectors lentivirals s'utilitzen tres plasmidis diferents que s'introdueixen a les cèl·lules HEK293T mitjançant la polietilenamina (PEI). Els plasmidis codifiquen pel vector lentiviral, l'empaquetador i l'embolcall víric. Tant el DNA com la membrana plasmàtica cel·lular tenen càrrega negativa, cosa que dificulta l'entrada de DNA a la cèl·lula. El PEI és un lípid catiònic que condensa el DNA plasmídic i també el protegeix de les DNases. Els agregats resultants tenen afinitat alta per la cèl·lula i la transfecció resulta

més efectiva (Florea et al 2002). La transfecció amb PEI es fa en medi OPTIMEM (GIBCO) sense sèrum ni antibiòtics.

Preparació de l'estoc de col·lagen

1. Es prepara la solució estoc de col·lagen:
 - a. Es prepara una solució 0,1 N d'àcid acètic en aigua milliQ (285 µl d'àcid acètic glacial en 50 ml d'aigua milliQ)
 - b. Es dissol el col·lagen en aquesta solució durant 4-6 hores agitant
 - c. La solució estoc de col·lagen (1 mg/ml) i es guarda a 4°C fins a un any
2. Per preparar la solució de treball col·lagen:
 - a. Es prepara una solució amb àcid acètic a 0,02 N i col·lagen a 75 µg/ml (es pot usar de 50 a 100 µg/ml) en aigua milliQ. Per exemple: 13 ml d'aigua, 16 µl d'àcid acètic glacial i 1 ml de colagen
 - b. Es posa el volum adequat a cada placa (p35-1 ml, p60-2 ml, p100-4 ml i p4-350 µl) i es deixa assecar amb la placa oberta dins la campana ON.

Preparació del PEI

1. Es dilueix el PEI al 20% en aigua (Cf. 4,5 M)
2. Es torna a diluir a 0,2 M (1 ml de la solució al 20% en 22,5 ml d'aigua milliQ)
3. Es porta a pH 5,6
4. Es dilueixen 4 ml de l'estoc 0,2 M en 142,26ml d'aigua milliQ (a Cf. 5,47 mM)
5. S'aliquota a 1 ml i es guarda a -20 °C
6. Es fa tot a la campana amb aigua milliQ estèril

Producció de Lentivirus

1. Es preparen plaques p100 amb col·lagen. Es poden guardar fins a 15 dies a 4 °C
2. El dia abans es sembren les plaques amb 1,5-2 milions cèl·lules de HEK293T
3. El procediment sencer (i sempre que estrelli amb virus) es fa a la campana BioIIA
4. Es prepara un tub diferent per cada vector amb el DNA-OPTIMEM
 - a. Per a cada p100:
 - i. 20 µg del vector LV

- ii. 13 µg de l'empaquetador o 627
 - iii. 7 µg de l'envoltori o 628
 - iv. 1,5 ml d'optimem
5. Es prepara el PEI-OPTIMEM per a totes les plaques juntes
 - a. Per a cada p100:
 - i. 1,260 ml d'OPTMEM
 - ii. 240 µl de PEI gota a gota
 6. Es posa el PEI-OPTIMEM sobre el DNA-OPTIMEM gota a gota
 7. Es "vortexa" 5 segons a 1800 rpm
 8. S'incuba 10 minuts a temperatura ambient
 9. Mentrestant es renten les plaques de les HEK293T amb 5 ml d'OPTIMEM
 10. S'hi agrega la solució de PEI-DNA-OPTIMEM (3 ml per p100) gota a gota
 11. S'afegeixen 4 ml d'OPTIMEM per placa
 12. S'incuba durant 1 h (poden ser fins a 4h) a 37 °C, 5% CO₂ i humitat
 13. Es canvia el medi per medi fresc estàndard (DMEM 4,5 g/l de glucosa, 10% FBS, P/S)
 14. Al cap de 3 dies es recull el medi que conté els virus en falcons
 15. Es guarden a 4 °C per a l'ús immediat

3.1.3. Concentració i valoració del títol dels virus

Es fan servir les columnes VIVASPIN 20 per concentrar els virus ja que és la forma més ràpida i segura. Els virus no passen pel filtre de manera que es pot descartar el medi i els subseqüents rentats i els virus queden a la part superior. Es concentren 15-30 vegades.

Protocol

1. Es renten les columnes VIVASPIN 20 (Sartorius) de 100.000 MW perquè poden contenir traces d'azida que podrien danyar els cultius amb 5 ml d'aigua milliQ i es centrifuga a 1.000 rpm 5 min
2. Es centrifugen els falcons que contenen el medi amb virus a 1.000 rpm 5 minuts (per descartar les cèl·lules que hagin quedat al sobrenedant)
3. Es filtra el sobrenedant a 0,45 µm (també es pot filtrar a 0,22 µm però es retenen més virus al filtre)

4. Es posen 15 ml per columna
5. Es centrifuga a 3.500 rpm 1 h a 4 °C
6. Es descarta el *flow-through* aspirant (es pot repetir el procés de concentració a la mateixa columna si es té més medi amb virus a concentrar)
7. S'afegeixen 15 ml de PBS per fer-hi un rentat
8. Es centrifuga a 3.500 rpm 1 h a 4 °C
9. Es descarta el *flow-through* aspirant
10. Es guarden els virus concentrats en tubs amb tap de rosca i *o-ring* aliquidats fins a 3 mesos a -80 °C.

Per evaluar la quantitat de virus s'usa l'ELISA comenrcial Quicktiter Lentivirus Quantitation Kit (HIV P24 ELISA) de Cell Biolabs. A partir del sobrenedant es fan dilucions 1/500 i 1/5000 en medi fresc i es titulen amb la placa ELISA tal com diu el protocol del kit.

3.1.4. Control de transducció per GFP

Per tenir una mesura relativa de la quantitat de virus necessaris per infectar els cardiomiòcits, es sembren plaques amb cardiomiòcits on s'afegeixen diferents quantitat de virus que contenen la proteïna GFP. El nombre de cèl·lules infectades (verdes) es compta i es calcula el percentatge d'infecció en relació amb el nombre total de cèl·lules.

3.2. Cultiu de cardiomiòcits neonatals de rata

Els cardiomiòcits neonatals de rata s'obtenen de cries de rata de P1 a P5. Els cors s'extreuen i es dissecionen primer mecànicament i després enzimàticament en el tampó ADS. Es tallen les aurícules i es fan servir només els ventricles ja que són més rics en cardiomiòcits i els que normalment presenten la patologia hipertròfica. També s'eliminen els vasos sanguinis i el pericardi sota la lupa. Després de la sembra es fa servir mitomicina C per inhibir el creixement de cèl·lules que proliferen. En tots els experiments es mantenen a 37 °C, humitat i CO₂ al 5% i el medi de cultiu es canvia cada 24 h.

Protocol

1. Es prepara el material, el tampó, els medis i l'enzim
 - a. Es desinfecten amb alcohol pinces, tisores i agulles

- b. Es posen en gel 3 plaques p35 amb ADS1x fred i la col·lagenasa II
 - c. S'escalfa un falcon amb ADS1x a 37 °C
 - d. S'escalfa el medi DMEM 4,5 g/L, 10% FBS P/S a 37 °C
2. Es decapiten les rates, es treuen els cors i es posen junts en una p35 amb ADS1x fred. Es trasllada tot a sota la lupa
 3. Es treuen els vasos sanguinis i el pericardi (la membrana del voltant del cor). Es descarten les aurícules i el cor (que ara només té els ventricles) es posa a una nova p35 amb ADS1x
 4. Es fan incisions al cor amb les tisores per permetre que l'enzim penetri millor i es posa a una p35 nova amb ADS1x. Es trasllada tot a la campana de flux laminar
 5. Es preparen eppendorffs amb 1ml d'ADS1x a 37 °C i 12-15 µl de collagenasa II. S'afegeixen 3-4 cors per eppendorff
 6. S'incuba a 37 °C, 1.000 rpm durant 15 min al Thermomixer
 7. Es preparen 2 tubs amb 8-10 ml de medi calent i quan acaba la digestió enzimàtica es posa la suspensió de cèl·lules al tub (2 eppendorfs per tub).
 8. S'afegeix 1 ml d'ADS1x calent i 10-15 µl de col·lagenasa II a l'eppendorf que conté els cors i s'incuba per segona vegada a 37 °C, 1.000 rpm durant 15 min al Thermomixer. Mentrestant es centrifuguen els tubs de 10 ml a 800 rpm 4 min
 9. Es descarta el sobrenedant, s'afegeixen 2 ml de medi de cultiu i es resuspenen les cèl·lules
 10. Es repeteixen els passos anteriors per fer un total de tres digestions amb col·lagenasa II
 11. S'ajunten totes les cèl·lules en un tub i es porta fins a 10 ml. Es fa una presembra en una p100 sense *coating* (10-12 cors per p100). S'incuba a 37 °C 45 min.
 12. Mentrestant es du a terme el *coating* de les plaques amb una solució de gelatina al 0,2% (w/v) i es deixen les plaques tancades dins l'incubador.
 13. Es fa una segona presembra recollint el sobrenedant de la primera presembra i posant-lo en una nova p100. S'incuba a 37 °C 45 min.
 14. Es recull el sobrenedant de la segona presembra i es centrifuga a 800 rpm 4 min
 15. Es descarta el medi i es resuspenen les cèl·lules en MC usant 1 ml per cor

16. Per fer el comptatge de cèl·lules es posen en un eppendorf 50 µl d'ADS, 25 µl solució de blau tripà al 0.4% i 25 µl suspensió de cardiomiòcits. Es barreja i es fa el comptatge de cèl·lules vives (refringents) en una cambra de Bürker.
17. Per sembrar les cèl·lules es treu la solució de gelatina de les plaques i es porta la suspensió de cardiomiòcits fins a al volum que calgui. S'afegeix la mitomicina C diluint-la 100 vegades. El nombre de cèl·lules que es sembra a cada placa o pou són els següents:
 - a. P96 - 15-20.000 cèl·lules
 - b. M4 - 75.000c cèl·lules
 - c. P35 - 750.000 cèl·lules (fins a 1 milió)
 - d. P60 - 1.5 milions de cèl·lules
18. S'incuba 4h a 37 °C amb humitat i 5% CO₂
19. Es canvia el medi per medi fresc (sense mitomicina) i s'afegeixen els virus (5,5 ng de p24 per cada 1.000 cèl·lules segons el títol obtingut amb l'ELISA)

El tampó ADS10x es prepara amb 6,8 g de NaCl, 120 mg de Na₂HPO₄·2H₂O, 0,4 g de KCl, 197 mg de MgSO₄·7H₂O, 1 g de glucosa i 4,8 g d'HEPES en 100 ml d'aigua milliQ. Es porta a pH 7,4 i es filtra a 0,22 µm. Es dilueix a ADS1x abans de cada aïllament de cardiomiòcits.

El medi estàndard per cardiomiòcits (MC) es prepara amb 150 ml de DMEM amb 1 g/l de glucosa , 50 ml de M199, 2 ml d'HEPES 1M pH 7,4 , 10 ml d'FBS, 20 ml de HS i 2 ml de GlutaMaxi®. Anteriorment s'afegeix penicil·lina (100 U/ml) i estreptomycin (100 µg/ml) als medis DMEM i M199 (tot de GIBCO).

La col·lagenasa II (Worthington) es prepara a 10 U/µl en ADS 1x i es guarda a -20 °C. La gelatina es prepara al 0,2% en aigua milliQ i s'esterilitza a l'autoclau i es guarda a temperatura ambient. Es prepara fresca cada setmana. La mitomicina C es prepara a 1 mg/ml amb PBS i s'usa diluïda 100 vegades. Es guarda a 4 °C.

Per a preparar el suplement de lípids de cardiomiòcits s'ha seguit el protocol descrit per Brodersen i col·laboradors amb algunes modificacions (Brodersen, Vorum, Skriver, & Pedersen, 1989).

Protocol

1. Es preparen les solucions dels àcids grassos en etanol; l'àcid palmític a 90 mM (23,1 mg/ml) i l'àcid esteàric a 45 mM (12,8 mg/ml)
2. S'escalfen a 60 °C al Thermomixer durant 15 minuts per dissoldre'ls
3. Es prepara la solució de BSA a 300 µM (20 mg /ml en aigua milliQ) i s'ajusta a pH 9 amb NaOH
4. S'afegeix 1 volum de la solució etanòlica del lípid per cada 50 volums de solució de BSA en agitació constant
5. Es manté a la nòria ON per permetre'n la dissolució

El medi per cardiomiòcits amb suplement d'àcids grassos (MC+AG) es prepara amb 1,667 ml de solució de BSA-palmitat, 1,667 ml de solució de BSA-seteàric i 0,5 ml de solució de BSA-oleic-linoleic ajustant a un volum de 50 ml amb el medi de cardiomiòcits estàndard. L'albumina queda a una concentració final de 20 µM (a més de la que prové del sèrum). La concentració final dels àcids grassos és de 60 µM per al palmitat i de 30 µM per a l'esteàric, l'oleic i el linoleic, que és la concentració que està descrita per aquests lípids en plasma de rata en dejú (Zhou, Vessby, & Nilsson, 2002).

3.3. Anàlisi de la viabilitat cel·lular

L'anàlisi de la viabilitat cel·lular es va dur a terme amb diferents assaigs perquè cada assaig mesura un paràmetre fisiològic o morfològic que no correspon exactament a la viabilitat. Cada assaig té avantatges i inconvenients. Per això vam creure millor combinar diferents mesures com són la permeabilitat de la membrana cel·lular o el potencial d'oxidació/reducció.

3.3.1. *Live/Dead de Life Technologies*

Les cèl·lules viables tenen activitat estearasa intracel·lular ubiqüa que es pot determinar per la conversió enzimàtica de la calceïna AM (pràcticament no fluorescent) a calceïna (fluorescent). Es una sonda polianiónica que queda retinguda dins la cèl·lula produint fluorescència intensa verda en les cèl·lules vives (Ex/Em: 495/515). L'homodimer d'etidi (Eth) entra a les cèl·lules amb les membranes danyades i es torna quaranta vegades més

fluorescent en unir-se als àcids nucleics pel que les cèl·lules mortes emeten fluorescència vermella (Ex/Em: 495/635). L'Eth és exclòs de les cèl·lules vives que tenen la membrana.

Protocol

1. Es sembren entre 15-20.000 cèl·lules per pou a una placa p96
2. S'inclou un control positiu de cèl·lules mortes (usant 70% metanol 30 min a RT)
3. Es renten les cèl·lules amb PBS
4. Es prepara la solució de treball: 4 μ M EtH i 2 μ M CAM en PBS
5. S'incuben les cèl·lules en 100 μ l de la solució de treball durant 30-45 min a RT
6. Es renten les cèl·lules amb PBS
7. Es fan les fotos al microscopi i el recompte de cèl·lules mortes i vives amb l'ImageJ

3.3.2. MTT

L'assaig MTT és un mètode colorimètric que mesura l'activitat d'enzims que redueixen el MTT a formazans, d'un color lilós intens. Mesura la capacitat reductora de la cèl·lula i també es pot usar per valorar la viabilitat cel·lular (Mosmann, 1983).

Protocol

1. Es sembren entre 15-20.000 cèl·lules per pou a una placa p96
2. Es prepara l'estoc d'MTT a 12 mM (5 mg d'MTT en 1 ml de PBS estèril). La solució estoc es pot guardar durant 1 mes a 4 °C
3. Es canvia el medi de les cèl·lules per medi fresc (100 μ l) o per el tampó que es vulgui (HBSS amb Ca^{2+} , Mg^{2+} i glucosa en el cas de l'assaig de sensibilitat a l'estrès)
4. S'afegeixen 10 μ l de l'estoc d'MTT a cada pou i s'inclou un control negatiu amb medi sol.
5. S'incuba 4 h a 37 °C, 5% CO_2 i humitat
6. Es treuen 85 μ l de medi o tampó
7. S'afegeixen 50 μ l de DMSO a cada pou i es barreja bé amb la pipeta
8. S'incuba a 37 °C 5%, CO_2 i humitat 10 min
9. Es barreja de nou cada pou i es mesura l'absorbància a 540 nm al lector de plaques Biotek

En el cas de la mesura de la viabilitat cel·lular en resposta a l'estrès oxidatiu abans de l'assaig les cèl·lules s'incuben amb diferents concentracions de *tert*-butil hidropèroxid durant 30-45 minuts en HBSS amb Ca^{2+} , Mg^{2+} sense glucosa. Després es du a terme l'assaig en medi HBSS amb Ca^{2+} , Mg^{2+} i glucosa.

3.3.3. Cristall violeta

El cristall violeta (CV) s'uneix al DNA i s'utilitza com a mesura de la viabilitat cel·lular (Gillies, Didier, & Denton, 1986).

Protocol

1. Es sembren entre 15-20.000 cèl·lules per pou a una placa p96
2. Es renten dues vegades les cèl·lules amb HBSS amb Ca^{2+} , Mg^{2+} i glucosa
3. Es tenyeixen amb cristall violeta al 0,5% (w/v) en una solució amb metanol al 20% (v/v) durant 15 min a temperatura ambient
4. Es renta la placa de p96 amb aigua 5 vegades
5. Es solubilitza en una solució de citrat sòdic 0,1 M pH 4,2 en 50% metanol (v/v)
6. Es barreja fins que el color és homogeni i es mesura l'absorbància a 550 nm al lector de plaques Biotek

3.3.4. Roig Neutre

El roig neutre (NR) tenyeix els lisosomes (Winckler, 1974) i també s'usa com a mesura de la viabilitat cel·lular.

Protocol

1. Es sembren entre 15-20.000 cèl·lules per pou a una placa p96
2. El dia anterior a l'assaig es prepara la solució estoc de roig neutre a 4 mg/ml que es dilueix 100 vegades en HBSS amb Ca^{2+} , Mg^{2+} i glucosa i s'incuba ON a 37 °C
3. Abans de dur a terme l'assaig es renten dues vegades les cèl·lules amb HBSS
4. Es tenyeixen amb 100 µl de solució de roig neutre en HBSS durant 4h a l'incubador
5. Es fan dos rentats d'HBSS
6. S'afegeixen 150 µl la solució per destenyir (1% àcid acètic (v/v) i 50% etanol (v/v)) i es deixa en un agitador orbital 10 min

7. Es mesura l'absorbància a 540 nm al lector de plaques Biotek

3.4. Microscòpia

Per obtenir les imatges de les tincions cel·lulars es va usar un microscopi Olympus IX71 equipat amb epifluorescència i una càmera CCD DP70. Les imatges es van obtenir amb amb l'objectiu de 40x. Per mesurar el potencial de membrana mitocondrial amb el TMRM (*tetramethylrhodamine methyl ester*) es van visualitzar les cèl·lules en un microscopi confocal FV1000 d'Olympus usant l'objectiu de 60x.

3.4.1. Mitotracker

Per evaluar la integritat i funcionalitat dels mitocondris es poden usar fluorocroms com el Mitotracker X-Rosamina CM-H₂XROS que esdevé fluorescent després de l'oxidació, un procés que té lloc majoritàriament al mitocondri gràcies a la respiració oxidativa on és retingut posteriorment. Com que aquest procés només ocorre si els mitocondris són actius oxidativament, aquesta sonda és apropiada per discriminar la morfologia, distribució i funcionalitat dels mitocondris in vivo (Gadella & Harrison, 2002; De Vries et al, 2003).

Protocol

1. Es prepara una solució estoc a 1 mM en DMSO i es guarda a -20 °C
2. Es dilueix la sonda en medi estàndard (s'usa 100 nM)
3. S'inoculen les cèl·lules 3 minuts a temperatura ambient
4. Es renten les cèl·lules amb medi DMEM 1 g/L de glucosa
5. S'obtenen les imatges al microscopi òptic

Per estimar el percentatge de cèl·lules amb una alteració mitocondrial es van codificar les imatges i dos persones van classificar les cèl·lules segons la morfologia de la xarxa mitocondrial. Així, els cardiomiòcits amb els mitocondris organitzats de manera regular, distribuïts en línies i amb aparença de *spots* de mida similar es van classificar com a "organitzats". Els cardiomiòcits que no tenien els mitocondris organitzats d'aquesta manera regular, tant a nivell espacial com a nivell de mida, es van classificar com a "desorganitzats". Per cada condició es van analitzar un mínim de 75 cèl·lules de 8 camps

diferents. El nombre de mitocondris gegants es va estimar usant la eina “*Analyze Particles*” del programa ImageJ. Per fer-ho, es va treure el soroll de fons de les imatges i es van detectar les partícules de més de $2 \mu\text{m}^2$ i amb una circularitat de 0,5-1.

3.4.2. JC-1

La diferència de potencial de membrana mitocondrial es pot estimar mitjançant el fluorocrom *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide* (JC-1) que s'acumula de manera depenent del potencial mitocondrial. Quan el potencial de membrana mitocondrial és més gran JC-1 es troba en estat agregat i emet llum taronja, i quan és baix o els mitocondris estan despolaritzats, el compost es disgrega en monòmers que emeten llum verda.

Protocol

1. Es prepara una solució estoc a 5mM en DMSO i es guarda a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$
2. Es dilueix la sonda en medi estàndard (s'usa a $5 \mu\text{M}$).
3. S'inoculen les cèl·lules 30 minuts a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 i humitat
4. Es renten les cèl·lules amb medi
5. S'obtenen les imatges al microscopi òptic

3.4.3. Bodipy 493/503

Les gotes lipídiques intracel·lulars són acumulacions de lípids neutres, per això es poden visualitzar i quantificar mitjançant la sonda fluorescent lipofílica BODIPY 493/503 (BP) que a més és efectiva tant en cèl·lules fixades com in vivo.

Protocol

1. Es prepara una solució estoc a 10 mg/ml en DMSO i es guarda a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$
2. Es renten les cèl·lules amb PBS
3. S'incuben les cèl·lules amb BP $5 \mu\text{M}$ ($20 \mu\text{g/ml}$) en PBS a 37°C
4. Es renten les cèl·lules amb PBS
5. Es fa un rentat llarg de 10 minuts a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (si es vol es poden tenyir els nuclis amb Hoechst a $0,05 \mu\text{g/ml}$ durant aquest pas)
6. Es fa un rentat curt de nou amb PBS i s'obtenen les imatges al microscopi òptic

3.4.4. Immunofluorescència

La immunofluorescència ens permet detectar la presència de proteïnes en les cèl·lules in situ. En aquest cas fem servir la immunofluorescència indirecta, és a dir, amb un anticòs primari no marcat i un secundari marcat amb un fluorocrom.

Protocol

1. Fixació
 - a. Es fan 3 rentats de 5 min amb PBS a RT
 - b. S'incuba amb paraformaldehid al 4% dissolt amb PBS durant 12 minuts a RT. *Per a l'actinina alfa s'afegeix un pas de metanol fred 1-2 min
 - c. Es renta 3 cops més amb PBS
 - d. Es poden guardar amb PBS:Glicerol 1:1 a -20 °C durant 1 mes o, si es volen utilitzar aviat, en PBS a 4 °C durant una setmana.
2. Permeabilització i bloqueig
 - a. S'incuben les cèl·lules fixades durant 1h a RT en la solució de bloqueig (0,2% tritó X-100 (v/v), 2% BSA (v/v) i 2% HS (v/v) en PBS)
3. Immunodetecció
 - a. S'incuba la mostra 2 h amb l'anticòs primari a RT
 - b. Es fan 3 rentants de 5 minuts amb PBS
 - c. S'incuba la mostra amb l'anticòs secundari durant 1 h
 - d. *En el pas on s'incuben les cèl·lules amb l'anticòs secundari es pot afegir el Hoechst. Sinó s'incuben amb el Hoechst 20 min després de l'anticòs
 - e. ** En el cas de voler tenyir les gotes lipídiques també es fa una incubació de 10 min amb BODIPY 493/503 5 µM en PBS
 - f. Es fan 3 rentats més amb PBS
4. Muntatge (opcional)
 - a. Es treu el tampó de les cèl·lules i s'hi afegeix 40 µl (en pous de plaques p4) d'una solució amb Mowiol 6,6 mg/ml en 0,1 M Tris HCl pH 8,5, 20% glicerol (v/v) i DABCO al 0,5% (w/v).
 - b. A sobre s'hi col·loca un cobre-objectes de vidre i es deixa assecar a RT.

4. TÈCNIQUES DE BIOQUÍMICA

4.1. Preparació de les mostres per estudis bioquímics

4.1.1. Western blot

En general, s'utilitzen plaques p35. Les cèl·lules es renten dos cops amb PBS fred i després es recullen amb un *scraper* en 200 µl de tampó de lisi (125 mM Tris HCl amb 2% SDS (w/v)), inhibidors de proteases de ROCHE, 1 mM EDTA i, si cal, inhibidors de desacetilases (0,2 mM TSA i 10 nM NAM). S'incuba l'extret 5 min a 95 °C per ajudar a desnaturalitzar les proteïnes i es deixa refredar. Després es centrifuga a 10.000 rpm 10min i es guarda el sobrenedant a -20 °C. Per carregar el gel s'igualen les mostres a la mateixa concentració i s'afegeix tampó de càrrega 5x (375 mM Tris HCl pH 6.8, 50% glicerol, 10% SDS, 25% β-mercaptoetanol i blau de bromofenol) en proporció 1:5.

4.1.2. Activitat aconitasa i citrat-sintasa

S'utilitzen plaques p35. Les cèl·lules es renten dos cops amb PBS fred i després es recullen amb un *scraper* en 200 µl de tampó (Tris HCl 50 mM pH 7,4, inhibidors de proteases (sense EDTA), 0,5% Tritó (v/v) i 2,5 mM citrat sòdic). Es barreja amb la pipeta i s'incuba 5min en gel. Després es centrifuga a 13.000 rpm 5 min i es mesura l'activitat en fresc.

4.1.3. Activitats de la cadena respiratòria i l'oxidació d'àcids grassos

S'utilitzen plaques p35. Les cèl·lules es renten dos cops amb PBS fred i després es recullen amb un *scraper* en 200 µl de PBS amb inhibidors de proteases (sense EDTA), 0,005% saponina (w/v) i 0,2% dodecilmaltòsid (w/v). S'homogenitza l'extret amb un *pestle* de tefló 15 vegades i després s'incuba 10-30 min a 4 °C. Les activitats es mesuren en fresc.

4.1.4. Obtenció de fraccions enriquides en mitocondris

Per obtenir una fracció enriquida en mitocondris es va utilitzar un protocol que no manté intactes totes les propietats mitocondrials però és suficient per als estudis que realitzem nosaltres. Per conservar els mitocondris és millor congelar-los ràpidament amb nitrogen líquid i descongelar-los també ràpid a la mà per després mantenir-los en gel. El material i les solucions estan freds i el procediment es realitza també en fred i ràpid.

Protocol

1. Preparar el tampó MS (10 mM TrisHCl, 210 mM manitol, 70 mM sucrosa i 1 mM EGTA amb inhibidors de proteases sense EDTA).
2. Es fa servir un cor (millor si és fresc) rentat i tallat per eppendorff i es pesa per saber el material de partida. S'afegeix 1 ml de tampó MS per 0,2-0,4 g de teixit
3. S'usa un homogenitzador tipus Douncer i es fan 15 *strokes* amb el pestle A i 15 *strokes* amb el *pestle* B (pels cors adults se'n fan 20 de l'A i 20 del B)
4. Es centrifuga a 1.000 x g 10 min a 4 °C
5. Es descarta el pellet i es posa el SN a un tub nou
6. Es centrifuga a 12.000 x g 15 min a 4 °C
7. Es guarda el SN (citosol) per controls i es renta el pellet (mitocondris) amb 1 ml resuspenent-lo (opcional). Es repeteix aquest pas (opcional).
8. Es congela el pellet amb nitrògen líquid i es guarda a -80 °C sense sobrenedant
9. Es poden fer controls de qualitat per veure com d'enriquit està l'extret amb el sobrenedant (citosol) i els rentats mitjançant una activitat o un WB de proteïnes mitocondrials de membrana mitocondrial, matriu mitocondrial i citosol.

4.1.5. Detecció de carbonils amb anticossos contra DNP

Aquest protocol permet detectar proteïnes carbonilades amb un anticòs gràcies a una derivatització del grup carbonil amb la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).

Protocol

1. S'igualen la concentració de totes les mostres i es porten a un volum final de 20 µl
2. S'afegeixen 4 µl d' SDS al 24% (Cf. 6% SDS)
3. S'incuben a 95 °C 5 min al bany
4. Es centrifuguen a 10.000 rpm 10 min
5. Es recupera el sobrenedant
6. Es derivatitzen afegint 24 µl de solució de DNPH (10 mM DNPH en 10% TFA (v/v))
7. S'incuben 10 min a 25 °C al Thermomixer (cal exactitud amb el temps de cada tub)
8. S'afegeixen 24 µl de la solució de neutralització (Tris HCl 2 M, 30% glicerol(v/v), 15% β-mercaptoetanol (v/v)) per a que la solució quedi a pH més o menys neutre
9. Es carrega la mostra al gel directament

4.1.6. Isoelectroenfoc

La preparació de la mostra per a l'isoelectroenfoc és clau perquè s'ha d'aconseguir una solubilització completa de les proteïnes sense que n'afecti el pI (amb un detergent no iònic o zwieteriònic i amb els amfolits), cal desnaturalitzar les proteïnes (amb urea o tiourea), i també reduir-les (amb DTT). Les cèl·lules es creixen en una placa p35, s'hi fan 2 rentats amb PBS amb 1mM EDTA, i es recullen en 200 µl de tampó de rehidratació (RHB) V de GE amb un *scraper* i es preparen en fresc (en cas de no poder-ho fer es poden guardar a -20 °C). Per preparar la mostra per l'isoelectroenfoc es descongelen (si cal) i es sonica la mostra al bany 15 segons. S'incuben 2 h a 22 °C i 700 rpm. Es centrifuga a 10.000 rpm 10 minuts i es recull el sobrenedant. Es preparen 80 µg de proteïna pels gels analítics i 300 µg pels preparatius. S'hi afegeix DTT 100 mM i amfolits fins al volum que marca la casa comercial de la tira. S'incuba 2 h a 22 °C i 700 rpm.

4.1.6.1. Gels no-desnaturalitzants

Els mitocondris es solubilitzen en 200 µl de tampó Tris HCl 50mM pH 7,4 amb inhibidors de proteases i es divideixen en diferents tubs als quals s'afegeixen les diferents quantitats de detergent (DDM i Tritó X-100), quelants de metalls (EDTA) i sals (NaCl). S'incuba a la nòria a 4 °C durant 30 min i s'afegeix una solució solubilitzadora (Tris HCl 50mM pH 7,4, 40% glicerol i blau de bromofenol) en proporció 1:3.

4.1.6.2. Blue-Native PAGE

Segons les condicions establertes pels experiments de mobilitat de la frataxina es van fixar les condicions de preparació de la mostra per al Blue-Native PAGE. El pellet mitocondrial d'1 mg es resuspen en 90 µl de Blue-Native PAGE Sample Buffer 1x (Life Technologies) amb DDM al 2% (w/v) i Tritó X-100 al 0.5% (w/v). S'incuba 15 min en gel i es centrifuga a 15.500 x g durant 30 min a 4°C. Es guarda el sobrenedant i s'hi afegeix blau comassie G-250 al 0,5%.

4.1.7. Quantificació de les mostres

Les mostres amb SDS es dilueixen 10 vegades en aigua i es mesuren com diu el protocol del Kit de Qubit® *Protein Assay*. Per mostres sense SDS (com les d'activitats o les de RHB)

es mesura la quantitat de proteïna amb el BioRad® *Protein Assay*. En alguns experiments s'utilitza l'absorbància a 280 nm mesurada al Nanodrop per tenir una idea relativa de la quantitat de proteïna.

4.2. Proteòmica

La proteòmica és l'estudi bioquímic de les proteïnes. El proteoma és el conjunt sencer de proteïnes expressada per un genoma, cèl·lula, teixit biològic o un organisme. La proteòmica permet determinar composició aminoacídica, la presència de modificacions post-traduccionals (com fosforilacions, acetilacions i d'altres) i d'isoformes (proteïnes diferents que depenen del mateix gen), permet analitzar la composició dels complexos proteics (grups de proteïnes íntimament relacionades que constitueixen una unitat funcional).

4.2.1. Tècniques d'electroforesi

S'utilitzen per separar molècules (en aquest cas, proteïnes) mitjançant un camp elèctric.

4.2.1.1. Electroforesi desnaturalitzant (SDS-PAGE)

Per aquest tipus d'electroforesi s'utilitza la presència del detergent iònic dodecilsulfat sòdic (SDS) que s'uneix a les proteïnes en una proporció fixa SDS/aminoàcid, fent que les proteïnes adquireixin una càrrega neta negativa. Això fa possible la separació de les proteïnes segons el seu pes molecular en un sistema d'electroforesi discontinua (Laemmli 1970). Els sistemes utilitzats han estat el *Miniprotean II* (BioRad) per gels monodimensionals i bidimensionals de 7 cm i el sistema *Ettan Dalt* (GE) per gels bidimensionals de 24 cm.

Protocol

1. Es prepara el gel separador: Tris HCl 375 mM pH 8,9, acrilamida/bisacrilamida (30:0,8) (w/w) 7-15% (v/v), SDS 0,1% (w/v), persulfat amònic 0,005% (w/v) i TEMED 0,025% (v/v)
2. Es prepara el gel concentrador: Tris HCl 125 mM pH 6,8, acrilamida/bisacrilamida (30:0,8) (v/v) 5% (v/v), SDS 0,1% (w/v), persulfat amònic 0,005% (w/v) i TEMED 0,025% (v/v)

3. Es carrega la mostra al gel (de 10 a 30 µg de proteïna per carril).
4. S'omple la cubeta amb el tampó d'electroforesi 25 mM Tris HCl, 192 mM Glicina, 0,1% SDS (w/v)
5. L'electroforesi es realitza a amperatge constant (15 mA/gel) fins que el front de proteïna arriba al gel separador, on s'incrementa l'amperatge a 20-25 mA/gel fins que el front arriba al final del gel.

4.2.1.2. Electroforesi en gels no desnaturalitzants

En aquells casos en què es requeria preservar la integritat dels complexos proteics, com per exemple per mesurar activitats enzimàtiques o per observar la mobilitat de les proteïnes en forma nativa, es realitza l'electroforesi sense SDS i en condicions no reductores. En aquest cas, les proteïnes migren segons el seu pes molecular, forma i càrrega degut a que no s'afegeix cap detergent iònic a la mostra ni cap agent desnaturalitzant i/o reductor. L'extret proteic ha d'estar lliure d' SDS i a la mostra se l'hi incorpora sacarosa (5% v/v) o bé glicerol (10% v/v) i blau de bromofenol (0,0125% w/v). La preparació dels gels és la mateixa que en l'apartat anterior però sense SDS. La cursa es realitza a 4 °C i les condicions elèctriques són les mateixes que en l'apartat anterior.

Si es vol transferir el gel no desnaturalitzant a una membrana per dur a terme un *western blot*, primer cal incubar el gel durant 1 h aproximadament en tampó equilibrador i reductor amb Tris 0,375 M pH 8,9 SDS 1% (w/v) i β-mercaptoetanol 1% (v/v).

4.2.1.3. Electroforesi bidimensional (1a dimensió de Blue-Native PAGE)

Aquesta tècnica és un tipus d'electroforesi nativa, que enlloc de detergent utilitza blau de Comassie en un tampó catiònic, així otorga una càrrega negativa a la proteïna o complex a estudiar preservant-ne la forma nativa. D'aquesta manera es mantindran els complexos proteics estables i migraran només segons el seu pes molecular. Serveix per aïllar complexos de membranes biològiques i homogenats cel·lulars o tissulars. En el nostre cas s'ha utilitzat per identificar interaccions fisiològiques entre la frataxina i altres proteïnes. Els complexos nadius es poden recuperar dels gels o fer una segona dimensió (SDS-PAGE) i identificar les proteïnes mitjançant un *western blot* o l'espectrometria de masses (MS). La

primera dimensió es realitza en uns gels de gradient (4-16% d'acrilamida) de Life Technologies i la segona en gels SDS-PAGE de 7 cm estàndards.

4.2.1.4. Electroforesi bidimensional (1a dimensió d'isoelectroenfoc)

Mitjançant aquesta tècnica es poden separar les proteïnes d'una mescla biològica seguint un primer pas d'isoelectroenfoc (IEF), on les proteïnes es separen segons el seu punt isoelèctric (pI). Aquesta tècnica de separació de molècules carregades, basada en l'electroforesi, és ideal per separar molècules amfòteres com les proteïnes. Es genera un gradient de pH mitjançant un camp elèctric que passa per tampons amfotèrics. Les proteïnes es quedaran aturades quan la seva càrrega neta esdevingui 0, és a dir quan el pH sigui igual al seu punt isoelectric. Per a dur a terme l'isoelectroenfoc s'utilitzen unes tires d'acrilamida deshidratades que contenen un gradient de pH immobilitzat (tires IPG) de pH 3 a 10 no lineal (NL) de General Electric (GE) de 24 cm. Seguidament, mitjançant una segona dimensió, es separen les proteïnes segons el seu pes molecular, utilitzant un sistema d' SDS-PAGE. Per aquest tipus d'electroforesi s'ha utilitzat el sistema *Ettan Dalt* de GE Healthcare. Els gels utilitzats en la segona dimensió han estat gels de 25,5 x 20 cm.

Protocol

1. Es fa una rehidratació passiva de la tira IPG (sense electricitat)
 - a. Es descongela la tira a RT (GE 24 cm pH 3-10 NL), es posa la mostra a una cubeta de plàstic i es cobreix amb la tira amb l'acrilamida cara avall. Damunt la tira es posa oli mineral per evitar l'evaporació
 - b. Es deixa ON (15-16 h) rehidratant a RT
2. L'endemà es du a terme l'isoelectroenfoc
 - a. Es posa la tira dins la cubeta d'IEF cara amunt i s'hi posen uns papers als extrems per evitar que els electrodes cremin l'acrilamida.
 - b. S'usa el programa: (1) 500V 1h lent; (2) 3000Vx23h 70000C ràpids; (3) 500V 3h ràpid
3. L'endemà es treuen i es congelen les tires o es segueix amb la segona dimensió. Abans de fer la segona dimensió hi ha un pas on s'equilibren les tires per reduir les proteïnes i on s'afegeix glicerol per densitat a la mostra.
 - a. Es renta la tira amb aigua milliQ breument.

- b. S'incuba la tira amb la solució equilibradora I (Tris HCl 375 mM pH 8,8, urea 6 M, SDS 2% (w/v), DTT 130 mM, glicerol 20% (w/v)) durant 15 min
 - c. S'incuba la tira amb la solució equilibradora II (Tris 375 mM HCl pH 8.8, urea 6 M, SDS 2% (w/v), iodoacetamida 135 mM, glicerol 20% (w/v)) durant 15 min i es manté la tira amb el tampó d'electroforesi
4. Es fa una segona dimensió amb gels SDS-PAGE
- a. Per a la segona dimensió es preparen els gels del sistema *Ettan Dalt* (60 ml pel separador i 5 ml pel concentrador) tal com s'explica a l'apartat de l'SDS-PAGE.
 - b. Es carrega la tira al gel i es cobreix amb una solució d'agarosa al 0,5% (w/v) i blau de bromofenol al 0,002% (w/v) en tampó de l'electroforesi
 - c. Les condicions de la cursa són de 12 mA per gel durant 15 hores

4.2.2. Western blot

Les proteïnes que han estat separades mitjançant un SDS-PAGE, poden ser transferides a una membrana mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric que poden ser detectades després amb l'addició d'anticossos específics. En aquest treball s'han utilitzat membranes de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) amb un porus μm de 0,45 μm (estàndards i baixes en fluorescència) i membranes de nitrocel·lulosa (NC) per a la detecció de frataxina. La transferència s'ha realitzat utilitzant dos sistemes semisecs: *Hoeffer Semiphor* (GE Healthcare) i *ECL semidry* (Amersham Biosciences)

Protocol

1. Transferència de proteïnes del gel a la membrana:
 - a. Membrana de PVDF:
 - i. Es submergeix la membrana de PVDF en metanol durant 15 segons
 - ii. S'incuba la membrana amb tampó de transferència (Tris HCl 48 mM glicina 39 mM SDS 0,0375% (w/v) i metanol 10% (v/v)) uns 15 min
 - b. Membrana de NC:
 - i. S'incuba la membrana amb tampó de transferència (Tris HCl 48 mM glicina 39 mM i metanol 20% (v/v)) com a mínim 15 min.

- c. Es submergeixen dos papers de filtre (papers Whatman) en tampó de transferència.
- d. Després de l'electroforesi s'incuba el gel amb tampó de transferència durant 1-2 min.
- e. Es realitza el muntatge del sandvitx seguint l'ordre (+) ànode - paper Whatman - membrana - gel - paper Whatman - càtode (-)
- f. Les condicions elèctriques són
 - i. PVDF: 1 mA/cm² de membrana 1h
 - ii. NC: 0,8 mA/c m² de membrana 1h
 - iii. SI les proteïnes tenen un PM>100 KDa es pot incrementar el temps

2. Bloqueig

- a. Es bloqueja la membrana amb una solució de llet en pols al 5% en TBST (20 mM Tris HCl pH 8, NaCl 125 mM i Tween-20 0,1% (v/v)) per tal d'evitar interaccions inespecífiques entre l'anticòs i la membrana. El bloqueig es realitza durant 1h a temperatura ambient o bé a 4 °C tota la nit.

3. Immunodetecció

- a. S'incuba la membrana amb l'anticòs primari un mínim d'1 h a temperatura ambient fins a 16 h a 4°C. Els anticossos utilitzats figuren a la taula 3
- b. Es fan 3 rentats de 5 min amb TBST
- c. S'incuba la membrana amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa o fluorocroms un mínim d'1 h a temperatura ambient. Els anticossos utilitzats figuren a la taula 3
- d. Es fan 5 rentats de 5 min amb TBST
- e. S'incuba la membrana amb un substrat de la peroxidasa que dona lloc a un producte quimioluminescent. Els substrats utilitzats han estat el de Millipore i el *SuperSignal* de Pierce. En el cas de la detecció fluorescent, la membrana es deixa assecar durant 10 minuts entre dos papers de filtre
- f. S'adquireix la imatge utilitzant la càmera CCD de ChemiDoc XRS (BioRad) en posició de quimioluminescència o del Versadoc MP (BiorRad) amb l'excitació i emissió corresponents a cada fluorocrom

Anticòs	Dilució	Casa comercial	Referència
SOD-1	1/3.000	Chemicon/Millipore	Ab1237
SOD-2	1/5.000	Stressgen	SOD-110
	1/2.000	Stressgen	SOD-111
Frataxina	1/500	Santa Cruz Biotechnology	sc-25820
MCAD	1/500	Santa Cruz Biotechnology	sc-365109
VLCAD	1/1.000	Santa Cruz Biotechnology	sc-271225
ETFDH	1/1.000	Santa Cruz Biotechnology	sc-242642
ACO2	1/2.000	Sigma	HPA001097
ETFB	1/1.000	Abcam	ab104944,
HADHA	1/1.000	Abcam	ab54477
OXPHOS Kit	1/1.000	Life Technologies	458099
PGC1 α	1/1.000	Cayman	101707
3NT	1/500	Abcam	Ab5411
DNP	1/10.000	Dako	V0401
GSH	1/1.000	Abcam	ab19534
Cy3-IgG mouse	1/500	Chemicon/Millipore	AP192C
Cy5-IgG rabbit	1/500	Chemicon/Millipore	AP182S
HRP-IgG mouse	1/40.000	Pierce	31400
HRP-IgG rabbit	1/40.000	Pierce	31402
HRP-IgG goat	1/25.000	Invitrogen	A10549
HRP-IgG rat	1/5.000	Life Technologies	81-9520

Taula 3. Llista d'anticossos primaris i secundaris utilitzats.

4.2.3. Tincions de gels

4.2.3.1. Blau de Coomassie

Es submergeix el gel en una solució colorant que conté blau coomassie G250 0,1% (w/v), àcid acètic 10% (v/v) i isopropanol 25% (v/v). Posteriorment es transfereix el gel a una solució decolorant que conté àcid acètic 10% (v/v) i isopropanol 10% (v/v). S'utilitza aquesta tinció principalment per a gels monodimensionals quan la quantitat de proteïna és elevada. Aquest mètode detecta de 10-25 ng de proteïna.

4.2.3.2. Coomassie Biosafe

Es renta el gel 3 vegades amb aigua durant 5 minuts per treure l'SDS, i es tenyeix durant 1 hora amb la solució de *Coomassie Biosafe* de BioRad. Després es renta amb aigua milliQ de nou durant 20 min. Té una sensibilitat de 5-10 ng

4.2.3.3. Nitrat de plata

Es segueixen les indicacions dels kits utilitzats que són *Silver Staining Protein kit* de GE Healthcare i *ProteoSilverTM Plus* de Sigma. Aquest mètode s'utilitza per visualitzar les proteïnes (*spots*) en gels bidimensionals ja que té una sensibilitat de 0,5-1 ng de proteïna.

4.2.3.1. SyproRuby i Flamingo

Es fixa el gel ON en una solució de fixació que conté 10% metanol (v/v) i 7% àcid acètic (v/v). Posteriorment, es transfereix el gel a una solució de *SyproRuby* (BioRad) i s'incuba durant 3 hores o bé en una solució de *Flamingo* (BioRad) durant 8 hores protegint els gels de la llum. Aquests mètodes tenen una sensibilitat semblant al nitrat de plata.

4.2.4. Tinció de membranes

Per determinar les diferències de càrrega als diferents carrils a l'hora de fer un *western blot* de manera rutinària es fa servir la immunodetecció d'una proteïna que s'usa com a control de càrrega com ara la tubulina, l'actina o la GAPDH. Tot i així, és més ràpid, econòmic i simple fer una tinció de tota la proteïna de la membrana, que és compatible amb el bloqueig. A més, té una linearitat superior que altres mètodes (Romero-Calvo et al., 2010; Welinder & Ekblad, 2011).

En el cas de membranes de PVDF, la membrana es submergeix en la solució de tinció amb 0,1% blau de comassie(w/v), 50% metanol (v/v) i 10% àcid acètic (v/v). Un cop tenyida es destenyeix el fons en una solució amb 50% metanol i 10% acètic i es deixa assecar. Per a membranes de nitrocel·lulosa, es fa servir una solució de Ponceau S al 0,1% en 5% àcid acètic (v/v). Es deixa tenyint uns minuts i es destenyeix amb aigua.

4.2.5. Adquisició de la imatge i anàlisi dels gels i les membranes

Les imatges de quimioluminiscència de les membranes es van adquirir amb una càmera CCD al ChemiDoc XRS de Biorad i les de fluorescència al VersaDoc MP de la mateixa casa. L'anàlisi de la intensitat es va mesurar per volums amb els programes QuantityOne i ImageLab de BioRad. Després de la tinció de proteïna, la imatge de la membrana es va adquirir amb el densitòmetre GS-800 de BioRad i també es va analitzar la intensitat

mitjançant volums. La relació entre la intensitat de la proteïna d'interès i la intensitat de la tinció de proteïna es va usar per obtenir els nivells relatius.

Les imatges de dels gels es van adquirir amb una càmera CCD al VersaDoc MP BioRad. En el cas dels gels bidimensionals, l'anàlisi de la intensitat es va mesurar per volums normalitzant amb el mètode LOESS amb el programa PDQuest de BioRad. Aquest mètode de normalització depèn de la intensitat mitjana i és menys susceptible a *outliers* que una regressió lineal simple perquè corregeix per les diferències de tinció. El model calcula una corba que minimitza la distància a tots els punts del gràfic de dispersió. Aquesta corba es fa servir per normalitzar cada *spot*.

4.3. Espectrofotometria

L'espectrofotometria serveix per mesurar i quantificar, en funció de la longitud d'ona, substàncies i microorganismes.

4.3.1. Ferro

Per mesurar el ferro intracel·lular es recullen les cèl·lules, es digereixen amb àcid nítric i es determina la concentració de ferro fent servir el quelant *bathophenanthroline disulfonic acid* (BPS) (Tamarit, Irazusta, Moreno-Cermeño, & Ros, 2006).

Protocol

1. S'utilitzen p35 i un control només amb medi per fer el blanc
2. Es recullen les cèl·lules:
 - a. Es fan dos rentats amb PBS amb 1mM EDTA
 - b. Es recullen les cèl·lules amb un *scraper* en 200 µl de tampó MES KOH pH 4,5 amb 1% SDS en un tub amb *o-ring* (STARSTED) i es guarda a -20 °C
3. Es digereixen les cèl·lules
 - a. S'afegeixen 8,63 µl d'àcid nítric al 69,5% (v/v) (Cf. 3%)
 - b. Es barreja amb la pipeta
 - c. S'incuba a 98 °C ON a 700 rpm al Thermomixer
 - d. Es centrifuga a 10.000 rpm 5 min
4. Es mesura el contingut de ferro

- a. El sobrenedant es passa a un eppendorf nou i s'afegeixen
 - i. 112,5 µl d'aigua milliQ
 - ii. 60 µl d'una solució d'ascorbat sòdic a 38 mg/ml
 - iii. 126 µl d'una solució d'acetat d'amoni provinent d'una solució d'acetat d'amoni saturada i diluïda 3 vegades en aigua milliQ
 - b. Es passa el contingut de l'eppendorf a la cubeta i es llegeix l'absorbància en diferents longituds d'ona:
 - i. A 535 (Ferro)
 - ii. A 680 (Soroll de fons o referència)
 - iii. A 420 (Mesura relativa al nombre de cèl·lules)
 - c. S'afegeixen 5,63 µl de BPS a 34 mg/ml a la cubeta i es barreja
 - d. Es torna a llegir l'absorbància a les diferents longituds d'ona
5. Es calcula la concentració de ferro
- a. Es calcula la diferència : $(A_{BPS} - A)$ per a cada longitud d'ona
 - b. Es calculen les equacions: $Eq1 = A420 - A680$; $Eq2 = A535 - A680$
 - c. El resultat s'obté en nmols de ferro: $(Eq2_{mostra} - Eq2_{blanc}) / (Eq1_{mostra} - Eq1_{blanc})$

4.3.2. Glucosa, lactat i àcids grassos

Per estudiar el consum de substrats energètics es realitza una mesura indirecta de la glucosa, el lactat i els àcids grassos lliures del medi amb kits de bioquímica analítica pel sèrum que donen un compost colorimètric després d'una sèrie de reaccions enzimàtiques. Per la glucosa s'utilitza el de BioSystems (#11803) i 2 µl de medi, pel lactat el de Spinreact (#1001330) amb 1,5 µl de medi i pels àcids grassos el kit de Roche (#11383175001) amb 70 µL de medi. Es mesurar tots en una placa p96 en relació amb una corva estàndard.

4.3.3. Activitats enzimàtiques

L'obtenció de les mostres s'ha dut a terme tal com s'explica a l'apartat de "Preparació de les mostres". La mesura de les activitats es realitza a l'espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401. Cada mostra es mesura per duplicat amb dues quantitats d'extret diferent mesurades en sentit invers. S'utilitza la part lineal de la corva per calcular l'activitat

4.3.3.1. Aconitasa

L'aconitasa (ACO) catalitza la conversió del citrat a isocitrat amb un pas intermedi on es forma cis-aconitat. La reacció forma part del cicle de Krebs. L'activitat s'ha mesurat acoplada a la de l'enzim isocitrat-deshidrogenasa i la formació de NADPH. L'activitat es calcula com a μmol de citrat/min/mg de proteïna usant un coeficient d'extinció molar del NADPH a 340 nm $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Protocol

1. Es barregen dins una cubeta de plàstic els següents compostos
 - a. 800 μl Tris HCl 50 mM pH 7,4
 - b. 100 μl Citrat sòdic (Cf. 5 mM)
 - c. 50 μl NADP (Cf. 0,2 mM)
 - d. 50 μl MnCl_2 (Cf. 0,6 mM)
 - e. 2 μl ICDH (0,25 U)
2. Es mesura l'absorbància a 340 nm durant 180 segons a 25 °C per fer el blanc
3. S'afegeix l'extret (20 μl)
4. Es mesura l'absorbància a 340 nm durant 180 segons a 25 °C per a l'activitat (primer minut lineal)

4.3.3.2. Citrat-sintasa

La citrat-sintasa (CS) també pertany al cicle de Krebs i catalitza la síntesi de citrat a partir d'acetil-CoA i oxalacetat. L'activitat es mesura acoblant-la a la reducció del 5,5'-ditiobis(2-àcid nitrobenzoic) (DTNB) (Shepherd & Garland, 1969). L'activitat es calcula com a μmol de DTNB/min/mg de proteïna usant un coeficient d'extinció molar del DTNB a 412 nm $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Protocol

1. Es barregen dins una cubeta de plàstic els següents compostos i
 - a. 810 μl aigua
 - b. 100 μl DTNB (0,4 mg/ml en Tris HCl 1 M pH 8,1)
 - c. 10 μl Acetil-CoA (10 mg/ml)
 - d. S'afegeix l'extret (4 μl)

2. Es mesura l'absorbància a 412 nm durant 120 segons a 25 °C per fer el blanc
3. S'afegeix el substrat: 7 µl Oxalacetat (8,5 mg/ml en aigua)
4. Es mesura l'absorbància a 412 nm durant 120 segons a 25 °C per fer l'activitat (últim minut lineal)

4.3.3.3. Cadena de transport electrònic (complexes I+III)

L'activitat de transport d'electrons entre els complexos I i III de la cadena de transport electrònic es mesura afegint el substrat del complex I (NADH) i mesurant la reducció del citocrom c per part del complex III, afegint cianur de sodi que bloqueja el transport d'electrons al complex IV. La rotenona inhibeix el complex I i l'activitat resulta de sotstreure l'activitat que resta no sensible a rotenona de l'activitat mesurada en afegir el substrat NADH. L'activitat es calcula com a µmol de citocrom c oxidat/min/mg de proteïna usant un coeficient d'extinció molar del citocrom c a 550 nm $\epsilon_{550} = 20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Protocol

1. Es barregen dins una cubeta de plàstic els següents compostos
 - a. 727 µl aigua
 - b. 200 µl Tris 50 mM pH 8 (Cf. 10 mM)
 - c. 50 µl Citocrom c 10 mg/ml (Cf. 40 µM)
 - d. 3 µl NaCN 80 mM (Cf. 240 µM)
 - e. 20 µl d'extret
2. Es mesura l'absorbància a 550 nm durant 600 segons a 25 °C per fer el blanc
3. S'afegeix el substrat 20 µl NADH 40 mM (Cf. 0,8 mM)
4. Es mesura l'absorbància a 550 nm durant 600 segons a 25 °C per a l'activitat
5. S'afegeix l'inhibidor 2 µl rotenona 2mM (Cf. 4 µM)
6. Es mesura l'absorbància a 550 nm durant 600 segons a 25 °C per a l'activitat inespecífica

4.3.3.4. Cadena de transport electrònic (complexes II+III)

L'activitat de transport d'electrons entre els II i III de la cadena de transport electrònic es mesura afegint el substrat del complex II (succinat) i mesurant la reducció del citocrom c per part del complex III, afegint cianur de sodi que bloqueja el transport d'electrons al

complex IV. La rotenona inhibeix el complex I i la thenoiltrifluoroacetona (TTFA) el complex II. L'activitat resulta de sostreure l'activitat restant en afegir l'inhibidor TTFA. L'actiuat es calcula com a μmol de citocrom c oxidat/min/mg de proteïna usant un coeficient d'extinció molar del citocrom c a 550 nm $\epsilon_{550} = 20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Barrientos, Fontanesi, & Díaz, 2009).

Protocol

1. Es barregen dins una cubeta de plàstic els següents compostos
 - a. 716 μl aigua
 - b. 200 μl KH_2PO_4 50 mM pH 7,8 (Cf. 10 mM)
 - c. 4 μl EDTA 0,5 M (Cf. 2 mM)
 - d. 3 μl NaCN 80 mM (Cf. 240 μM)
 - e. 2 μl rotenona 2 mM (Cf. 4 μM)
 - f. 5 μl ATP 40 mM (Cf. 0,2 mM)
 - g. 20 μl d'extret
 - h. 20 μl succinat 500 mM (Cf. 10 mM)
2. Es mesura l'absorbància a 550 nm durant 600 segons a 25 °C per fer el blanc
3. S'afegeix el substrat: 50 μl citocrom c 10 mg/ml (Cf. 40 μM)
4. Es mesura l'absorbància a 550 nm durant 600 segons a 25 °C per a l'activitat
5. S'afegeix l'inhibidor: 5 μl TTFA 100 mM (Cf. 0,5 mM)
6. Es mesura l'absorbància a 550 nm durant 600 segons a 25 °C per a l'activitat inespecífica

4.3.3.5. Oxidació dels àcids grassos

L'oxidació dels àcids grassos es du a terme gràcies a diferents reaccions químiques en les quals un àcid gras acaba donant acetil-CoA que passarà al cicle de Krebs per acabar produint CO_2 i energia. El pas previ és l'activació dels àcids grassos a acil-coenzim A (acil-CoA) Posteriorment, el transportador carnitina-palmitoiltransferasa trasloca els acil-CoA a l'interior de la matriu mitocondrial on es dona la β -oxidació. L'acetil-CoA produït a la β -oxidació serà oxidat al cicle de Krebs. La β -oxidació es produeix majoritàriament a la matriu mitocondrial, però també es pot produir dins els peroxisomes. Per a l'actiuat es dona palmitoil-CoA com a substrat, juntament amb altres substrats i cofactors de la β -

oxidació i del cicle de Krebs i es recullen mostres a diferents temps. Per mesurar l'activitat s'analitza la desaparició del palmitoil-CoA amb HPLC com a μmol de palmitoil-CoA/min/mg de proteïna usant l'HPLC per detectar la quantitat de palmitoil-CoA.

Protocol

1. Es barreja l'extret (42,5 μl) amb 127 μl de la barreja de reacció (Tris HCl 27,6 mM, palmitoil-CoA 0,15 mM, oxalacetat 0,1 mM, GDP 0,1 mM, CoA 0,3 mM i NAD 1,5 mM)
2. S'incuba a 37 °C durant 5, 10 i 20 minuts
3. A cada temps s'agafen 50 μl de la barreja de l'activitat i s'atura la reacció afegint 2,6 μl d'HCl 2 M
4. S'incuba en gel durant 10 minuts
5. S'afegeixen 10 μl de KOH 1 M per a que quedi a un pH aproximadament neutre
6. Es guarda congelat a -80 °C fins a ser analitzat amb l'HPLC
7. Es fa un control sense extret per poder analitzar l'estabilitat del palmitoil-CoA

4.4. Cromatografia líquida o HPLC

S'ha utilitzat la cromatografia líquida per mesurar els nivells de palmitoil-CoA en la mesura de l'activitat d'oxidació dels àcids grassos, així com per analitzar el contingut dels nucleòtids fosfats ATP, ADP i AMP.

4.4.1. Àcids grassos

El contingut de palmitoil-CoA es determina per HPLC usant l'absorbància del coenzim A.

Protocol

1. Es descongelen els extrems de les activitats de -80 °C en gel
2. Es centrifugen a 14.000 rpm a 4 °C durant 10 minuts
3. Els sobrenedants es posen en tubs d'HPLC i es programa l'injector automàtic.

La cromatografia es du a terme a un flux de 1,25 ml/min en un HPLC Agilent Infinity 1200 amb una columna Kromasil® C18 (4,60x250 mm amb partícules de 5 μm) de Phenomenex (#00G-3033-E0). Tampó A: Fosfat potàssic 25 mM pH 6,9. Tampó B: Acetonitril. El

gradient utilitzat va ser 0min 30% ACN; 2min 30% ACN; 7min 40% ACN; 16min 46% ACN; 21min 62% ACN; 26min 62% ACN; 27min 30% ACN. S'injecten 10 µl de mostra i es detecta l'absorbància a 260 nm. Els pics s'identifiquen pel temps de retenció amb estàndards i es quantifiquen per l'àrea.

4.4.2. Nucleòtids fosfat

Els nucleòtids fosfat es van quantificar per HPLC com es descriu a (Manfredi, Yang, Gajewski, & Mattiazzi, 2002) amb algunes modificacions.

Protocol

1. Es renten les cèl·lules amb PBS fred
2. S'afegeixen 150 µl d'HClO₄ als pous i es congela la placa en nitrogen líquid
3. Es recullen les cèl·lules amb un *scraper*
4. S'homogenitza la suspensió cel·lular amb una xeringa de 20 G
5. Es mantenen 10 minuts en gel
6. Es centrifuga a 14.000 rpm a 4 °C durant 10 minuts
7. Es recull el sobrenedant i es guarda el pellet per mesurar la quantitat de proteïna*
8. Es neutralitza el sobrenedant afegint 20 µl de K₂PO₄ i es comprova amb una tira indicadora de pH que estigui entre 6 i 7
9. Es congela a -80 °C com a mínim dues hores per a que precipiti el perclorat sòdic
10. Es centrifuga de nou a 14.000 rpm a 4 °C durant 10 minuts
11. S'analitza a l'HPLC el contingut de nucleòtids fosfat

La cromatografia es du a terme a un flux de 0,2 ml/min en un sistema Waters 625 acoblat a un detector UV-diode array amb una columna C18 DeltaPak® HPI (2x150 mm amb partícules de 5 µm) de Waters (#WAT052765). Es va usar un gradient linial des de 100% del tampó A fins a 100% del tampó B durant 25 min. Tampó A: NaH₂PO₄ 25 mM, 100 mg/l TBA, pH 5. Tampó B: NaH₂PO₄ 200 mM, 10% acetonitril (v/v) 100 mg/l TBA, pH 4. S'injecten 10 µl de mostra i es detecta l'absorbància a 260 nm. Els pics s'identifiquen pel temps de retenció amb estàndards i es quantifiquen per l'àrea. El pellet de proteïna es respuspen amb RHB i es mesura la quantitat amb el mètode Bradford

4.5. Metabolòmica

La metabolòmica és l'estudi de les empremtes (o perfils) de metabòlits que deixen els processos cel·lulars específics.

Protocol

1. Per recollir els cultius i extreure els metabòlits
 - a. Es renten dos cops amb solució isotònica (NaCl 0,9%) freda
 - b. Es recullen amb 0,5 ml de la mateixa solució
 - c. Es centrifuga a 14.000 durant 15 segons
 - d. Es descarta el sobrenedant i es guarda el pellet
 - e. Es resuspen el pellet en 200 µl al 50% d'acetonitril
 - f. Es barreja bé amb la pipeta i el vòrtex
 - g. Es centrifuga a 13.000 rpm 10 min
 - h. Es treu el sobrenedant i es divideix en dos tubs que es guarden a -80 °C
2. Per mesurar el contingut de metabòlits com a referència
 - a. Es mesura l'espectre d'absorció i l'absorbància a 260 nm del sobrenedant al Nanodrop
3. Per mesurar la quantitat de proteïna com a referència
 - a. Es resuspen el pellet amb 100 µl de RHB 1 h a 22 °C
 - b. Es centrifuga a 14.000 rpm 10 minuts
 - c. Es mesura la proteïna amb el mètode Bradford

Les dades de metabolòmica han estat adquirides mitjançant un equip LC ESI-QTOF-MS/MS 6520 (Agilent Technologies). El mètode cromatogràfic consisteix en injectar 4 µl de l'extret desproteïnit en una columna C18 Luna® (3µm pfp(2) 150x2 mm) de Phenomenex. El flux es manté constant a 200 µl/min i el gradient comença amb un 5% de fase mòbil B (ACN:H₂O en proporció 95:5 (v/v) amb 0,1% d'àcid fòrmic). Seguidament s'arriba al 100% de la fase mòbil en el minut 20, es manté durant 5 min i es reequilibra 6 min a 5% de fase mòbil. La fase mòbil A és aigua milliQ amb 0,1% d'àcid fòrmic.

Les dades es recullen en mode positiu (M+H⁺) i negatiu (M-H⁺) operant en mode TOF de rastreig des de 100 fins a 3.000 m/z. El voltatge capil·lar és de 3.500 V i la velocitat

d'escaneig d'1 escan/s. S'utilitza N₂ com a gas del nebulitzador (amb un flux de 5 l/min i una temperatura de 350°C). Per a l'obtenció dels resultats s'ha utilitzat el processador *MassHunter Data Analysis Software* (Agilent Technologies).

Per a l'anàlisi de les dades de l'estudi metabolòmic s'ha utilitzat una aproximació no dirigida per obtenir i comparar els perfils metabòlics generals dels diferents grups de mostres. En aquest cas s'han analitzat les mostres control (shscr) i els diferents interferits de frataxina (sh34, sh37 i sh80), usant quatre rèpliques per condició. Per fer l'anàlisi estadístic s'ha realitzat un anàlisi de components principals (PCA) no supervisat, i un anàlisi discriminant dels mínims quadrats parcials (PLS-DA) que sí que és supervisat. La conversió de les dades dona dues matrius, amb les variables i el pes de cada una d'aquestes a l'anàlisi es projecta en els PCA i els PLS-DA. Cada component principal (PC) és una combinació lineal dels paràmetres de les dades originals. Cada PC posterior explica la màxima quantitat de variància possible que no ha estat tinguda en compte pels PC anteriors. Els PC són ortogonals els uns als altres. La diferència entre el PCA i el PLS-DA és que aquest últim té en compte el nom de cada classe en l'anàlisi.

4.6. Anàlisi estadístic

Els experiments han estat repetits com a mínim tres vegades amb preparacions independents de cardiomiòcits, excepte en els que s'especifica un nombre determinat. Els valors s'expressen coma mitjanes +/- error estàndard. Les dades obtingudes de cada experiment independent es van fer servir per l'anàlisi estadístic, comparant els interferits amb el control amb un anàlisi T d'Student. En tots els casos, la significació estadística ve donada per valors de $p < 0,05$ (*) o $p < 0,01$ (**).

RESULTATS

RESULTATS

1. MODEL DE CARDIOMIÒCITS DEFICIENTS EN FRATAXINA.

Tal com s'explica a l'apartat dels objectius vam decidir desenvolupar un model cel·lular cardíac per a poder estudiar els efectes intrínsecs de la deficiència de frataxina en aquestes cèl·lules. Aquest model es va basar en la interferència de l'expressió de frataxina en cultius primaris de cardiomiòcits ventriculars de rates nounades.

1.1. Enriquiment de cardiomiòcits, transducció i *knock-down* de frataxina

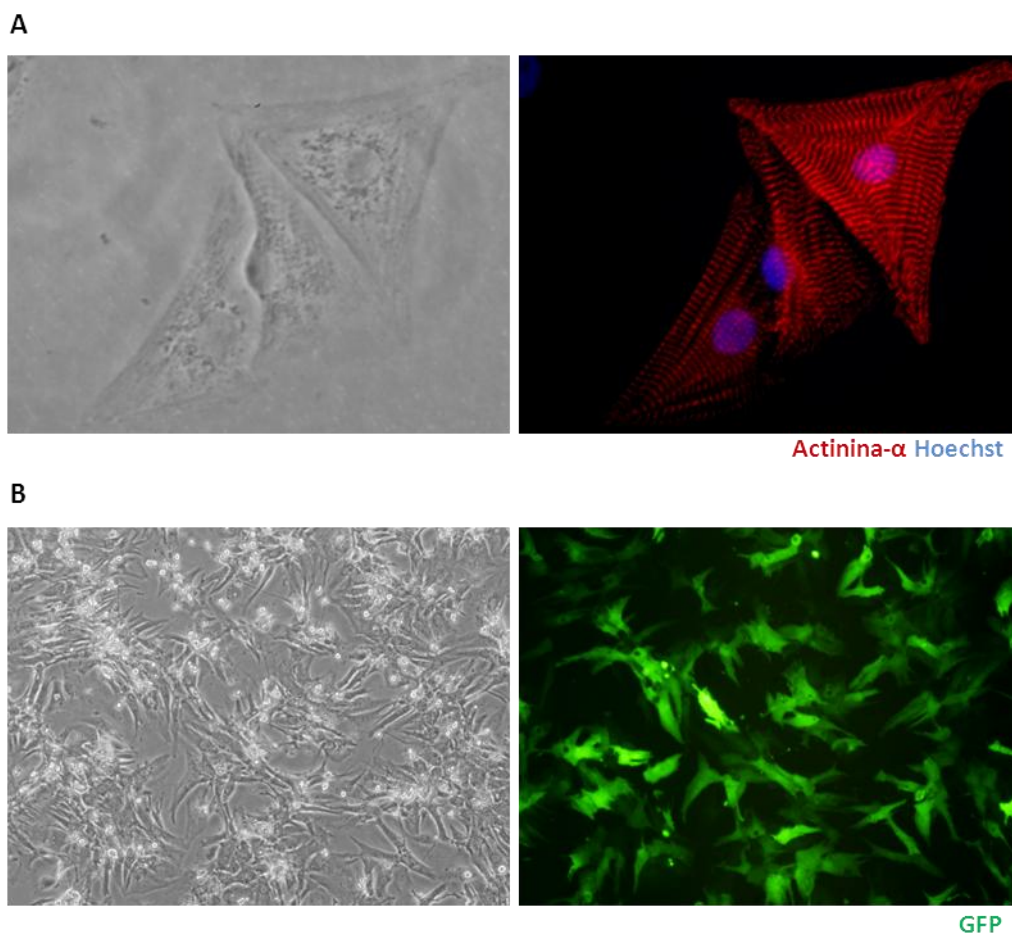


Figura 39. Enriquiment de miòcits i infecció amb lentivirus del cultiu primari de cardiomiòcits. (A) Contrast de fase i immunofluorescència contra actinina- α i tinció amb Hoechst per determinar la proporció de cardiomiòcits en els cultius. El recompte de miòcits positius per actinina- α representava un 80% del total de cèl·lules. **(B)** Imatges microscòpiques de cardiomiòcits infectats amb virus amb GFP. El recompte de les cèl·lules infectades amb virus amb GFP ens donava un percentatge d'infecció superior al 65%.

Per saber el percentatge de miòcits cardíacs dels cultius es va dur a terme una immunofluorescència contra actinina- α (una proteïna específica del sarcòmer cardíac) un cop acabat l'aïllament de cardiomiòcits. Tot seguit, es va comptar el nombre de miòcits en cultiu en relació amb el nombre de cèl·lules totals, que es va obtenir tenyint tots els nuclis amb Hoechst (Figura 39A). En el nostre cas, els cardiomiòcits representaven un 80% del total.

La quantitat de virus a utilitzar per tal d'obtenir un silenciament òptim de frataxina es va decidir fent una corba amb diferents concentracions de virus que contenien la proteïna verda fluorescent (GFP de *green fluorescent protein*). Es va decidir utilitzar la concentració més baixa possible que permetia aconseguir el màxim d'infecció per evitar els efectes adversos de la infecció i de l'interferència d'RNA. El percentatge d'infecció era d'un 65% (Figura 39B). En tots els experiments posteriors es va utilitzar la mateixa quantitat de virus.

Els virus usats per interferir la frataxina portaven 3 seqüències diferents que aliniaven a la regió codificant (CDS): sh34, sh37 i sh80. Com a control es van usar virus que contenien el mateix vector però amb una seqüència *scrambled* (scr), que en anglès seria "barrejat". Aquesta seqüència shscr no interfereix en cap ORF (*open reading frame*) coneguda de humana, rata o ratolí.

Els nivells d'expressió de frataxina es van mesurar mitjançant la reacció en cadena per la polimerasa en temps real (RQ-PCR) (Figura 40A). A partir del quart dia després d'infectar els cardiomiòcits ja hi havia una disminució de més d'un 90% de l'mRNA de frataxina que es mantenia encara el dia 7.

Els nivells de proteïna es van analitzar per *western blot* (Figura 40C) i es van quantificar amb el programa ImageLab (Figura 40B). El quart dia després de la transducció de les cèl·lules, els nivells de proteïna encara eren elevats però al setè dia ja s'observava una baixada per sota d'un 30% del control, uns nivells semblants als que es troben en pacients d'FRDA.

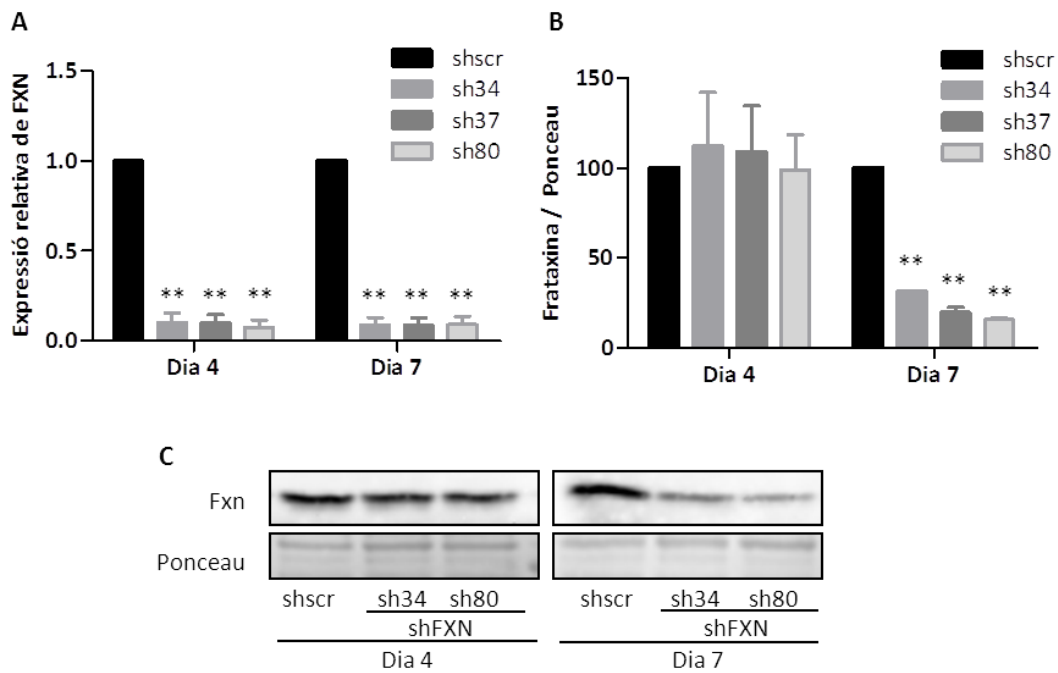


Figura 40. Anàlisi del knock-down de frataxina. (A) Expressió relativa de frataxina. Els nivells d'mRNA es van mesurar per RQ-PCR amb sondes TaqMan® i es van relativitzar envers l'expressió del gen normalitzador actina-β i l'expressió a les mostres control shscr. Els nivells d'expressió de la frataxina de les mostres interferides (sh34, sh37 i sh80) al dia 4 i 7 eren inferiors al 10% dels nivells del control shscr. **(B)** Nivells de frataxina en lisats de cardiomiòcits. Quantificació del western blot amb el programa ImageLab® i relativitzant a la proteïna total de la membrana tenyida amb Ponceau S. També es va usar el control shscr com a referència. Els nivells a dia 4 es mantenen però a dia 7 disminueixen per sota d'un 30% dels nivells del control shscr. **(C)** Imatge del western blot anti-frataxina. Els nivells de frataxina es mantenen semblants als del control shscr el dia 4 però a dia 7 s'observa una disminució de la intensitat. Es va usar la tinció de la proteïna total amb Ponceau S com a control de càrrega.

1.2. Anàlisi de la supervivència

La falta de frataxina pot provocar la mort als diferents tipus cel·lulars afectats per la malaltia, com les cèl·lules beta pancreàtiques (Cnop et al., 2012), les neurones dels ganglis de l'arrel dorsal (DRG) (A H Koeppen et al., 2009), i els miòcits cardíacs (M Pandolfo, 2006).

Per tal de saber si la interferència de frataxina en els cardiomiòcits en cultiu n'afectava la viabilitat, vam dur a terme diferents assaigs, ja que cada assaig mesura processos cel·lulars diferents:

- La doble tinció fluorescent del kit de Molecular Probes Live/Dead® (Figura 41), que usa la calceïna acetometoxi (calceïna AM) la qual és retinguda per les cèl·lules vives gràcies a l'acció de les esterases (Wang et al., 1993) i l'homodímer-1 d'etidi, que només tenyeix el DNA de les cèl·lules amb la membrana permeable (Xilouri, Vogiatzi, Vekrellis, Park, & Stefanis, 2009).
- L'assaig MTT (Figura 42A), que mesura capacitat reductora dels enzims (i per tant de les cèl·lules vives) que redueixen l'MTT a formazan, un compost lila que es detecta espectrofotomètricament (Mosmann, 1983). L'MTT s'incorpora a la cèl·lula gràcies a la seva càrrega positiva i es redueix de manera dependent de NADH al mitocondri, citosol i membranes (Berridge, Herst, & Tan, 2005).
- La tinció amb roig neutre (Figura 42B) (Borenfreund & Puerner, 1985), que depèn de la capacitat de la cèl·lula de mantenir els gradients de pH a través de la producció d'ATP; a pH fisiològic la sonda té càrrega neta zero i penetra dins la cèl·lula però dins els lisosomes, amb el pH més baix gràcies al gradient de protons, la sonda agafa càrrega i hi queda retinguda (Winckler, 1974).
- La tinció de cristall violeta (Figura 42C) que s'uneix al DNA del nucli cel·lular (Gillies et al., 1986) i s'usa per determinar el nombre de cèl·lules en cultius monocapa.

Amb la doble tinció fluorescent Live/Dead® es va analitzar la supervivència després de 4, 7 i 10 dies de la infecció amb lentivirus que contenien l'RNAi contra frataxina (sh34, sh37 i sh80) i es va observar que durant aquest període la manca de frataxina no induïa la mort cel·lular (Figura 41).

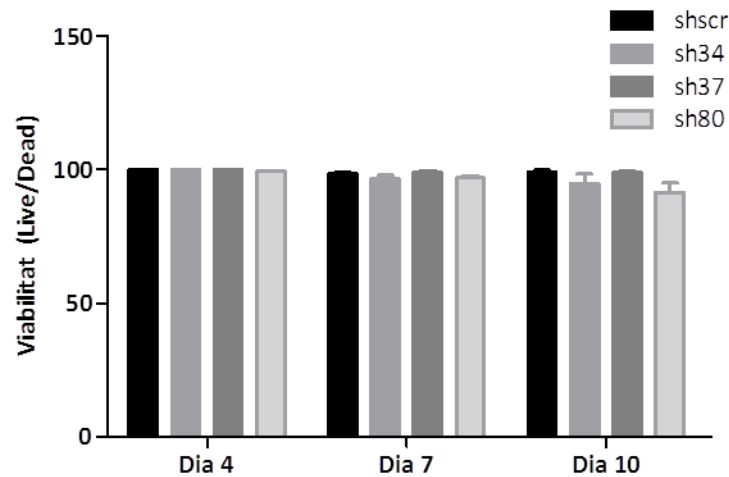


Figura 41. Viabilitat dels cardiomiòcits deficients en frataxina. Anàlisi de la viabilitat els dies 4, 7 i 10 després de la interferència de frataxina mesurada amb el kit fluorescent Live/Dead de LifeTechnologies. Cap de les seqüències de RNAi contra frataxina provocava la mort dels cardiomiòcits durant el període analitzat.

Per corroborar els resultats, es van analitzar els cultius scr, sh34 i sh80 a dia 7 amb els altres assaigs i tampoc es va veure que hi hagués una pèrdua de viabilitat en els cultius interferits per frataxina (Figura 42A-C). És més, l’assaig MTT indicava un cert augment de la capacitat reductora dels cultius interferits

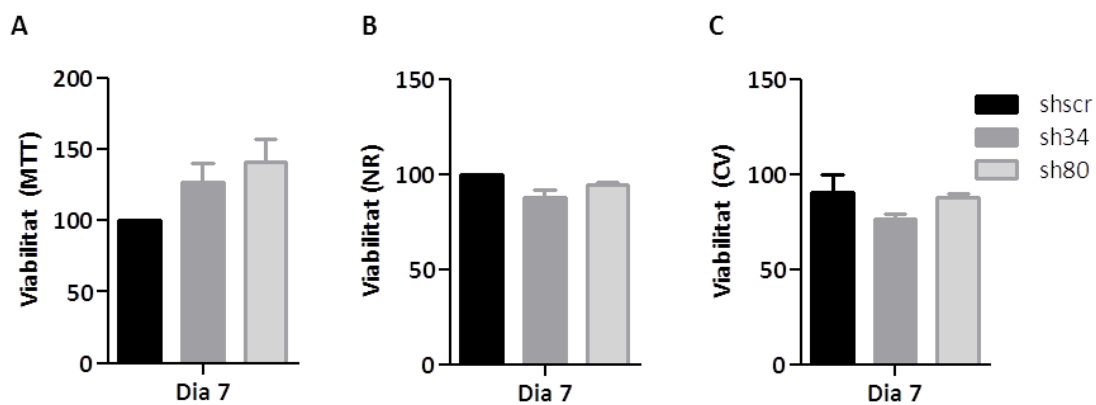


Figura 42. Viabilitat dels cardiomiòcits deficients en frataxina. (A) Assaig MTT el dia 7 després d’infectar les cèl·lules. No es va detectar una mort de cardiomiòcits, tot i que sí un cert augment de la capacitat reductora dels cultius deficients en frataxina (sh34 i sh80). (B) Assaig amb roig neutre (NR) el dia 7 després d’infectar les cèl·lules. Tampoc es va observar canvis en la viabilitat a dia 7 després d’interferir la frataxina. (C) Assaig amb cristall violeta (CV) el dia 7 després d’infectar les cèl·lules. No es detecten canvis de viabilitat després de 7 dies d’interferència de frataxina.

2. ANÀLISI DEL METABOLISME DEL FERRO

El dèficit de frataxina s'ha relacionat, ja des d'un principi, amb una alteració del metabolisme del ferro i dels centres ferro-sofre. Aquesta alteració s'ha observat tant en pacients d'atàxia de Friedreich com en diferents models existents de la malaltia. Tot i la controvèrsia que hi ha en la funció que la frataxina pot jugar en aquests processos cel·lulars, la seva implicació en el metabolisme del ferro està força acceptada. Vam decidir estudiar alguns paràmetres relacionats amb el metabolisme cel·lular del ferro, com la quantitat, els nivells de les proteïnes amb centres ferro-sofre, i els dels mRNA que responen a la sobrecàrrega/excés de ferro.

2.1. Anàlisi del contingut i l'activitat de l'aconitasa

El dèficit de les activitats de les proteïnes que contenen centres ferro-sofre (ISP, de l'anglès *Iron sulfur proteins*) s'ha detectat en teixits post mortem de pacients i en diferents models d'atàxia de Friedreich. Aquest indici, juntament amb la desregulació del metabolisme del ferro, ha fet que es proposés que la frataxina juga un paper en la biosíntesi d'aquests centres. Un dels enzims que s'usa com a marcador de l'estat d'aquests cofactors és l'aconitasa. Les cèl·lules de mamífer tenen dos enzims (l'enzim citosòlic ACO1 i el mitocondrial ACO2) amb activitat aconitat hidratasa que catalitzen la isomerització de citrat a isocitrat via cis-aconitat. L'enzim mitocondrial té un paper important en el metabolisme energètic ja que forma part del cicle de Krebs, mentre que el citosòlic actua com a sensor dels nivells de centres ferro-sofre. El centre ferro-sofre de l'aconitasa mitocondrial és necessari per la seva activitat catalítica, així que un dèficit de l'activitat podria ser degut a un problema en la biosíntesi d'aquests cofactors o de la seva posterior transferència a les diferents holoproteïnes.

En el nostre model, vam mesurar el contingut d'aconitasa mitocondrial mitjançant *western blot* (Figura 43C) al cap de 4 i 7 dies després d'interferir la frataxina dels cardiomiòcits i no hi vam detectar canvis com mostra la quantificació amb el programa ImageLab® (Figura 43A).

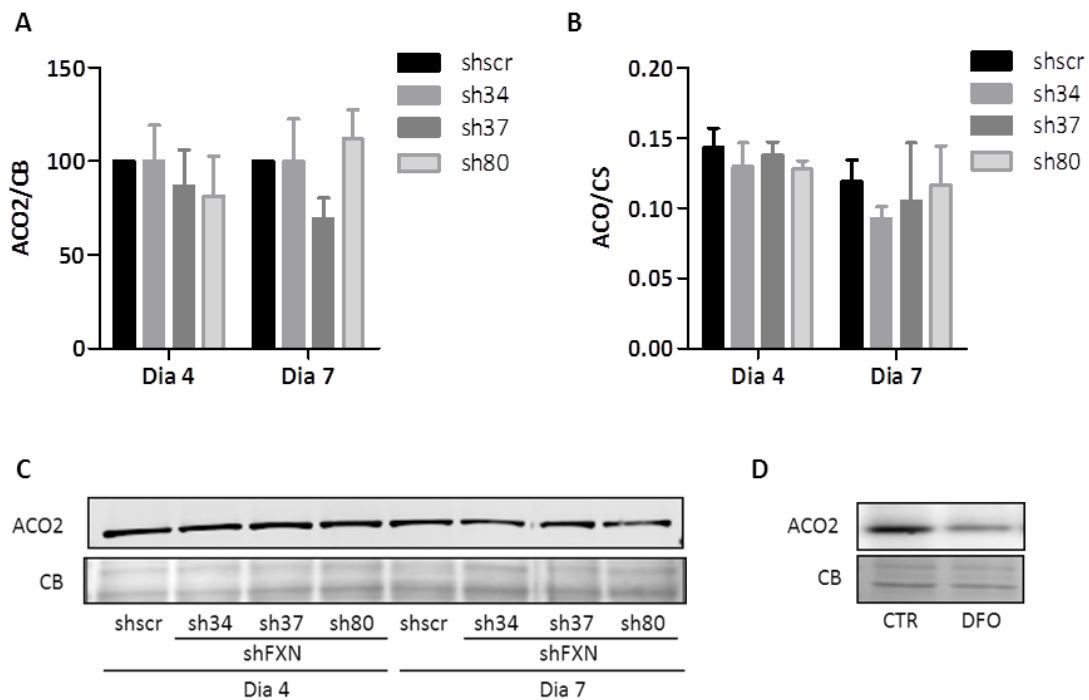


Figura 43. Estudi de la proteïna amb centres ferro-sofre aconitasa. (A) Quantificació del WB d'ACO2. No es van observar canvis ni a dia 4 ni a dia 7 a les cèl·lules tractades amb shFXN. **(B)** Activitat aconitat-hidratasa. Ràtio de l'activitat aconitasa (ACO) respecte la citrat-sintasa (CS), ambdues mesurades amb espectrofotòmetre en extrems totals. No es van observar canvis significatius durant el període analitzat. **(C)** Western blot representatiu de l'aconitasa mitocondrial (ACO2) i tinció amb blau de comassie (CB) de la membrana de PVDF. No es van observa canvis en els nivells de proteïna. **(D)** Western blot contra ACO2 en cultius de cardiomiocits tractats amb deferoxamina (DFO) 0,1 M durant 16h i de cardiomiòcits no tractats (CTR). Es veu una disminució important dels nivells de proteïna en els cultius tractats amb el quelant de ferro (DFO).

Per estar segurs que el nostre model era capaç de respondre a un dèficit de ferro provocant la disminució del contingut d'aconitasa, vam tractar les cèl·lules amb el quelant de ferro deferoxamina. Aquest tractament va provocar una baixada dels nivells d'aquesta proteïna a la meitat dels nivells de les cèl·lules no tractades (Figura 43D), confirmant que l'aconitasa responia a les IRP en el cultiu de cardiomiòcits.

Per comprovar que la proteïna a més de mantenir els nivells també mantenia l'activitat, vam mesurar l'activitat aconitasa hidratasa espectrofotomètricament en extrems totals i no hi vam detectar canvis. Es va mesurar l'activitat citrat-sintasa com a referència de quantitat mitocondrial (Figura 43B).

2.2. Anàlisi de l'expressió dels mRNA que responen al ferro

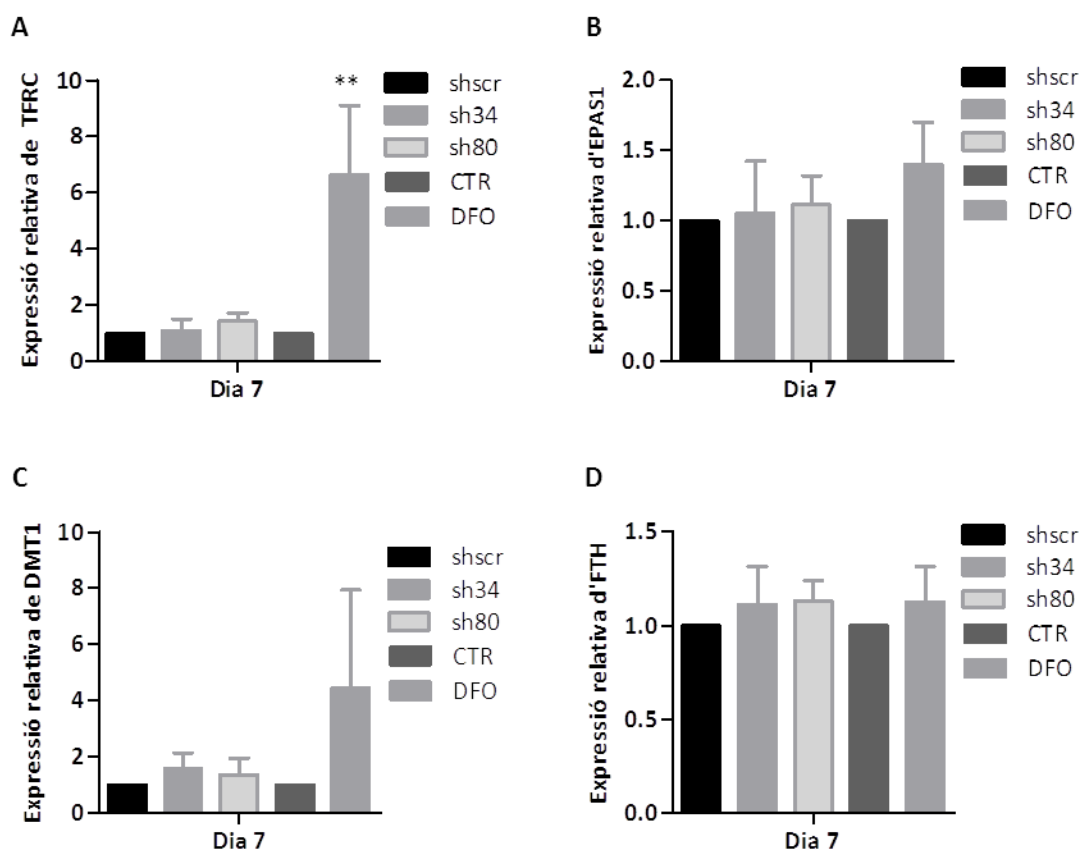


Figura 44. Anàlisi dels nivells dels mRNA que responen als nivells de ferro i les IRP. (A-D) Expressió relativa del receptor de transferrina (TFRC), del transportador de metalls divalents (DMT1), del factor endotelial (EPAS1) i de la ferritina (FTH). Els nivells d'mRNA es van mesurar per RQ-PCR amb sondes TaqMan® i es va usar el gen normalitzador actina-β i es va referenciar al control shscr. No es va detectar una alteració dels nivells d'mRNA de cap dels casos estudiats pels cardiomiòcits amb deficiència de frataxina (sh34 i sh80) respecte al control (shscr). Els nivells dels mRNA amb IRE a l'extrem 3'UTR (A;C) augmentaven en tractar les cèl·lules amb el quelant de ferro deferroxamina (DFO) mentre que els que tenien l'IRE a l'extrem 5'UTR (B;D) es mantenien iguals que al control no tractat (CTR). N≥5.

Les cèl·lules de mamífer tenen un mecanisme molt especialitzat de regulació de l'homeòstasi del ferro: les proteïnes reguladores del ferro (IRP – *Iron-responsive element-binding proteins*) i els elements de resposta al ferro (IRE - *iron responsive elements*). Aquestes proteïnes responen al ferro, a l'oxigen i als centres ferro-sofre i s'uneixen als RNA que contenen IRE a la seva seqüència, estabilitzant-los o inhibint-ne la traducció segons la posició d'aquests elements a l'mRNA. D'aquesta manera regulen l'entrada, l'emmagatzematge i la sortida de ferro dins la cèl·lula. Alguns d'aquests mRNAs són el del receptor de la transferrina (TFRC), del transportador de metalls divalents (DMT1), del

factor induïble per hipòxia-2 α (HIF2 α) també anomenat EPAS1 (*Endothelial PAS domain protein-1*) o de la cadena gran de la ferritina (FTH- *ferritin heavy chain*).

Per estudiar si hi havia alguna desregulació del ferro a nivell intracel·lular, vam mirar els nivells dels mRNAs esmentats anteriorment, ja que donat el cas que hi hagués poc ferro al citosol l'IRP s'uniria als mRNAs amb IREs provocant un augment en els seus nivells. Pel que fa als transportadors TFRC i DMT1, no vam veure que la falta de frataxina provoqués un augment dels seus mRNAs, cosa que sí que es veia en el cas del TFRC quan tractàvem el cultiu amb el quelant de ferro deferoxamina (DFO) (Figura 44A;C). Els mRNAs amb l'IRE a l'extrem 5' com l'EPAS1 o el FTH no variaven en cap dels casos (Figura 44B;D).

2.3. Anàlisi del contingut intracel·lular de ferro

El ferro com a cofactor és necessari per moltes funcions cel·lulars, però en excés pot generar espècies reactives de l'oxigen (Eaton & Qian, 2002). En l'atàxia de Friedreich es creu que hi ha una acumulació mitocondrial de ferro que fa que el citosol quedi deficient en aquest metall i se n'activi la recaptació, donant lloc a un excés cel·lular de ferro que esdevé tòxic. Nosaltres vam mesurar el ferro amb un mètode colorimètric que digereix les cèl·lules i allibera el ferro que forma complexes. Posteriorment es redueix el ferro i s'usa un quelant que forma un complex amb color quan s'uneix al ferro (Tamarit et al., 2006). Utilitzant aquest mètode en els cardiomiòcits control (shscr) i tractats amb shRNA anti-frataxina no vam observar una afectació en el contingut intracel·lular de ferro.

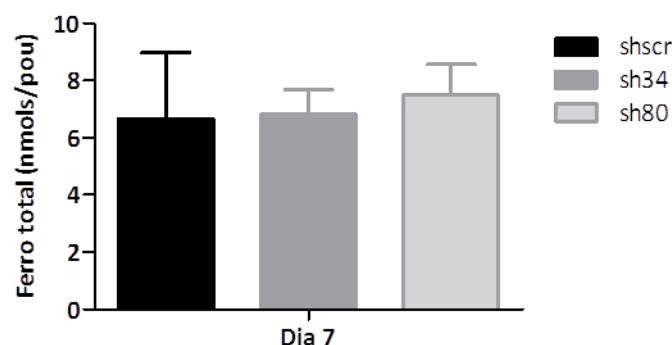


Figura 45. Determinació fotomètrica del ferro intracel·lular. Els cardiomiòcits control i els *knock-down* per frataxina es van llisar i es va analitzar el ferro total com es descriu a “materials i mètodes”. No es van observar canvis significatius en el contingut intracel·lular de ferro. N=5.

3. ANÀLISI DEL FUNCIONAMENT MITOCONDRIAL I EL METABOLISME ENERGÈTIC

Els mitocondris juguen un paper clau en la majoria de les funcions cel·lulars. En el cas dels cardiomiòcits aquest paper clau es fa pal·lès pel fet que ocupen una part molt important del volum cel·lular i que estan disposats de manera molt organitzada. A més, són el lloc clau pel funcionament del metabolisme energètic oxidatiu que obté l'energia necessària per la contracció, l'homeòstasi iònica i la resta de funcions cel·lulars.

3.1. Mitocondris: disposició i potencial de membrana mitocondrial

El funcionament mitocondrial depèn del manteniment del gradient quimiosmòtic a través de la membrana interna mitocondrial (MIM) per poder proporcionar energia (Mitchell, 1979). Aquest gradient, generat per tres enzims de la cadena de transport electrònic (ETC), permet la síntesi d'ATP i altres funcions mitocondrials. El gradient té dos components: el potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), creat per l'acumulació de càrrega positiva a l'IMS, i el de gradient de pH (Nicholls & Chalmers, 2004; Nicholls, Ferguson, & Ferguson, 2002). D'aquest dos components, el $\Delta\psi_m$ contribueix a la majoria d'energia acumulada al gradient, i per determinacions pràctiques, el $\Delta\psi_m$ pot ser usat com a indicador de l'estat d'energització del mitocondri. Les cardiomiopaties apareixen com una de les manifestacions clíniques més clares de les malalties mitocondrials on el $\Delta\psi_m$ es veu compromès (Wallace, 1999). Així, estudiar el $\Delta\psi_m$ en cardiomiòcits és rellevant per a l'FRDA. Malgrat tot, no hi ha cap mètode infal·libre perquè tots tenen els seus punts forts i dèbils. En el nostre cas, hem usat tres sondes diferents que s'acumulen al mitocondri en base a l'equació de Nernst. Aquesta prediu que els compostos lipofílics catiónics es concentraran al mitocondri perquè aquest és relativament més electronegatiu que al citoplasma. Tant el Mitotracker, el JC-1 com el TMRM són sondes lipofíliques catióniques fluorescents que permeten la monitorització de canvis relatius del $\Delta\psi_m$.

3.1.1. Mitotracker

Les sondes Mitotracker[®] són compostos permeables a la membrana amb un motiu tiol clorometil mitjanament reactiu molt utilitzades per tenyir els mitocondris. El Mitotracker[®] Red CM-H2XROS en concret no emet fluorescència fins que és oxidat al mitocondri on hi queda segregat.

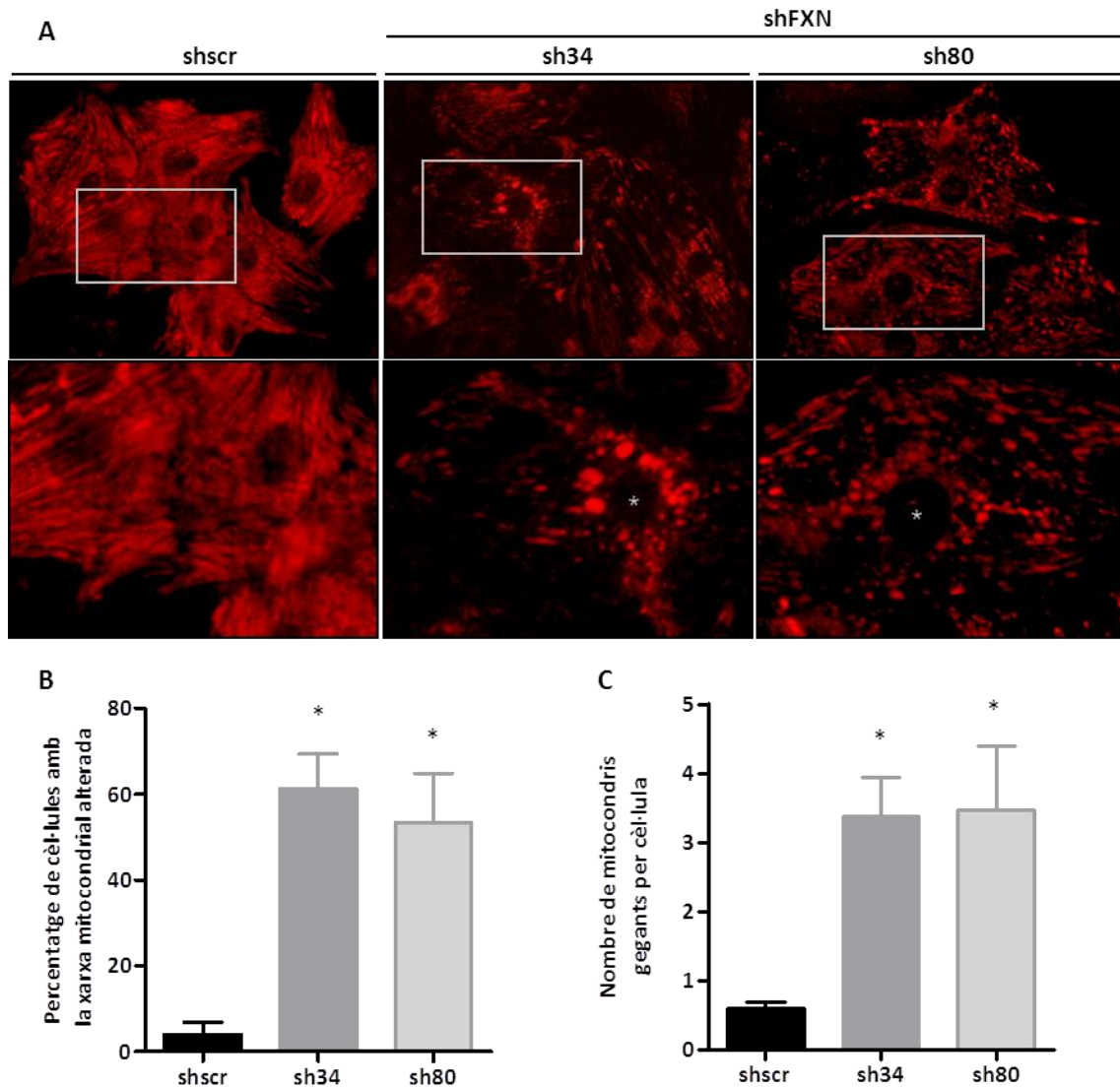


Figura 46. Alteració de la xarxa mitocondrial en els miòcits amb deficiència de frataxina. (A) Imatges representatives de cardiomiòcits tenyits amb la sonda Mitotracker®. Amb aquesta tinció mitocondrial es van observar cèl·lules amb un canvi de l'arquitectura mitocondrial, un engrandiment dels mitocondris i l'acumulació perinuclear d'aquests (detall de cèl·lules individuals amb asteriscs a la fila inferior) en els cardiomiòcits deficients en frataxina (sh34 i sh80). **(B)** Percentatge de cèl·lules amb la xarxa mitocondrial alterada. El nombre de cèl·lules amb una alteració en la disposició dels mitocondris es va obtenir tal com es descriu a materials i mètodes. Més del 50% de les cèl·lules tenien alterada la xarxa mitocondrial en els cultius de cardiomiòcits amb dèficit de frataxina (sh34 i sh80). **(C)** Nombre de mitocondris gegants per cèl·lula. Les imatges es van analitzar amb el programa ImageJ i es van comptar el nombre de mitocondris engrandits segons els paràmetres descrits a materials i mètodes, que va resultar ser tres vegades superior a les cèl·lules interferides (sh34 i sh80) respecte als controls (shscr).

Per estudiar la funcionalitat mitocondrial vam tenyir els cardiomiòcits amb mitotracker en condicions basals després de 7 dies d'haver-los infectat amb els lentivirus. D'aquesta manera vam poder observar que l'arquitectura mitocondrial es trobava molt afectada en

els cardiomiòcits deficients en frataxina, ja que hi havia mitocondris gegants i es perdia el patró típic dels cardiomiòcits on els mitocondris formen una xarxa *string-like* (Figura 46).

3.1.2. JC-1

El JC-1 és una carbocyanina que s'acumula al mitocondri. A una concentració baixa, la sonda es manté com a monòmer i emet fluorescència verda, i a concentració alta, forma J-agregats que canvien l'espectre d'excitació i emissió, i es detecta de color vermell. Així, com més diferència de potencial hi hagi, s'acumularà més sonda i es detectarà emissió vermella. Aquesta característica fa que mitjançant aquesta sonda es pugui tenir una noció relativa del $\Delta\psi_m$ mitocondrial. En tenyir els cardiomiòcits amb JC-1, vam observar que la població mitocondrial era heterogènia, tant a les cèl·lules control com a les deficients en frataxina, ja que s'observaven mitocondris amb fluorescència verda i mitocondris amb fluorescència vermella. Es seguia veient, però, el canvi de la distribució mitocondrial, tal com havíem vist amb la sonda Mitotracker®. Cal dir que els mitocondris "gegants" tenien un marcatge verd, cosa que indicava que tenien un potencial de membrana relativament baix (Figura 47).

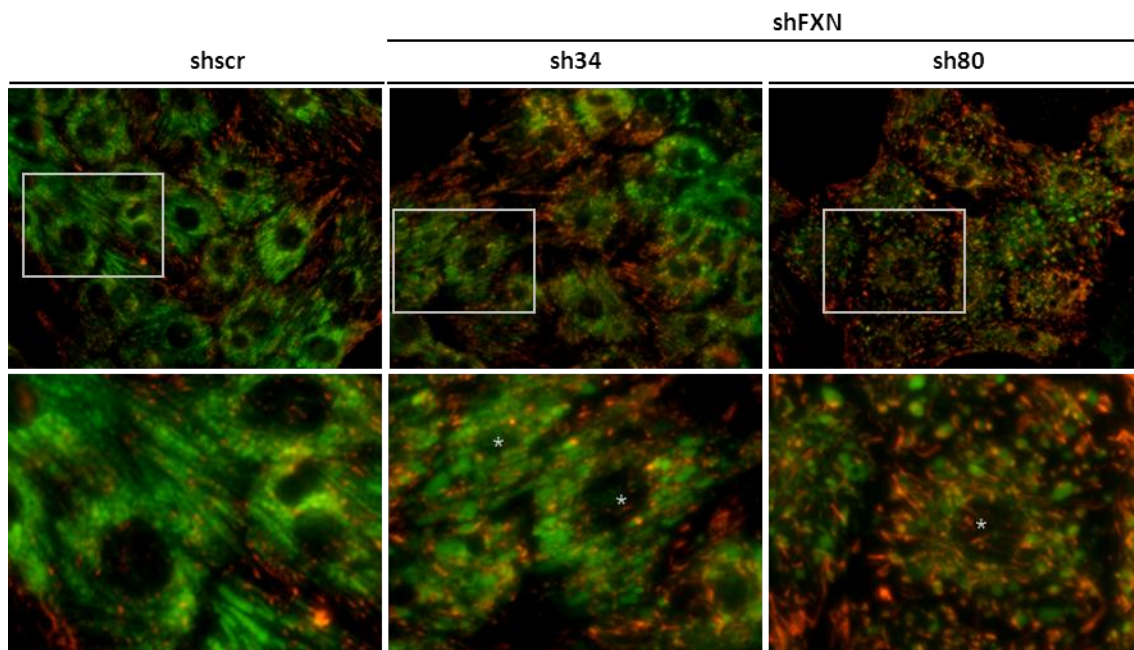


Figura 47. Imatges representatives de cardiomiòcits tenyits amb la sonda JC-1. En les imatges es va observar el canvi de l'arquitectura mitocondrial i un engrandiment dels mitocondris (els quals presentaven un $\Delta\psi_m$ més baix, de color verd) en els cardiomiòcits deficients en frataxina (sh34 i sh80). En la part inferior es pot observar el detall de cèl·lules individuals amb mitocondris engrandits (marcades amb asteriscs).

3.1.3. TMRM

El TMRM és un altre compost que s'acumula al mitocondri i emet fluorescència taronja-vermella. Vam decidir usar aquest compost perquè s'ha descrit que és el millor per mesurar el $\Delta\psi_m$ preexistent amb el mètode *non-quenching*, és a dir, fent servir concentracions baixes de sonda per evitar l'extinció de la fluorescència.

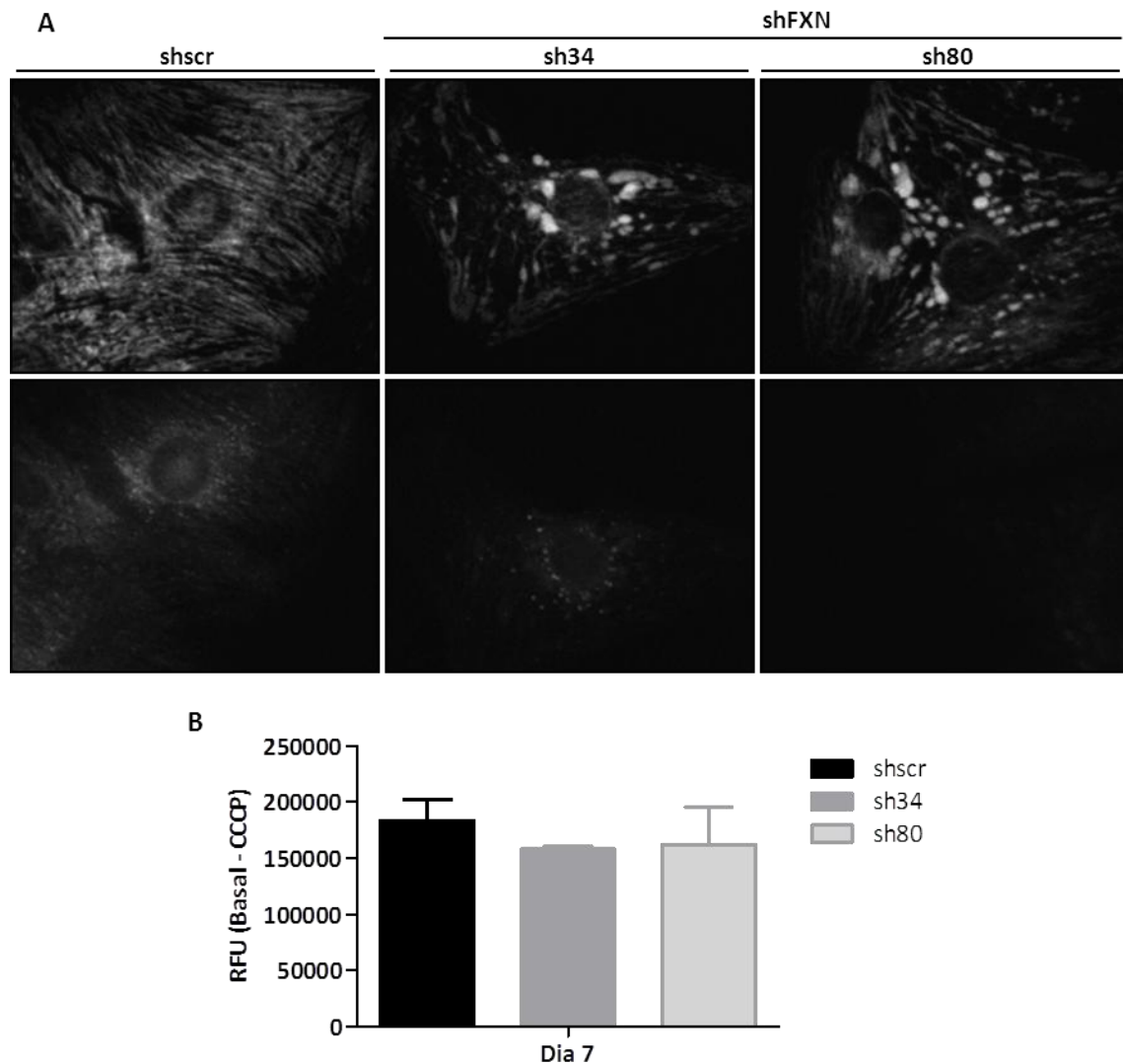


Figura 48. Anàlisi del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) amb TMRM. (A) Imatges confocals representatives de cardiomiòcits tenyits amb TMRM. En estat basal (fila superior) es podia observar el canvi de l'arquitectura mitocondrial i els mitocondris "gegants" en els cardiomiòcits deficientes en frataxina (sh34 i sh80). Les imatges de la fila inferior mostren del mateix camp que les superiors però després d'afegir CCCP per mesurar la fluorescència inespecífica no deguda al gradient electroquímico del mitocondri. **(B)** Gràfic que representa la fluorescència de les imatges preses al confocal. Les dades representen la diferència entre el valor basal i després de l'addició de CCCP. No es van observar canvis en el potencial de membrana mitocondrial. RFU = *Relative Fluorescent Units*.

Per mesurar el $\Delta\psi_m$ vam usar el TMRM a 30 nM deixant-lo equilibrar en el tampó durant 1 h a 37 °C a l'incubador amb atmosfera controlada. Vam prendre imatges al microscopi confocal amb temperatura, humitat i CO₂ controlats abans i després de tractar el mateix camp amb el ionòfor CCCP per desacoblar el gradient mitocondrial. Tot i observar el canvi en l'arquitectura mitocondrial (Figura 48A), si es mesurava el $\Delta\psi_m$ de la cèl·lula en el seu total, no s'observaven canvis entre els cardiomiòcits control i els interferits per frataxina (Figura 48B).

3.2. Anàlisi de la cadena de transport electrònic

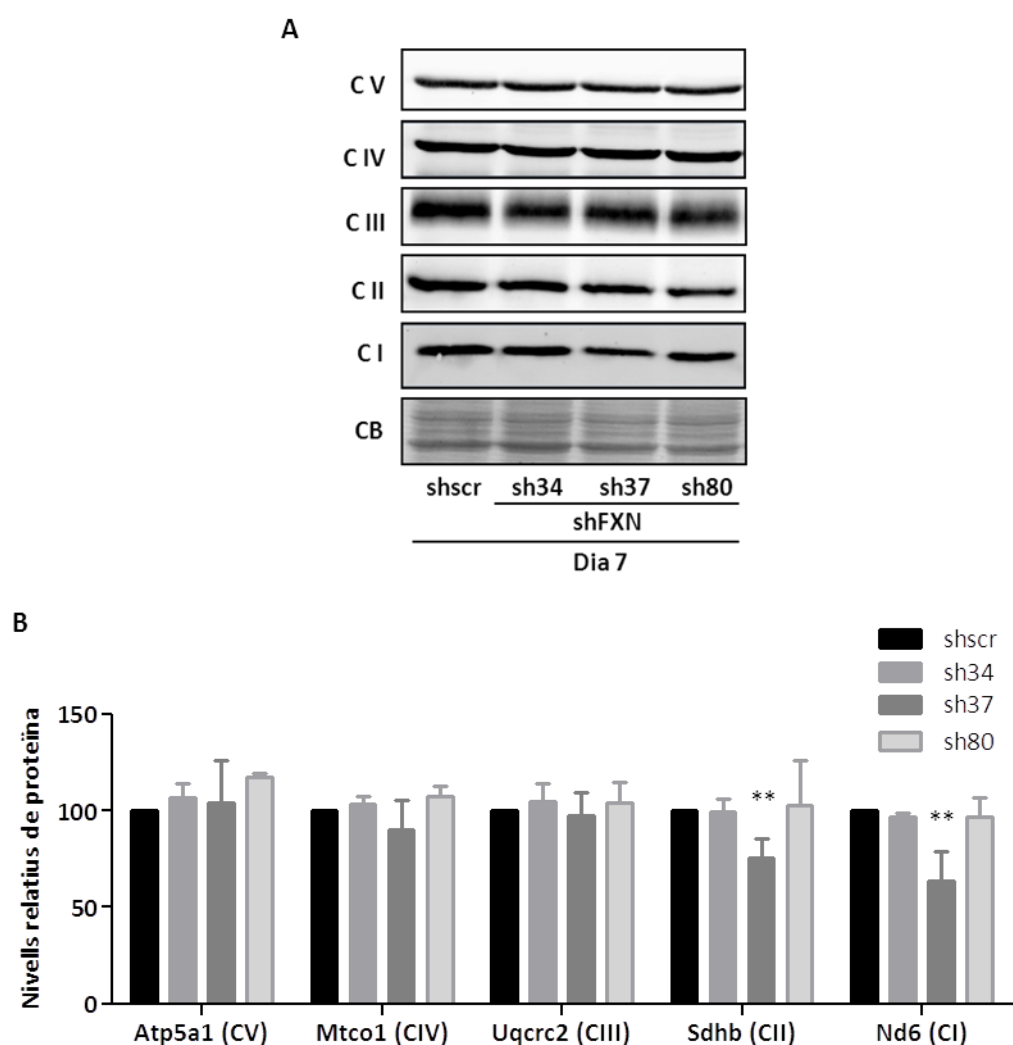


Figura 49. Anàlisi dels nivells de components de la cadena de transport electrònic. (A) Imatges representatives dels *western blots* contra subunitats dels complexos de la CTE. No es van observar canvis en els nivells d'aquestes subunitats en els cardiomiòcits deficients per frataxina (shFXN) comparats amb els miòcits control (shscr). **(B)** Quantificació relativa dels nivells de les subunitats dels complexos. No s'observaven canvis significatius entre control i interferits, només en el cas del sh37.

La cadena de transport electrònic (ETC) està formada per cinc complexos multiproteics (I-V) i dos transportadors d'electrons mòbils (el citocrom c i la ubiquinona). Als complexos de la cadena respiratòria (CR) s'hi dona l'oxidació dels substrats NADH i FADH₂ fins a l'oxigen, l'acceptor final d'electrons. Deficiències primàries o secundàries en l'ETC són freqüents en diverses malalties mitocondrials i neurodegeneratives, entre elles l'atàxia de Friedreich (Bayot et al., 2011; Bénit, El-Khoury, Schiff, Sainsard-Chanet, & Rustin, 2010).

Com hem descrit en els apartats anteriors, els mitocondris dels cardiomiòcits deficients en frataxina tenien una distribució anormal molt marcada, i alguns eren més grans. Això ens va portar a analitzar els nivells i l'activitat de diferents components de la cadena respiratòria. En mesurar els nivells proteics d'algunes subunitats dels complexos respiratoris vam observar que no hi havia canvis entre els cardiomiòcits interferits i els control (Figura 49).

Per evaluar el funcionament de la cadena de transport electrònic vam dur a terme l'assaig descrit a materials i mètodes (Barrientos, 2002; Rustin et al., 1994) que mesura la capacitat de reduir el citocrom c aportant electrons com a NADH al complex I o com a succinat/FADH₂ al complex II. No vam observar canvis als cardiomiòcits interferits respecte als control en cap dels complexos.

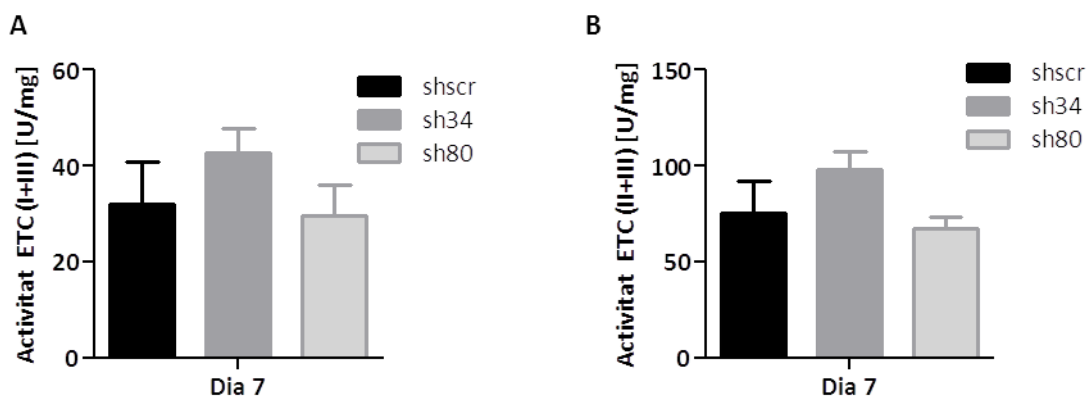


Figura 50. Anàlisi de l'activitat de la cadena de transport electrònic (ETC). (A) Activitat dels complexos I+III, mesurant la reducció del citocrom c afegint NADH com a substrat. No es van observar canvis significatius entre els cultius control (shscr) i els interferits (sh34 i sh80). (B) Activitat dels complexos II+III, afegint succinat com a substrat i mesurant la reducció del citocrom c. No es van observar canvis significatius entre les cèl·lules control i les *knock-down* per frataxina. N=4.

3.3. Mesura de l'activitat citrat-sintasa

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'activitat citrat-sintasa es pot fer servir com a marcador enzimàtic mitocondrial. És un assaig ràpid, específic, senzill i fàcil. A més de usar-lo per relativitzar les altres activitats, ens podria donar una idea de la "quantitat" de mitocondris que hi ha als cardiomiòcits control o interferits (Darley-USmar, Rickwood, & Wilson, 1987). A més és un marcador del metabolisme aeròbic del cor (Sylvén, Lin, Kallner, & Jansson, 1989). Com s'observa a la figura 51, la citrat-sintasa presentava algun canvi però només en un dels cardiomiòcits deficientes en frataxina.

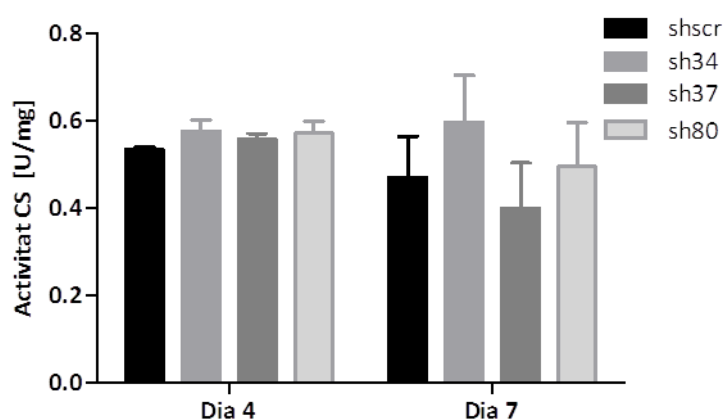


Figura 51. Activitat de la citrat-sintasa mitocondrial (CS). Es va mesurar la reducció del DTNB afegint oxalacetat com a substrat en llisats totals de cardiomiòcits. No es van observar canvis significatius en l'activitat d'aquesta proteïna entre els cardiomiòcits control (shscr) i els deficientes en frataxina (sh34 i sh80) en els diferents dies estudiats.

3.4. Mesures d'ATP, ADP i AMP

Com s'ha mencionat, gairebé tot l'ATP dels cardiomiòcits es produeix al mitocondri i, com que són molt vulnerables al dèficit d'ATP, necessiten una regulació molt fina dels nivells dels nucleòtids fosfat. Anormalitats en la distribució i el funcionament mitocondrial poden provocar un dèficit d'ATP que s'associa amb cardiopaties, defectes de conducció, disfunció endotelial i malalties coronàries (Dorn, 2013; Limongelli, Masarone, D'Alessandro, & Elliott, 2011).

Tenint en compte que la major part dels pacients d'atàxia de Friedreich pateixen miocardiopaties, i que havíem observat una desorganització de la xarxa mitocondrial, vam mesurar les relacions entre els diferents nucleòtids fosfat en cultius de cardiomiòcits

control i interferits durant 7 dies mitjançant HPLC, tal com s'indica a materials i mètodes. La figura 52 mostra les ràtios entre ATP/ADP i ATP/AMP, les quals no mostraven diferències significatives entre els cultius control i els interferits per frataxina.

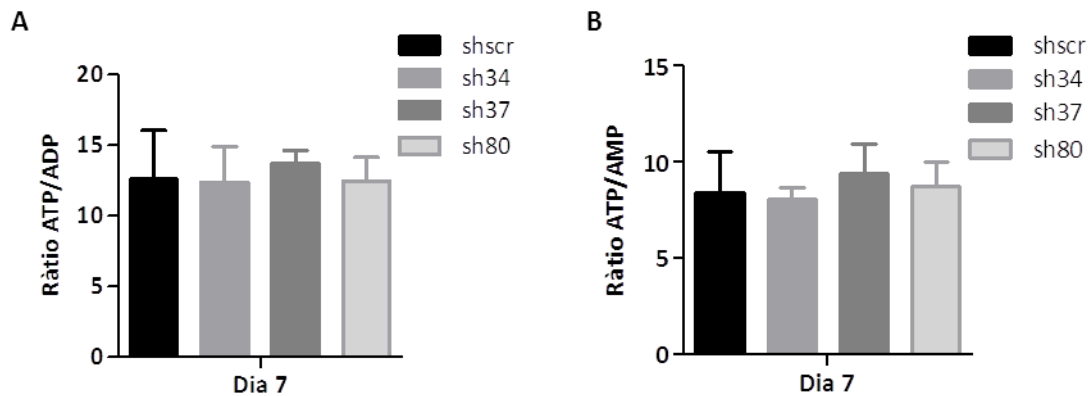


Figura 52. Mesura dels nivells d'ATP, ADP i AMP dels cardiomiòcits. (A) Ràtio entre els nivells d'ATP i ADP i **(B)** entre els nivells d'ATP i AMP. No es van observar canvis en les relacions ATP/ADP i ATP/AMP dels cardiomiòcits interferits (sh34, sh37 i sh80) respecte als controls (shscr). N=5

3.5. Anàlisi de la preferència de substrats

Normament, juntament amb els canvis en la funció mitocondrial, el cor hipertròfic es caracteritza per un canvi marcat en la preferència de substrat (d'àcids grassos cap a glucosa). Aquest canvi es deu, en part, a la regulació exercida pels metabòlits clau i en alteracions en la transcripció de gens involucrats en el transport i el metabolisme de substrats energètics. En condicions normals, els AG cobririen un 65% de la demanda energètica i la glucosa un 30% (Koeppen et al., 2009; van der Vusse, Glatz, Stam, & Reneman, 1992), tot i que també hi ha controvèrsia sobre l'aportació d'altres nutrients com en piruvat, el lactat, els cossos cetònics i els aminoàcids (Burkhoff et al., 1991; Neely & Morgan, 1974). S'ha descrit, a més, que durant la hipertròfia, a part de consumir més glucosa, aquesta és convertida a lactat enlloc de ser oxidada completament (Becker, Bünger, Permanetter, & Gerlach, 1984). Per tal de determinar el consum de glucosa i la producció de lactat dels cardiomiòcits, vam realitzar una mesura indirecta que era el contingut de glucosa i lactat del medi després de 16 hores de cultiu.

Els resultats van mostrar que el contingut de glucosa al medi (Figura 53A) tendia a ser superior el dia 6 que el dia 3 en els cardiomiòcits control (shscr), cosa que podria indicar que les cèl·lules consumien menys glucosa al llarg dels dies però no de manera significativa. El contingut de glucosa del medi era una mica inferior en els interferits (sh34 i sh80) comparat amb el dels controls (shscr), i una mica més a dia 6, però els canvis tampoc eren significatius. El contingut de lactat del medi (Figura 53B) era semblant en tots els casos (tant entre els diferents dies com entre les diferents mostres), cosa que fa pensar que la producció de lactat no canviava entre els miòcits control i els interferits per frataxina (sh34 i sh80).

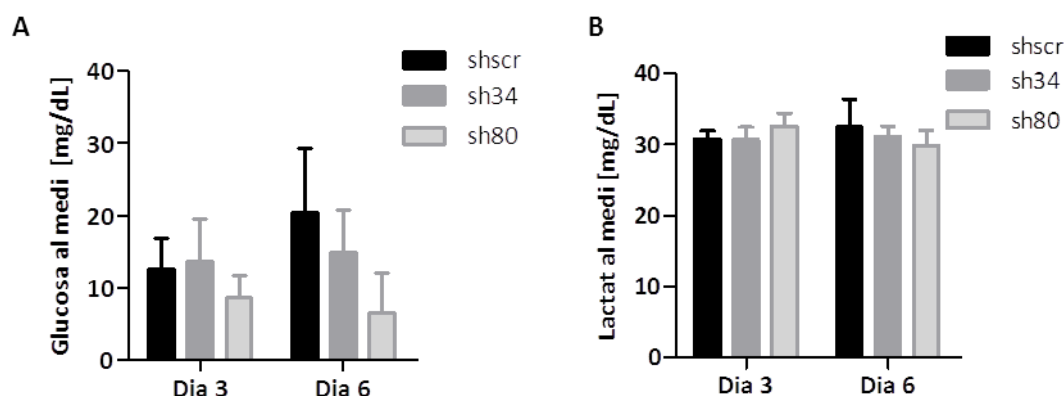


Figura 53. Mesura dels nivells de glucosa i lactat al medi. (A) Nivells de glucosa al medi després de 16 h de canviar-lo per medi fresc, mesurat els dies 3 i 6 després d'infectar els cardiomiòcits amb shscr i shFXN (sh34 i sh80). Els nivells de glucosa del medi són majors als cultiu control el dia 6 comparats amb el dia 3, però el canvi no és significatiu. **(B)** Nivells de lactat al medi després de 3 i 6 dies de cultiu. No s'observen diferències ni entre els controls i els interferits ni entre els diferents dies estudiats. N≥10.

3.5.1. Preparació de medi suplementat amb àcids grassos

En analitzar el contingut de glucosa i lactat del medi que es fa servir normalment per cultivar cardiomiòcits (aquí referit com a MC), ens vam plantejar quins nivells d'àcids grassos contenia, ja que aquests són el substrat preferit per aquestes cèl·lules. L'aportació del medi va resultar ésser mínima, comparada amb els nivells d'AG que es troben habitualment en plasma de rata (Zhou et al., 2002), ja que bàsicament provenien del sèrum. Tenint en compte aquest fet, vam decidir suplementar el medi amb els àcids grassos oleic, linoleic, palmitat i esteàric. El medi resultant simulava les concentracions fisiològiques circulants d'aquests AG (que són els més abundants i representen la majoria

d'AG circulants). Després de comprovar que no hi havia canvis evidents en el fenotip, vam mesurar el contingut d'AG lliures al medi suplementat (MC+AG) després de 24 hores de cultiu per comprovar que els cardiomiòcits eren capaços de consumir-los (Figura 54).

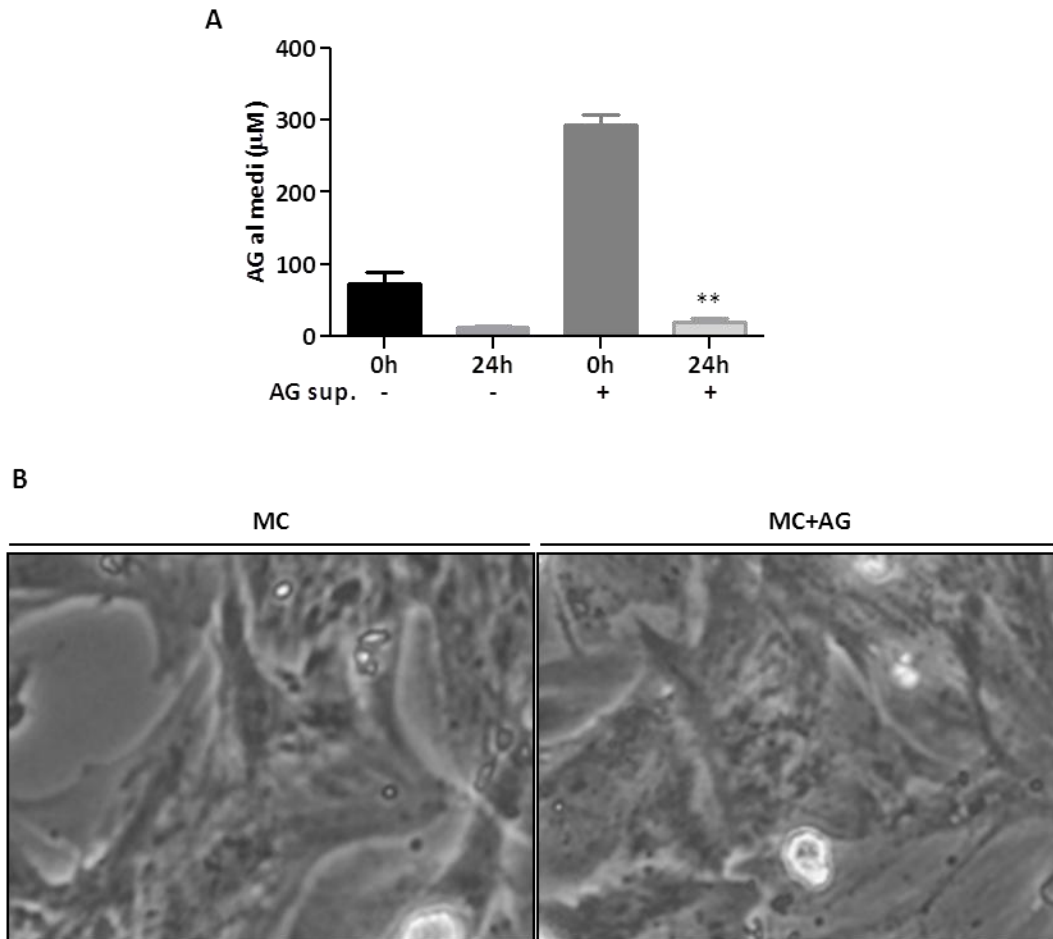


Figura 54. Anàlisi dels àcids grassos al medi i l'efecte a les cèl·lules. (A) Nivells d'àcids grassos al medi a temps 0 (en canviar el medi per medi fresc) i després de 24 h en cultiu. Com mostra el gràfic, vam observar que els cardiomiòcits eren capaços de consumir els àcids grassos, tant del medi estàndard com del medi suplementat amb AG (AG sup.). **(B)** Fotografies representatives de cardiomiòcits crescuts en medi estàndard (MC) o medi suplementat amb AG (MC+AG). N=4.

3.6. Contingut de gotes lipídiques

En les cèl·lules interferides per frataxina havíem observat unes petites boles refringents al llarg dels dies de cultiu. Vam sospitar que podien ser gotes lipídiques i per comprovar-ho vam utilitzar la sonda hidrofòbica BODIPY® 493/503 que tenyeix els lípids neutres. Tal com s'observa a la figura 55A, aquesta sonda s'acumulava en forma de petites gotes que es trobaven en més freqüència als cardiomiòcits intereferits, confirmant que el dèficit de frataxina provocava una acumulació de lípids.

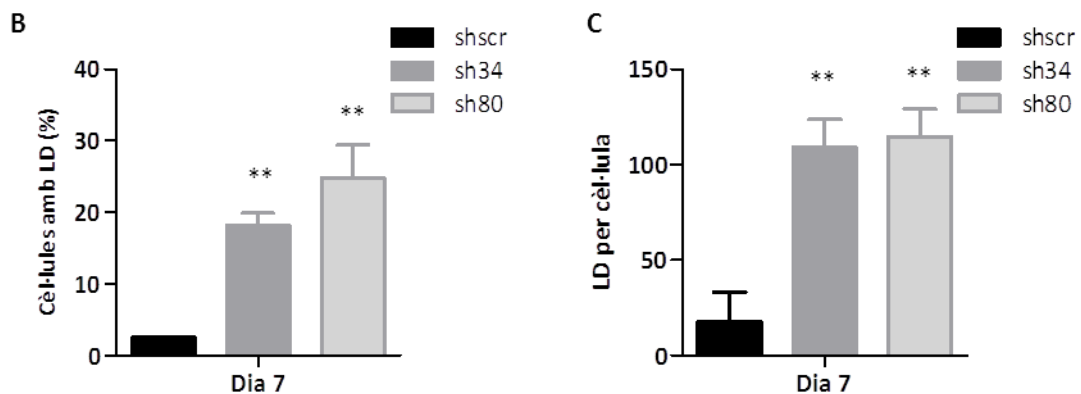
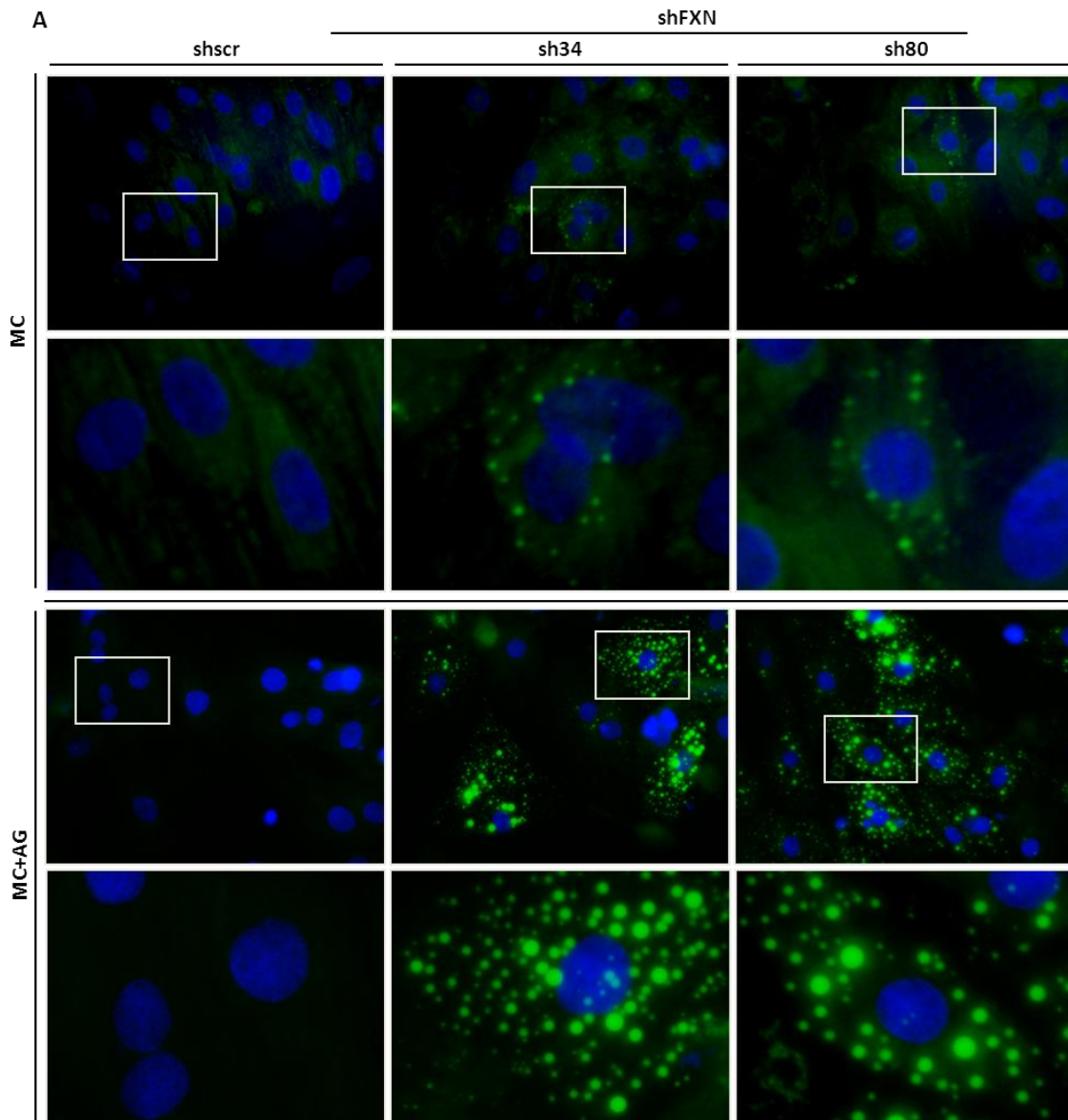


Figura 55. Contingut de gotes lipídiques als cardiomiòcits. (A) Imatges representatives de cèl·lules cardíaques crescudes en medi estàndard (MC) o medi suplementat amb AG (MC+AG) tenyides amb BODIPY 493/503 (que evidencia les LD de color verd) i amb Hoechst (pel nucli). A sota de les imatges es mostra l'ampliació d'una cèl·lula amb les gotes lipídiques. Es va observar una acumulació de lípids ja a les cèl·lules crescudes en MC que es va fer més evident en afegir el suplement de lípids (MC+AG). **(B)** Gràfic del percentatge de cèl·lules amb LD crescudes en medi

estàndard sense AG afegits (MC). Mentre els cardiomiòcits control contenien un 2% de les cèl·lules amb LD, als interferits el percentatge augmentava fins prop del 20%. **(C)** Gràfic del promig de les gotes lipídiques per cèl·lula en cultius sense suplement d'AG. A les cèl·lules control (shscr) s'observaven menys de 20 gotes per cèl·lula, però les interferides n'acumulaven més de 100, que a més eren de mida més gran.

Quan vam afegir el suplement de lípids al medi de cultiu, vam veure que les cèl·lules acumulaven una gran quantitat de lípids en forma de gotes lipídiques (LD de *lipid droplets*), tant en nombre com de mida (Figura 55A). L'anàlisi de les imatges de les cèl·lules crescudes en MC amb el programa ImageJ va mostrar un augment tant del nombre de cèl·lules amb LD (Figura 55B) com del nombre de LD per cèl·lula (Figura 55C).

3.7. Anàlisi del metabolisme de lípids

En veure que els cardiomiòcits deficientes en frataxina acumulaven lípids de manera tant exagerada en forma de les LD, vam decidir estudiar si era un problema del consum, el catabolisme o bé hi havia un problema en la senyalització que regula el metabolisme lipídic.

3.7.1. Consum de lípids

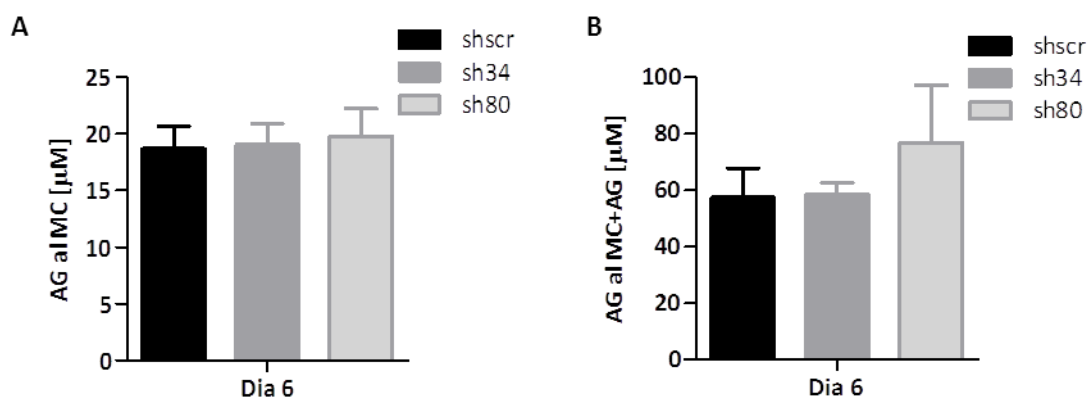


Figura 56. Anàlisi del contingut de lípids del medi. (A) Anàlisi del contingut d'AG en medi convencional (MC). Per saber el consum de lípids, es va fer una mesura indirecta dels AG lliures del medi passades 24 h en cultiu. No es van observar diferències entre els nivells d'AG del medi dels cultius amb deficiència de frataxina (sh34 i sh80) respecte als control (shscr). **(B)** Anàlisi del contingut d'AG en medi amb suplement de lípids. No es van observar diferències entre els nivells d'AG entre els cultius control i interferits. N=9.

Per començar vam analitzar el consum de lípids, per saber si la deficiència en frataxina provocava una inducció del transport de lípids. Vam mesurar els àcids grassos lliures del medi per saber si en 24 h hi havia diferències entre el consum dels controls o dels cardiomiòcits *knock-down* per frataxina, tant en medi estàndard (Figura 56A) com en medi suplementat amb àcids grassos (Figura 56B). No vam detectar diferències en el contingut d'AG entre els cultius control (shscr) i els interferits (sh34 i sh80) en cap dels dos medis, ja fos medi estàndard (MC) o medi suplementat amb AG (MC+AG).

3.7.2. Metabolisme lipídic

Com que no semblava que l'acumulació de les LD fos la causa de l'augment del consum de lípids, vam analitzar si el problema era en el catabolisme d'aquests. Vam mesurar primer els nivells de diferents proteïnes del catabolisme lipídic. Dues deshidrogenases (la *medium chain acyl-CoA dehydrogenase* – MCAD i la *very-long chain acyl-CoA dehydrogenase* - VLCAD), la subunitat alfa de la proteïna trifuncional mitocondrial de la beta-oxidació (TFP, MTP, o HADHA de *hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, alpha subunit*) i les flavoproteïnes de transport electrònic (ETF de *electron transfer flavoprotein* i ETFDH o ETFQO de *electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase*). La cadena respiratòria ja l'havíem mirat anteriorment. L'únic enzim que vam detectar augmentat de manera repetitiva va ser la deshidrogenasa MCAD (Figura 57A-B), que és l'específica per cadenes d'àcids grassos de 4 a 16 carbonis (o de 4 a 12 depèn de la font) i que usa FAD com a cofactor.

Com que el metabolisme dels lípids als cardiomiòcits està controlat en gran part per la família de receptors nuclears, i més concretament pels *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR), vam decidir estudiar la implicació d'aquests factors i el coactivador PGC1 α en l'acumulació de lípids (en forma d'LD) i en l'augment de l'MCAD.

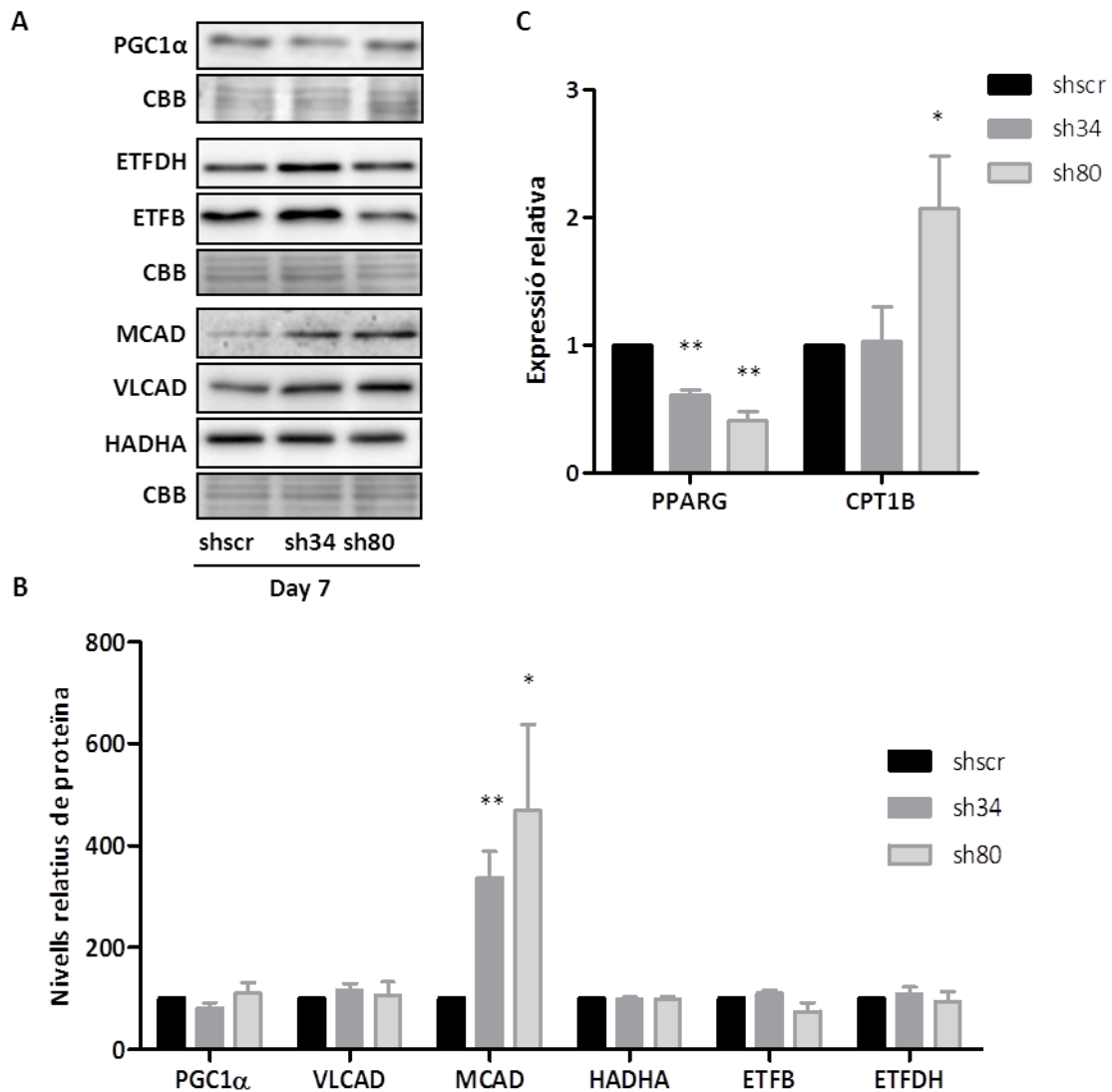


Figura 57. Anàlisi dels enzims i factors transcripcionals implicats en el catabolisme dels lípids. (A) *Western blots* contra proteïnes implicades en el catabolisme lipídic. El contingut de la majoria de proteïnes implicada en el catabolisme dels lípids no variava entre els cardiomiòcits control i els interferits, però s'observava una forta inducció de l'MCAD en els cardiomiòcits interferits per frataxina (sh34 i sh80). (B) Quantificació dels *western blots* contra proteïnes del catabolisme lipídic. Es va observar un augment de la proteïna MCAD en els cultius deficientes per frataxina comparat amb els control. (C) Anàlisi de l'expressió de PPARG i CPT1B. L'expressió de CPT1B estava augmentada en els cardiomiòcits interferits amb sh80 però no en els sh34. L'expressió de PPARG era menor en els cardiomiòcits silenciats per frataxina que en els control (shscr).

Aquesta família consta de tres isoformes. La isoforma PPARα s'expressa predominantment en teixits amb gran capacitat oxidativa, com per exemple el cor. PPARβ/δ s'expressa ubiquament i s'ha vist que té un rol important també en el metabolisme lipídic del cor. Tot i que està menys descrit, es creu que té les mateixes dianes que PPARα, que serien bàsicament la captació i l'oxidació dels FA. A més, el KO per PPARβ/δ acumula LD, cosa que no passa al cor del mutant per PPARα (Yang & Li, 2007).

L'isoforma PPAR γ s'expressa sobretot en adipòcits i, tot i que hi ha controvèrsia sobre la seva funció al cor, es creu que podria jugar un paper en el metabolisme lipídic; s'ha vist que el canvi en l'ús d'AG a glucosa i acumulació de lípids que es dona en la hipertròfia i la fallida cardíaca podria estar mediat per un eix HIF1 α – PPAR γ , que estarien regulats a l'alça; el primer activaria els gens glicolítics i el segon activaria la captació d'AG i la síntesi de glicerolípid. Aquests canvis portarien a un augment del flux glicolític i a una conversió de glucosa a lípid per la via del glicerol-2-fosfat, a més d'apoptosi i disfunció contràctil (Krishnan et al., 2009).

Vam mesurar els nivells de proteïna de PGC1 α en cardiomiòcits (Figura 57A), els quals no estaven alterats, i també els nivells d'expressió de PPAR γ (Figura 57C), els quals estaven disminuïts en el miòcits interferits (sh34 i sh80) respecte als control (shscr). També vam mesurar els nivells d'expressió de CPT1B com a diana d'aquests factors (Figura 57C). Tot i estar induïda en els cardiomiòcits interferits per frataxina amb la seqüència sh80, no ho estava amb la seqüència sh34 pel que no semblava que hi hagués una activació dels PPAR, sinó més aviat una regulació a la baixa.

Conjuntament aquests resultats mostraven que no hi havia una regulació a la baixa dels enzims implicats en el catabolisme dels lípids, sinó més aviat el contrari, perquè els cardiomiòcits deficients en frataxina mostraven una certa activació d'aquesta via com mostraven l'augment d'MCAD i la disminució de PPAR γ .

3.7.3. Oxidació d'àcids grasos

Com que tot i tenir l'MCAD molt induïda les cèl·lules deficients en frataxina acumulaven LD, cosa que d'entrada semblava paradòxica, vam decidir analitzar les activitats d'aquests i altres enzims de la β -oxidació. Un dèficit en l'oxidació dels àcids grasos podria provocar que aquests fossin emmagatzemats en forma de LD per evitar efectes tòxics.

Per mesurar l'activitat total, és a dir des de les activitats desidrogenases fins a l'oxidació al cicle de Krebs i la cadena de transport electrònic, vam posar a punt un mètode que mesurés el consum d'un àcid gras activat (palmitoil-CoA) en extrems totals de cardiomiòcits. Els cultius es van lissar en un tampó que conservés la funcionalitat dels

enzims i es van incubar els lisats amb l'AG activat. Es van extreure mostres a diferents temps i es va mesurar la desaparició del substrat (palmitoil-CoA) en mitjançant HPLC.

Tal com s'observa en la Figura 58, no es van observar diferències en la taxa de consum de palmitoil-CoA entre els diferents cultius cel·lulars, cosa que indicava un funcionament normal dels enzims implicats en la β -oxidació dels AG en els cardiomiòcits deficient en frataxina.

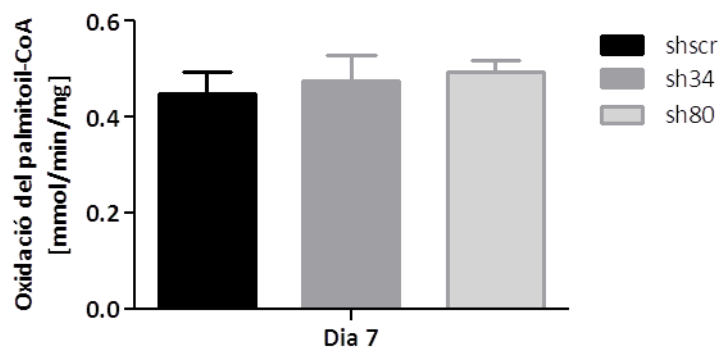


Figura 58. Mesura de l'oxidació del palmitoil-CoA. Els nivells de palmitoil-CoA van ser mesurats en diferents temps mitjançant HPLC i es va calcular l'activitat conjunta de la β -oxidació i el cicle de Krebs com s'explica a "materials i mètodes". No es van observar canvis entre els cardiomiòcits control (shscr) i els deficientes en frataxina (sh34 i sh80) pel que fa a l'activitat enzimàtica. $N \geq 4$.

4. ANÀLISI DEL ROL DE L'ESTRÈS OXIDATIU I ELS SISTEMES ANTIOXIDANTS

L'estrès oxidatiu es considera com un dels majors contribuents a la patologia de l'atàxia de Friedreich. De fet, algunes de les teràpies més prometedores són l'ús de diferents antioxidants. Hi ha principalment dues hipòtesis vigents on l'estrès oxidatiu juga un paper més o menys primari a la patofisiologia. La primera hipòtesi proposa que la pèrdua de les proteïnes amb centres ferro-sofre provocaria una acumulació de ferro que a la vegada provocaria un augment de les ROS i així es donaria un cercle viciós que portaria a la disfunció cel·lular. L'altra hipòtesi seria que a les cèl·lules silenciades per frataxina tindrien una senyalització deficient de defenses antioxidants cosa que provocaria que els centres ferro-sofre fossin més sensibles als ROS, i la pèrdua d'aquests cofactors provocaria l'acumulació de ferro (Bayot et al., 2011).

4.1. Anàlisi de la resistència a l'estrès oxidatiu

Els diferents estudis duts a terme en models amb un dèficit total de frataxina han descrit que les cèl·lules deficientes en frataxina presenten menys defenses antioxidants i un augment de l'estrès oxidatiu en condicions basals. En canvi, els estudis realitzats en cèl·lules de pacients i en models amb deficiència parcial de frataxina no han observat una reducció dels *pools* d'antioxidants o dels enzims antioxidants. Ara bé, aquestes cèl·lules sí que presenten una sensibilitat major a agents oxidatnts, tant exògens com endògens (Bayot et al., 2011).

Per saber si els nostres cultius també seguien aquesta pauta, ja que tenen poca frataxina però no està delecionada del tot, vam tractar les cèl·lules amb diferents concentracions de l'agent oxidant *tert*-butil hidroperòxid (tBHP) i vam fer un assaig de viabilitat amb MTT. Com es pot observar al gràfic de la figura 59, les cèl·lules deficientes en frataxina mostraven una lleugera major sensibilitat que les cèl·lules control a l'oxidant tBHP.

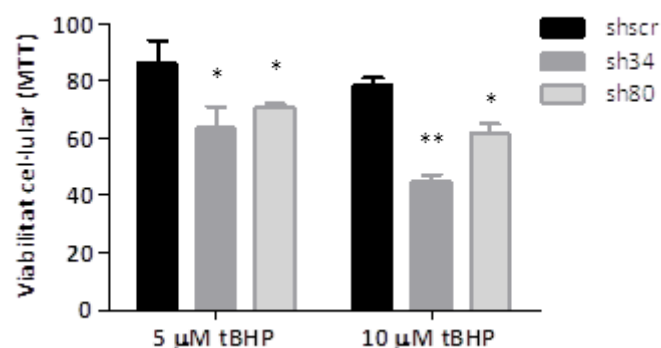


Figura 59. Sensibilitat a l'estrès oxidatiu. Les cèl·lules cardíques crescudes en p96 es van tractar amb diferents concentracions de tBHP durant 30 min i es va mesurar la viabilitat amb l'assaig MTT. Dades relatives a l'absorbància obtinguda en cèl·lules control (shscr) no tractades. Els cardiomiòcits interferits (sh34 i sh80) mostren una major sensibilitat a l'agent oxidant tBHP en comparació als control (shscr).

4.2. Anàlisi de la modificació oxidativa de proteïnes

Com que havíem observat una major sensibilitat a l'estrès oxidatiu, vam voler estudiar si es donava una situació basal de major estrès en les cèl·lules deficientes en frataxina. Com

que les proteïnes són una de les principals dianes de les ROS, vam estudiar diferents modificacions com la glutatiolació, la nitració de la tirosina i la carbonilació proteica.

4.2.1. Glutatiolació

La glutatiolació és una modificació postraduccionals dels tiols dels residus de cisteïnes, on s'hi uneix un glutatió. El glutatió és la molècula de baix pes molecular amb tiols més important i més abundant. La glutatiolació s'indueix quan hi ha estrès oxidatiu i es creu que podria protegir els tiols de les proteïnes d'una oxidació irreversible. S'ha descrit que pot modificar molts enzims i en redueix l'activitat catalítica. Com s'ha dit, és reversible, i la reducció dels ponts disulfur la poden catalitzar les tioredoxines/tioredoxina reductasa, les glutaredoxines i les proteïnes disulfur-isomerasa (Ghezzi, 2013).

Per tal d'analitzar si es produïa un augment del nombre de proteïnes glutatiolades, es va dur a terme un *western blot* contra glutatió en extrems totals de cardiomiòcits. Els resultats (Figura 60A) indicaven que no hi havia un augment general de les proteïnes glutatiolades.

4.2.2. 3-Nitrotirosina

La 3-nitrotirosina s'ha proposat com un marcador de la nitració dels residus de tirosina de proteïnes (Ohshima, Friesen, Brouet, & Bartsch, 1990) causada per espècies reactives del nitrogen (RNS) (Pacher et al., 2007). S'assumeix que una major nitració de tirosina soluble i proteica es pot usar com a marcador d'estrès nitrosatiu (Murphy, Dandy, & Henry, 2009). Aquesta modificació provoca disfunció cel·lular i s'associa a diferents patologies (Dalle-Donne et al., 2006).

La modificació amb 3-nitrotirosina es va detectar mitjançant *western blot* en extrems totals de cardiomiòcits control i deficients en frataxina. No es van observar diferències entre els diferents grups, ni a nivell del patró de proteïnes modificades ni dels nivells generals de 3-nitrotirosina (Figura 60B).

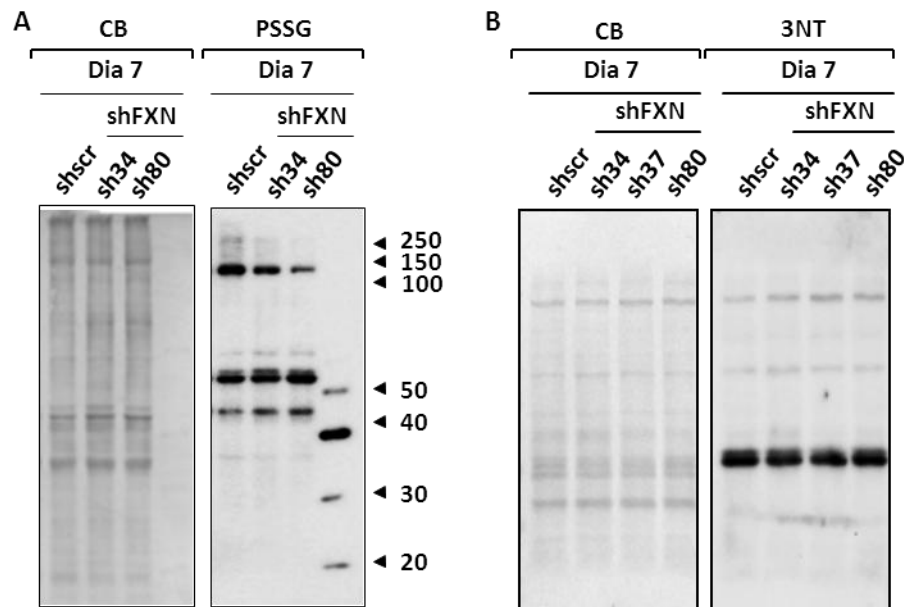


Figura 60. Modificació oxidativa de proteïnes. (A) Glutatiolació de proteïnes. **(B)** Nitració de tirosina. *Western blots* contra proteïnes glutatiolades (PSSG) i contra 3-nitrotirosina (3NT) d'extrets totals de cardiomiòcits control (shscr) i interferits per frataxina (shFXN). No es van observar canvis del patró de proteïnes glutatiolades o amb 3-nitrotirosina, així com tampoc un augment general de les modificacions en els miòcits interferits respecte als control.

4.2.3. Carbonilació

La carbonilació (un altre tipus d'oxidació proteica) és deguda a les cetones o aldehids reactius provocats per les ROS en les cadenes laterals dels aminoàcids. Aquests grups poden ser detectats gràcies a que poden reaccionar amb les 2,4-dinitrofenilhidrazines (DNPH) i formar hidrazones (revisat a (Irazusta, Moreno-Cermeño, Cabisco, Tamarit, & Ros, 2010; Scaloni, Zolla, Møller, Rogowska-Wrzesinska, & Rao, 2011)). En el nostre model, vam mirar l'oxidació proteica en extrets totals i mitocondrials, amb un *western blot* contra DNPH.

Tal com es mostra a la figura 61 es va detectar un augment de les proteïnes carbonilades en els extrets totals dels cardiomiòcits deficientes per frataxina (sh34 i sh80) respecte als controls (shscr). Com que els mitocondris són el principal lloc de producció de ROS vam analitzar també extrets mitocondrials per detectar-hi les proteïnes carbonilades. Els extrets mitocondrials no presentaven canvis en la carbonilació de proteïnes entre els cultius de cardiomiòcits silenciats per frataxina i els controls.

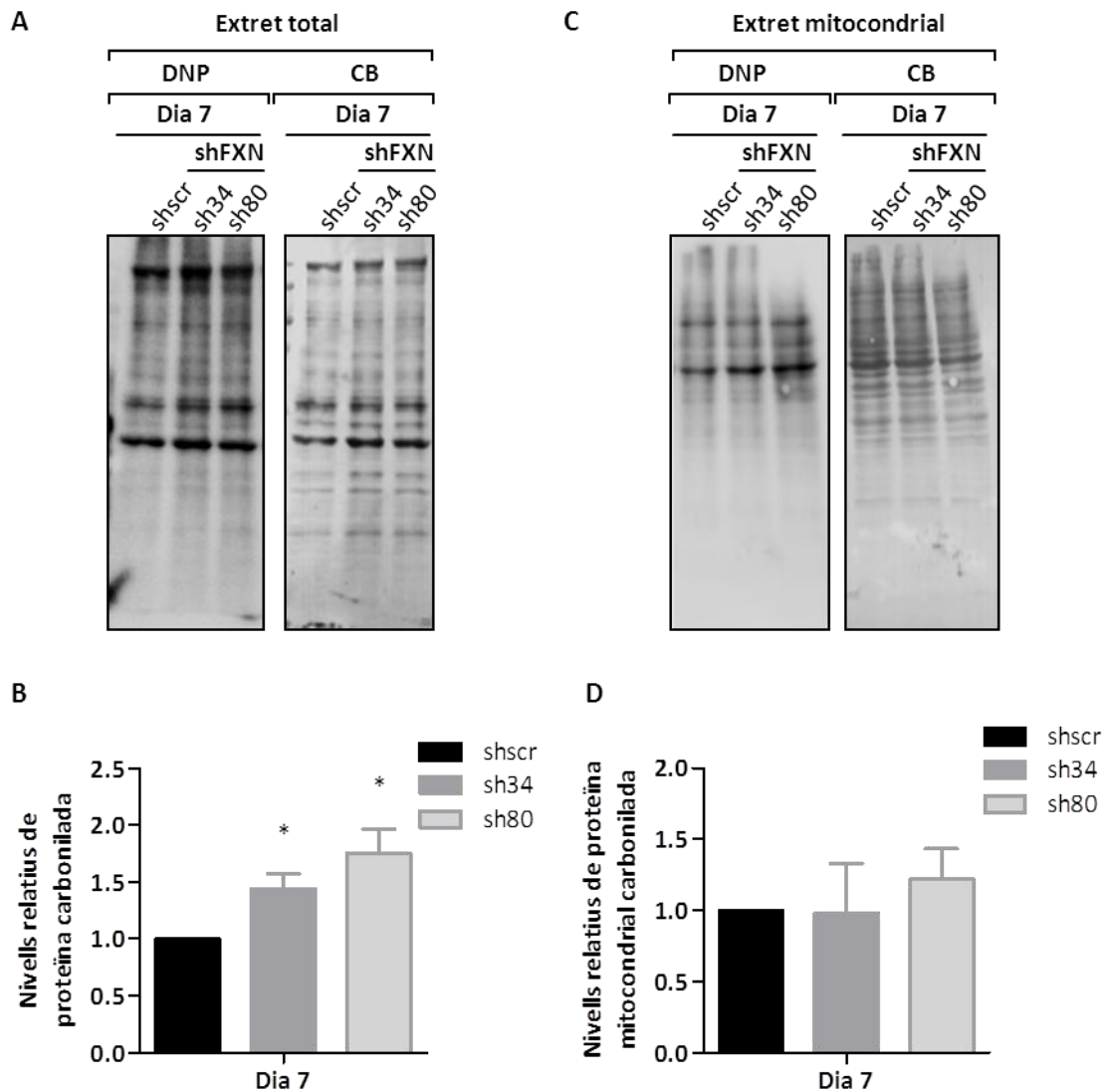


Figura 61. Carbonilació de proteïnes. *Western blots* contra DNP d'extrets totals Ni enriquits en mitocondris (C-D) de cardiomiòcits control (shscr) i interferits per frataxina (shFXN). Quantificació dels *western blots* d'extrets totals (B) i mitocondrials (D) amb el programa ImageLab i usant la tinció de proteïna amb blau comassie (CB) de referència. Mentre que a l'extret mitocondrial no es van observar canvis en els nivells de carbonilació proteica, als extrets totals de les cèl·lules silenciades per frataxina s'observava un augment significatiu dels nivells de carbonilació general.

4.3. Anàlisi dels sistemes antioxidants

El cor té diferents sistemes antioxidants per detoxificar les diferents espècies reactives d'oxigen (ROS) en diferents compartiments cel·lulars. Per saber l'estat de les defenses antioxidants dels cardiomiòcits deficientes en frataxina vam estudiar les superòxid dismutases, ja que estudis anteriors del nostre grup, mostraven una alteració d'aquests enzims.

4.3.1. Superòxid dismutasa 1 i 2

Les superòxid dismutases són els enzims encarregats de detoxificar l'anió superòxid. La SOD2 és mitocondrial mentre que la SOD1 és citosòlica. Al cor, la majoria d'activitat SOD és deguda a la SOD2 (aproximadament un 90% als miòcits cardíacs (Assem et al., 1997)). La SOD2 té una gran importància en la regulació de l'estrès oxidatiu al miocardi, sobretot durant el període postnatal, ja que el KO de SOD2 mor després de nàixer per cardiomiopatia dilatada (Li et al., 1995). A més a més, en un model d'FRDA de llevat el nostre grup havia detectat un increment dels nivells de les superòxid dismutases, mentre que la seva activitat estava disminuïda (Irazusta et al., 2010). Tot i així, es podia recuperar l'activitat afegint els cofactors d'aquestes (manganès i coure) i, d'aquesta manera, també es recuperaven alguns fenotips del mutant. Als cardiomiòcits vam voler mesurar com estaven aquests enzims antioxidants i vam detectar una tendència a augmentar els nivells de les SOD (al voltant del 30%) (Figura 62).

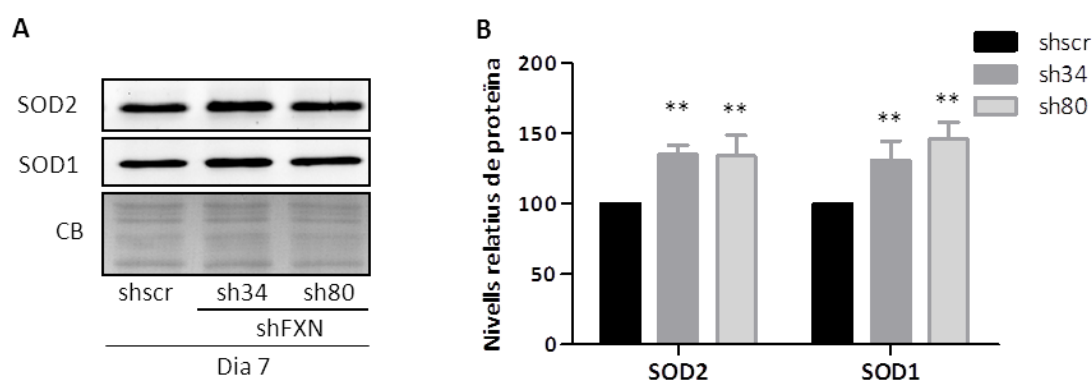


Figura 62. Anàlisi dels nivells de les superòxid dismutases. (A) *Western blots* contra SOD2 (mitocondrial) i SOD1 i control de càrrega amb CB. **(B)** Quantificació dels nivells de proteïna dels *western blots*. A nivell de proteïna es va observar un regulació a l'alça de les dues superòxid dismutases a dia 7 en els cultius de cardiomiòcits silenciats per frataxina.

5. ÒMIQUES

La revolució de les òmiques està essent de gran ajuda pels estudis orientats a la salut, especialment per trobar mecanismes subjacents de malalties, per diagnosi molecular o pel tractament personalitzat. Per tenir una visió més àmplia del que succeïa i veient que semblava que les cèl·lules cardíques deficientes en frataxina patien una mena de canvi metabòlic, vam dur a terme un estudi metabòlic i proteòmic.

5.1. Anàlisi metabòlica

La metabòlica és l'estudi *high-throughput* del metabòlits. Es pot estudiar el perfil de metabòlits presents a la cèl·lula, que s'anomena *metabolic fingerprint*, i els del medi, que s'anomena *footprint*. En el nostre cas vam decidir estudiar el *fingerprint* dels cardiomiòcits.

Els primers passos de la preparació de la mostra per a l'anàlisi metabòlica són crítics per obtenir uns resultats acurats i fiables. Cal fer el mostreig ràpidament, parar/refredar l'activitat metabòlica (el que s'anomena *quench*), separar el medi extracel·lular i extreure els metabòlits. Inicialment es va fer una comparació de diferents protocols d'extracció descrits a la literatura (Dietmair, Timmins, Gray, Nielsen, & Krömer, 2010) (tots ells en fred) per tal d'avaluar el grau de recuperació de metabòlits dels diferents protocols. Aquests eren:

- amb acetonitril al 50% (ACN)
- amb metanol al 50% i un cicle de congelació-descongelació (MF)
- amb metanol al 50% sense congelar (M)
- amb metanol:cloroform 1:1 (MC)
 - la fase superior (metanol – MC-U)
 - la fase inferior (cloroform MC-L).

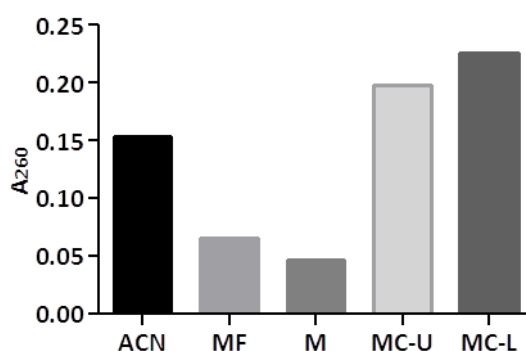


Figura 63. Recuperació de metabòlits amb diferents mètodes d'extracció. Absorbància de les mostres assecades al buit i resuspeses en aigua. Els que presentaven més absorbància (equivalent a més recuperació de metabòlits) van ser l'acetonitril (ACN) i la fase superior (U) i inferior (L) de l'extracció amb metanol:cloroform 1:1 (MC). MF: metanol i cicle de congelació; M metanol.

El grau de recuperació dels metabòlits es va avaluar mesurant l'absorvència dels metabòlits en el mateix solvent i després d'assecar-los al buit i dissoldre'ls en aigua concentrats cinc vegades. Vam decidir utilitzar l'extracció amb acetonitril perquè era el que era capaç de dissoldre un ampli nombre de compostos iònics i no polars, i perquè normalment es fa servir de fase mòbil en l'HPLC i l'LC-MS, a més, no calia separar les dues fases com amb el metanol/cloroform.

Un cop establert el mètode d'extracció, vam dur a terme un anàlisi metabolòmic no dirigit de cultius de cèl·lules de miocardi recollits el dia 4 i el dia 7 després de ser infectats amb virus per provocar una deficiència de frataxina. Les mostres es van analitzar en un sistema cromatogràfic equipat amb un detector MS/MS tipus QTOF, tant en mode d'ionització positiva com negativa. Es van dur a terme 4 rèpliques per a cada condició. Amb les dades obtingudes es van fer dos tipus d'anàlisi multivariant no dirigida, el PCA (*Principal Component Analysis*) i el PLS-DA (*Partial Least Squares – Discriminant Analysis*). Ambdues anàlisis pretenen diferenciar entre classes o grups de mostres fent servir conjunts de dades complexes. El PCA és el mètode no supervisat més usat pel *metabolic fingerprinting*. El PLS-DA és dels mètodes supervisats més usat, i com a tal, té en compte el grup on es classifiquen les mostres a l'hora de fer l'anàlisi.

Aquestes anàlisis permeten visualitzar de manera tridimensional la similitud i les diferències entre mostres. Cada punt del mateix color representa una rèplica d'una mostra en concret, i cada color correspon a les diferents mostres (shscr, sh34 sh37 i sh80) d'un dia concret (dia 4 i dia 7). Es van fer dos tipus d'anàlisi. El primer tenia en compte tots els grups de mostres per separat (Figures 64 i 66) i en el segon s'agrupaven totes les mostres interferides per frataxina (sh34, sh37 i sh80) per comparar-les amb els controls (shscr). Els tres eixos de coordenades (anomenats components) són una transformació lineal que usa el conjunt original de dades per triar un subconjunt de dades en el qual hi ha la màxima variància entre mostres, i així amb cada component. En les figures 64, 65, 66 i 67 es mostren els resultats d'aquest tipus d'anàlisi en base a tres components principals. Primer es mostren els anàlisis de PCA i PLS-DA amb ionització positiva (Figures 64 i 65) i després amb negativa (Figures 66 i 67).

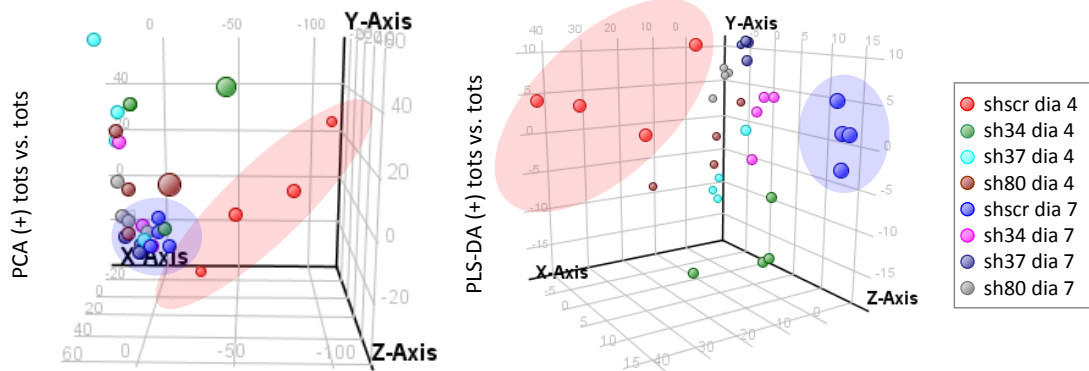


Figura 64. Anàlisi metabòlica en positiu de totes les mostres. PCA (esquerra) i PLS-DA (dreta) 75% de molècules com a mínim en una condició: 1067; $p < 0.05$, $FC \geq 2 = 120$; $p < 0.05$, $FC \geq 1 = 129$. PLS-DA amb una precisió de 0,84. Es demostrava la diferenciació entre els mostres control (el·lipses vermelles i blaves) i les deficientes en frataxina (resta de punts), sobretot al PLS-DA.

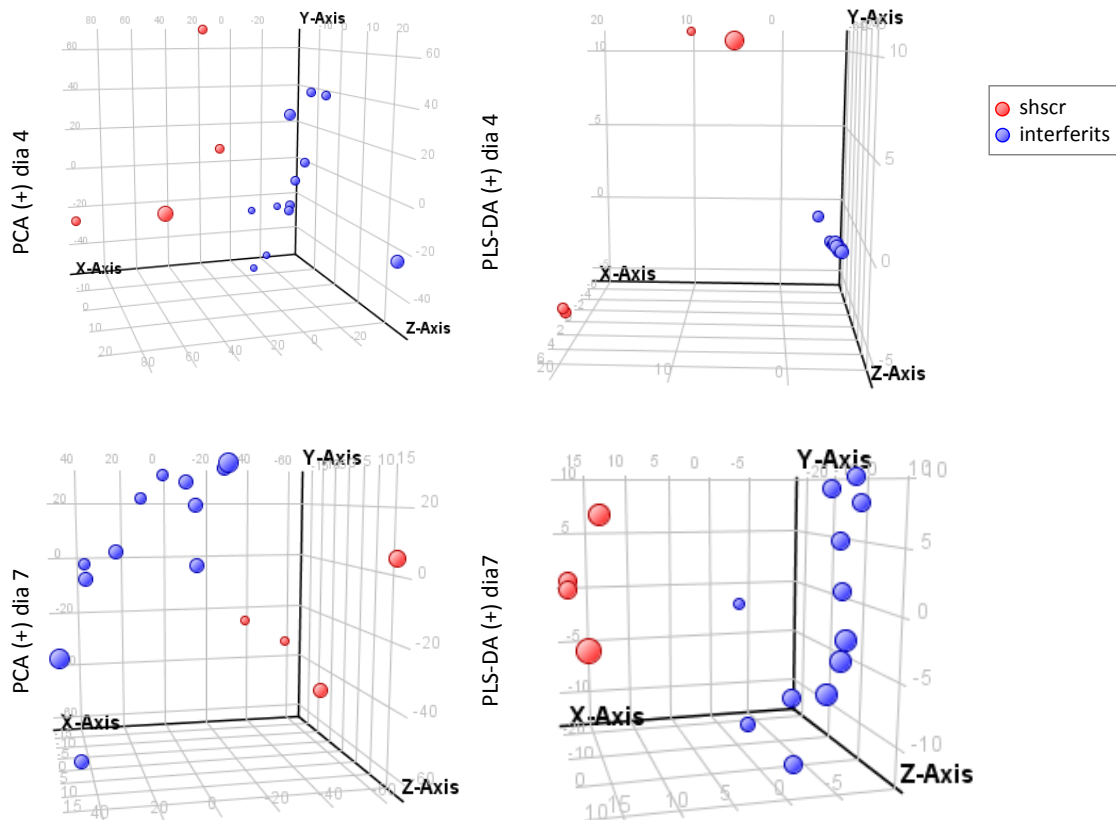


Figura 65. Anàlisi metabòlica en positiu del control (shscr) vs. el conjunt d'interferits. PCA (esquerra) i PLS-DA (dreta). A dalt: anàlisi del dia 4; 75% de molècules com a mínim en una condició: 567; $p < 0.05$, $FC \geq 2 = 145$; $p < 0.05$, $FC \geq 1 = 153$. PLS-DA amb una precisió de 1. A baix: anàlisi del dia 7; 75% de molècules com a mínim en una condició: 630; $p < 0.05$, $FC \geq 2 = 63$; $p < 0.05$, $FC \geq 1 = 90$. PLS-DA amb una precisió de 0,75. Tots els anàlisis mostren Es mostra una separació a dia 4 i a dia 7. Aquests anàlisis mostren una millor agrupació de totes les mostres deficientes en frataxina que en aquest cas s'han agrupat en un conjunt (interferits).

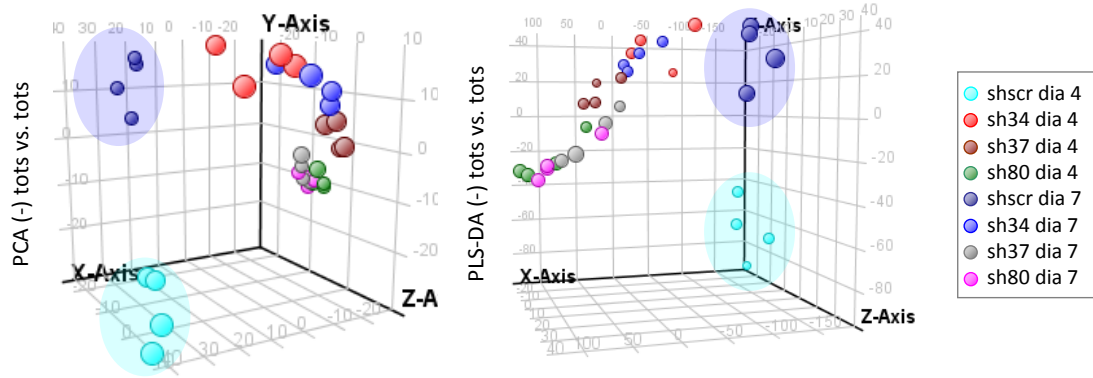


Figura 66. Anàlisi metabòlica en negatiu de totes les mostres. PCA (esquerra) i PLS-DA (dreta) 75% de molècules com a mínim en una condició: 1633; $p < 0.05$, $FC \geq 2 = 1197$; $p < 0.05$, $FC \geq 1 = 1232$. PLS-DA amb una precisió de 0,81. El nombre de molècules és molt superior a l'obtingut en la ionització en positiu i les rèpliques mostren una major agrupació entre elles i una major separació de la resta. També permet diferenciar bé entre les rèpliques de la mateixa mostra corresponent als diferents dies (4 i 7) sobretot en els controls (shscr – el·lipses blau clar i blau fosc).

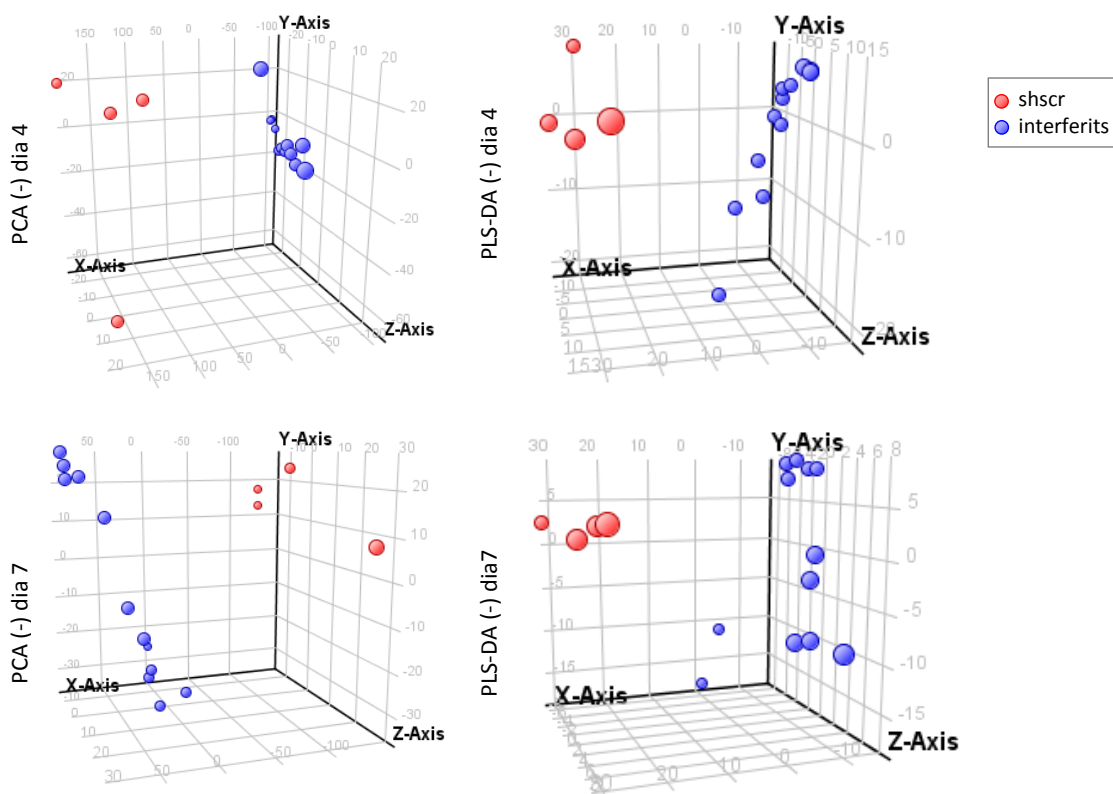


Figura 67. Anàlisi metabòlica en negatiu dels controls (shscr) vs. els interferents. PCA (esquerra) i PLS-DA (dreta) A dalt: anàlisi del dia 4; 75% de molècules com a mínim en una condició: 735; $p < 0.05$, $FC \geq 2 = 535$; $p < 0.05$, $FC \geq 1 = 563$. PLS-DA amb una precisió de 1. A baix: anàlisi del dia 7; 75% de molècules com a mínim en una condició: 696; $p < 0.05$, $FC \geq 2 = 369$; $p < 0.05$, $FC \geq 1 = 420$. PLS-DA amb una precisió de 0,88. Els cultius interferents per frataxina usant diferents seqüències d'RNAi (blau) s'agrupen entre ells, demostrant que comparteixen la majoria de molècules característiques que a la vegada els separen dels controls (vermell).

Als experiments en negatiu (Figura 66) es van obtenir més molècules diferencials entre mostres que als experiments en positiu (Figura 64). A més, amb ionització negativa es separaven millor les mostres en els dos tipus d'anàlisi multivariant. Si es compara entre els diferents dies, el dia 4 ja es podia observar una separació dels cultius *knock-down* respecte als shscr, sobretot als experiments en negatiu. Aquesta separació es feia encara més evident el dia 7.

Posteriorment es van analitzar quins eren els compostos que podien ser responsables de la diferenciació entre els cardiomiocits deficient en frataxina respecte als controls en base a la relació massa-càrrega (m/Q) i quines eren les vies afectades. La identificació dels compostos, però, encara està per confirmar.

L'anàlisi de les vies afectades es va dur a terme usant l'eina d'anàlisi de vies metabòliques *MetaboAnalyst 2.0* fent servir els compostos indexats a les bases de dades *Human Molecular Data Base (HMDB)* i *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*. El software *MetaboAnalyst 2.0* permet una interpretació funcional de les dades de metabolòmica, ja que, entre altres eines, permet la representació gràfica de les principals vies afectades. En el nostre cas vam analitzar les dades amb aquesta eina i els resultats es mostren a les següents figures i taules.

Es van analitzar els dies per separat per poder veure si algunes vies que s'afectaven el dia 4 (Figura 68) després de la infecció encara es mantenien afectades a dia 7.(Figura 69). Cada rodona numerada representa una via metabòlica i el color (més vermell) i la grandària són proporcionals a la importància que li assigna el programa segons els possibles metabòlits afectats.

A les taules 4, 5, es llisten les diferents vies i metabòlits afectats segons l'anàlisi amb el programa *MetaboAnalyst 2.0*, amb els diferents metabòlits afectats de cada via i diferents paràmetres que indiquen la importància de cada una segons el nombre de metabòlits totals i el nombre de metabòlits (teòrics de cada via) i el nombre de possibles metabòlits alterats que es van obtenir a l'anàlisi metabolòmic.

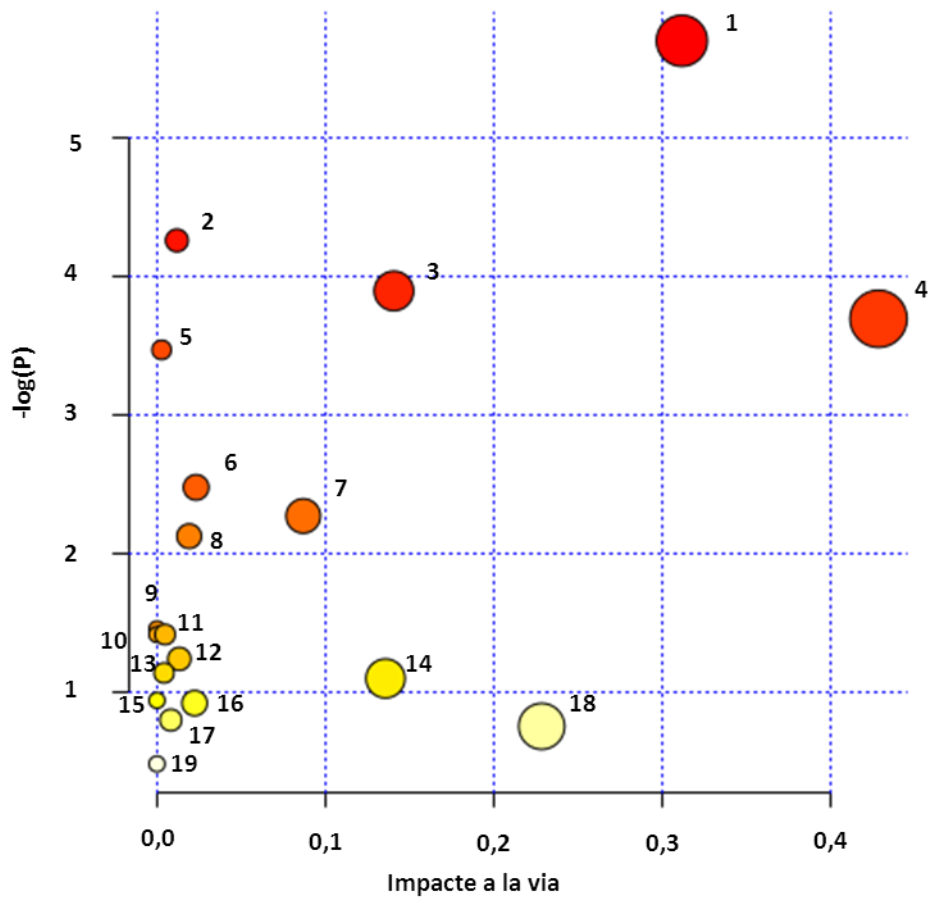


Figura 68. Vies afectades en els cardiomiòcits silenciats per frataxina a dia 4. Representació gràfica de l'anàlisi dels metabòlits alterats a dia 4 en els miòcits deficients en frataxina amb el *software Metaboanalyst 2.0K*, que utilitza mesures de centralitat per analitzar la importància relativa dels metabòlits i les vies. L'*impacte* màxim d'una via és 1. La *p* es calcula segons l'enriquiment de metabòlits de cada via. Les rodones representen vies metabòliques diferents i els colors i la mida la importància de la via (com més vermella i més gran la rodona, més importància té la via tenint en compte el conjunt de metabòlits alterats). Cada rodona numerada representa una via. La informació de cada via es detalla a la taula següent.

Codi	Nom de la via	Total	Hits	p	-log(p)	Holm p	FDR	Impacte	Metabòlits
1	Sphingolipid metabolism	25	3	0.003341 2	5.7014	0.2673	0.2673	0.3114	Sphinganine 1-phosphate
									Ceramide
									Phytosphingosine
2	Arginine and proline metabolism	77	4	0.014107	4.2611	1.0	0.49656	0.01182	N-Acetyl-L-glutamyl 5-phosphate
									N2-Succinyl-L-ornithine
									N-Acetylputrescine
									Glyoxylic acid
3	Sulfur metabolism	18	2	0.020304	3.897	1.0	0.49656	0.14055	Sulfite
									O-acetylserine
4	Taurine and hypotaurine metabolism	20	2	0.024828	3.6958	1.0	0.49656	0.42806	Taurine
									Sulfite
5	Cysteine and methionine metabolism	56	3	0.031062	3.4718	1.0	0.49699	0.00276	O-acetylserine
									3-Sulfinylpyruvic acid
									Sulfite
6	Inositol phosphate metabolism	39	2	0.083742	2.48	1.0	1.0	0.02322	Inositol 1,3,4,5-tetrphosphate
									1-Phosphatidyl-1D-myo-inositol 3-phosphate
7	Nicotinate and nicotinamide metabolism	44	2	0.10294	2.2736	1.0	1.0	0.08679	Nicotinic acid mononucleotide
									Niacinamide
8	Glycine, serine and threonine metabolism	48	2	0.11909	2.1279	1.0	1.0	0.01909	Glyoxylic acid
									Phosphohydroxypyruvic acid
9	Caffeine metabolism	21	1	0.2324	1.4593	1.0	1.0	0.0	Glyoxylic acid
10	Retinol metabolism	22	1	0.24205	1.4186	1.0	1.0	0.0	Retinyl palmitate
11	Selenoamino acid metabolism	22	1	0.24205	1.4186	1.0	1.0	0.00482	O-Acetylserine
12	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	1	0.28858	1.2428	1.0	1.0	0.01325	L-Leucine
13	Purine metabolism	92	2	0.31927	1.1417	1.0	1.0	0.00419	Xanthosine 5-triphosphate
									Glyoxylic acid
14	Pentose phosphate pathway	32	1	0.33233	1.1016	1.0	1.0	0.13556	6-Phosphogluconic acid
15	Nitrogen metabolism	39	1	0.38925	0.94354	1.0	1.0	0.0	Taurine

16	Valine, leucine and isoleucine degradation	40	1	0.39699	0.92386	1.0	1.0	0.02232	L-Leucine
17	Primary bile acid biosynthesis	47	1	0.44856	0.80172	1.0	1.0	0.00822	Taurine
18	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	50	1	0.46933	0.75645	1.0	1.0	0.22823	Glyoxylic acid
19	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	1	0.61538	0.48551	1.0	1.0	0.0	L-Leucine

Taula 4. Vies metabòliques afectades el dia 4. La taula mostra els resultats detallats de l'anàlisi de les vies amb el *software Metabolanalyst 2.0*. *Total* és el nombre de components de la via. *Hits* és el nombre de components o metabòlits de la via que s'han trobat alterats. La *p* està calculada amb un anàlisi d'enriquiment de metabòlits de la via. La *Holm p* és el valor de *p* ajustat pel mètode Holm-Bonferroni, l'*FDR p* és el valor de *p* ajustat usant el *False Discovery Rate*, l'*impacte* és el valor calculat amb amb l'anàlisi topològic de la figura anterior.

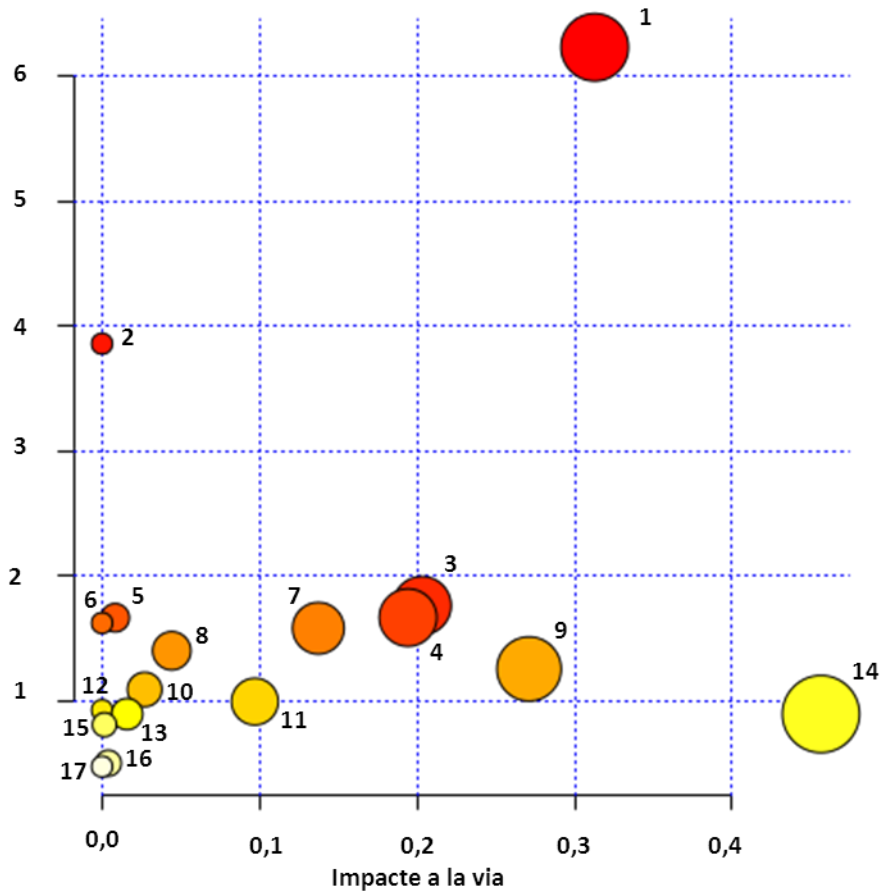


Figura 69. Vies afectades en els cardiomiòcits silenciatos per frataxina a dia 7. Representació gràfica de l'anàlisi dels metabòlits alterats a dia 4 en els miòcits deficientes en frataxina amb el *software Metaboanalyst 2.0K*, que utilitza mesures de centralitat per analitzar la importància relativa dels metabòlits i les vies. L'*impacte* màxim d'una via és 1. La *p* es calcula segons l'enriquiment de metabòlits de cada via. Les rodones representen vies metabòliques diferents i els colors i la mida la importància de la via (com més vermella i més gran la rodona, més importància té la via tenint en compte el conjunt de metabòlits alterats). Cada rodona numerada representa una via. La informació de cada via es detalla a la taula següent.

Codi	Nom de la via	Total	Hits	p	-log(p)	Holm p	FDR	Impacte	Metabòlits
1	Sphingolipid metabolism	25	3	0.0019589	6.2354	0.15671	0.15671	0.15641	Glucosylceramide
									Galabiosylceramide
									Sphingosine
2	Retinol metabolism	22	2	0.021072	3.8598	1.0	0.84287	0.0	Retinyl palmitate
									Retinoyl b-glucuronide
3	Sulfur metabolism	18	1	0.17188	1.7609	1.0	1.0	0.10157	Sulfite
4	Taurine and hypotaurine metabolism	20	1	0.18913	1.6653	1.0	1.0	0.09712	Sulfite
5	Arginine and proline metabolism	77	2	0.18945	1.6636	1.0	1.0	0.00417	N2-Succinyl-L-ornithine
									Glyoxylic acid
6	Caffeine metabolism	21	1	0.19762	1.6214	1.0	1.0	0.0	Glyoxylic acid
7	Selenoamino acid metabolism	22	1	0.20603	1.5797	1.0	1.0	0.06867	Selenomethionine
8	Fatty acid elongation in mitochondria	27	1	0.24681	1.3991	1.0	1.0	0.02213	Octanoyl-CoA
9	Pentose phosphate pathway	32	1	0.28558	1.2532	1.0	1.0	0.13556	6-Phosphogluconic acid
10	Inositol phosphate metabolism	39	1	0.33665	1.0887	1.0	1.0	0.01353	1-Phosphatidyl-1D-myo-inositol 3-phosphate
11	Nicotinate and nicotinamide metabolism	44	1	0.37096	0.99165	1.0	1.0	0.04852	Nicotinic acid mononucleotide
12	Glycine, serine and threonine metabolism	48	1	0.39718	0.92336	1.0	1.0	0.0	Glyoxylic acid
13	Fatty acid metabolism	50	1	0.40989	0.89186	1.0	1.0	0.00796	Octanoyl-CoA
14	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	50	1	0.40989	0.89186	1.0	1.0	0.22823	Glyoxylic acid
15	Cysteine and methionine metabolism	56	1	0.4465	0.80631	1.0	1.0	7.6E-4	Sulfite
16	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	88	1	0.60776	0.49797	1.0	1.0	0.00197	Uridine diphosphate-N-acetylgalactosamine
17	Purine metabolism	92	1	0.62442	0.47094	1.0	1.0	0.0	Glyoxylic acid

Taula 5. Vies metabòliques afectades el dia 7. La taula mostra els resultats detallats de l'anàlisi de les vies amb el *software Metabolanalyst 2.0*. *Total* és el nombre de components de la via. *Hits* és el nombre de components o metabòlits de la via que s'han trobat alterats. La *p* està calculada amb un anàlisi d'enriquiment de metabòlits de la via. La *Holm p* és el valor de *p* ajustat pel mètode Holm-Bonferroni, l'*FDR p* és el valor de *p* ajustat usant el *False Discovery Rate*, l'*impacte* és el valor calculat amb amb l'anàlisi topològic de la figura anterior.

A més a més dels metabòlits que s'han citat a les taules 4 i 5, altres possibles metabòlits quedaven fora de l'anàlisi dut a terme amb el *software Metaboanalyst 2.0*, ja sigui perquè no els assignava a cap via o perquè no en reconeixia el nom o l'identificador. Aquests metabòlits es mostren a la taula següent (Taula 6), juntament amb la via associada a cadascun d'aquests utilitzant les bases de dades HMDB (*Human Metabolome Database*) i SMPDB (*Small Molecule Pathway Database*).

Nom de la via	Metabòlits
O-glycan biosynthesis and Hexosamine biosynthetic pathway	UDP-N-Acetylgalactosamine
Collagen biosynthesis or Lysine degradation	5-Hydroxylysine
Glutamate metabolism	Glutamate
Glutathione metabolism	S-Sulfanylgutathione
Pyruvate, vitamin B6 and thiamine metabolism	Pyridoxal phosphate
Mitochondrial Electron Transport Chain and Ubiquinone biosynthesis	Ubiquinone / Ubiquinone -1 / Ubiquinone -6

Taula 6. Altres vies metabòliques afectades. La taula mostra altres possibles metabòlits alterats en l'anàlisi metabolòmic i les vies afectades segons cadascun d'aquests a dies 4 i 7 usant les bases de dades HMDB (*Human Metabolome Database*) i SMPDB (*Small Molecule Pathway Database*) usant metabòlits exclosos de l'anàlisi amb el *software Metaboanalyst 2.0*.

De la mateixa manera, molts dels possibles metabòlits alterats eren lípids, la majoria dels quals no eren tinguts en compte per les anàlisis anteriors. Així és que vam classificar els possibles metabòlits lipídics en les seves corresponents classes segons la base de dades LIPID MAPS (*LIPID MAPS Structure Database*) (Fahy et al., 2005, 2009). La taula següent (Taula 7) enumera les diferents classes de lípids afectats segons l'anàlisi metabòlic (entre claudàtors es mostra el codi de casa categoria i classe segons la mateixa base de dades).

Categoria	Classe	Sub-classe
Fatty Acyls [FA]	Fatty Acids and Conjugates [FA01]	Straight chain fatty acids [FA0101]
		Branched fatty acids [FA0102]
		Unsaturated fatty acids [FA0103]
		Hydroperoxy fatty acids [FA0104]
		Hydroxy fatty acids [FA0105]
		Oxo fatty acids [FA0106]
		Amino fatty acids [FA0110]
		Nitro fatty acids [FA0112]
		Dicarboxylic acids [FA0117]
	Eicosanoids [FA03]	Prostaglandins [FA0301]
		Hydroxy/hydroperoxyeicosapentaenoic acids [FA0307]
	Fatty amides [FA08]	N-acyl amines [FA0802]
		Fatty acyl homoserine lactones [FA0803]
N-acyl ethanolamines (endocannabinoids) [FA0804]		
Fatty nitriles [FA09]	Fatty nitriles [FA09]	
Glycerolipids [GL]	Monoradylglycerols [GL01]	Monoacylglycerols [GL0101]
	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]
		Dialkylglycerols [GL0203]
	Triradylglycerols [GL03]	Triacylglycerols [GL0301]
Glycerophospholipids [GP]	Glycerophosphoethanolamines [GP02]	Diacylglycerophosphoethanolamines [GP0201]
		Dialkylglycerophosphoethanolamines [GP0204]
		Monoacylglycerophosphoethanolamines [GP0205]
	Glycerophosphoserines [GP03]	Diacylglycerophosphoserines [GP0301]
	Glycerophosphoglycerols [GP04]	Diacylglycerophosphoglycerols [GP0401]
		Dialkylglycerophosphoglycerols [GP0404]
	Glycerophosphates [GP10]	Diacylglycerophosphates [GP1001]
		Monoacylglycerophosphates [GP1005]
Glycosylglycerophospholipids [GP14]	Diacylglycosylglycerophospholipids [GP1401]	
Sphingolipids [SP]	Sphingoid bases [SP01]	Sphing-4-enines (Sphingosines) [SP0101]

		4-Hydroxysphinganine (Phytosphingosine) [SP0103]
		Sphingoid base homologs and variants [SP0104]
		Sphingoid base 1-phosphates [SP0105]
	Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]
		N-acylsphinganine (dihydroceramides) [SP0202]
		Ceramide 1-phosphates [SP0205]
	Phosphosphingolipids [SP03]	Ceramide phosphoinositols [SP0303]
Neutral glycosphingolipids [SP05]	Simple Glc series [SP0501]	
Acidic glycosphingolipids [SP06]	Sulfoglycosphingolipids (sulfatides) [SP0602]	
Sterol Lipids [ST]	Sterols [ST01]	Cholesterol and derivatives [ST0101]
		Steryl esters [ST0102]
		Ergosterols and C24-methyl derivatives [ST0103]
		Gorgosterols and derivatives [ST0106]
	Steroids [ST02]	C18 steroids (estrogens) and derivatives [ST0201]
		C19 steroids (androgens) and derivatives [ST0202]
		C21 steroids (gluco/mineralocorticoids, progestogens) and derivatives [ST0203]
	Secosteroids [ST03]	Vitamin D2 and derivatives [ST0301]
		Vitamin D3 and derivatives [ST0302]
		Vitamin D4 and derivatives [ST0303]
	Bile acids and derivatives [ST04]	C24 bile acids, alcohols, and derivatives [ST0401]
		C23 bile acids, alcohols, and derivatives [ST0406]
	Steroid conjugates [ST05]	Glycine conjugates [ST0503]
	Isoprenoids [PR01]	C40 isoprenoids (tetraterpenes) [PR0107]
		Retinoids [PR0109]
	Quinones and hydroquinones [PR02]	Ubiquinones [PR0201]
		Vitamin K [PR0203]

Taula 7. Classes de lípids afectades a l'anàlisi metabolòmic. La taula mostra les diferents classes de lípids afectades segons l'anàlisi metabolòmic a dies 4 i 7 usant la base de dades LMDb (*LIPID MAPS Structure Database*) (Fahy et al., 2005, 2009).

5.2. Anàlisi proteòmica

El fet que els cardiomiòcits presentessin un metabolisme alterat ja el dia 4 i que gran part de les vies metabòliques afectades ho estaven tant a dia 4 com a dia 7 ens va portar a realitzar l'estudi proteòmic als 4 dies d'infecció per veure canvis que es donaven en estadis inicials de la deficiència de frataxina. L'estudi del proteoma encara és un camp jove degut a la seva complexitat però durant els últims anys ha progressat gràcies a l'espectrometria de masses i les bases de dades. Per l'estudi proteòmic dels cardiomiòcits vam separar les proteïnes segons el punt isoelectric i el pes molecular en gels bidimensionals.

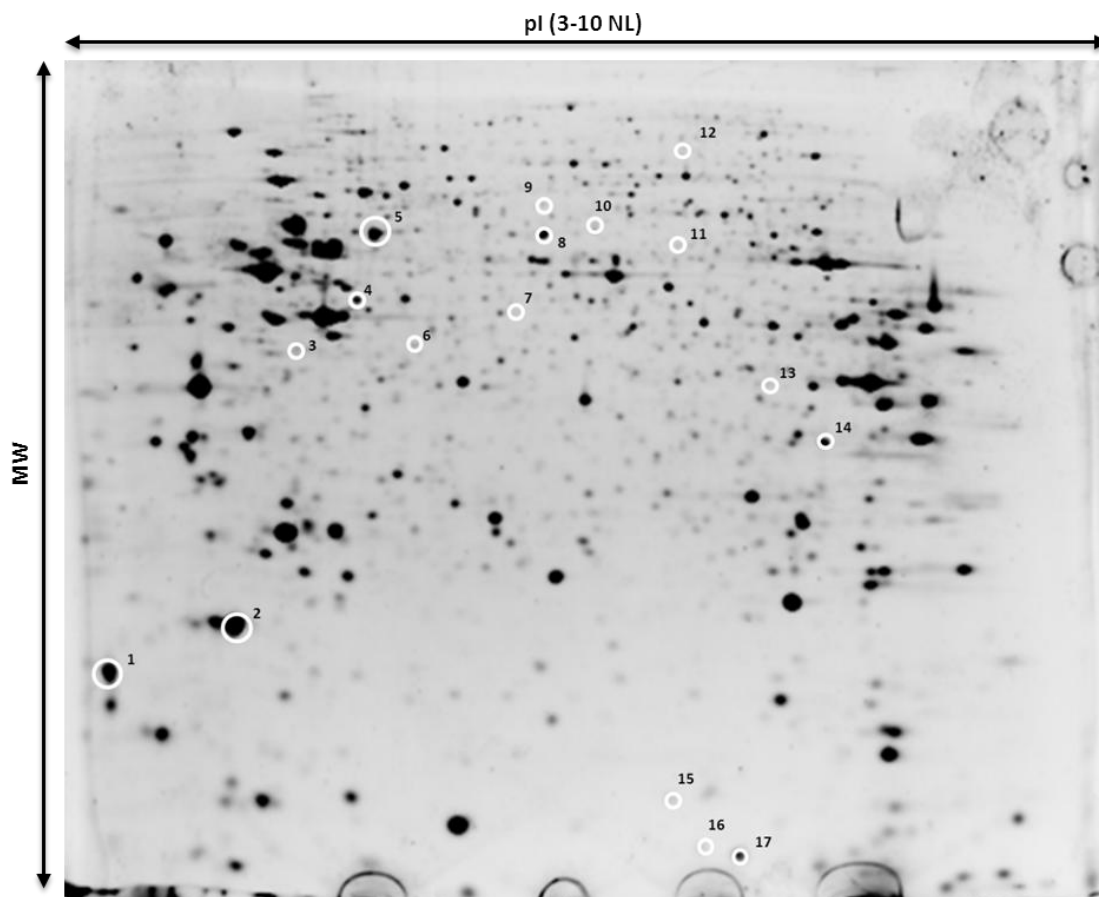


Figura 70. Gel bidimensional representatiu de l'estudi proteòmic amb els spots diferencials marcats. Els cardiomiòcits van ser cultivats en medi estàndard durant quatre dies després de la infecció i es va dur a terme la primera dimensió separant les proteïnes pel punt isoelectric (pI) de pH 3 a 10 no lineal (NL) seguida d'una segona dimensió separant pel pes molecular (MW) tal com està explicat a materials i mètodes. Els *spots* encerclats són els diferencials després de normalitzar pel total de proteïna utilitzant el mètode LOESS (*locally weighted scatterplot smoothing*) i d'aplicar la prova de T-Student amb el *software* PDQuest® entre les classes control (shscr) i interferits (sh34 i sh80).

Extrets totals de 3 cultius independents de cardiomiòcits es van recollir després de 4 dies de ser infectats per provocar el dèficit de frataxina. Els extrets es van tractar com es descriu a materials i mètodes i es va dur a terme un isoelectroenfoc en tires amb gradient de pH 3 a pH 10 (tires IPG de *immobilized pH gradient*). Després es va fer una segona dimensió d'electroforesi en un gel desnaturalitzant (SDS-PAGE) (Figura 70).

Després d'analitzar els gels per trobar els *spots* diferencials amb el software PDQuest® aquests es van digerir amb tripsina i els pèptids obtinguts es van analitzar en un MALDI-TOF/TOF per tal de procedir a la seva identificació. L'anàlisi dels gels proteòmics analítics va resultar en 17 *spots* diferencials entre els cardiomiòcits interferits per frataxina (sh34 i sh80) i els control (shscr). A la figura 71 es mostra una ampliació de les imatges dels gels per cada un dels *spots* que mostrava una variació significativa dels nivells de proteïna. Es va realitzar un gel preparatiu amb més quantitat de proteïna per tallar els *spots* que havien de ser identificats per MS i MS/MS. Dels 17 *spots* diferencials entre els controls i els interferits, 7 van ser identificats després de ser tripsinitzats. Els resultats de la identificació es mostren a les taules 8 i 9. Les proteïnes identificades estaven involucrades en diferents vies com són la regulació de la contracció muscular, la senyalització per calci i intermediaris lipídics, el plegament de proteïnes al reticle i la resposta a l'estrès.

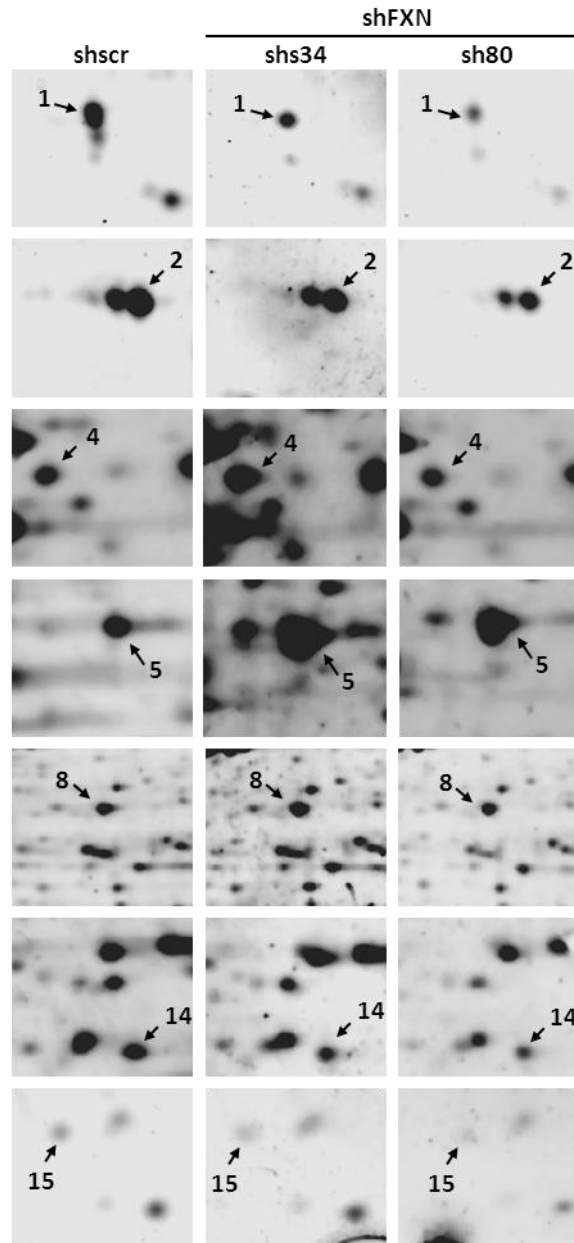


Figura 71. Detall dels spots diferencials identificats en l'anàlisi proteòmica. Els *spots* assenyalats amb una fletxa són els que es van identificar després d'anàlitzar els spots diferencials normalitzant la quantitat de proteïna pel mètode LOESS i aplicant la prova T-Student amb el *software* PDQuest

Spot	Proteïna	Accés Uniprot	Nom	Gen	Regulació	MW	pI	Score	Percentatge Cobertura	Pèptids identificats
CM1	TNNC1	Q4PP99	<i>Cardiac troponin C</i>	Tnnc1	down	17131	4.05	133	20	2
CM2	MLC-2v	P08733	<i>Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform</i>	Myl2	down	18868	4.86	204	84	14
CM4	eIF-4A	Q6P3V8	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4A1</i>	Eif4a	up	44807	5.61	143	33	12
CM5	Hsp60	P63039	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	Hspd1	up	61088	5.91	181	33	17
CM8	p58	P11598	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PdiA3	up	57044	5.88	194	35	18
CM14*	RACK1	P63245	<i>Receptor of activated protein kinase C 1*</i>	Gnb211	down	35511	7.60	74	21	7
CM15*	PKCI-1	P62959	<i>Protein kinase C inhibitor 1*</i>	Hint1	down	13882	6.36			

Taula 8. Hits identificats per MS. Els spots es van digerir amb tripsina i els pèptids es van analitzar en un MALDI-TOF utilitzant l'eina Mascot. Els hits marcats amb un asterisc es van identificar per MS/MS (veure la taula 9).

Spot	Nom	Gen	Observed MW	Ion Score	Seqüència
CM14	<i>Receptor of activated protein kinase C 1</i>	Gnb211	1192.5603	50	DETNYGIPQR
			1309.6352	56	DVLSVAFSSDNR
			1059.5942	5	VWQVTIGTR
CM15	<i>Protein kinase C inhibitor 1</i>	Hint1	1387.7148	36	AQVAQPGGDTIFGK

Taula 9. Hits identificats per MS/MS. Els spots es van digerir amb tripsina i els pèptids es van analitzar en un MALDI-TOF/TOF utilitzant l'eina Mascot..

5.3. Anàlisi de la interacció de la frataxina amb altres proteïnes

Diferents antecedents ens van fer decidir a estudiar les diferents interaccions que podia mantenir la frataxina. Per una banda, la possible implicació de la frataxina en el metabolisme dels lípids, que havíem vist manifestada en l'acumulació considerable de gotes lipídiques als cardiomiòcits interferits i que s'ha observat també en altres models de la malaltia. D'altra banda, el fet que la frataxina també podria participar en la regulació de l'estat redox de la cèl·lula (havíem detectat alteracions en la ràtio NAD^+/NADH i en la ubiquinona). De fet s'ha descrit que la frataxina pot interaccionar directament amb la cadena de transport electrònic i amb la proteïna ETF i, fins i tot, que el FAD recupera el fenotip del mutant (Gonzalez-Cabo et al., 2010).

5.3.1. Aïllament de mitocondris cardíacs

Per estudiar la interacció de la frataxina amb altres proteïnes vam decidir usar un enriquiment de mitocondris ja que és en aquest orgànul on es troba la proteïna i la quantitat de frataxina sembla ser bastant petita. Per aïllar els mitocondris del cor de rates i ratolins vam fer servir una adaptació de diferents protocols (Life Technologies, Mitoscience, Sigma i (Frezza, Cipolat, & Scorrano, 2007)) i en vam analitzar l'enriquiment amb diferents marcadors de citosol i mitocondri.

A la figura 72, es pot observar que els diferents marcadors mitocondrials com la citocrom c oxidasa (COX), la porina (POR) o la superòxid dismutasa 2 (SOD2) es troben només a la fracció mitocondrial i no n'hi ha a la citosòlica. Tampoc hi ha contaminació de citosol o altres orgànuls a la fracció mitocondrial, tal com s'observa amb marcadors com la proteïna contenidora de valosina (VCP), que es troba al citoplasma, reticle endoplasmàtic i golgi, i la superòxid dismutasa 1 (SOD1) citosòlica. L'aconitasa (ACO) es troba tant a citosol com mitocondris. Els mitocondris es van aïllar seguint aquest protocol per a la resta d'experiments.

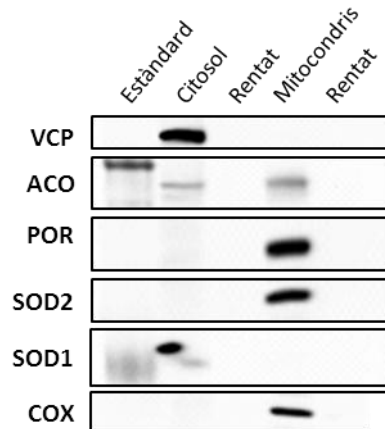


Figura 72. Comprobació de l'enriquiment de mitocondris per *western blot*. La fracció mitocondrial i les diferents fraccions obtingudes durant l'aïllament van ser evaluades per a diferents marcadors dels diferents compartiments cel·lulars. Proteïna contenidora de valosina (VCP), aconitasa (ACO), porina (POR), superòxid dismutasa 2 (SOD2), superòxid dismutasa 1 (SOD1), citocrom c oxidasa (COX).

5.3.2. Mobilitat de la frataxina en gels no desnaturalitzants

S'ha descrit que les cèl·lules poden tenir diferents isoformes de frataxina coexistents, tot i que el significat d'això encara no es coneix amb detall. Per altra banda, diversos estudis suggereixen que frataxina podria tenir algun tipus de relació directa amb components de la cadena de transport electrònic o altres components de la membrana mitocondrial. Ara bé, l'estudi de la possible formació de complexos per part de la frataxina amb altres proteïnes de membrana no ha estat mai abordat amb electroforesi en gels no desnaturalitzants o amb la tècnica Blue-Native PAGE.

Per començar, vam estudiar si podíem veure canvis de mobilitat de la frataxina en resposta als quelants de metalls, la força iònica o els detergents, ja que ens podia donar informació sobre la seva hidrofobicitat o sobre si unia ferro. Com es veu a la figura 73, en un gel natiu la frataxina es presentava en dues formes, una banda a la part superior del gel menys abundant i una altra a la part inferior (marques a l'esquerra de la figura 73). La banda superior s'observava millor en condicions de poc dodecil maltòsid (DDM) (dreta) i desapareixia en condicions de poca força iònica i poc Tritó X-100 (esquerra). Això podia indicar que la proteïna interactua de manera hidrofòbica amb altres proteïnes o amb la membrana perquè aquestes interaccions estan afavorides per la força iònica alta i el Tritó X-100 i el DDM en permet la solubilització.

Tritó (%)	1	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
DDM (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5
EDTA (mM)	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1
NaCl (mM)	150	50	150	50	150	50	150	50	150	50	150	50	150	50	150	50

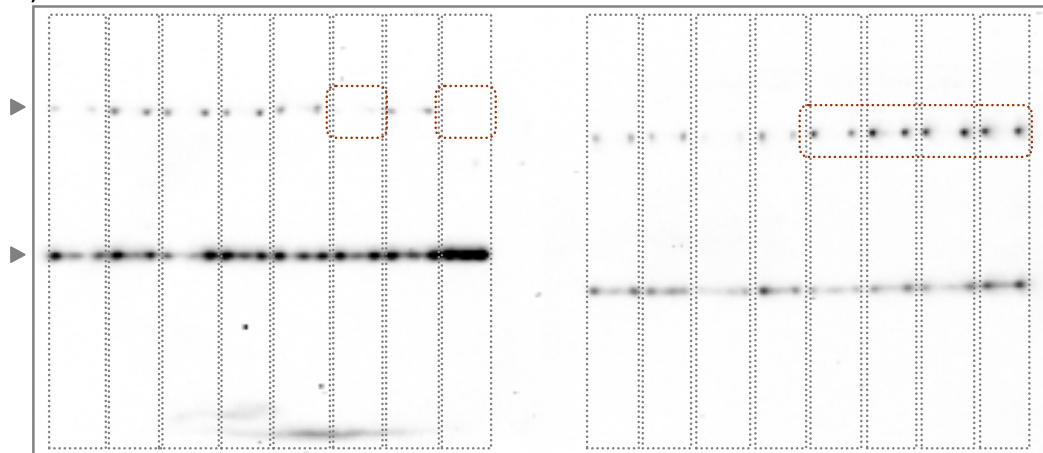


Figura 73. Canvis de mobilitat de la frataxina en un gel natiu. Els extrems enriquits en mitocondris de cors de rata i/o ratolí van ser tractats amb diferents concentracions de tritó, DDM, EDTA i NaCl. La part soluble es va córrer en un gel no desnaturalitzant i es va fer un *western blot* contra frataxina. La banda de frataxina de la part superior millorava amb poc dodecil maltòsid (línia de punts vermella a la dreta) i desapareixia en disminuir la força iònica o el Tritó X-100 (línia de punts vermella a l'esquerra). El detergent provoca que la proteïna no tingui es distribueixi correctament als carrils, per això provoca aquestes bandes puntejades.

5.3.3. *Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* o BN-PAGE

Fent servir les condicions que milloraven l'aparició de la banda superior a l'apartat anterior, vam realitzar una electroforesi bidimensional (BN-PAGE/SDS-PAGE) de mitocondris de rata i ratolí. Vam solubilitzar les proteïnes mitocondrials (tal com hem explicat en l'apartat anterior i a materials i mètodes) i vam separar les proteïnes de les mostres en gels no desnaturalitzants comercials de gradient fent servir la tècnica Blue-Native PAGE. Després, cada carril es va tallar i es va córrer per separat en gels desnaturalitzants. Dos dels gels van ser transferits a membranes de nitrocelulosa per tal de dur a terme un *western blot* contra la cadena respiratòria (Figura 74A) i contra frataxina (Figura 74B). La cadena respiratòria va sortir formant supercomplexes tal com s'havia publicat en altres articles (Schägger & Pfeiffer, 2000). En aquestes condicions, el western contra frataxina indicava la presència de dues formes, una de alta mobilitat en el BN-PAGE i per tant probablement monomèrica, i una de menor mobilitat en el BN-PAGE, que probablement estaria formant part d'algun complex. En el gel desnaturalitzant, el

pes molecular aparent d'aquestes formes era de menys de 20KDa en el cas de la primera i d'aproximadament 25 kDa en el cas de la segona.

Un tercer gel es va tenyir amb SYPRO® Ruby (Fibura 74D) i després de fer un *merge* entre els tres gels (Figura 74C). Es van retallar diversos *spots* que quedaven a la vertical imaginària de la posició de la frataxina d'alt pes molecular (Figura 74D) i es van identificar per MS o MS/MS. A les taules 10 i 11 hi ha la llista de les proteïnes identificades. Així mateix es van retallar els *spots* que reaccionaven amb l'anticòs anti-frataxina (BN7, BN8), tot i que en aquest cas no es va poder obtenir una identificació positiva de cap dels dos.

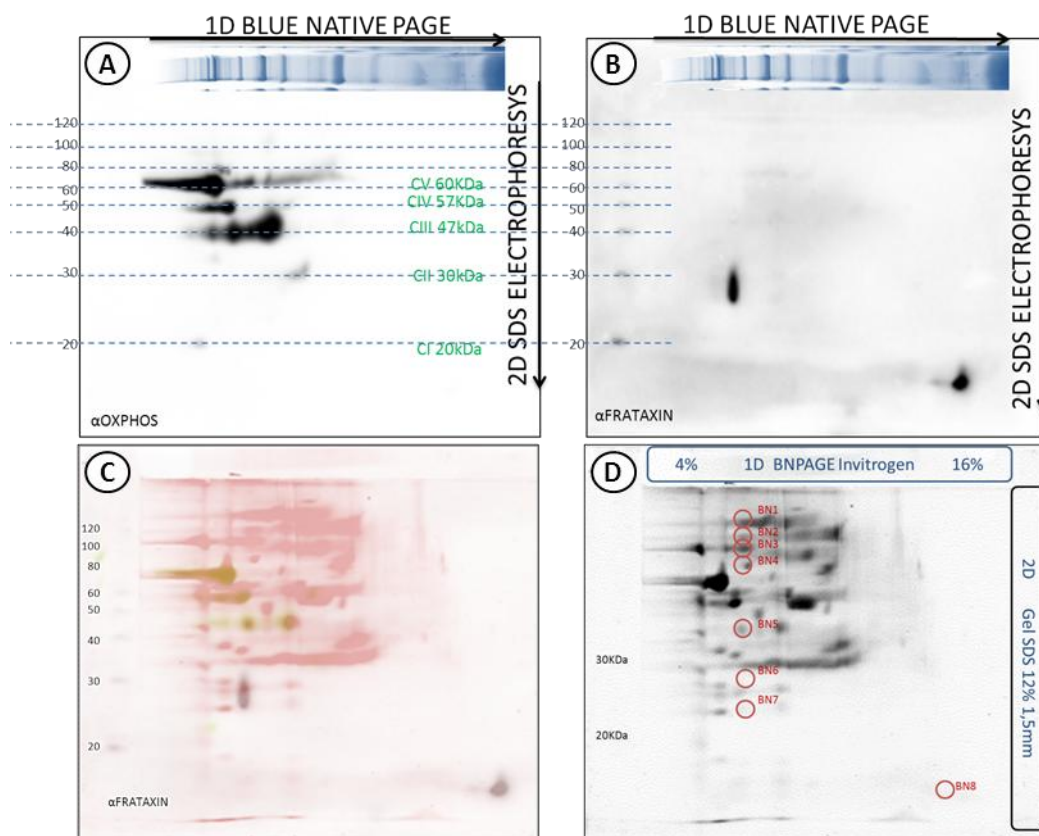


Figura 74. BN-PAGE de mitocondris de rata i ratolí. (A) *Western blot* contra complexos de la cadena respiratòria. **(B)** *Western blot* contra frataxina. **(C)** *Merge* entre les membranes de *Western blot* i el gel de proteïna tenyida. **(D)** Gel de BN-PAGE tenyit per proteïna (Sypro Ruby) on s'han marcat els *spots* que es van identificar. El *western blot* contra els complexos de la cadena de transport electrònic ens va servir per colocalitzar les membranes amb el gel de proteïna. Com que el *western blot* de frataxina presentava dos possibles isoformes que reaccionaven amb l'anticòs, vam retallar els *spots* que coincidien amb la banda amb major pes molecular tant a la primera dimensió Blue-Native (perquè podria estar formant complexos amb altres proteïnes) com els dos *spots* que coincidien amb les isoformes de frataxina, la de més de 20 KDa "que interaccionava" i la de menys de 20 KDa i "lliure".

Spot	Proteïna	Accés Uniprot	Nom	Gen	MW	Score	Percentatge Cobertura	Pèptids identificats
BN1	NNTM	Q61941	<i>NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial</i>	Nnt	114449	124	19	19
BN1	OGDC-E1	Q60597	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial</i>	Ogdh	117572	68	15	14
BN2	ACOM	Q99K10	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	Aco2	86151	149	24	17
BN3	TP α	Q8BMS1	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</i>	Hadha	83302	195	42	29
BN4	VLCAD	P50544	<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	Acadvl	71230	84	21	11
BN5	MDHM	P08249	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	Mdh2	36045	71	24	6
BN6	CYTC1	Q9D0M3	<i>Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial</i>	Cyc1	35533	133	37	9
BN6*	RISP	Q9CR68	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial</i>	Uqcrcs1	29634			

Taula 10. Hits identificats al BN-PAGE. Els spots que pertanyen a la mateixa columna que la frataxina amb un pes molecular més alt es van identificar per MS o per MS/MS utilitzant l'eina Mascot. Els spots identificats amb M/MS estan marcats amb un asterisc (veure taula 11).

Spot	Nom	Gen	Observed MW	Ion Score	Seqüència
BN6	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial</i>	Uqcrcs1	1154.5822	23	VPDFSDYRR
			1586.8170	20	EIDQEAAVEVSQLR
			2563.3475	34	EIDQEAAVEVSQLRDPQHDLDR

Taula 11. Hit identificat al BN-PAGE per MS/MS. El spot BN6 contenia dues proteïnes del mateix complex, i una es va identificar per MS/MS utilitzant l'eina Mascot.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

1. MODEL CEL·LULAR CARDÍAC DE L'ATÀXIA DE FRIEDREICH

La miocardiopatia és un dels principals símptomes de l'atàxia de Friedreich i, tot i ser la principal causa de mort dels pacients, les publicacions que es centren en el cor són poques en comparació amb les que estudien la patologia neurològica (Lane, Huang, Ting, Sivagurunathan, & Richardson, 2013; Payne, 2011; R. Santos et al., 2010). La miocardiopatia a l'atàxia de Friedreich afecta els dos ventricles, sol ser hipertròfica, però pot derivar en miocardiopatia dilatada. La hipertròfia és un augment del gruix del miocardi que forma la paret ventricular, degut a un augment de la mida dels miòcits i de la matriu extracel·lular. Fins al moment, no existeix un model cel·lular que estudiï la patologia als miòcits cardíacs, els principals afectats en la miocardia hipertròfica. Així, el nostre estudi presenta un nou model cel·lular per investigar les conseqüències de la deficiència de frataxina en un cultiu primari de miòcits cardíacs. Aquest model presenta diversos avantatges. Per una banda, el cultiu primari de cardiomiòcits permet estudiar en una població més homogènia, evitant interferències humorals o d'altres cèl·lules, com afecta la deficiència de frataxina en aquestes cèl·lules en concret. Per l'altra, els cardiomiòcits de rata en cultiu mantenen moltes de les propietats de les cèl·lules cardíques in situ, com és l'organització del sarcòmer i la contracció cel·lular. Per tant s'aproximen més a la fisiologia dels cardiomiòcits que altres cèl·lules com les HL-1 o les iPSC derivades a cardiomiòcits. A més, el fet de ser un cultiu primari permet la manipulació directa de les cèl·lules i la possibilitat d'analitzar possibles estratègies terapèutiques.

En el nostre model de miòcits cardíacs hem observat com la deficiència de frataxina en estadis inicials provoca un canvi en la morfologia de la xarxa mitocondrial i una alteració en el metabolisme de lípids. Aquests fenotips, a més d'aportar noves dades sobre les vies afectades en aquest tipus cel·lular en concret, ens permetran estudiar en un futur compostos terapèutics específics que siguin capaços de revertir-los.

2. EL METABOLISME DEL FERRO

Un dels punts que pot generar discussió és que el nostre model cel·lular cardíac no té afectat el metabolisme del ferro, a diferència del que ocorre en cèl·lules cardíques i/o altres tipus cel·lulars d'altres models de la malaltia. En el nostre model no observem ni una acumulació general de ferro ni una disminució de les proteïnes que responen a ferro, com és el cas de l'aconitasa. Tampoc estan afectats els nivells dels mRNA que contenen elements de resposta al ferro (IRE). No obstant, els nostres resultats concorden amb els obtinguts en altres estudis que indiquen una afectació més moderada o tardana del metabolisme del ferro. En cors de pacients de la malaltia sí que es troben dipòsits de ferro, però aquests són molt localitzats i no afecten els nivells totals de ferro al cor (R. L. Ramirez, Qian, Santambrogio, Levi, & Koeppen, 2012). Pel que fa als models murins, com s'ha comentat a la introducció, el ratolí *knock-out* és letal embrionari, cosa que ha fet que s'estudiï la patologia cardíaca utilitzant models condicionals, com els ratolins mutants condicionals NSE i MCK del laboratori de la Dra. Puccio i els models *knock-out knock-in* dels laboratoris del Dr. Pook i del Dr. Pandolfo. Els mutants condicionals presenten un cert grau d'afectació del metabolisme del ferro: el model NSE (amb la deleció de la frataxina al cervell i al cor) creix poc, presenta atàxia i mostra dipòsits de ferro al cor; el ratolí MCK no presenta atàxia ja que només té dèficit de frataxina al cor, però sí miocardia hipertròfica i dèficit de proteïnes que responen al ferro. Ambdós reproduïxen, doncs, alguns fenotips de la malaltia humana. Ara bé, el fet de no tenir gens d'expressió residual de frataxina als teixits on s'activa la deleció, fa que el fenotip sigui molt sever i la vida mitjana d'aquests ratolins sigui d'uns 30 dies. La segona estratègia és la introducció del gen humà amb les expansions de GAA. Aquests ratolins, tot i tenir un genotip més similar al de la malaltia humana, tenen un fenotip molt lleu. A un any de vida, el ratolí del laboratori del Dr. Pook no mostra dipòsits de ferro i només una lleu acumulació de col·lagen al cor. Ara bé, dos dels tretze ratolins havien mort durant aquest període i sí que mostraven acumulació de ferro i fibrosi cardíaca (Perdomini et al., 2013). Aquests models evidencien que una deleció total de la frataxina provoca un fenotip més greu, i que l'acumulació de ferro provocada pel dèficit parcial de frataxina és més aviat moderada o tardana. Els nostres resultats confirmarien aquesta idea. És més, el fet de no observar alteracions del metabolisme del ferro al nostre model durant els dies estudiats no descarta que a terminis més llargs pugui veure's afectat. De fet, s'ha descrit que la

frataxina té una vida mitjana d'aproximadament dos dies (Franco, Fernández, & Torres-Alemán, 2012; K. Li, Besse, Ha, Kovtunovych, & Rouault, 2008), i nosaltres no observem una baixada dels nivells fins més tard del dia 4. Així, els nostres resultats mostren les afectacions que es donen en un termini breu després de la deficiència de frataxina.

Tot i que en aquests moments hi ha la convicció que la frataxina juga un paper directe en el metabolisme del ferro i dels centres ferro-sofre, diverses evidències fan pensar que el rol de la frataxina és més aviat secundari o de regulació. Una funció que descarta el nostre model és que la frataxina actui com a donadora de ferro o jugui un paper essencial en la síntesi de centres ferro-sofre. El dèficit d'enzims amb centres ferro-sofre és característic dels models i els pacients d'atàxia de Friedreich. En el nostre cas, però, l'activitat aconitasa es manté al llarg dels dies en els cultius interferits per frataxina i només disminueixen els nivells de proteïna quan es tracta el cultiu amb el quelant de ferro deferoxamina. Diversos estudis podrien explicar el dèficit d'aquest enzim o l'acumulació de ferro descrita en pacients sense que hi hagi un problema a la síntesi dels centres ferro-sofre. Per una banda, dos estudis diferents en llevat mostren com la disminució dels nivells de l'aconitasa i altres proteïnes que responen al ferro no es deu a la falta de frataxina per sí mateixa sinó a una remodelació causada per l'acumulació de ferro. Aquesta remodelació la provoquen dos factors transcripcionals, Cth2p a *S. cerevisiae* i Php4p a *S. pombe*. Aquestes proteïnes tenen una funció similar a les IRP en llevat i, tot i que actuen amb un mecanisme d'acció diferent, acaben remodelant les proteïnes implicades en el transport i el metabolisme del ferro en funció dels nivells de ferro intracel·lulars (Gabrielli et al., 2012; Moreno-Cermeño et al., 2010, 2013). Les IRP de mamífers també podrien promoure una regulació similar ja que està ben descrit que responen a l'estrès oxidatiu (Pantopoulos & Hentze, 1998; K Pantopoulos et al., 1997). De fet, l'acumulació de ferro que s'observa en alguns models quan falta frataxina podria ser una conseqüència d'una situació d'estrès oxidatiu, ja que s'ha observat que en tractar els llevats amb agents oxidants, s'indueix el reguló del ferro controlat per la proteïna Aft1p (Castells-Roca, Mühlenhoff, Lill, Herrero, & Bellí, 2011). A més de respondre a estressos exògens com el tBHP, també s'ha descrit que la manca de la redoxina Prx1p mitocondrial provoca una activació del reguló del ferro, que seria deguda a un augment del seu substrat, el peròxid d'hidrogen mitocondrial. L'activació del reguló de ferro en llevat en

aquest cas també seria depenent d'Aft1p, el qual s'activa per un senyal encara desconegut quan hi ha manca de ferro o quan hi ha un dèficit de centres ferro-sofre. Aquest senyal depèn del glutatió. En el cas dels llevats on s'ha deletat Prx1p, aquesta activació és independent de la integritat dels centres ferro-sofre, ja que aquests continuen intactes. Els autors proposen que és per la via del glutatió perquè si juntament amb Prx1p es deleta la Grx2p, ja no s'activa la resposta d'Aft1p ni l'activació de la captació de ferro, però sí que s'observa un augment de les proteïnes glutatiolades. El glutatió és clau en la regulació d'aquest factor, perquè les glutaredoxines 3 i 4 el mantenen al citosol i n'eviten la translocació al nucli de manera depenent de glutatió. Altres evidències demostren que l'estrès oxidatiu pot provocar un augment de ferro de manera depenent de glutatió. Estressos com el seleni, que disminueixen els nivells de glutatió reduït, també provoquen una activació del reguló del ferro de manera depenent d'Aft1p (Pérez-Sampietro, Casas, & Herrero, 2013; Salin et al., 2008). En cors de ratolí les espècies reactives de l'oxigen també afecten la captació de ferro. En condicions de sobrecàrrega de ferro, el cor és un dels òrgans on s'acumula més ferro, el qual provoca una major producció d'espècies reactives de l'oxigen, que a la vegada provoquen més acumulació de ferro, apoptosi i fibrosi (el que es coneix com miocardiopatia per sobrecàrrega de ferro). Ara bé, si es suplementa la dieta dels ratolins amb taurina, s'evita la formació de dipòsits de ferro així com el dany oxidatiu, la mort cel·lular i la fibrosi cardíaca. Els autors demostren que l'acció antioxidant de la taurina es deu a una protecció dels nivells de glutatió reduïts, pel fet de ser un aminoàcid que conté sofre (Oudit et al., 2004). La taurina també podria disminuir els nivells de ferro del cor inhibint els canals de calci de tipus L, que han demostrat ésser una via d'entrada important en condicions de saturació de ferro (Oudit et al., 2003; Satoh, 2001; Tsushima et al., 1999). Seria interessant estudiar els efectes sobre el dany oxidatiu i el metabolisme del ferro de suplementes de taurina en cardiomiòcits deficients en frataxina.

De la resta de funcions que s'han atorgat a la frataxina, el nostre model podria concordar amb un paper de detoxificació de ferro, on la frataxina oligomeritzada descrita per Isaya i col·laboradors, evitaria l'acumulació de ferro lliure al LIP (Adamec et al., 2000; Cavadini, 2002; Musco et al., 2000; Park et al., 2003). Si es dones un augment del ferro lliure, aquest reaccionaria amb el peròxid d'hidrogen tal com descriuen les reaccions de Fenton i

Haber-Weiss, augmentant l'estrès oxidatiu. En el nostre model hem observat més dany oxidatiu a les proteïnes en els cardiomiòcits interferits per frataxina, així com una inducció dels enzims superòxid-dismutases i una major sensibilitat a agents oxidants. El problema és que la hipòtesi de la frataxina que oligomeritza i forma escuts com els que s'han descrit amb la ferritina no sembla probable en organismes superiors, ja que estudis duts a terme pel grup de Pastore amb la frataxina de mamífers semblen indicar que aquesta proteïna no podria formar oligòmers a les condicions fisiològiques de pH, força iònica i concentració de metalls (S Adinolfi et al., 2002). A més, aquest grup també ha mencionat que la unió de ferro per part de la frataxina podria ser una funció no conservada, i que segurament aquestes tindrien una funció cel·lular més complexa.

3. MITOCONDRIIS I METABOLISME ENERGÈTIC

Els nostres experiments realitzats amb diferents tincions mostren canvis importants en la morfologia de la xarxa mitocondrial amb la presència de mitocondris engrandits als cardiomiòcits deficients en frataxina.

La pèrdua de l'organització de la xarxa mitocondrial pot provocar l'alteració de la contracció, de l'homeostasi iònica i de les vies de senyalització. Com s'explica a la introducció, els mitocondris cardíacs es divideixen amb diferents poblacions; els subsarcolèmics, els intermiofibrilars i els perinuclears. Cada població aporta energia a diferents processos. L'energia aportada pels mitocondris intermiofibrilars (població mitocondrial que normalment no sobrepassa els límits dels sarcòmers i que es troba entre la zona delimitada per les dues línies Z) s'utilitza en les miofibril·les i el reticle sarcoplasmàtic (Segretain et al., 1981; Vendelin et al., 2005). Els cardiomiòcits deficients en frataxina han perdut l'organització *crystal-like* d'aquests mitocondris, cosa que podria afectar l'intercanvi energètic i iònic entre els orgànuls que consumeixen l'energia (miofibril·les i reticle sarcoplasmàtic) i els que la produeixen (mitocondris), i per tant la funció contràctil. A més, els microdominis de calci i fosfats (les ICEU o *intracellular energetic units*) també regulen l'aportació d'energia des de la fosforilació oxidativa mitocondrial en funció de la demanda energètica segons el treball cardíac. Així, si es perd l'organització de la xarxa mitocondrial es podria produir un desacoblament entre la

fosforilació oxidativa i la demanda energètica, que es faria més evident en situacions de més demanda energètica com és un augment del treball cardíac.

Diversos factors poden induir l'alteració de la xarxa mitocondrial i l'aparició dels mitocondris gegants. La hipòxia, per exemple, provoca la formació de mitocondris gegants. L'augment de les espècies reactives de l'oxigen i/o del calci provoquen l'obertura de l'MPTP (Baines, 2009; Crow et al., 2004). En els miòcits cardíacs deficientes en frataxina s'observa un augment dels mitocondris engrandits amb les diferents tincions. És més, amb la sonda JC-1, que permet discernir entre mitocondris amb potencial de membrana major o menor, s'observa que els mitocondris gegants tenen un potencial de membrana relativament menor. Això podria indicar que part dels mitocondris tenen un dèficit en la cadena de transport electrònic o bé experimenten l'obertura de l'MPTP. Altres factors que modifiquen la morfologia de la xarxa mitocondrial i l'obertura de l'MPTP són les proteïnes que regulen les dinàmiques mitocondrials, com l'MFN2 i l'OPA1. També els lípids poden alterar els processos de fusió i fissió així com la permeabilitat de l'MPTP (L. Chen et al., 2012; Parra et al., 2008). En el nostre cas no hem observat ni una disminució de l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria ni tampoc una baixada general del potencial de membrana mitocondrial. Pel que fa a la cadena respiratòria, el fet de mesurar l'activitat in vitro fa que aquesta escapi de la regulació exercida per la seva pròpia organització o per la disponibilitat i/o compartimentalització dels seus substrats i reguladors. Un augment local de les ràtios de NADH/NAD⁺, d'acetil-CoA/CoA o d'ATP/ADP inhibiria tant la cadena respiratòria com el cicle de Krebs. Pel que fa al potencial de membrana mitocondrial, tot i mostrar uns nivells generals semblants tant als cardiomiòcits controls com als deficientes en frataxina, podria estar alterat en alguns mitocondris, com és el cas dels gegants. No podem descartar doncs una afectació d'aquests processos que no s'ha detectat a causa de les limitacions pràctiques dels assaigs utilitzats per la cadena de transport electrònic. Ara bé, sí que es pot descartar una afectació primària causada pel dèficit de centres ferro-sofre, per exemple, ja que l'activitat dels complexos de la cadena de transport electrònic, així com la de l'aconitasa del cicle de Krebs és normal. Cal ressaltar també que els nostres experiments estan duts a terme en condicions basals, on el cor actua a un percentatge baix de la seva capacitat oxidativa. Seria interessant estudiar què succeïx quan es provoca un augment de la

demanda energètica, com per exemple amb un estímul catecolamínic. En aquest cas podríem estudiar si funciona el vincle regulatori entre l'augment de la demanda i l'augment de la capacitat de la cadena de transport electrònic i la producció d'energia per oxidació fosforilativa.

4. PREFERÈNCIA DE SUBSTRATS ENERGÈTICS

La glucosa és un dels substrats preferits del cor. Durant els estadis fetals la major part de l'energia prové de la utilització de la glucosa com a font de carboni, mentre que en estadis adults l'obtenció d'energia deriva majoritàriament de l'oxidació d'àcids grassos. Aquest canvi en la preferència de substrat energètic es dona durant el període postnatal, concretament els primers dies després de néixer. Durant el desenvolupament postnatal, l'augment de l'oxidació d'àcids grassos (que es pot multiplicar per 10) es deu a un augment de l'aportació d'àcids grassos a la circulació (provinents de la llet materna) i a una disminució del contingut de malonil-CoA (que és molt alt durant l'estadi fetal). A més, la CPT1, que és el punt principal de regulació de l'oxidació d'àcids grassos, canvia de l'isoforma CPT1A (o fetal) a la CPT1B (o adulta), aquesta última essent molt més sensible a malonil-CoA. L'augment de malonil-CoA es deu a una disminució de l'activitat de l'ACC (acetil-CoA carboxilasa) i a un augment de l'activitat de l'MCD (malonil-CoA descarboxilasa), segurament gràcies a l'activitat de l'AMPK. Com s'ha explicat a la introducció, l'oxidació dels àcids grassos suprimeix l'oxidació de la glucosa. Ara bé, durant la hipertròfia cardíaca es produeix el que s'anomena un remodelació metabòlica que s'ha descrit com un "retorn" al metabolisme fetal perquè el cor canvia de substrat preferent d'àcids grassos a glucosa, tal com succeeix en estadis embrionaris. Aquest canvi cap a l'ús de glucosa és adaptatiu i pot enlentir la transició de la hipertròfia a la fallida cardíaca, però encara es desconeix quin n'és el desencadenant (revisat a (Lin et al., 2011)).

Per analitzar si la deficiència de frataxina provocava una alteració de la preferència de substrats als cardiomiòcits en cultiu, vam mesurar els nivells dels principals substrats al medi en dies diferents al llarg del cultiu. Pel que fa als àcids grassos, no vam observar un augment en el consum dels cardiomiòcits interferits, tot i l'acumulació evident de TAG en forma de gotes lipídiques. Pel que fa a la glucosa, tampoc vam trobar canvis significatius. Cal esmentar que, en les primeres mesures de glucosa, vam observar que aquesta

disminuïa molt al cap de 24 h en cultiu, sobretot els primers dies. És per això que vam decidir canviar el medi cada dia. De fet, sembla que els cardiomiòcits control tendeixen a usar menys glucosa al llarg del cultiu, i el dia 6 s'observa com els nivells de glucosa al medi dels control és més alt que al dia 3, tot i que el canvi no és significatiu. Els cardiomiòcits interferits per frataxina, en canvi, tenen els nivells de glucosa del medi semblants al llarg del cultiu, cosa que podria indicar un ús preferent de glucosa al llarg del temps, quan haurien d'haver fet el canvi cap a ús d'àcids grassos.

La glucosa, un cop dins la cèl·lula, pot seguir diferents vies, essent la més important l'oxidació via la glucòlisi i el cicle de Krebs. També pot ser oxidada a lactat, una ruta que no té tant pes en els cardiomiòcits perquè el cor acostuma a ser un consumidor net de lactat (perquè hi predominen les isoformes de la lactat-deshidrogenasa que ho afavoreixen) sempre que no estigui en condicions patològiques com la isquèmia. En mesurar el contingut de lactat al medi no vam observar canvis entre els diferents dies de cultiu ni entre les mostres. Així, si es donés una tendència a utilitzar més glucosa per part dels interferits, no seria per aquesta ruta. Altres vies que pot seguir la glucosa en entrar a la cèl·lula són la síntesi de glicogen, la via de les pentoses fosfat o la biosíntesi d'hexosamines (Kolwicz & Tian, 2011). Segons s'ha descrit, el contingut de glicogen no es veu alterat durant la hipertròfia (Allard et al., 1997; Schönekeess, Allard, Henning, Wambolt, & Lopaschuk, 1997). Pel que fa a les altres dues vies accessòries, diversos estudis han descrit que s'indueixen en cors hipertròfics i es creu que podrien jugar rols importants en regular les funcions cel·lulars. Aquestes vies s'expliquen a continuació.

5. METABOLISME DE CARBOHIDRATS

Convé fer ressaltar que els anàlisis PCA de l'estudi metabolòmic indiquen un canvi metabòlic molt marcat en els cardiomiòcits deficients en frataxina. A més, també hi ha un canvi metabòlic de dia 4 a dia 7 en els cardiomiòcits control (shscr) que no s'observa en el conjunt d'interferits. En relació al metabolisme de carbohidrats, no hem observat diferències molt marcades entre els cardiomiòcits control i els interferits en frataxina. Tot i així, sí que hem trobat dos possibles metabòlits que ens indicarien un augment del flux de les vies accessòries de la glucosa.

Un d'aquests metabòlits és l'àcid 6-fosfogluconic, de la via de les pentoses fosfat, que augmenta molt els dies 4 i 7. La via de les pentoses fosfat (PPP de *pentose phosphate pathway*) oxida normalment un percentatge baix de la glucosa (McCommis, Douglas, Krenz, & Baines, 2013; Ussher, Jaswal, & Lopaschuk, 2012; Wamelink, Struys, & Jakobs, 2008). Té dues fases, una oxidativa irreversible on es transforma la glucosa-6-fosfat en ribulosa-5-fosfat, i una fase no oxidativa reversible on la ribulosa-5-fosfat es metabolitza a fructosa 6-fosfat o a gliceraldehid-3-fosfat. La fase oxidativa produeix NADPH (coenzim clau per a la resposta antioxidant i la síntesi de lípids) i la no oxidativa produeix ribosa-5-fosfat (un precursor per a la síntesi de nucleòtids, com per exemple l'ATP) i gliceraldehid-3-fosfat (que evita la regulació exercida per la PFK a la glucòlisi).

A més d'aquest metabòlit, altres indicis ens podrien indicar que els cardiomiòcits deficients en frataxina pateixen una alteració d'aquesta via. En primer lloc, l'augment de les LD i dels àcids dicarboxílics indiquen un dèficit de la β -oxidació i una activació de l' ω -oxidació. L' ω -oxidació utilitza el citocrom P450, i aquest usa NADPH com a coenzim. L'augment de la demanda de NADPH per al citocrom P450 podria fer augmentar el flux de la via de les pentoses fosfat. D'altra banda, quan hi ha dèficit de frataxina, també observem un major dany oxidatiu a les proteïnes i una alteració de la resposta antioxidant. El NADPH produït per la via de les pentoses fosfat podria usar-se per pal·liar aquest major estrès actuant de coenzim dels enzims antioxidants, o bé causar-lo, a través de les NADPH-oxidases. S'ha descrit que el flux metabòlic a través de la via de les pentoses fosfat augmenta quan el cor s'hipertrofia i progressa cap a la fallida cardíaca. A més, la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD), l'enzim limitant de la via, s'indueix. I a la inversa, quan hi ha un dèficit de G6PD o una alteració de la via de les PPP, també es desenvolupa hipertròfia (revisat a (Kolwicz & Tian, 2011)). De moment no es coneix si l'augment del flux d'aquesta via és patològic o protector. Uns estudis relacionen l'augment del flux i del NADPH amb més ROS produïdes per la NADPH-oxidasa. Altres estudis, però, han relacionat l'augment del flux amb una millor funció cardíaca. És per això que el tema encara genera controvèrsia (Kolwicz & Tian, 2011; McCommis et al., 2013; Wamelink et al., 2008). Seria interessant, doncs, mesurar els nivells de la G6PD en els miòcits interferits així com els diferents metabòlits clau de la via, sobretot el NADPH.

Un altre metabòlit alterat en els cardiomiòcits interferits, el qual indicaria una activació de vies accessòries a l'oxidació de glucosa, és l'UDP-N-acetilgalactosamina. En l'estudi metabolòmic trobem un augment d'aquest metabòlit, que és el producte de la via de la biosíntesi d'hexosamines (HBP de *hexosamine biosynthetic pathway*). És més, a l'estudi metabolòmic també trobem l'UDP disminuït, que forma part de la mateixa via. Ambdós metabòlits podrien indicar una activació de la via, cosa que suposaria un augment d'aquesta modificació postraduccionals als cardiomiòcits interferits. En general, la via de l'HBP usa un tant per cent baix de la glucosa captada per la cèl·lula, tot i que no es coneix quin és el flux relatiu al cor (Victor M Darley-Usmar, Ball, & Chatham, 2012; Dassanayaka & Jones, 2014; L. Wells et al., 2002). En altres models amb hipertròfia cardíaca també s'observa un augment del flux de la via de la biosíntesi de les hexosamines. Aquesta via té com a substrat la glucosa-6-fosfat i dóna com a producte la N-acetilglucosamina (GlcNAc). Aquest monosacàrid s'incorpora a les proteïnes amb un enllaç *O*-glicosídic (*O*-GlcNAc) i és un tipus modificació postraduccionals que regula la funció i la localització de les proteïnes. La modificació de proteïnes amb *O*-GlcNAc es creu que actua com a alarma autoprotectora o com a resposta a l'estrès. Si augmenta, millora la supervivència en estressos aguts, i si disminueix, augmenta el dany cel·lular. Seria interessant estudiar si aquesta via podria estar involucrada en la detecció del problema energètic (a través de la glutamina i la glucosa) i estar mediant una resposta adaptativa. També podria estar involucrada en la mort provocada per l'agent oxidant tBHP (Zachara et al., 2004), en la transcripció de les proteïnes *heat shock* (a l'estudi proteòmic veiem un augment de l'HSP60) o amb el *swelling* mitocondrial (Dassanayaka & Jones, 2014; G. a Ngho, Watson, Facundo, & Jones, 2011; G. A. Ngho, Facundo, Zafir, & Jones, 2010).

Una altra modificació postraduccionals a tenir en compte en el nostre model seria l'acetilació de proteïnes. Per una banda, tenim un gran augment de TAG, i es creu que la majoria de l'acetil-CoA prové de l'oxidació dels AG (Pougovkina et al., 2014). L'acetil-CoA és segurament el metabòlit central més important, ja que és el producte tant de la glucosa com de l'oxidació d'àcids grassos que després passa a ser substrat del cicle de Krebs. Un dels mecanismes que regula la producció d'acetil-CoA és la ràtio mitocondrial d'acetil-CoA/CoA. Un augment d'aquesta ràtio produeix una inhibició al·lostèrica de l'oxidació d'AG i de glucosa. D'altra banda, el malonil-CoA que deriva de l'acetil-CoA

regula l'oxidació d'AG al mitocondri inhibint la CPT. A part d'aquestes regulacions metabòliques, l'acetil-CoA també regula el metabolisme amb el control de diferents enzims metabòlics mitjançant l'acetilació. Aquesta regulació es fa mitjançant dos enzims: les histona-acetiltransferases (HAT) i les histona-desacetilases (HDAC) (Pillai, Sundaresan, & Gupta, 2014; Shaw et al., 2008; Xiong & Guan, 2012). Les HAT transfereixen el grup acetil de l'acetil-CoA als residus de lisina, neutralitzant la càrrega positiva de la lisina i alterant així l'estructura de les proteïnes i les seves interaccions. La reacció és reversible, mitjançant l'acció de les histona-desacetilases (HDAC), que produeixen com a co-productes O-acetil-ADP-ribose i nicotinamida. Les sirtuïnes (SIRT) són una família de desacetilases anomenades de classe III que depenen de NAD^+ . N'hi ha set de descrites, essent la isoforma SIRT1 la més estudiada i les isoformes 3, 4 i 5 les residents al mitocondri. SIRT1 és important perquè pot regular el metabolisme mitjançant la desacetilació i activació de PGC1- α . També pot desacetilar PPAR γ i Akt (Banks et al., 2008; Han et al., 2010). En general, l'activació de SIRT1 regula la senyalització per insulina. SIRT3 és la desacetilasa més important al mitocondri i s'ha comprovat que té diferents dianes com l'LCAD, el complex de la PDH i membres del cicle de Krebs i la cadena respiratòria (Bharathi et al., 2013; Finley et al., 2011; Hebert et al., 2013; Hirschey et al., 2010; Lombard et al., 2007; Zhao et al., 2010). En un estudi amb el ratolí mutant condicional de frataxina en cor, s'ha descrit que els extrems mitocondrials estan hiperacetilats perquè SIRT3 està inhibida a causa de l'augment de NADH (Wagner et al., 2012). Podria ser, doncs, que la manca de frataxina provoqués un augment de NADH mitocondrial que limitaria el metabolisme oxidatiu. Si fos així, en el nostre cas no hauriem pogut observar-ho ja que hem mesurat les activitats enzimàtiques depenents de NADH in vitro, on escapen d'aquesta regulació. En general, s'associa que l'acetilació dels enzims involucrats en l'oxidació d'AG inhibeix la β -oxidació i la desacetilació per part de SIRT3 l'accelera. Ara bé, aquest fet encara genera controvèrsia i alguns autors afirmen que l'acetilació, de fet, s'associa amb un augment del flux de la β -oxidació al cor (Abo Alrob & Lopaschuk, 2014). La mesura de l'acetilació dels diferents enzims de l'oxidació d'AG seria un punt important a tenir en compte, així com el contingut de NAD^+/NADH i l'activitat de SIRT3.

6. METABOLISME DELS LÍPIDS

Diversos resultats d'aquest treball indiquen que el dèficit de frataxina en cardiomiòcits provoca una afectació important del metabolisme de lípids. Una de les observacions més destacades és la presència de gotes lipídiques (LD) a les cèl·lules cardíques deficientes en frataxina. L'altra, és l'afectació de diferents espècies lipídiques que ens revela l'estudi metabolòmic. Tot i que els resultats de l'estudi metabolòmic encara no han estat validats, el lliat de compostos diferencials entre les cèl·lules control i les deficientes en frataxina suggereixen que hi ha més d'una via metabòlica afectada relacionada amb el metabolisme lipídic. L'alteració d'aquestes vies podria contribuir a la patogenicitat de la malaltia, tant a nivell energètic com a nivell de senyalització, i provocar així la hipertròfia i la fibrosi cardíaca característiques de la malaltia.

6.1. Les LD al cor en models d'atàxia de Friedreich

Una de les observacions més destacades d'aquest treball és la presència de gotes lipídiques (LD) a les cèl·lules cardíques deficientes en frataxina. Aquests orgànuls eren més grans i freqüents en els cultius mantinguts en medi enriquit amb àcids grassos. Les LD s'han observat en altres models d'atàxia de Friedreich com són la mosca *D. melanogaster* o els ratolins *knock-out* condicionals (Navarro et al., 2010; Puccio et al., 2001), pel que es pot deduir que no és un fet artefactual del cultiu ja que pot succeir in vivo quan hi ha dèficit de frataxina. Tot i que el metabolisme cardíac és diferent en individus nous i adults, en mamífers recent nascuts el metabolisme lipídic juga un paper important. En la majoria de mamífers, l'expressió de molts dels enzims que es necessiten pel metabolisme lipídic augmenta molt aviat després del naixement i l'oxidació dels àcids grassos passa a ser la font d'energia dominant durant la primera setmana de vida (Onay-Besikci, 2006). En cors de rata, aquest fenomen pot ocórrer encara més aviat, ja que s'ha descrit que moltes de les acil-CoA deshidrogenases assoleixen entre un 30 i un 50% dels nivells dels adults el segon dia de vida i es mantenen entre aquests nivells durant el període d'al·letament (Nagao, Parimoo, & Tanaka, 1993). Com que els cardiomiòcits usats en aquest estudi s'han obtingut dels dies 3 i 4, ja han augmentat l'expressió d'aquests enzims i la capacitat oxidativa. De fet, diferents autors han demostrat que els cultius de miòcits cardíacs neonats tenen la capacitat de consumir

àcids grassos quan aquests es troben al medi (Ross & McCarl, 1984; van der Lee et al., 2000) i els nostres resultats ho corroboren.

6.2. Les LD i alteracions en la xarxa mitocondrial

És important destacar que les alteracions en el metabolisme lipídic s'han associat a diverses miocardiopaties amb disfuncions mitocondrials. Els dipòsits de triacilglicèrids del cor solen ser minoritaris en individus sans, tot i que augmenten amb l'edat (Szczepaniak et al., 2003). En individus sans, intervencions nutricionals com la restricció calòrica i el dejú provoquen un augment del contingut de triacilglicèrids juntament amb una disminució amb la funció diastòlica. També els pacients amb diabetis tipus II presenten acumulació de LD al miocardi, la qual correlaciona amb un augment de la concentració de lípids circulants en plasma. El cor conté relativament poc contingut de lípids neutres i reacciona de diverses maneres quan aquests s'hi acumulen: primer hi ha una hiperactivació de la β -oxidació, cosa que causa un augment de les espècies reactives de l'oxigen (ROS), i aquestes acaben afectant la bomba de calci del reticle sarcoplasmàtic. Això provoca una disfunció diastòlica del miocardi, i la consegüent fibrosi i hipertròfia. Es creu que l'augment de triacilglicèrids al cor és una conseqüència de la sobrecàrrega d'àcids grassos que sobrepassa la capacitat oxidativa. En aquestes circumstàncies, l'acumulació de triacilglicèrids pot servir inicialment com un reservori de lípids, alhora que els manté aïllats per evitar la producció d'espècies tòxiques derivades dels lípids. Ara bé, els TAG també acaben experimentat peroxidació i saturació, i fomenten la formació d'intermediaris d'àcids grassos al citosol que provoquen la disfunció cel·lular (Iozzo, 2011), que és el que es coneix com a lipotoxicitat cardíaca.

En el nostre model varies observacions concorden amb aquesta seqüència, ja que observem un augment de l'MCAD en els diferents interferits per frataxina, així com un augment de CPT1B en algun dels interferits. Aquesta activació d'enzims del catabolisme de lípids podria ser una temptativa d'activar l'oxidació dels àcids grassos que s'acumularien a la cèl·lula degut, segurament, a una disfunció del catabolisme mitocondrial. L'acumulació superior d'àcids grassos en LD provocaria la peroxidació lipídica i un dany major a les macromolècules, tal com s'ha observat amb la detecció d'un augment de proteïnes carbonilades en els cultius *knock-down* de frataxina. Com que no

sembla que la deficiència de frataxina provoqui un augment de la captació d'àcids grassos, tal com es mostra als resultats, ni tampoc hi ha una alteració de l'oxidació dels àcids grassos ni de la cadena respiratòria, sembla que el problema primari deriva del trastorn mitocondrial. En aquest sentit, altres patologies cardíques amb base mitocondrial també mostren alteracions del metabolisme de lípids i/o acumulació de LD (McDermott-Roe et al., 2011). Per exemple, la inhibició de la fusió mitocondrial, ja sigui per MFN2 o per OPA1, provoca un engrandiment dels mitocondris, hipertròfia cardíaca i una alteració del metabolisme lipídic amb acumulació de LD (Drosatos & Schulze, 2013; Piquereau et al., 2012). Aquests canvis poden anar acompanyats, o no, de deficiències en l'activitat de la cadena respiratòria. Aquestes similituds amb el nostre model ens poden fer hipotetitzar que el dèficit observat en el metabolisme lipídic podria ser una conseqüència de l'alteració a la xarxa mitocondrial.

Les pertorbacions de la xarxa mitocondrial i l'acumulació extensa de LD observades en els cardiomiòcits amb deficiència de frataxina també podrien indicar un dèficit de l'autofàgia, tant a nivell mitocondrial (mitofàgia), com a nivell de les mateixes LD (lipofàgia). S'ha descrit que la dinàmica mitocondrial afecta el procés autofàgic (Tanaka et al., 2010; Twig, Hyde, & Shirihai, 2008) i que l'autofàgia és un mecanisme més de regulació metabòlica (K. Liu & Czaja, 2013). És més, els nivells d'àcids grassos intracel·lulars poden inhibir el flux autofàgic alterant la composició de lípids de les membranes (Koga, Kaushik, & Cuervo, 2010). A més, les LD també contenen la proteïna LC3, implicada amb l'autofàgia (Klionsky et al., 2012; Shibata et al., 2009). L'augment de LD podria provocar una disminució general de l'autofàgia pel fet de "segrestar" la proteïna LC3. Una altra proteïna *scaffold* de la membrana de les LD que relaciona l'alteració de la xarxa mitocondrial amb el metabolisme lipídic és la perilipina-5, que a més de regular la lipòlisi, recluta els mitocondris a la superfície de les LD, i facilita la interacció física i funcional de les LD amb els mitocondris i amb altres proteïnes lipolítiques (Brasaemle, 2013). També es troben a la superfície de les LD les proteïnes SNARE, involucrades en la fusió de membranes. És interessant un membre de la família en concret, la proteïna SNAP23, que és necessària per la fusió de les LD. Aquesta proteïna també permet la translocació de membranes per captar glucosa després de l'estimulació amb insulina. La proteïna SNAP23 és un lligam important entre l'acumulació de lípids i la resistència a la insulina, ja que en ser

“segrestada” a les LD, no permet el reclutament de GLUT4 de les vesícules a la membrana (Boström et al., 2007; Olofsson et al., 2008; Senthivinayagam, McIntosh, Moon, & Atshaves, 2013). Així, ens podria vincular l’acumulació de lípids al cor amb la resistència a la insulina que presenten alguns pacients d’atàxia de Friedreich. En resum, tots aquests factors podrien causar l’acumulació lipídica i les seves complicacions, pel que seria interessant estudiar el procés d’autofàgia i de les proteïnes involucrades en les dinàmiques mitocondrials, en l’estructura i la funció de les LD en els cardiomiòcits deficients en frataxina.

6.3. Lipotoxicitat cardíaca

Com s’ha dit anteriorment, l’acumulació de lípids i LD al cor s’associa a una disfunció cardíaca, cosa que s’anomena lipotoxicitat cardíaca. No està clar encara quina és la causa de l’afectació cardíaca, però es creu que podria ser l’excés d’oxidació d’AG, l’acumulació de lípids tòxics, o per ambdues coses a la vegada. No tots els lípids són tòxics i un exemple són els triacilglicèrids. L’augment de TAG es correlaciona amb la resistència a la insulina en pacients obesos o amb el síndrome metabòlic, però sembla ser que per ells mateixos els TAG només són un marcador d’una acumulació general de lípids a nivell intracel·lular. Per exemple, la sobreexpressió de la diacilglicerol-aciltransferasa 1 (DGAT1) que forma els TAG induïx la formació de gotes lipídiques, però resulta ser citoprotectora i provoca només una hipertròfia fisiològica (Liu et al., 2009). En canvi, els AG de cadena llarga saturats, i en particular el palmitat, es consideren més lipotòxics que els insaturats com l’oleic. Aquest fet s’ha correlacionat amb un augment dels nivells de ceramida causat per l’especificitat dels enzims de síntesi de ceramida per aquest àcid gras (Listenberger et al., 2003; Okere et al., 2006; Park et al., 2008). La ceramida causa o agreuja considerablement les conseqüències de l’acumulació de lípids. Si en cors amb acumulació de lípids s’inhibeix la síntesi de la ceramida, es corregeix la hipertròfia cardíaca. Això concorda amb el fet que els miòcits cardíacs en cultiu exposats a un excés de palmitat, el qual sembla que s’incorpora poc als triacilglicèrids, moren per apoptosi. Ara bé, si es cultiven també amb àcids grassos insaturats, es rescata l’apoptosi induïda per palmitat perquè els AG insaturats canalitzen la incorporació del palmitat al *pool* de triacilglicèrids (Listenberger et al., 2003). També la generació de ROS induïda per palmitat podria causar la mort cel·lular programada (Drosatos & Schulze, 2013).

Uns altres lípids que provoquen lipotoxicitat i causen resistència a la insulina en múscul i fetge són els diacilglicerols (DAG). Si es sobreexpressa l'enzim que converteix els DAG en TAG es preveu la disfunció cardíaca, tot i que encara s'acumulen lípids (Inoguchi et al., 1992; Liu et al., 2009; Newton & Johnson, 1998; Nishizuka, 1992). Altres lípids tòxics, com els AG esterificats (acil-CoA), les acilcarnitines, el colesterol lliure i les lisolecitines (com la lisofosfatidilcolina o la lisofosfatidiletanolamina) també causen lipotoxicitat perquè poden provocar apoptosi, inflamació, disfunció mitocondrial i/o alterar la senyalització intracel·lular. Aquestes vies es tracten a continuació.

6.3.1. Lipotoxicitat cardíaca i vies de senyalització

El palmitat, i també la ceramida, és capaç d'activar la via de les MAPK, que inclouen Erk1/2, JNK1/2 i p38, que regula la supervivència dels cardiomiòcits després d'un estrès oxidatiu. A més, l'acumulació general d'AG causa l'alteració de la via de la insulina/IRS1/PI3K/AKT provocant una miocardiopatia. Aquesta alteració podria estar causada per l'augment de ROS (per la saturació de l'oxidació d'AG) o a l'acumulació d'altres lípids (com els DAG i la ceramida). Es creu que l'efecte d'aquests lípids en aquestes vies podria estar mediat per l'activació de les proteïnes quinases C (PKC), ja que tant els DAG com la ceramida poden activar les PKC. Tot i que els resultats de l'estudi metabolòmic no s'han validat, en els cardiomiòcits interferits per frataxina observem fins a 18 possibles espècies de DAG alterades, onze de les quals ja estan augmentades a dia 4. A més, a l'estudi proteòmic trobem disminuïdes dues proteïnes de la via de les PKC: la proteïna RACK1 (*receptor of activated protein kinase C 1*) i la PKCI-1 (*protein kinase C inhibitor 1*). Al cor, l'activació de les PKC provoca canvis a curt termini en la contracció i una remodelació ventricular a llarg termini (Steinberg, 2012). Per exemple, la PKC α altera la funció de diferents canals de calci com el SERCA2 o els LTCC, a més de fosforilar proteïnes del sarcòmer. Val a dir que dues de les dianes identificades en l'estudi proteòmic són la troponina C i la cadena lleugera reguladora de la miosina, ambdues proteïnes del sarcòmer que uneixen calci i regulen la contracció. Podria ser que l'activació de les PKC causada pels DAG o la ceramida provoqués la fosforilació d'aquestes proteïnes contràctils, n'alterés l'afinitat pel calci i provoqués una disminució de la interacció entre l'actina i la miosina amb la consegüent disfunció contràctil.

D'altra banda, la lipotoxicitat cardíaca provocada pel palmitat també pot provocar estrès de reticle, el qual es considera secundari a l'estrès oxidatiu i resulta en una inducció del factor d'elongació eucariota 1A (eEF1A1). Aquest factor interfereix en la integritat del citoesquelet i causa mort cel·lular. El palmitat també podria provocar l'estrès de reticle d'una manera més directa, incorporant-se als fosfolípids i als TAG de les membranes microsomals de l'SR comprometent-ne la integritat. La pèrdua de la integritat de la membrana de l'SR pot provocar una redistribució de xaperones de plegament de proteïnes del SR al citosol (Borradaile et al., 2006). L'estudi proteòmic mostra la inducció de la PDIA3, una xaperona de reticle, que podria ser deguda tant a les ROS com a l'excés d'AG saturats dins la cèl·lula. També hem trobat augmentat el factor eucariota d'inici de la traducció EIF4A1 en els cardiomiòcits deficients en frataxina. Podria ser que aquests factors estiguessin mitjançant la remodelació del citoesquelet i la mort apoptòtica conjuntament. Donada la importància de l'SR en l'homeòstasi del calci, seria interessant estudiar la funcionalitat d'aquest compartiment subcel·lular, així com els fluxes de calci entre els diferents compartiments.

La lipotoxicitat també afecta una gran varietat de factors de transcripció involucrats en el metabolisme energètic. Els PPAR, l'ERR α , l'SREBP, l'AMPK i el PGC1 α , que s'han trobat afectats en diferents malalties cardíques, regulen el metabolisme lipídic i estan regulats per lípids i els seus derivats tòxics (Drosatos & Schulze, 2013). S'ha descrit que la senyalització dependent dels PPAR i PGC1 α està alterada en diferents models de la malaltia, entre ells el cor del model de ratolí KIKO (Coppola et al., 2009). En el nostre cas no hem observat canvis en PGC1 α a nivell de proteïna en els cardiomiòcits deficients en frataxina, però sí que hi havia una alteració d'algunes dianes de la via implicades en el catabolisme de lípids, com són l'MCAD i la CPT1. La regulació a l'alça d'aquestes mateixes dianes de PPAR α s'ha observat en un model de fallida cardíaca amb acumulació de lípids sense una alteració dels nivells de PPAR α . Aquestes dades podrien indicar una lleu activació de la via de PPAR α deguda a l'alteració del metabolisme lipídic, ja que com s'ha explicat, aquests mateixos lípids poden activar PPAR α (Sharma et al., 2004). La regulació a la baixa de PPAR γ que s'observa als cardiomiòcits deficients en frataxina també podria ser secundària a l'acumulació de lípids, per intentar compensar l'excés de dipòsits d'àcids

grassos i evitar de captar-ne més, ja que tant PPAR α com PPAR γ fomenten la captació d'AG. Per tant, l'alteració de la via dels PPAR sembla ser més una conseqüència de l'acumulació de lípids que es dona quan manca la frataxina que no la causa. Ara bé, això no descarta les possibles complicacions que se'n deriven, com per exemple l'activació de la via d'NF- κ B i altres vies pro-inflamatòries que podrien incentivar més la fibrosi i la hipertròfia cardíaca (Bensinger & Tontonoz, 2008; Glass & Saijo, 2010). Cal seguir estudiant quina implicació tenen els diferents factors que regulen el metabolisme lipídic (i mitocondrial) en la patologia i la patogènesi de la hipertròfia cardíaca de l'atàxia de Friedreich. De fet, els agonistes dels PPAR ja s'utilitzen en estudis clínics, encara que no es pot descartar la implicació d'altres factors transcripcionals, com l'SREBP, l'ERR α i els COUP perquè també juguen un paper clau en la regulació del fenotip metabòlic.

6.3.2. Lipotoxicitat i dèficit de la β -oxidació

Els nostres resultats suggereixen que la β -oxidació es troba compromesa en els cardiomiòcits deficients en frataxina. Per una banda, observem l'acumulació de TAG. Per l'altra, una acumulació d'àcids dicarboxílics que, com s'explica més endavant, s'acumulen quan hi ha dèficits d'enzims del catabolisme lipídic.

En el primer cas, l'acumulació de lípids en forma de LD es podria deure al fet que els àcids grassos captats pels cardiomiòcits siguin primer esterificats en TAG abans d'oxidar-se, ja que el recanvi de TAG és força important a les cèl·lules cardíques. Així, si hi ha un dèficit de la β -oxidació, seria normal que els AG s'esterifiquessin en TAG dins les gotes lipídiques. D'altra banda, com que la biosíntesi de TAG de novo comença amb la via de síntesi d'àcids fosfatídics i utilitza glicerol-3-fosfat i dihidroxiacetona fosfat, podria ser que aquests metabòlits es trobessin en excés si els cardiomiòcits deficients en frataxina estiguessin captant més glucosa i/o aquesta no s'oxidés completament al mitocondri fins a CO₂.

En el segon cas, pel que fa als àcids dicarboxílics, aquests s'han detectat ja des de fa temps en síndromes per dèficits d'enzims del metabolisme mitocondrial d'AG. Per exemple, el síndrome causat per un dèficit de l'enzim carnitina palmitoil transferasa (CPT) fa que els pacients excretin àcids dicarboxílics de 6 a 10 carbonis de llargada. El dèficit de l'acil-CoA deshidrogenasa de cadena mitjana (MCAD) també provoca una clínica similar

(Gregersen et al., 1982; C. A. Stanley et al., 1983). La β -oxidació permet a la cèl·lula obtenir energia dels àcids grassos i depèn de la presència de carnitina al citosol i del funcionament dels dos enzims CPT. L'entrada al cicle de la β -oxidació requereix l'acció de les acil-CoA deshidrogenases, el primer enzim de la seqüència, que agafa electrons del carboni α i β introduint-hi un doble enllaç. Aquests electrons es transfereixen al cofactor de flavina que és essencial pel funcionament de l'enzim. Després, es transfereixen a la cadena de transport electrònic a través de les proteïnes ETF i ETFDH per produir ATP. L'MCAD necessita un altre coenzim, el NAD^+ , cosa que implica que el metabolisme de les vitamines sigui clau per l'obtenció de l'energia a partir dels àcids grassos. Hi ha dos punts relatius a la β -oxidació que cal tenir en compte a l'hora d'interpretar els nostres resultats. El primer és que els àcids grassos de menys de 12 carbonis no requereixen l'activitat de la CPT per entrar al mitocondri, i el segon és que hi ha diferents deshidrogenases que actuen en els àcids grassos de diferent llargada, en el cas de la MCAD oxida AG de 6 a 12 carbonis. La pèrdua de l'activitat de l'MCAD provoca que aquests àcids grassos no es catabolitzin i s'acumulin els àcids dicarboxílics, que són els anàlegs estructurals dels àcids grassos que no poden ser metabolitzats per l'MCAD. Aquests àcids dicarboxílics es formen per la ruta de l' ω -oxidació, que intenta oxidar els àcids grassos per l'extrem oposat. L' ω -oxidació la catalitzen diferents enzims de la família el citocrom P450 (CYP450). D'aquesta manera, tenint en compte tot això i comparant-ho amb els nostres resultats, podem fer hipòtesis de diferents escenaris. Un d'aquests és que l'activació de l' ω -oxidació podria indicar, tal com ho fa l'acumulació de gotes lipídiques, un dèficit en la β -oxidació. A més, la majoria dels àcids dicarboxílics augmentats en l'anàlisi metabolòmic tenen entre 6 i 12 carbonis, cosa que indica que l'MCAD no és capaç d'oxidar els àcids grassos que arriben als mitocondris tot i estar induïda als cardiomiòcits interferits per frataxina. Com que in vitro sembla que l'oxidació d'àcids grassos funciona bé, ens podria estar indicant que el problema de l'acumulació de lípids prové de l'entrada d'àcids grassos al mitocondri, a nivell de la CPT1. Per la qual cosa, estarien entrant una gran quantitat d'àcids grassos de fins a 12 carbonis al mitocondri, atès que que no necessiten la CPT1 per ser translocats, i explicaria una inducció de la MCAD per compensar-ho, la qual estaria sobresaturada i s'acumularien els àcids dicarboxílics. De fet, també s'observa una disminució gran de l'octanoil-CoA (C8) als miòcits deficients en frataxina, que concorda amb aquesta hipòtesi. Cal mencionar que l' ω -oxidació també és la via que oxida els AG ramificats, els quals

també trobem augmentats en els cardiomiòcits interferits per frataxina (revisat a (Wanders et al., 2011)). També s'oxiden per aquesta via els isopren i els carotens, com el coenzim Q i la vitamina A o el retinoic. Aquests es troben alterats als miòcits interferits per frataxina però se'n parlarà més endavant.

De manera paral·lela, si hi ha un dèficit en l'oxidació dels àcids grassos, seria interessant provar compostos com el FAD i el NAD⁺ (i/o també els seus precursors) per millorar l'oxidació d'àcids grassos. En efecte, ja s'està duent a terme un assaig clínic en el qual s'utilitza NAD⁺ (NCT01589809 de ClinicalTrials.gov) però està enfocat a mesurar si hi ha una regulació a l'alça dels nivells de frataxina gràcies a la inhibició del silenciament del gen de la frataxina (el NAD⁺ és un coenzim de les sirtuines). Els nostres resultats metabolòmics indiquen que hi ha una desregulació de la via de la biosíntesi de nicotinamida també en cardiomiòcits. Pel que fa al FAD, el grup del Dr. Palau ha descrit que la frataxina interactua amb el complex II i la proteïna ETF de la cadena respiratòria. Ambdues utilitzen FAD com a cofactor. És més, si es suplementen tant llevats com cucs amb FAD, aquests recuperen part del fenotip associat al dèficit de frataxina (Gonzalez-Cabo et al., 2010; González-Cabo et al., 2005). La carnitina podria ser un altre compost per millorar l'oxidació dels àcids grassos perquè és necessària per a l'activitat de transport de la CPT1 o la translocació dels acils-CoA al mitocondri. La carnitina s'usa per tractar tant miocardiopaties com dèficits en l'oxidació d'àcids grassos orgàniques i en aquest moments s'està duent a terme un assaig que estudiarà la funció cardíaca en pacients d'atàxia de Friedreich amb suplementes de L-carnitina (NCT01921868 de ClinicalTrials.gov).

6.3.3. Lipotoxicitat: altres lípids bioactius

El cor conté dos *pools* importants de lípids: els triacilglicèrids de les reserves energètiques i els fosfolípids de membrana. Quant als TAG, ja hem mencionat que segurament no provoquen la lipotoxicitat per si mateixos, sinó que ho farien els intermediaris que es formen durant la seva síntesi i degradació, com ara els acil-CoA de cadena llarga i els diacilglicerols (DAG).

En relació als DAG, es creu que la seva funció senyalitzadora recau en la localització d'aquests mateixos (a la membrana o al citosol), més que el contingut de DAG per si

mateix, i en la seva composició de lípids (saturats o insaturats) (Bergman, Hunerdosse, Kerege, Playdon, & Perreault, 2012).

Igualment, la composició dels AG de la membrana de fosfolípids també és important. Algunes espècies de fosfolípids s'han estudiat força, com per exemple la cardiolipina. En els nostres experiments no trobem la cardiolipina com a metabòlit diferencial, però sí que forma part dels metabòlits que permeten la separació del grup control i interferits en els PCA. La cardiolipina és un fosfolípid únic que conté quatre àcids grassos de cadena llarga enlloc de dos, dels quals el més abundant és el linoleic. La cardiolipina es troba a la MIM i és important per al funcionament de la cadena respiratòria (tant el complex II, el IV i el V necessiten la cardiolipina per funcionar) i també per a la fusió de les membranes. Un dèficit de cardiolipina s'associa a estrès oxidatiu i miocardiopatia. A més, tant la hipertròfia com la fallida cardíaca solen presentar una disminució del contingut de cardiolipina, cosa que podria explicar, en part, la disfunció mitocondrial d'aquestes patologies (W. C. Stanley, Khairallah, & Dabkowski, 2012).

La composició d'AG de les membranes de fosfolípids afectarà diferents propietats d'aquestes membranes, com per exemple la fluïdesa. Com més insaturats són els àcids grassos que la componen, més fluida és la membrana, cosa que afecta l'activitat de les proteïnes incrustades a la membrana, com els canals iònics i els receptors. Per exemple, els esfingolípids són lípids de membrana que juguen un paper clau en la senyalització. Els cultius interferits presenten un augment de 5 tipus diferents d'esfingolípids, tant a dia 4 com a dia 7. Els esfingolípids constitueixen un 30% del total de lípids de la membrana plasmàtica, i a part del seu paper estructural a les membranes (sigui plasmàtica, mitocondrial, de golgi o de reticle), se'ls han atribuït diferents activitats biològiques. Intervenien en diferents processos com la regulació del citoesquelet d'actina, l'endocitosi, el tràfic de vesícules, la migració, la inflamació, el cicle cel·lular, la supervivència i l'apoptosi. Els més importants són l'esfingosina-1 fosfat, la ceramida, la ceramida-1-fosfat, la gluocsilceramida, la lisoesfingomielina i la dihidroceramida, alguns dels quals hem trobat a l'estudi metabòlic. La ceramida, com s'ha dit, pot activar la PKC, regular el potencial de membrana, inhibir l'AKT i alterar la senyalització per insulina i la supervivència. L'enzim que forma la ceramida, l'esfingomielinasa (SMasa), pot ser activat

per estrès oxidatiu (Castillo, Levy, Thaikootathil, & Goldkorn, 2007). L'augment d'aquestes 5 espècies de fosfolípids podria estar alterant el potencial de membrana mitocondrial i la senyalització per AKT i insulina, o bé estar mediant la inflamació que desembocaria en fibrosi (Knowles, Cebova, & Pinz, 2013).

L'àcid araquidònic (o eicosatetraenoic C20:4) també pot derivar dels fosfolípids. Gràcies a l'acció de les ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) i el citocrom P450, dona lloc a diferents lípids bioactius anomenats eicosanoids. Els eicosanoids es divideixen entre prostaglandines, tromboxans (anomenats conjuntament prostanoids) i leucotriens. El perfil de prostaglandines produïdes depèn de l'estímul i del tipus cel·lular. Nosaltres hem trobat alterades 6 possibles prostaglandines per la falta de frataxina en l'estudi metabolòmic. Les prostaglandines són lligands de receptors lligats a proteïna G que provoquen canvis en els nivells de cAMP, IP₃ i calci (revisat a (Ricciotti & FitzGerald, 2011)). En general són proinflamàtories, però alguna pot tenir efectes anti-hipertròfics. Uns altres eicosanoids són els àcids grassos insaturats oxidats (hidroxi- i hidroperòxi-) derivats de l'àcid eicosapentaenoic. D'aquests, n'hem trobat un d'augmentat tant a dia 4 com a dia 7. Altres àcids grassos oxidats, com els àcids grassos de cadena llarga amb 3-hidroxil, s'acumulen quan hi ha un dèficit de l'LCAD o la TFP. Aquests dèficits tenen en comú una miocardiopatia com a síntoma. A més, els AG amb 3-hidroxil desacoplen la fosforilació oxidativa al cor (Tonin et al., 2013). Aquests AG, a més de disminuir el potencial de membrana mitocondrial, també disminueixen el *pool* de NAD(P)H de la matriu mitocondrial. Així, poden promoure l'obertura del MPTP i el *swelling* mitocondrial, cosa que altera l'homeòstasi energètica i provoca la miocardiopatia. Per tant, l'augment d'aquests AG també podria provocar una alteració en el potencial en la fosforilació oxidativa i en el *pool* mitocondrial de NADPH als cardiomiòcits deficients en frataxina. També seria interessant estudiar la seva acció proinflamatòria i profibròtica en el nostre model.

Uns altres AG oxidats que trobem alterats en l'estudi metabolòmic són els que tenen un grup hidroxil (HFA) o peroxil (HPFA). A l'estudi metabolòmic trobem augmentats 12 HFA i 2 HPFA en els cardiomiòcits interferits per frataxina. Els HFA poden formar-se espontàniament a partir dels HPFA. Els HPFA provenen de l'oxidació dels AG polinsaturats

dels fosfolípids de membrana a causa de la peroxidació lipídica quan hi ha un excés de ROS, en particular de radicals peroxil i els seus derivats, per l'acció de la fosfolipasa A2 (PLA2) que talla el fosfolípid i allibera els HPFA. Aquests AG són espècies no radicals però reactives i poden ser degradats gràcies a les glutatió peroxidases o les fosfolípid-hidroperòxid glutatió peroxidases formant els HFA corresponents (Spiteller, 2002). S'ha suggerit que els HPFA produïts per l'excés de ROS poden atravesar la MIM a través de la UCP2, la qual s'expressa en poca quantitat però és present a tots els teixits. L'UCP2 podria transportar els AG aniònics a l'IMS on agafarien un protó i tornarien a la matriu pel mecanisme de *flip-flop* atravesant la membrana i transportant un protó a través de la membrana (Jaburek, Miyamoto, Di Mascio, Garlid, & Jezek, 2004). S'ha descrit que aquest flux de protons cap a la matriu disminueix la formació de ROS perquè disminueix la vida mitja de la ubiquinona en estat radical aniònic i la producció de ROS, cosa que fa pensar que, a banda de mediar la peroxidació lipídica, la formació de HPFA actua com a mecanisme de *feedback* negatiu per evitar la producció de més ROS (Korshunov, Korkina, Ruuge, Skulachev, & Starkov, 1998). Per tant, aquests AG podrien estar provocats per l'estrès oxidatiu i actuar amb aquest mecanisme de *feedback* negatiu entre la producció de ROS, la peroxidació lipídica i la inhibició de la producció de ROS mitocondrials.

A l'anàlisi metabolòmic també trobem alterats altres lípids esterols. Els esterols estan formats per quatre anells de carboni i hidrogen fusionats (tres anells amb sis àtoms i un amb cinc). D'una banda, trobem un augment d'èsters de colesterol amb àcids grassos de cadena llarga i insaturats. Els èsters de colesterol són molècules de colesterol amb àcids grassos de cadena llarga units al grup hidroxil. Són molt menys polars que el colesterol lliure i sembla que són usats per transportar i emmagatzemar el colesterol. No formen part de membranes, sinó que s'empaqueten dins de les gotes lipídiques o les lipoproteïnes. El colesterol és un dels esterols més comuns i té diverses funcions. A nivell estructural, és un component molt important de les membranes plasmàtiques, on en regula les propietats fisicoquímiques. A nivell de precursor, és la base per la síntesi de la vitamina D, les hormones sexuals i corticoesteroidals, les sals biliars i per a la formació de les *lipid raft* (Ikonen, 2008). Alguns estudis fins i tot mostren que podria actuar com a antioxidant (Smith, 1991). És probable que l'augment de colesterol detectat sigui degut a

l'augment de gotes lipídiques intracel·lulars; tot i així, caldria estudiar la seva implicació en les propietats de les membranes i en la senyalització cel·lular.

Uns altres esterols són la vitamina D i els seus derivats. La vitamina D engloba un grup de molècules liposolubles semblant als esterols però amb l'anell "trecat" que s'anomenen secoesterols (seco prové del grec "tallar"). A l'estudi metabòlic hi ha fins a 15 possibles metabòlits d'aquest grup alterats. Si bé primer no se sabia si els efectes de la vitamina D al cor eren primaris o secundaris a l'alteració del sistema renina-angiotensina (que regula la pressió arterial i el balanç hídric), diferents estudis han demostrat que la vitamina D juga un paper clau en la fisiologia i la hipertròfia cardíaca. D'una banda, la vitamina D augmenta la captació de calci als miòcits ventriculars promovent l'obertura dels canals de calci i també la seva transcripció (Selles, Massheimer, Santillan, Marinissen, & Boland, 1997; Walters, Ilenchuk, & Claycomb, 1987). A més, en cardiomiòcits adults de rata provoca una relaxació accelerada a curt i a llarg termini de manera dependent de PKC. A curt termini, la PKC fosforila la troponina T (disminuint-ne l'afinitat dels miofilaments pel calci) i també el fosfolamban (provocant un major segrest de calci al reticle sarcoplasmàtic). Si l'administració de vitamina D continua, a llarg termini es creu que es donen canvis d'expressió de factors que regulen els cicles de calci als cardiomiòcits. Per exemple, la vitamina D controla l'expressió de la mateixa PKC i del seu propi receptor VDR. D'altra banda, la vitamina D també està implicada en l'homeòstasi de la matriu extracel·lular i en regula la regeneració. La vitamina D regula tant l'expressió de metaloproteinases (MMP) que hidrolitzen les proteïnes de la matriu extracel·lular com els inhibidors tissulars d'aquestes metaloproteases (TIMP). Un desequilibri entre les MMP i els TIMP provoca fibrosi i hipertròfia cardíaca (revisat a (Pilz, Tomaschitz, Drechsler, Dekker, & März, 2010)). L'alteració dels metabòlits de precursors i derivats de la vitamina D podrien alterar la senyalització per la PKC i els cicles de calci, i promoure una hipertròfia cardíaca, per la qual cosa seria interessant veure l'efecte d'un suplement de vitamina D en els cardiomiòcits deficientes en frataxina.

Dins el grup dels esterols, cal destacar els retinoides, ja que són lligands dels receptors X retinoides (RXR). El retinil-palmitat i el retinil-estearat es trobaven augmentats en els cardiomiòcits deficientes en frataxina segons l'estudi metabòlic. Com s'explica més

amunt, aquests receptors dimeritzen amb els PPAR i els VDR per promoure la transcripció gènica que modula el metabolisme i la hipertròfia cardíaca. Així, aquests lípids serien uns bons candidats com a causants de la remodelació metabòlica dels cardiomiòcits deficients en frataxina.

Per acabar, l'estudi metabolòmic mostra l'afectació de les quinones i hidroquinones (també lípids esterols) però el seu paper es tractarà més endavant en l'apartat del paper de l'estrès oxidatiu.

7. PROTEÏNES QUE PODRIEN INTERACCIONAR AMB LA FRATAXINA AL COR

Per estudiar quines proteïnes podrien interaccionar amb la frataxina vam dur a terme una aproximació que fins a la data no havia estat abordada. Aquesta consistia en la separació de les proteïnes mitocondrials mitjançant la tècnica BN-PAGE, amb la posterior localització de frataxina gràcies al *western blot* i la identificació d'aquelles proteïnes que havien migrat conjuntament amb la frataxina (i que, per tant, eren candidates a poder formar part del mateix complex). Tal com s'ha mostrat a l'apartat de resultats, en el gel de la segona dimensió l'anticòs contra frataxina reaccionava amb dos *spots*. Un *spot* tenia un pes molecular d'uns 14 KDa (segurament corresponent a la isoforma madura de la frataxina). L'altre, de major pes molecular (que podria correspondre a una isoforma diferent o intermediària), corresponia a una isoforma que migrava més lentament a la primera dimensió. Dit d'una altra manera, aquest segon *spot* podria ser susceptible de formar algun tipus de complex amb altres proteïnes. Entre els *spots* que comigraven amb aquesta segona forma, vam obtenir les següents dianes.

L'NNTm (NAD(P)-transhidrogenasa, mitocondrial) és una proteïna integral de la MIM que transfereix l'hidrogen del NADH al NADP^+ formant NADPH alhora que transporta un protó cap a la matriu a través de la MIM. Fa servir, doncs, el gradient de protons per produir NADPH que s'utilitzarà per a la biosíntesi de molècules i per a la detoxificació de les ROS. El cor té una expressió molt alta d'NNT, així com la glàndula adrenal, el ronyó, la tiroides i el teixit adipós (Meimaridou et al., 2012). Quan hi ha insuficiència cardíaca disminueix l'activitat de l'NNT, disminueix el NADPH, augmenta la ràtio GSSG/GSH, s'afecten els enzims depenents de NADPH i disminueix la capacitat de la cèl·lula de mantenir el potencial de membrana. Això fa que hi hagi menys capacitat bioenergètica, s'afecti l'estat

redox i les defenses antioxidants i augmenti el dany oxidatiu en proteïnes (Sheeran, Rydström, Shakhparonov, Pestov, & Pepe, 2010). El *knock-down* d'NNT a les cèl·lules PC12 inhibeix la PDH i la SCOT (enzim per la síntesi d'oxoàcids) (Yin, Sancheti, & Cadenas, 2012) i el ratolí KO té afectada la secreció d'insulina (Shimomura et al., 2009).

L'OGDC-E1 (2-oxoglutarat-deshidrogenasa, mitocondrial) forma el complex de la 2-oxoglutarat deshidrogenasa del cicle de Krebs i catalitza la conversió del 2-oxoglutarat a succinil-CoA i CO₂. Té tres components, que a més de NAD⁺ utilitzen lipoamida (deriva de l'octanoic, que surt a metabolòmica) i tiamina pirofosfat. L'OGDC es reprimeix pel producte i es regula per acetilació (Choudhary et al., 2009). Cal dir que és un dels enzims que produeix més H₂O₂, sobretot si està alterada la ràtio NADP⁺/NADPH (Starkov et al., 2004).

L'MDHm (malat-deshidrogenasa, mitocondrial) catalitza l'oxidació reversible de malat a oxalacetat reduint el NAD⁺ a NADH. Es regula al·lostèricament per malat, oxalacetat i citrat i postraduccionalment per malonilació, succinilació i acetilació, que augmenten la seva activitat prop d'un 70% (Peng et al., 2011; Zhao et al., 2010). Es creu que forma un complex amb la fumarasa i la citrat-sintasa per afavorir la formació de malat (Minárik, Tomásková, Kollárová, & Antalík, 2002).

L'ACOm (aconitat-hidratasa, mitocondrial) catalitza la isomerització del citrat a isocitrat via cis-aconitat i també forma part del cicle de Krebs. Conté un centre 4Fe-4S (Mirel et al., 1998) i s'ha descrit que interacciona directament amb la frataxina (Bulteau et al., 2004). L'aconitasa podria ser fàcilment oxidada per l'estrès oxidatiu (Yan, Levine, & Sohal, 1997), provocant la seva inactivació. Podria ser que la proximitat als llocs de generació de NADH i NADPH (les deshidrogenases i la transhidrogenasa NNT) en permetrés la reparació per part dels sistemes antioxidants. També pot ser acetilada.

La TFP α (proteïna trifuncional subunitat alfa, mitocondrial) és una proteïna amb dues activitats; l'enoil-CoA hidratasa transforma el 3-hidroxiacil-CoA a trans-2/3-enoil-CoA i H₂O i la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa converteix un hidroxiacil-CoA a 3-oxoacil-CoA reduint el NAD⁺ a NADH. Funciona com a octàmer (4 subunitats d'HADHA i 4 d'HADHB) per β -oxidar els àcids grassos al mitocondri. Mutacions en aquest gen poden donar miocardiopaties (també neuropatia perifèrica i absència dels reflexes de tendó) (den Boer

et al., 2003; IJlst, Ruiten, Hoovers, Jakobs, & Wanders, 1996). També es regula per acetilació (Choudhary et al., 2009). Cal dir que s'han trobat força àcids grassos amb els grups funcionals oxo i hidroxil alterats a l'estudi metabolòmic, que s'acumulen quan hi ha dèficit de la TFP.

La VLCAD (*very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial*) està associada a la MIM i oxida els acil-CoA reduint la proteïna ETF (McAndrew et al., 2008). Actua sobre els àcids grassos de cadena llarga i molt llarga (fins a 24 carbonis) i presenta poca activitat per AG de menys de 12C. Utilitza el FAD com a cofactor i es regula per acetilació (Choudhary et al., 2009). Mutacions en el seu gen provoquen un error congènit del metabolisme caracteritzat per una alta incidència de miocardiopaties (Mathur et al., 1999; Sourì, Aoyama, Orii, Yamaguchi, & Hashimoto, 1996).

El CYTC1 (*cytochrome c1, heme protein, mitochondria*) i la RISP (*cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial*) són subunitats del complex III de la cadena respiratòria de la MIM, també anomenat citocrom bc1 o coenzim Q: citocrom-c oxidoreductasa. El complex III està format per 11 subunitats, de les quals 3 actuen com a transportadores d'electrons: el citocrom c1, el citocrom b i la proteïna Rieske, que conté un centre 2Fe-2S (Vázquez-Acevedo, Antaramian, Corona, & González-Halphen, 1993). El complex III en forma nativa és dimèric i es troba associat als complexos I i IV formant el respirasoma (Schägger & Pfeiffer, 2000). A la cadena respiratòria, varies deshidrogenases redueixen el *pool* d'ubiquinona a ubiquinol, el qual és oxidat pel complex III (Crofts, 2004). Amb l'energia ajuda a crear el gradient de protons (Zhang et al., 1998) i és una de les fonts més importants de ROS al mitocondri (Muller, Liu, & Van Remmen, 2004).

Totes les proteïnes identificades mitjançant la tècnica Blue-Native PAGE són mitocondrials i afecten tres processos clau del metabolisme: el cicle de Krebs, la cadena respiratòria i l'estat redox del mitocondri. Totes depenen de NAD⁺, FAD, centres Fe-S o grups hemo. De fet, tots aquests processos depenen de l'estat redox del mitocondri, i aquest es regula mitjançant l'NNT que també es troba a les dianes. Tot i que de les proteïnes trobades algunes estan descrites com a proteïnes de matriu, altres articles ja les citen com a proteïnes que poden interaccionar tant entre elles com amb la MIM (Havugimana et al., 2012; Y. Wang, Mohsen, Mihalik, Goetzman, & Vockley, 2010). D'altra

banda, la majoria d'aquestes proteïnes es regulen per acetilació, la qual depèn de NAD^+ i que modula el metabolisme segons l'estat redox cel·lular. Caldrà, però, dur a terme futures investigacions per analitzar en més detall la possible interacció de la frataxina amb les proteïnes indicades i per confirmar que l'*spot* que reacciona amb l'anticòs de frataxina correspon realment a aquesta proteïna.

8. VIES AFECTADES SEGONS L'ESTUDI PROTEÒMIC

En l'estudi proteòmic de la deficiència de frataxina que es va dur a terme a dia 4 vam observar set *spots* diferencials que es poden agrupar en tres grups segons els processos on intervenen. Aquests processos són els següents.

8.1. Citoesquelet i disfunció contràctil

Com s'ha esmentat, la miocardiopatia hipertròfica és un dels símptomes més freqüents de l'atàxia de Friedreich i es caracteritza per una hipertròfia asimètrica del ventricle esquerre, amb una desestructuració dels miòcits i el desenvolupament de fibrosi. Aquesta desestructuració pot estar causada per alteracions del citoesquelet, i de fet el 60% dels pacients amb miocardiopatia hipertròfica presenten alteracions en 8 gens que codifiquen per diferents proteïnes de la maquinària de contracció (Sala, 2013; Teekakirikul, Kelly, Rehm, Lakdawala, & Funke, 2013). Nosaltres observem dues d'aquestes proteïnes de citoesquelet regulades a la baixa. S'ha descrit que aquestes són sensibles a oxidació, un dels mecanismes que pot contribuir a la pèrdua de la contractibilitat (Dalle-Donne et al., 2006).

La TNNC1 (troponina C tipus 1, lenta) forma part de la troponina. La troponina és la proteïna reguladora central de la contracció del múscul estriat i està col·locada al filament d'actina juntament amb la tropomiosina. Consta de tres subunitats: la TnI, que és l'inibidora de l'actomiosina ATPasa; la TnT, que conté el lloc d'unió a tropomiosina, i la TnC, que és la que uneix calci. La unió de calci a la TnC aboleix l'efecte inhibitori de la TnI i permet la interacció de l'actina amb la miosina, l'hidròlisi de l'ATP i la generació de tensió. Mutacions al gen *Tnnc1* estan associades amb miocardiopaties dilatades de tipus 1Z (Mogensen et al., 2004). La troponina C uneix calci i magnesi i és sensible a l'oxidació formant ponts disulfur o sulfonats.

L'MLC-2v (*myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform*) correspon a la cadena lleugera reguladora de la miosina que amb l'augment de calci es fosforila i provoca la contracció. Mutacions en aquest gen estan associades amb miocardiopatia hipertròfica (Poetter et al., 1996). Aquesta proteïna també uneix calci i pot formar ponts disulfur amb altres proteïnes quan s'oxida.

8.2. Xaperones i resposta a estrès

Dues de les proteïnes induïdes que s'han identificat a l'estudi proteòmic són proteïnes que poden ser classificades en aquest grup.

L'HSP60 (*heat shock protein 60 KDa, mitochondrial*) predomina als mitocondris i és essencial pel plegament i l'assemblatge de les proteïnes importades al mitocondri. Es regula a l'alça amb l'hiperglicèmia, l'estrès oxidatiu (Hall & Martinus, 2013) i amb estressos originats específicament del mitocondri (Martinus et al., 1996). El seu promotor té llocs d'unió tant per PPAR γ com per NF- κ B. La seva activitat al mitocondri podria preservar els enzims metabòlics i protegir la maquinària de producció energètica de l'oxidació directa o de canvis perjudicials en l'agregació proteica. Per altra banda, durant la fallida cardíaca, l'HSP60 es pot detectar a la membrana plasmàtica, on colocalitza amb les *lipid rafts* i tot això es correlaciona amb un augment de l'apoptosi. Es creu que l'alliberament de HSP60 podria activar el sistema immune innat, provocant l'augment de TNF α i la inflamació (L. Lin et al., 2007).

La PDIA3 (*protein disulfide isomerase associated 3*), també anomenada p58 o *glucose-regulated protein*, té activitat isomerasa de ponts disulfur i participa en el complex d'histocompatibilitat principal (MHC de l'anglès *major histocompatibility complex class I*) (Garbi, Tanaka, Momburg, & Hämmerling, 2006). Les PDI es troben al reticle endoplasmàtic, tenen dos dominis tioredoxina-*like* i catalitzen la formació i el trencament de ponts disulfur entre residus de cisteïnes de proteïnes mentre es pleguen. Entre les seves funcions trobem, doncs, el plegament de proteïnes, la reparació de modificacions postraduccional, el rol de xaperona (fins i tot sense fer servir la seva activitat enzimàtica) i la presentació d'antígens. Tal com passa amb l'Hsp60, també pot colocalitzar amb les *lipid rafts* de la membrana plasmàtica. La seva activitat depèn de l'estat redox de la

cèl·lula i de glutatió. Tant aquesta proteïna com la Ero1 estan involucrades en la producció de ROS al reticle endoplasmàtic.

8.3. Senyalització deguda a lípids i estrès

Aquest grup està relacionat amb els dos grups anteriors, ja que s'ha descrit que les PKC poden ser activades en situacions d'estrès oxidatiu, ja sigui per oxidació directa (Whisler, Goyette, Grants, & Newhouse, 1995), per DAG oxidats (O'Brian, Ward, Weinstein, Bull, & Marnett, 1988; Takekoshi et al., 1995) o per senyalització a través d'altres proteïnes (Kamata & Hirata, 1999). La troponina i la miosina (TnI i MLC-2) són dues de les seves dianes (Jideama et al., 1996; Venema, Raynor, Noland, & Kuo, 1993). S'ha relacionat la PKC amb la propensió a patir hipertròfia cardíaca (Braz et al., 2004; Hahn et al., 2003). A l'estudi metabolòmic hem trobat diferents activadors com els DAG, els quals podrien estar mediant una resposta dependent de PKC. Les proteïnes d'aquest grup són RACK1, PKCI-1 i eIF-4A. Les dues primeres es trobaven disminuïdes, mentre que la tercera estava induïda.

L'eIF-4A (*eukaryotic translation initiation factor 4A1 and 4A2*) és una helicasa d'RNA dependent d'ATP que està involucrada en la iniciació de la traducció. Segons el model establert, l'eIF4a desenrotllaria l'estructura secundària de la regió 5'-UTR de l'mRNA per permetre la unió de la subunitat petita del ribosoma i començar la traducció (Chang et al., 2009; Loh et al., 2009). La traducció és un procés molt regulat i el metabolisme hi té un paper important. Com s'ha mencionat a l'apartat del metabolisme del ferro, l'oxigen, l'òxid nítric, el ferro o el coure poden regular la traducció dels mRNA que contenen IRE. Així mateix, l'inici de la traducció també es pot regular per metabòlits com la glucosa o els lípids. Per exemple, s'ha vist que en condicions hiperglicèmiques el transportador de lípids CD36 es tradueix per mecanismes que involucren la *ribosomal reinitiation* que permet augmentar la traducció de CD36 i els seus nivells a la cèl·lula (Griffin et al., 2001). Aquest factor es regula per acetilació i fosforilació i per vies de senyalització que inclouen PI3K i mTORC.

La proteïna RACK1 (*receptor of activated protein kinase C 1*), també anomenada GNB2L1 (*guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*), està involucrada en el reclutament, assamblatge i/o regulació de varies molècules de senyalització. És també un

component de la subunitat ribosomal 40s involucrada en l'inici traduccional. La funció de RACK1 seria fer de nexa que uneix la subunitat ribosomal petita amb els complexos de senyalització que es troben sobretot a les membranes cel·lulars (Toby J. Gibson, 2012). També promou l'ubiquitinització de HIF1A i l'apoptosi i es pot regular per fosforilació i acetilació.

La proteïna PKCI-1 (*protein kinase C inhibitor 1*), també anomenada HINT1 (*histidine triad nucleotide-binding protein 1*), hidrolitza els nucleòtids fosfoamidats de purines. També serveix de proteïna *scaffold*, que modula d'una banda l'activitat transcripcional, com per exemple de p53 (s'ha descrit que Hint1 actua com a supressor tumoral), i de l'altra la degradació al proteasoma de proteïnes diana de les *E3 ubiquitin-protein ligase complex* (revisat per (Huebner, Saldivar, Sun, Shibata, & Druck, 2011)). Mutacions en aquest gen causen una neuropatia axonal autosòmica recessiva, classificada dins la malaltia de Charcot-Marie-Tooth (CMT) o *hereditary motor and sensory neuropathy* (HMSN) (De Rijk et al., 2012; Tazir, Bellatache, Nouioua, & Vallat, 2013).

9. PAPER DE L'ESTRÈS OXIDATIU

Tenint en compte els resultats, podríem dir que els cardiomiòcits deficients en frataxina presenten un cert estrès oxidatiu en estat basal. Això ho evidencia l'augment dels enzims antioxidants SOD1 i SOD2, l'oxidació proteica detectada amb *western blot* anti DNP, la presència de productes de peroxidació lipídica dels àcids grassos, la major sensibilitat al tBHP i probablement també la inducció de HSP60 i PDIA3.

Amb relació als nivells de SOD1, SOD2 i HSP60, l'augment es podria deure a una certa activació de la via de l'NF-κB, ja que els tres són dianes d'aquest factor transcripcional. Les ROS interaccionen en diferents punts de la via de senyalització de l'NF-κB de manera específica en diferents tipus cel·lulars (Morgan & Liu, 2011). La PKC és un activador de la via d'NF-κB (Ogata, Yamamoto, Kugiyama, Yasue, & Miyamoto, 2000). De fet, els DAG i altres lípids bioactius podrien estar activant la PKC i alhora promovent l'activació d'NF-κB. Els resultats de proteòmica apunten a una alteració de la via de la PKC, amb una disminució dels nivells de RACK1 i de PKCI-1. La manera com concorda aquest augment dels enzims antioxidants amb un major dany proteic i menor resistència a l'estrès oxidatiu està encara per aclarir. El nostre grup també havia observat un augment dels enzims

superòxid-dismutasa en models de dèficit de frataxina en llevat. Ara bé, tot i l'augment dels nivells proteics de la SOD1 i la SOD2 d'aquests llevats, l'activitat enzimàtica era igual o menor en els llevats deficients en frataxina. En canvi, si es suplementava el medi de cultiu de llevat amb els cofactors dels enzims SOD (amb coure i manganès) es recuperava l'activitat dels enzims i alguns fenotips dels mutants (per exemple l'activitat de les proteïnes amb centres ferro-sofre) (Irazusta et al., 2006; Irazusta et al., 2010; Moreno-Cermeño et al., 2010). En els cardiomiòcits hem observat un augment dels nivells de SOD1 i SOD2 però no hem pogut mesurar l'activitat de SOD2, de manera que podria ser que en els cardiomiòcits succeís el mateix que en llevats i que l'activitat de SOD2 fos menor quan hi ha dèficit de frataxina. En els llevats deficients en frataxina el dèficit de l'activitat podria atribuir-se a una metal·lació incorrecta, on el ferro reemplaçaria el manganès del centre actiu de la SOD. Aquest fenomen seria degut a la gran acumulació de ferro que presenten els llevats deficients en frataxina, que provoca un augment del ferro lliure i la inhibició del principal transportador de manganès de llevats, evitant d'aquesta manera la captació d'aquest metall. Com que en els cardiomiòcits no observem un augment del contingut de ferro a dia 7, que és quan observem un augment dels nivells de SOD2, no podem assumir que ocorri el mateix. Així doncs, en relació amb els miòcits cardíacs, seria interessant provar què succeeix amb les activitats SOD, l'oxidació proteica i la sensibilitat a l'estrès si suplementem el medi de cultiu de cardiomiòcits amb manganès.

Una altra observació que mostra que hi podria haver un cert estrès oxidatiu a nivell basal és la presència de carbonils a les proteïnes i una major sensibilitat a agents oxidants. Els àcids grassos oxidats (hidroperòxids) que trobem en l'estudi metabolòmic podrien provocar la peroxidació lipídica i el dany oxidatiu observat a les proteïnes com a carbonils. Altres models han trobat signes de peroxidació lipídica, com una pèrdua parcial de frataxina en ratolins (Al-Mahdawi et al., 2006). En canvi, això no succeeix en models de ratolí amb una deleció total de la frataxina (Seznec et al., 2005)). Aquests indicis són consistents amb un estat oxidatiu alterat. Per bé que en condicions basals sembla que els cardiomiòcits deficients en frataxina són capaços de combatre l'estrès oxidatiu, si es tracten amb l'agent oxidant tBHP resulten ser més sensibles. Aquests resultats podrien indicar que els cardiomiòcits deficients en frataxina no poden assumir un augment de les ROS. Una possible explicació seria que els cardiomiòcits afectats fossin incapaçs d'activar

la resposta antioxidant de fase II mitjançant el factor transcripcional NRF2, tal com ha descrit el grup del Dr. Rustin en fibroblasts de pacients (Paupe et al., 2009). Segons els autors, en les cèl·lules deficientes en frataxina la interacció de l'actina amb la via d'NRF2 està alterada (per una desorganització de les fibres d'estrès d'actina) i no poden transcriure els gens antioxidants en resposta a l'estrès oxidatiu.

Una de les dianes d'NRF2 és la NAD(P)H deshidrogenasa (quinona 1), o NQO1, que redueix les diferents quinones i hidroquinones, entre elles la vitamina K. La vitamina K reduïda està augmentada en els cardiomiòcits deficientes en frataxina. Aquesta vitamina té un paper molt important en les malalties cardiovasculars perquè afecta la coagulació i la calcificació. La vitamina K permet la carboxilació d'alguns residus de glutamat formant residus de gamma-carboxiglutamat (Gla) que es troben en diferents proteïnes i afavoreixen la unió de calci (Furie, Bouchard, & Furie, 1999). S'ha postulat que la forma reduïda de la vitamina K també podria actuar com a *scavenger* de radicals perquè atura la peroxidació lipídica als microsomes i a les membranes del reticle endoplasmàtic (J. Li, Wang, & Rosenberg, 2009; Mukai, Morimoto, Kikuchi, & Nagaoka, 1993; Vervoort, Ronden, & Thijssen, 1997). Aquest rol seria dependent de NQO1. L'NQO1 conté FAD i usa NADH o NADPH per reduir la vitamina K i, per tant, té un paper detoxificador (Shearer & Newman, 2014). L'augment de vitamina K reduïda podria indicar una alteració de l'estat redox mitocondrial d'aquestes cèl·lules.

Si la manca de frataxina afecta l'estat redox mitocondrial, com indiquen alguns dels nostres resultats i d'altres estudis, seria interessant veure si l'activitat NADPH-transhidrogenasa (NNT) està afectada als cardiomiòcits, ja que era una de les possibles dianes d'interaccionar amb frataxina. La proteïna NNT, localitzada a la MIM, forma NADPH i NAD^+ a partir de NADP^+ i NADH transportant protons cap a la matriu (Earle, Anderson, & Fisher, 1978). Es creu que l'NNT genera la major part de NADPH, fins a un 45% del total cel·lular, i que la resta prové de la via de les pentoses fosfat citosòlica i de la isocitrat deshidrogenasa i l'enzim màlic mitocondrials. Es creu que la funció de l'NNT és mantenir l'estat redox dels tiols mitocondrials, en particular del glutatió, les tioredoxines, les peroxiredoxines i les glutaredoxines (Hoek & Rydström, 1988; Holmgren, 1989). Com que la conversió del glutatió oxidat (GSSG) a reduït (GSH) necessita NADPH, l'NNT

permetria mantenir la ràtio GSH/GSSG i protegir així del dany produït per les ROS. En pacients amb fallida cardíaca s'ha observat que els nivells d'NNT al cor són més baixos, amb menor NADPH i menor ràtio GSH/GSSG. Els autors han associat aquests factors a una disminució de la capacitat bioenergètica, de la regulació redox i de les defenses antioxidants, amb un augment del dany oxidatiu de proteïnes (Sheeran et al., 2010). Cal mencionar que el cor és el teixit amb més expressió d'NNT i amb més activitat transhidrogenasa (Arkblad et al., 2002; Humphrey, 1957). Pel que fa al glutatió, cal dir que l'estudi proteòmic en cardiomiòcits mostrava una afectació de la PDI del reticle endoplasmàtic, l'activitat de la qual depèn del glutatió. A més, el glutatió s'ha postulat com el quelant més important de ferro (Hider & Kong, 2011), i una afectació de la ràtio de GSH/GSSG podria explicar una afectació dels nivells intracel·lulars de ferro en altres models. En efecte, un estudi amb fibroblasts de pacients on s'observa un augment de la glutatiolació de proteïnes respecte al glutatió lliure, demostra que l'addició de glutatió reduït pot millorar la viabilitat cel·lular (Anna Pastore et al., 2003). Els autors atribueixen el dèficit de glutatió a l'augment de les espècies reactives causades per l'increment dels nivells de ferro, però també podria ser que un dèficit en l'activitat transhidrogenasa alterés els nivells de glutatió reduït afectant l'estat redox de la cèl·lula, el dany oxidatiu i el metabolisme del ferro.

La similitud dels símptomes del dèficit de vitamina E i de frataxina (Jayadev & Bird, 2013), amb totes dues malalties incloent una atàxia cerebel·losa i una miocardiopatia feble, cosa que suggereix que les conseqüències cel·lulars de la manca de frataxina i vitamina E són similars. L'atàxia amb dèficit de vitamina E està causada per mutacions del gen TTPA que té com a producte la proteïna de transport d' α -tocoferol (*α TTP d' α -tocopherol transport protein*). L' α TTP és una proteïna citosòlica de 32 KDa expressada sobretot a les cèl·lules hepàtiques (Sato et al., 1993) i també en cèl·lules piramidals del cerebel (Hosomi et al., 1998). L' α TTP del fetge incorpora l' α -tocoferol dels quilomicrons a les VLDL que després es secreten a la circulació. Si el transportador falta, l' α -tocoferol es perd ràpidament en l'orina (Schuelke et al., 2000). L' α TTP té dues funcions bàsiques: la unió selectiva de l' α -tocoferol i la transferència d'aquest entre membranes. Es creu que l' α TTP transporta la vitamina E des del compartiment d'endocitosi fins a les vesícules de transport que permetran la secreció de la vitamina E a la membrana plasmàtica. S'han descrit tres

mutacions que no permeten que la vitamina E arribi a la membrana plasmàtica i quedi retinguda als lisosomes (R59W, R22W i A12T). Aquestes mutacions són en una regió positiva de la proteïna important per la interacció amb altres proteïnes, perquè orienta la regió hidrofòbica i permet un canvi conformacional que exposa la cavitat amb el lligand. La superfície positiva podria servir per acoblar l' α TTP a les membranes cel·lulars interaccionant amb els caps polars dels fosfolípids o bé per interaccionar amb altres proteïnes, tot i que no se'n coneix cap fins al moment (Min, Kovall, & Hendrickson, 2003).

La vitamina E actua com a antioxidant a la membrana, juntament amb la ubiquinona (Traber & Atkinson, 2007). La ubiquinona reduïda també es troba augmentada en l'anàlisi metabolòmica, tant la que conté 6 cadenes d'isoprè (coenzim Q₆) com la de 10 (coenzim Q₁₀). A més de la seva funció ben coneguda com a transportador d'electrons dins la membrana mitocondrial (Navarro et al., 1998), el coenzim Q pot actuar d'antioxidant. Per una banda, pot reduir els radicals peroxils lipídics; per l'altra, pot regenerar l' α -tocoferol reduint els radicals de la quinona d' α -tocoferil, molt inestables i que poden propagarse en una reacció en cadena (Bentinger, Tekle, & Dallner, 2010).

D'altra banda, una acumulació de coenzim Q reduït també s'associa a una major producció de ROS als mitocondris. Una prova d'això és que els nivells de ROS produïts augmenten si s'usen inhibidors de la cadena respiratòria com l'antimicina A (Starkov & Fiskum, 2003; J F Turrens, Alexandre, & Lehninger, 1985), suggerint que la reducció exagerada dels transportadors d'electrons de la cadena respiratòria són un dels factors responsables de la producció de ROS. Aquesta producció de ROS per part de la cadena respiratòria és variable i depèn, entre altres coses, del substrat utilitzat. Per exemple, l'oxidació del succinat produeix més ROS que la del NADH (Boveris, Oshino, & Chance, 1972). Això succeeix perquè el succinat és capaç de reduir el NAD⁺ mitjançant el que s'anomena transport revers d'electrons (RET de *reverse electron transport*). Durant el RET, els electrons del succinat es transfereixen a través del complex III de la cadena respiratòria al coenzim Q i, si hi ha un gradient de protons elevat, cap al complex I, d'on passen finalment al NAD⁺ de la matriu. També es pot donar RET en mitocondris amb una activitat alta de la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa, una flavoproteïna localitzada a la cara externa de la MIM que té molta activitat a les cèl·lules musculars cardíques (Tahara,

Navarete, & Kowaltowski, 2009). És important mencionar que la producció de ROS a partir de succinat és menor quan s'oxiden àcids grassos perquè aquests últims poden actuar de protonòfors. Malgrat això, la producció de ROS en el transport "cap endavant" o *forward* és més alta usant els àcids grassos com a substrat. Aquest fenomen es deu, en part, a una inhibició parcial de la cadena de transport electrònic per part dels AG (Schönfeld & Wojtczak, 2007, 2008). L'organització supramolecular de la cadena respiratòria, és a dir, els supercomplexes, també sembla ser diferent segons el substrat oxidat. De fet, el succinat és un intermediari del cicle de Krebs i la seva concentració en situacions normals és baixa. A més, l'activitat de la succinat deshidrogenasa s'inhibeix per l'oxalacetat, un altre intermediari del cicle de Krebs, que en situacions metabòliques normals tampoc s'acumula. En canvi, els àcids grassos són un substrat important per a molts tipus cel·lulars, entre ells els cardiomiòcits, i el fet de produir menys RET, i com a conseqüència menys ROS, seria clau per evitar el dany oxidatiu als mitocondris d'aquestes cèl·lules. Seria interessant estudiar en els miòcits cardíacs deficientes en frataxina la capacitat d'oxidar els diferents substrats i mesurar-ne la producció de ROS associada.

Diferents indicis apunten a un rol de la frataxina en el manteniment de l'estat redox de la cèl·lula. L'estat redox, al seu torn, afectaria el metabolisme i l'estat oxidatiu dels cardiomiòcits. Per una banda, segons els resultats del BN-PAGE i la interacció de la frataxina amb altres proteïnes, aquesta formaria un complex amb la cadena de transport electrònic i amb diferents deshidrogenases de la MIM. A més, la frataxina podria interaccionar amb la transhidrogenasa NNT, que manté l'estat redox mitocondrial. Després, el dèficit de vitamina E s'assembla molt al dèficit de frataxina. L'alteració de l'estat redox i oxidatiu de les cèl·lules cardíques podria estar causat per un bloqueig del transport d'electrons o bé per un transport revers a la cadena respiratòria. A la vegada, això podria alterar l'oxidació dels substrats i la generació de NADPH mitjançant la NNT. Les defenses antioxidants i de reparació del dany oxidatiu, que utilitzen NADPH i glutatió, no poden funcionar a màxim rendiment i no repararien les proteïnes oxidades. La síntesi dels centres ferro-sofre també podria estar alterada perquè depèn del potencial redox.

Encara més, el fet que sigui una patologia que comença a l'adolescència, podria indicar que els símptomes ocorren per acumulació de macromolècules danyades per l'oxidació,

tal com ocorre en la miocardiopatia que pateix el mutant de SOD2. També s'ha de tenir en compte que la idebenona, un anàleg del coenzim Q de cadena curta, s'ha provat en assaigs clínics amb resultats molt positius a l'hora de revertir la hipertròfia cardíaca (Hausse et al., 2002). És més, si es mesura l'activitat de les proteïnes amb centres ferro-sofre en biòpsies de miocardi preses abans i després de prendre idebenona, s'observa una millora un cop fet el tractament (Pierre Rustin, Bonnet, Rötig, Munnich, & Sidi, 2004). Per contra, la idebenona té poc o gens d'efecte a nivell neurològic. Una possible explicació seria que quan es comença a administrar la idebenona els pacients ja presenten símptomes neurològics, els quals serien causats pel dany i a la mort neuronal. L'agreujament de la malaltia podria donar-se per un fenomen d'auto-amplificació al llarg del temps provocat per la mort neuronal causada per la disfunció mitocondrial, més que per la mateixa disfunció mitocondrial. Per aquest motiu, una alternativa seria administrar una teràpia antioxidant o que atenui la disfunció mitocondrial, abans que comencin els símptomes de la malaltia (Bayot et al., 2011). En aquest sentit és clau el desenvolupament de biomarcadors que permetin el diagnòstic precoç, la prognosi i el tractament de la malaltia.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'ús de diferents shRNA anti-frataxina en cardiomiòcits de rates nounades permet la disminució dels nivells d'aquesta proteïna a nivells similars als dels pacients. El dèficit de frataxina no afecta la viabilitat cel·lular dels miòcits cardíacs a terminis curts.
2. A terminis curts, el contingut intracel·lular de ferro no varia, ni tampoc els mRNA que responen a ferro. L'alteració del metabolisme del ferro seria, doncs, una afectació secundària en els cardiomiòcits deficients en frataxina.
3. Els nivells i l'activitat de l'aconitasa, una proteïna amb centres ferro-sofre, es mantenen tot i la deficiència de frataxina. Així mateix, també es mantenen l'activitat i els nivells de diferents enzims de la cadena respiratòria amb centres ferro-sofre. Això descarta que la frataxina tingui un paper essencial en la biosíntesi dels centres ferro-sofre.
4. El dèficit de frataxina altera la distribució dels mitocondris i provoca una xarxa mitocondrial anormal amb mitocondris engrandits al voltant del nucli. Així i tot, no s'altera la producció energètica cel·lular, tal com indiquen uns nivells normals d'ATP, ADP i AMP.
5. Els miòcits cardíacs amb dèficit de frataxina tenen alterat el metabolisme energètic. S'hi observa un canvi del perfil metabòlic i una acumulació d'àcids grassos en forma de gotes lipídiques.
6. Els miòcits deficients en frataxina mostren una major sensibilitat als agents oxidants, un augment dels enzims antioxidants superòxid-dismutases i un major dany oxidatiu a les proteïnes. Això indica que el dèficit de frataxina en miòcits cardíacs neonatals provoca estrès oxidatiu.

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

- Abo Alrob, O., & Lopaschuk, G. D. (2014). Role of CoA and acetyl-CoA in regulating cardiac fatty acid and glucose oxidation. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 1043–51. doi:10.1042/BST20140094
- Abruzzo, P. M., Marini, M., Bolotta, A., Malisardi, G., Manfredini, S., Ghezzi, A., ... Casadio, R. (2013). Frataxin mRNA Isoforms in FRDA Patients and Normal Subjects: Effect of Tocotrienol Supplementation. *BioMed Research International*, 2013, 276808. doi:10.1155/2013/276808
- Acquaviva, F., Castaldo, I., Filla, A., Giacchetti, M., Marmolino, D., Monticelli, A., ... Coccozza, S. (2008). Recombinant human erythropoietin increases frataxin protein expression without increasing mRNA expression. *Cerebellum (London, England)*, 7(3), 360–5. doi:10.1007/s12311-008-0036-x
- Acquaviva, F., De Biase, I., Nezi, L., Ruggiero, G., Tatangelo, F., Pisano, C., ... Coccozza, S. (2005). Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 17), 3917–24. doi:10.1242/jcs.02516
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W. G., Naylor, S., Benson, L. M., Gacy, A. M., & Isaya, G. (2000). Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *American Journal of Human Genetics*, 67(3), 549–62. doi:10.1086/303056
- Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S. R., ... Pastore, A. (2009). Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(4), 390–6. doi:10.1038/nsmb.1579
- Adinolfi, S., Nair, M., Politou, A., Bayer, E., Martin, S., Temussi, P., & Pastore, A. (2004). The factors governing the thermal stability of frataxin orthologues: how to increase a protein's stability. *Biochemistry*, 43(21), 6511–8. doi:10.1021/bi036049+
- Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A. S., Martin, S., & Pastore, A. (2002). A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Human Molecular Genetics*, 11(16), 1865–77.
- Aisen, P. (1998). Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Metal Ions in Biological Systems*, 35, 585–631.
- Aisen, P., Enns, C., & Wessling-Resnick, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(10), 940–59. doi:10.1016/S1357-2725(01)00063-2
- Ajioka, R. S., Phillips, J. D., & Kushner, J. P. (2006). Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(7), 723–36. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.005
- Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I., & Halliwell, B. (1991). The antioxidant action of ergothioneine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(1), 10–16. doi:10.1016/0003-9861(91)90158-F
- Alboliras, E. T., Shub, C., Gomez, M. R., Edwards, W. D., Hagler, D. J., Reeder, G. S., ... Tajik, A. J. (1986). Spectrum of cardiac involvement in Friedreich's ataxia: clinical, electrocardiographic and echocardiographic observations. *The American Journal of Cardiology*, 58(6), 518–24.
- Allard, M. F., Henning, S. L., Wambolt, R. B., Granleese, S. R., English, D. R., & Lopaschuk, G. D. (1997). Glycogen Metabolism in the Aerobic Hypertrophied Rat Heart. *Circulation*, 96(2), 676–682. doi:10.1161/01.CIR.96.2.676
- Al-Maghrebi, M., Fridovich, I., & Benov, L. (2002). Manganese supplementation relieves the phenotypic deficits seen in superoxide-dismutase-null *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 402(1), 104–9. doi:10.1016/S0003-9861(02)00065-6
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Ismail, O., Varshney, D., Lymperi, S., Sandi, C., ... Pook, M. (2008). The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Human Molecular Genetics*, 17, 735–746. doi:10.1093/hmg/ddm346

- Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Ruddle, P., Carroll, C., Webster, Z., & Pook, M. (2004). GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics*, *84*(2), 301–10. doi:10.1016/j.ygeno.2004.04.003
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M. B., Hughes, S., ... Pook, M. A. (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics*, *88*(5), 580–90. doi:10.1016/j.ygeno.2006.06.015
- Amela, I., Delicado, P., Gómez, A., Querol, E., & Cedano, J. (2013). A dynamic model of the proteins that form the initial iron-sulfur cluster biogenesis machinery in yeast mitochondria. *The Protein Journal*, *32*(3), 183–96. doi:10.1007/s10930-013-9475-4
- Andermann, E., Remillard, G. M., Goyer, C., Blitzer, L., Andermann, F., & Barbeau, A. (1976). Genetic and family studies in Friedreich's ataxia. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *3*(4), 287–301.
- Anderson, P. R., Kirby, K., Hilliker, A. J., & Phillips, J. P. (2005). RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, *14*(22), 3397–405. doi:10.1093/hmg/ddi367
- Anderson, P. R., Kirby, K., Orr, W. C., Hilliker, A. J., & Phillips, J. P. (2008). Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(2), 611–6. doi:10.1073/pnas.0709691105
- Anflous-Pharayra, K., Lee, N., Armstrong, D. L., & Craigen, W. J. (2011). VDAC3 has differing mitochondrial functions in two types of striated muscles. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1807*(1), 150–6. doi:10.1016/j.bbabi.2010.09.007
- Anheim, M., Fleury, M., Monga, B., Laugel, V., Chaigne, D., Rodier, G., ... Koenig, M. (2010). Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics*, *11*(1), 1–12. doi:10.1007/s10048-009-0196-y
- Antunes, F., Han, D., & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, *33*(9), 1260–7.
- Arkblad, E. L., Egorov, M., Shakhparonov, M., Romanova, L., Polzikov, M., & Rydström, J. (2002). Expression of proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase in mouse, human brain and *C. elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *133*(1), 13–21. doi:10.1016/S1096-4959(02)00107-0
- Armstrong, J. S., Khmour, O., & Hecht, S. M. (2010). Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *24*(7), 2152–63. doi:10.1096/fj.09-143222
- Arpa, J., Sanz-Gallego, I., Rodríguez-de-Rivera, F. J., Domínguez-Melcón, F. J., Prefasi, D., Oliva-Navarro, J., & Moreno-Yangüela, M. (2014). Triple therapy with deferiprone, idebenone and riboflavin in Friedreich's ataxia - open-label trial. *Acta Neurologica Scandinavica*, *129*(1), 32–40. doi:10.1111/ane.12141
- Ashby, D. W., & Tweedy, P. S. (1953). Friedreich's ataxia combined with diabetes mellitus in sisters. *British Medical Journal*, *1*(4825), 1418–21. t
- Assem, M., Teyssier, J. R., Benderitter, M., Terrand, J., Laubriet, A., Javouhey, A., ... Rochette, L. (1997). Pattern of superoxide dismutase enzymatic activity and RNA changes in rat heart ventricles after myocardial infarction. *The American Journal of Pathology*, *151*, 549–555.
- Athias, P., Vandroux, D., Tissier, C., & Rochette, L. (2006). [Development of cardiac physiopathological models from cultured cardiomyocytes]. *Annales de Cardiologie et D'angéiologie*, *55*(2), 90–9. doi:10.1016/j.ancard.2006.02.004

- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., ... Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5319), 1709–12.
- Baines, C. P. (2009). The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(6), 850–7. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.02.007
- Balaban, R. S. (2002). Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(10), 1259–71.
- Banks, A. S., Kon, N., Knight, C., Matsumoto, M., Gutiérrez-Juárez, R., Rossetti, L., ... Accili, D. (2008). SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metabolism*, 8(4), 333–41. doi:10.1016/j.cmet.2008.08.014
- Barrientos, A. (2002). In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods (San Diego, Calif.)*, 26(4), 307–16. doi:10.1016/S1046-2023(02)00036-1
- Barrientos, A., Fontanesi, F., & Díaz, F. (2009). Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Current Protocols in Human Genetics / Editorial Board, Jonathan L. Haines ... [et Al.]*, Chapter 19, Unit19.3. doi:10.1002/0471142905.hg1903s63
- Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M. R., & Alexandrov, A. V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and Behavior*, 4(2), 108–122. doi:10.1002/brb3.208
- Bayot, A., Reichman, S., Lebon, S., Csaba, Z., Aubry, L., Sterkers, G., ... Rustin, P. (2013). Cis-silencing of PIP5K1B evidenced in Friedreich's ataxia patient cells results in cytoskeleton anomalies. *Human Molecular Genetics*, 22(14), 2894–904. doi:10.1093/hmg/ddt144
- Bayot, A., & Rustin, P. (2013). Friedreich's Ataxia, Frataxin, PIP5K1B: Echo of a Distant Fracas. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 725635. doi:10.1155/2013/725635
- Bayot, A., Santos, R., Camadro, J.-M., & Rustin, P. (2011). Friedreich's ataxia: the vicious circle hypothesis revisited. *BMC Medicine*, 9, 112. doi:10.1186/1741-7015-9-112
- Becker, B. F., Bünger, R., Permanetter, B., & Gerlach, E. (1984). Compartmentation and hemodynamic effects of nicotine in isolated, perfused guinea pig hearts. *Klinische Wochenschrift*, 62 Suppl 2, 67–75.
- Becker, E. M., Greer, J. M., Ponka, P., & Richardson, D. R. (2002). Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. *Blood*, 99(10), 3813–22.
- Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., & Murphy, M. P. (2004). Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant DEFENSE. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47939–51. doi:10.1074/jbc.M408011200
- Bénil, P., El-Khoury, R., Schiff, M., Sainsard-Chanet, A., & Rustin, P. (2010). Genetic background influences mitochondrial function: modeling mitochondrial disease for therapeutic development. *Trends in Molecular Medicine*, 16, 210–217. doi:10.1016/j.molmed.2010.03.001
- Bensinger, S. J., & Tontonoz, P. (2008). Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*, 454(7203), 470–7. doi:10.1038/nature07202
- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. (2010). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 74–9. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.147
- Berciano, J., Infante, J., Mateo, I., & Combarros, O. (2002). [Hereditary ataxias and paraplegias: a clinicogenetic review]. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 17(1), 40–51.
- Bergman, B. C., Hunerdosse, D. M., Kerege, A., Playdon, M. C., & Perreault, L. (2012). Localisation and composition of skeletal muscle diacylglycerol predicts insulin resistance in humans. *Diabetologia*, 55(4), 1140–50. doi:10.1007/s00125-011-2419-7

- Berkholz, D. S., Faber, H. R., Savvides, S. N., & Karplus, P. A. (2008). Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *382*(2), 371–84. doi:10.1016/j.jmb.2008.06.083
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, *11*, 127–152. doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7
- Bharathi, S. S., Zhang, Y., Mohsen, A.-W., Uppala, R., Balasubramani, M., Schreiber, E., ... Goetzman, E. S. (2013). Sirtuin 3 (SIRT3) protein regulates long-chain acyl-CoA dehydrogenase by deacetylating conserved lysines near the active site. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(47), 33837–47. doi:10.1074/jbc.M113.510354
- Bird, T. D., Turner, J. L., Sumi, S. M., & Bierman, E. L. (1978). Abnormal function of endocrine pancreas and anterior pituitary in Friedreich's ataxia. Studies in a family. *Annals of Internal Medicine*, *88*, 478–481.
- Bleackley, M. R., & Macgillivray, R. T. A. (2011). Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *24*(5), 785–809. doi:10.1007/s10534-011-9451-4
- Boddaert, N., Le Quan Sang, K. H., Rötig, A., Leroy-Willig, A., Gallet, S., Brunelle, F., ... Cabantchik, Z. I. (2007). Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood*, *110*(1), 401–8. doi:10.1182/blood-2006-12-065433
- Boesch, S., Sturm, B., Hering, S., Goldenberg, H., Poewe, W., & Scheiber-Mojdehkar, B. (2007). Friedreich's ataxia: clinical pilot trial with recombinant human erythropoietin. *Annals of Neurology*, *62*(5), 521–4. doi:10.1002/ana.21177
- Boesch, S., Sturm, B., Hering, S., Scheiber-Mojdehkar, B., Steinkellner, H., Goldenberg, H., & Poewe, W. (2008). Neurological effects of recombinant human erythropoietin in Friedreich's ataxia: a clinical pilot trial. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *23*(13), 1940–4. doi:10.1002/mds.22294
- Borenfreund, E., & Puerner, J. (1985). TOXICITY DETERMINED INVITRO BY MORPHOLOGICAL ALTERATIONS AND NEUTRAL RED ABSORPTION. *Toxicology Letters*, *24*, 119–124. doi:10.1016/0378-4274(85)90046-3
- Borg, T. K., & Terracio, L. (1990). Attachment Substrates for Heart Muscle Cells. In H. M. Piper (Ed.), *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research SE - 6* (pp. 99–107). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-75262-9_6
- Borradaile, N. M., Buhman, K. K., Listenberger, L. L., Magee, C. J., Morimoto, E. T. A., Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2006). A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(2), 770–8. doi:10.1091/mbc.E05-08-0742
- Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B. R., ... Olofsson, S.-O. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nature Cell Biology*, *9*(11), 1286–93. doi:10.1038/ncb1648
- Boveris, A., Oshino, N., & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, *128*(3), 617–30.
- Bradley, J. L. L., Blake, J. C., Chamberlain, S., Thomas, P. K., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (2000). Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, *9*(2), 275–82. doi:10.1093/hmg/9.2.275
- Branda, S. S., Cavadini, P., Adamec, J., Kalousek, F., Taroni, F., & Isaya, G. (1999). Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(32), 22763–9.
- Brandsema, J. F., Stephens, D., Hartley, J., & Yoon, G. (2010). Intermediate-dose idebenone and quality of life in Friedreich ataxia. *Pediatric Neurology*, *42*(5), 338–42. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2010.01.004
- Brasaemle, D. L. (2013). Perilipin 5: putting the brakes on lipolysis. *Journal of Lipid Research*, *54*(4), 876–7. doi:10.1194/jlr.E036962

- Braz, J. C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., ... Molkenkin, J. D. (2004). PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nature Medicine*, *10*, 248–254. doi:10.1038/nm1000
- Brenna, J. T., & Diau, G.-Y. (2007). The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, *77*(5-6), 247–50. doi:10.1016/j.plefa.2007.10.016
- Brigelius-Flohé, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, *27*(9-10), 951–65.
- Brigelius-Flohé, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13*(10), 1145–55.
- Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., & Loréal, O. (2012). Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1820*(3), 403–10. doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.014
- Brodersen, R., Vorum, H., Skriver, E., & Pedersen, A. O. (1989). Serum albumin binding of palmitate and stearate. Multiple binding theory for insoluble ligands. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *182*, 19–25.
- Bulteau, A. L., Planamente, S., Jornea, L., Dur, A., Lesuisse, E., Camadro, J. M., & Auchère, F. (2012). Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in $\Delta yfh1$ yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1822*(2), 212–25. doi:10.1016/j.bbadis.2011.11.003
- Bulteau, A.-L., Dancis, A., Gareil, M., Montagne, J.-J., Camadro, J.-M., & Lesuisse, E. (2007). Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. *Free Radical Biology & Medicine*, *42*(10), 1561–70. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.014
- Bulteau, A.-L., O'Neill, H. A., Kennedy, M. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., & Szwedda, L. I. (2004). Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5681), 242–5. doi:10.1126/science.1098991
- Bunse, M., Bit-avragim, N., Riefflin, A., Perrot, A., Schmidt, O., & Kreuz, F. R. (2002). Cardiac Energetics Correlates to Myocardial Hypertrophy in Friedreich ' s Ataxia, 2002–2004.
- Burgoyne, J. R., Mongue-Din, H., Eaton, P., & Shah, A. M. (2012). Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circulation Research*, *111*(8), 1091–106. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.255216
- Burk, R. F., & Hill, K. E. (2005). Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annual Review of Nutrition*, *25*, 215–35. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132120
- Burkhoff, D., Weiss, R. G., Schulman, S. P., Kalil-Filho, R., Wannenburg, T., & Gerstenblith, G. (1991). Influence of metabolic substrate on rat heart function and metabolism at different coronary flows, *261*(3), H741–H750.
- Busi, M. V., & Gomez-Casati, D. F. (2012). Exploring frataxin function. *IUBMB Life*, *64*(1), 56–63. doi:10.1002/iub.577
- Buyse, G., Mertens, L., Di Salvo, G., Matthijs, I., Weidemann, F., Eyskens, B., ... Van Hove, J. L. K. (2003). Idebenone treatment in Friedreich's ataxia: neurological, cardiac, and biochemical monitoring. *Neurology*, *60*(10), 1679–81.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., & Stoppani, A. O. M. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *180*(2), 248–257. doi:10.1016/0003-9861(77)90035-2
- Calmels, N., Seznec, H., Villa, P., Reutenauer, L., Hibert, M., Haiech, J., ... Puccio, H. (2009). Limitations in a frataxin knockdown cell model for Friedreich ataxia in a high-throughput drug screen. *BMC Neurology*, *9*(1), 46. doi:10.1186/1471-2377-9-46
- Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., ... Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, *110*(4), 1353–8. doi:10.1182/blood-2007-02-072520

- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., ... Koenig, M. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1771–80.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., ... Pandolfo, M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5254), 1423–7. R
- Cañizares, J., Blanca, J. M., Navarro, J. A., Monrós, E., Palau, F., & Moltó, M. D. (2000). dfh is a *Drosophila* homolog of the Friedreich's ataxia disease gene. *Gene*, 256(1-2), 35–42.
- Carroll, V. A., & Ashcroft, M. (2005). HIF-1 α regulation by proline hydroxylation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(6).
- Carvajal, J. J., Pook, M. A., dos Santos, M., Doudney, K., Hillermann, R., Minogue, S., ... Chamberlain, S. (1996). The Friedreich's ataxia gene encodes a novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Nature Genetics*, 14(2), 157–62. doi:10.1038/ng1096-157
- Castaldo, I., Pinelli, M., Monticelli, A., Acquaviva, F., Giacchetti, M., Filla, A., ... Cocozza, S. (2008). DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *Journal of Medical Genetics*, 45, 808–812. doi:10.1136/jmg.2008.058594
- Castells-Roca, L., Mühlhoff, U., Lill, R., Herrero, E., & Bellí, G. (2011). The oxidative stress response in yeast cells involves changes in the stability of Aft1 regulon mRNAs. *Molecular Microbiology*, 81(1), 232–48. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07689.x
- Castillo, S. S., Levy, M., Thaikootathil, J. V., & Goldkorn, T. (2007). Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 313(12), 2680–6. doi:10.1016/j.yexcr.2007.04.002
- Cavadini, P. (2002). Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Human Molecular Genetics*, 11(3), 217–227. doi:10.1093/hmg/11.3.217
- Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O., & Isaya, G. (2000). Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 41469–75. doi:10.1074/jbc.M006539200
- Cavadini, P., Gellera, C., Patel, P. I., & Isaya, G. (2000). Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Human Molecular Genetics*, 9(17), 2523–30.
- Ceaser, E. K., Moellering, D. R., Shiva, S., Ramachandran, A., Landar, A., Venkartraman, A., ... Darley-Usmar, V. M. (2004). Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt 1), 151–5. doi:10.1042/
- Chakravarthi, S., Jessop, C. E., & Bulleid, N. J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Reports*, 7(3), 271–5. doi:10.1038/sj.embor.7400645
- Chamberlain, S., Shaw, J., Rowland, A., Wallis, J., South, S., Nakamura, Y., ... Williamson, R. (1988). Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature*, 334(6179), 248–50. doi:10.1038/334248a0
- Chan, P. K., Torres, R., Yandim, C., Law, P. P., Khadayate, S., Mauri, M., ... Festenstein, R. (2013). Heterochromatinization induced by GAA-repeat hyperexpansion in Friedreich's ataxia can be reduced upon HDAC inhibition by vitamin B3. *Human Molecular Genetics*, 22(13), 2662–75. doi:10.1093/hmg/ddt115
- Chance, B., Leigh, J. S., Clark, B. J., Maris, J., Kent, J., Nioka, S., & Smith, D. (1985). Control of oxidative metabolism and oxygen delivery in human skeletal muscle: a steady-state analysis of the work/energy cost transfer function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), 8384–8.
- Chance, B., & Williams, G. R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, 17, 65–134.

- Chang, J. H., Cho, Y. H., Sohn, S. Y., Choi, J. M., Kim, A., Kim, Y. C., ... Cho, Y. (2009). Crystal structure of the eIF4A-PDCD4 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 3148–3153. doi:10.1073/pnas.0808275106
- Chasteen, N. D., & Harrison, P. M. (1999). Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *Journal of Structural Biology*, *126*(3), 182–94.
- Chen, C.-A., Wang, T.-Y., Varadharaj, S., Reyes, L. A., Hemann, C., Talukder, M. A. H., ... Zweier, J. L. (2010). S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature*, *468*(7327), 1115–8. doi:10.1038/nature09599
- Chen, L., Gong, Q., Stice, J. P., & Knowlton, A. A. (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovascular Research*, *84*(1), 91–9. doi:10.1093/cvr/cvp181
- Chen, L., Liu, T., Tran, A., Lu, X., Tomilov, A. A., Davies, V., ... Knowlton, A. A. (2012). OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability. *Journal of the American Heart Association*, *1*(5), e003012. doi:10.1161/JAHA.112.003012
- Chen, O. S., Hemenway, S., & Kaplan, J. (2002). Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(19), 12321–6. doi:10.1073/pnas.192449599
- Chlopčíková, S., Psotová, J., & Míketová, P. (2001). Neonatal rat cardiomyocytes—a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, *145*(2), 49–55.
- Cho, S. J., Lee, M. G., Yang, J. K., Lee, J. Y., Song, H. K., & Suh, S. W. (2000). Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(16), 8932–7. doi:10.1073/pnas.160270897
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., ... Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y.)*, *325*(5942), 834–40. doi:10.1126/science.1175371
- Clark, R. M., Dalgliesh, G. L., Endres, D., Gomez, M., Taylor, J., & Bidichandani, S. I. (2004). Expansion of GAA triplet repeats in the human genome: unique origin of the FRDA mutation at the center of an Alu. *Genomics*, *83*, 373–383. doi:10.1016/j.ygeno.2003.09.001
- Claycomb, W. C., Burns, A. H., & Shepherd, R. E. (1984). Culture of the terminally differentiated ventricular cardiac muscle cell. Characterization of exogenous substrate oxidation and the adenylate cyclase system. *FEBS Letters*, *169*(2), 261–6.
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Rai, M., Begu, A., Serroukh, Y., Depondt, C., ... Féry, F. (2012). Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Annals of Neurology*, *72*(6), 971–82. doi:10.1002/ana.23698
- Cnop, M., Vidal, J., Hull, R. L., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Schraw, T., ... Kahn, S. E. (2007). Progressive loss of beta-cell function leads to worsening glucose tolerance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *30*, 677–682. doi:10.2337/dc06-1834
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *The EMBO Journal*, *21*(7), 1616–27. doi:10.1093/emboj/21.7.1616
- Colombo, R., & Carobene, A. (2000). Age of the intronic GAA triplet repeat expansion mutation in Friedreich ataxia. *Human Genetics*, *106*(4), 455–8.
- Condò, I., Malisan, F., Guccini, I., Serio, D., Rufini, A., & Testi, R. (2010). Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin. *Human Molecular Genetics*, *19*(7), 1221–9. doi:10.1093/hmg/ddp592
- Condò, I., Ventura, N., Malisan, F., Rufini, A., Tomassini, B., & Testi, R. (2007). In vivo maturation of human frataxin. *Human Molecular Genetics*, *16*(13), 1534–40. doi:10.1093/hmg/ddm102

- Condò, I., Ventura, N., Malisan, F., Tomassini, B., & Testi, R. (2006). A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16750–6. doi:10.1074/jbc.M511960200
- Conrad, C. C., Grabowski, D. T., Walter, C. A., Sabia, M., & Richardson, A. (2000). Using MT(-/-) mice to study metallothionein and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(3), 447–62.
- Cooper, J. M., & Schapira, A. H. V. (2003). Friedreich's Ataxia: disease mechanisms, antioxidant and Coenzyme Q10 therapy. *BioFactors (Oxford, England)*, 18(1-4), 163–71.
- Coppola, G., Choi, S.-H., Santos, M. M., Miranda, C. J., Tentler, D., Wexler, E. M., ... Geschwind, D. H. (2006). Gene expression profiling in frataxin deficient mice: microarray evidence for significant expression changes without detectable neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 22(2), 302–11. doi:10.1016/j.nbd.2005.11.014
- Coppola, G., Marmolino, D., Lu, D., Wang, Q., Cnop, M., Rai, M., ... Geschwind, D. H. (2009). Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPARgamma pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, 18(13), 2452–61. doi:10.1093/hmg/ddp183
- Correia, A. R., Adinolfi, S., Pastore, A., & Gomes, C. M. (2006). Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding. *The Biochemical Journal*, 398(3), 605–11. doi:10.1042/BJ20060345
- Cossée, M., Campuzano, V., Koutnikova, H., Fischbeck, K., Mandel, J. L., Koenig, M., ... Pandolfo, M. (1997). Frataxin fracas. *Nature Genetics*, 15(4), 337–8. doi:10.1038/ng0497-337
- Cossée, M., Dürr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., ... Poirier, J. (1999). Friedreich's ataxia: Point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Annals of Neurology*, 45(2), 200–206. doi:10.1002/1531-8249(199902)45:2<200::AID-ANA10>3.0.CO;2-U
- Cossée, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., ... Koenig, M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Human Molecular Genetics*, 9(8), 1219–26.
- Cossée, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J. L., & Koenig, M. (1997). Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7452–7.
- Cotticelli, M. G., Crabbe, A. M., Wilson, R. B., & Shchepinov, M. S. (2013). Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biology*, 1(1), 398–404. doi:10.1016/j.redox.2013.06.004
- Crofts, A. R. (2004). The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annual Review of Physiology*, 66, 689–733. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251
- Crow, M. T., Mani, K., Nam, Y.-J., & Kitsis, R. N. (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circulation Research*, 95(10), 957–70. doi:10.1161/01.RES.0000148632.35500.d9
- D'Oria, V., Petrini, S., Travaglini, L., Priori, C., Piermarini, E., Petrillo, S., ... Piemonte, F. (2013). Frataxin Deficiency Leads to Reduced Expression and Impaired Translocation of NF-E2-Related Factor (Nrf2) in Cultured Motor Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7853–65. doi:10.3390/ijms14047853
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., & Butterfield, D. A. (Eds.). (2006). *Redox Proteomics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Darley-Usmar, V. M., Ball, L. E., & Chatham, J. C. (2012). Protein O-linked β -N-acetylglucosamine: a novel effector of cardiomyocyte metabolism and function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(3), 538–49. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.009
- Darley-Usmar, V. M., Rickwood, D., & Wilson, M. T. (Eds.). (1987). *Mitochondria: a practical approach*. (p. 321). IRL Press.
- Dassanayaka, S., & Jones, S. P. (2014). O-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(1), 62–71. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.11.005

- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., & Lodish, H. F. (1983). pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(8), 2258–62.
- De Biase, I., Chutake, Y. K., Rindler, P. M., & Bidichandani, S. I. (2009). Epigenetic silencing in Friedreich ataxia is associated with depletion of CTCF (CCCTC-binding factor) and antisense transcription. *PLoS One*, *4*(11), e7914. doi:10.1371/journal.pone.0007914
- De Michele, G., Di Maio, L., Filla, A., Majello, M., Coccozza, S., Cavalcanti, F., ... Campanella, G. (1996). Childhood onset of Friedreich ataxia: a clinical and genetic study of 36 cases. *Neuropediatrics*, *27*, 3–7. doi:10.1055/s-2007-973740
- De Michele, G., Filla, A., Cavalcanti, F., Di Maio, L., Pianese, L., Castaldo, I., ... Campanella, G. (1994). Late onset Friedreich's disease: clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *57*(8), 977–9.
- De Rijk, P., Peeters, K., Tournev, I., Löscher, W. N., Baets, J., Hahn, A. F., ... Bernert, G. (2012). Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng.2406
- Decker, M. L., Behnke-Barclay, M., Cook, M. G., La Pres, J. J., Clark, W. A., & Decker, R. S. (1991). Cell shape and organization of the contractile apparatus in cultured adult cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *23*(7), 817–32. R
- Dedkova, E. N., & Blatter, L. A. (2012). Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *52*(1), 48–61. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.030
- Den Boer, M. E. J., Dionisi-Vici, C., Chakrapani, A., van Thuijl, A. O. J., Wanders, R. J. A., & Wijburg, F. A. (2003). Mitochondrial trifunctional protein deficiency: a severe fatty acid oxidation disorder with cardiac and neurologic involvement. *The Journal of Pediatrics*, *142*(6), 684–9. doi:10.1067/mpd.2003.231
- Denicola, A., Batthyány, C., Lissi, E., Freeman, B. A., Rubbo, H., & Radi, R. (2002). Diffusion of nitric oxide into low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(2), 932–6. doi:10.1074/jbc.M106589200
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1830*(5), 3217–66. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018
- Devireddy, L. R., Hart, D. O., Goetz, D. H., & Green, M. R. (2010). A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production. *Cell*, *141*(6), 1006–17. doi:10.1016/j.cell.2010.04.040
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y. I., Ristow, M., & Shoelson, S. E. (2000). Crystal structure of human frataxin. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(40), 30753–6. doi:10.1074/jbc.C000407200
- Di Prospero, N. A., Sumner, C. J., Penzak, S. R., Ravina, B., Fischbeck, K. H., & Taylor, J. P. (2007). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose idebenone in patients with Friedreich ataxia. *Archives of Neurology*, *64*(6), 803–8. doi:10.1001/archneur.64.6.803
- Dietmair, S., Timmins, N. E., Gray, P. P., Nielsen, L. K., & Krömer, J. O. (2010). Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. *Analytical Biochemistry*, *404*(2), 155–64. doi:10.1016/j.ab.2010.04.031
- Dorn, G. W. (2005). Physiologic growth and pathologic genes in cardiac development and cardiomyopathy. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *15*(5), 185–9. doi:10.1016/j.tcm.2005.05.009
- Dorn, G. W. (2013). Mitochondrial dynamics in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1833*, 233–41. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.03.008
- Dow, L. E., & Lowe, S. W. (2012). Life in the fast lane: mammalian disease models in the genomics era. *Cell*, *148*(6), 1099–109. doi:10.1016/j.cell.2012.02.023
- Drosatos, K., & Schulze, P. C. (2013). Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. *Current Heart Failure Reports*, *10*(2), 109–21. doi:10.1007/s11897-013-0133-0

- Drysdale, J., Arosio, P., Invernizzi, R., Cazzola, M., Volz, A., Corsi, B., ... Levi, S. (2002). Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *29*(3), 376–83.
- Du, J., Campau, E., Soragni, E., Ku, S., Puckett, J. W., Dervan, P. B., & Gottesfeld, J. M. (2012). Role of mismatch repair enzymes in GAA-TTC triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia induced pluripotent stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(35), 29861–72. doi:10.1074/jbc.M112.391961
- Dufour, C. R., Wilson, B. J., Huss, J. M., Kelly, D. P., Alaynick, W. A., Downes, M., ... Giguère, V. (2007). Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERR α and γ . *Cell Metabolism*, *5*(5), 345–56. doi:10.1016/j.cmet.2007.03.007
- Durot, I., Maupoil, V., Ponsard, B., Cordelet, C., Vergely-Vandriessse, C., Rochette, L., & Athias, P. (2000). Oxidative injury of isolated cardiomyocytes: dependence on free radical species. *Free Radical Biology & Medicine*, *29*(9), 846–57.
- Dürr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., ... Koenig, M. (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *The New England Journal of Medicine*, *335*(16), 1169–75. doi:10.1056/NEJM199610173351601
- Earle, S. R., Anderson, W. M., & Fisher, R. R. (1978). Evidence that reconstituted bovine heart mitochondrial transhydrogenase functions as a proton pump. *FEBS Letters*, *91*(1), 21–4.
- Eaton, J. W., & Qian, M. (2002). Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, *32*, 833–840. doi:S0891584902007724 [pii]
- Ek, B., Hallberg, C., Sjögren, K. G., & Hjalmarson, A. (1994). Reoxygenation-induced cell damage of isolated neonatal rat ventricular myocytes can be reduced by chain-breaking antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, *16*(1), 117–21.
- Emond, M., Lepage, G., Vanasse, M., & Pandolfo, M. (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology*, *55*(11), 1752–3.
- Enns, G. M., Kinsman, S. L., Perlman, S. L., Spicer, K. M., Abdenur, J. E., Cohen, B. H., ... Miller, G. (2012). Initial experience in the treatment of inherited mitochondrial disease with EPI-743. *Molecular Genetics and Metabolism*, *105*(1), 91–102. doi:10.1016/j.ymgme.2011.10.009
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, *11*(1), 81–128.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., ... Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, *46*(5), 839–61. doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., ... Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, *50* Suppl, S9–14. doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200
- Fantus, I. G., Seni, M. H., & Andermann, E. (1993). Evidence for abnormal regulation of insulin receptors in Friedreich's ataxia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *76*, 60–63.
- Fernandez-Checa, J. C., & Kaplowitz, N. (2005). Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *204*(3), 263–73. doi:10.1016/j.taap.2004.10.001
- Festenstein, R. (2006). Breaking the silence in Friedreich's ataxia. *Nature Chemical Biology*, *2*(10), 512–3. doi:10.1038/nchembio1006-512
- Filla, A., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G., & Coccozza, S. (1996). The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *American Journal of Human Genetics*, *59*(3), 554–60.
- Finley, L. W. S., Haas, W., Desquiret-Dumas, V., Wallace, D. C., Procaccio, V., Gygi, S. P., & Haigis, M. C. (2011). Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PLoS One*, *6*(8), e23295. doi:10.1371/journal.pone.0023295
- Forman, H. J., Maiorino, M., & Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, *49*(5), 835–42. doi:10.1021/bi9020378

- Foury, F., & Cazzalini, O. (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Letters*, *411*(2-3), 373–7.
- Foury, F., Pastore, A., & Trincal, M. (2007). Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe-S cluster assembly. *EMBO Reports*, *8*(2), 194–9. doi:10.1038/sj.embor.7400881
- Franco, C., Fernández, S., & Torres-Alemán, I. (2012). Frataxin deficiency unveils cell-context dependent actions of insulin-like growth factor I on neurons. *Molecular Neurodegeneration*, *7*, 1–10. doi:10.1007/s12038-012-9401-2
- Frezza, C., Cipolat, S., & Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols*, *2*, 287–295.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, *64*, 97–112. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
- Friedreich, N. (1863). Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Archiv Fur Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Fur Klinische Medizin*, *26*, 391–419.
- Furie, B., Bouchard, B. A., & Furie, B. C. (1999). Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood*, *93*(6), 1798–808.
- Gabrielli, N., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2012). Cells lacking pfh1, a fission yeast homolog of mammalian frataxin protein, display constitutive activation of the iron starvation response. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(51), 43042–51. doi:10.1074/jbc.M112.421735
- Gakh, O., Park, S., Liu, G., Macomber, L., Imlay, J. A., Ferreira, G. C., & Isaya, G. (2006). Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Human Molecular Genetics*, *15*(3), 467–79.
- Ganz, T. (2011). Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood*, *117*(17), 4425–33. doi:10.1182/blood-2011-01-258467
- Garbi, N., Tanaka, S., Momburg, F., & Hämmerling, G. J. (2006). Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nature Immunology*, *7*, 93–102. doi:10.1038/ni1288
- Gatchel, J. R., & Zoghbi, H. Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nature Reviews. Genetics*, *6*(10), 743–55. doi:10.1038/nrg1691
- Gebauer, F., & Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(10), 827–35. doi:10.1038/nrm1488
- Ghezzi, P. (2013). Protein glutathionylation in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1830*, 3165–72. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.009
- Ghezzi, P., Bonetto, V., & Fratelli, M. (2005). Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(7-8), 964–72. doi:10.1089/ars.2005.7.964
- Gibson, T. J. (2012). RACK1 research – ships passing in the night? *FEBS Letters*. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.048
- Gibson, T. J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A., & Bork, P. (1996). Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends in Neurosciences*, *19*(11), 465–8. doi:10.1016/S0166-2236(96)20054-2
- Gilde, A. J., van der Lee, K. A. J. M., Willemsen, P. H. M., Chinetti, G., van der Leij, F. R., van der Vusse, G. J., ... van Bilsen, M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circulation Research*, *92*(5), 518–24.
- Gillies, R. J., Didier, N., & Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, *159*, 109–113. doi:10.1016/0003-2697(86)90314-3
- Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2012). Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1820*(3), 188–202. doi:10.1016/j.bbagen.2011.10.013
- Glass, C. K., & Saijo, K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nature Reviews. Immunology*, *10*(5), 365–76. doi:10.1038/nri2748

- Glickstein, H., El, R. Ben, Shvartsman, M., & Cabantchik, Z. I. (2005). Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood*, *106*(9), 3242–50. doi:10.1182/blood-2005-02-0460
- Gonzalez-Cabo, P., Ros, S., & Palau, F. (2010). Flavin adenine dinucleotide rescues the phenotype of frataxin deficiency. *PLoS One*, *5*(1), e8872. doi:10.1371/journal.pone.0008872
- González-Cabo, P., Vázquez-Manrique, R. P., García-Gimeno, M. A., Sanz, P., & Palau, F. (2005). Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Human Molecular Genetics*, *14*(15), 2091–8. doi:10.1093/hmg/ddi214
- Gordon, D. M., Shi, Q., Dancis, A., & Pain, D. (1999). Maturation of frataxin within mammalian and yeast mitochondria: one-step processing by matrix processing peptidase. *Human Molecular Genetics*, *8*(12), 2255–62.
- Gottesfeld, J. M., Rusche, J. R., & Pandolfo, M. (2013). Increasing frataxin gene expression with histone deacetylase inhibitors as a therapeutic approach for Friedreich's ataxia. *Journal of Neurochemistry*, *126 Suppl*, 147–54. doi:10.1111/jnc.12302
- Greene, E., Mahishi, L., Entezam, A., Kumari, D., & Usdin, K. (2007). Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research*, *35*, 3383–3390. doi:10.1093/nar/gkm271
- Gregersen, N., Wintzensen, H., Christensen, S. K., Christensen, M. F., Brandt, N. J., & Rasmussen, K. (1982). C6-C10-dicarboxylic aciduria: investigations of a patient with riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation defects. *Pediatric Research*, *16*(10), 861–8. doi:10.1203/00006450-198210000-00012
- Griffin, E., Re, A., Hamel, N., Fu, C., Bush, H., McCaffrey, T., & Asch, A. S. (2001). A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nature Medicine*, *7*, 840–846. doi:10.1038/89969
- Gruber, C. W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J. L., & Craik, D. J. (2006). Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in Biochemical Sciences*, *31*(8), 455–64. doi:10.1016/j.tibs.2006.06.001
- Gupte, S. A., Levine, R. J., Gupte, R. S., Young, M. E., Lionetti, V., Labinskyy, V., ... Recchia, F. A. (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *41*(2), 340–9. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.05.003
- Hahn, H. S., Marreez, Y., Odley, A., Sterbling, A., Yussman, M. G., Hilty, K. C., ... Dorn 2nd, G. W. (2003). Protein kinase Calpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circ Res*, *93*, 1111–1119. doi:10.1161/01.RES.0000105087.79373.17\r01.RES.0000105087.79373.17 [pii]
- Hall, L., & Martinus, R. (2013). Hyperglycaemia and oxidative stress upregulate HSP60 & HSP70 expression in HeLa cells. *SpringerPlus*, *2*(1), 431. doi:10.1186/2193-1801-2-431
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. New York :: Oxford University Press.
- Han, L., Zhou, R., Niu, J., McNutt, M. A., Wang, P., & Tong, T. (2010). SIRT1 is regulated by a PPAR{γ}-SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. *Nucleic Acids Research*, *38*(21), 7458–71. doi:10.1093/nar/gkq609
- Hanley, A., Corrigan, R., Mohammad, S., & MacMahon, B. Friedreich's ataxia cardiomyopathy: case based discussion and management issues., *103 Irish medical journal* 117–118 (2010).
- Harary, I., & Farley, B. (1963). In vitro studies on single beating rat heart cells. II. Intercellular communication. *Experimental Cell Research*, *29*, 466–74.
- 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 : A Journal of Neurology*, *104*(3), 589–620. doi:DOI: 10.1093/brain/104.3.589
- Harding, A. E., & Hower, R. L. (1983). The heart disease of Friedreich's ataxia: a clinical and electrocardiographic study of 115 patients, with an analysis of serial electrocardiographic changes in 30 cases. *The Quarterly Journal of Medicine*, *52*(208), 489–502.

- Harding, A. E., Matthews, S., Jones, S., Ellis, C. J., Booth, I. W., & Muller, D. P. (1985). Spinocerebellar degeneration associated with a selective defect of vitamin E absorption. *The New England Journal of Medicine*, *313*(1), 32–5. doi:10.1056/NEJM198507043130107
- Harper, M.-E., Bevilacqua, L., Hagopian, K., Weindruch, R., & Ramsey, J. J. (2004). Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiologica Scandinavica*, *182*(4), 321–31. doi:10.1111/j.1365-201X.2004.01370.x
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2003). The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *35*(4), 339–41.
- Hause, A. O., Aggoun, Y., Bonnet, D., Sidi, D., Munnich, A., Rötig, A., & Rustin, P. (2002). Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart (British Cardiac Society)*, *87*(4), 346–9.
- Havugimana, P. C., Hart, G. T., Nepusz, T., Yang, H., Turinsky, A. L., Li, Z., ... Emili, A. (2012). A census of human soluble protein complexes. *Cell*, *150*(5), 1068–81. doi:10.1016/j.cell.2012.08.011
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*, 51–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
- He, Y., Alam, S. L., Proteasa, S. V., Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A., & Stemmler, T. L. (2004). Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferroxidase interaction. *Biochemistry*, *43*(51), 16254–62. doi:10.1021/bi0488193
- Hebert, A. S., Dittenhafer-Reed, K. E., Yu, W., Bailey, D. J., Selen, E. S., Boersma, M. D., ... Coon, J. J. (2013). Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial proteome. *Molecular Cell*, *49*(1), 186–99. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.024
- Heidari, M. M., Houshmand, M., Hosseinkhani, S., Nafissi, S., & Khatami, M. (2009). Complex I and ATP content deficiency in lymphocytes from Friedreich's ataxia. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *36*(1), 26–31.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell*, *142*(1), 24–38. doi:10.1016/j.cell.2010.06.028
- Herman, D., Jenssen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S. L., & Gottesfeld, J. M. (2006). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.*, *2*, 551–558. doi:nchembio815 [pii]r10.1038/nchembio815
- Hewer, R. L. (1968). Study of fatal cases of Friedreich's ataxia. *British Medical Journal*, *3*, 649–652. doi:10.1136/bmj.3.5619.649
- Hewer, R. L., & Robinson, N. (1968). Diabetes mellitus in Friedreich's ataxia, 226–231.
- Hick, A., Wattenhofer-donzé, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J. P., Vaucamps, N., ... Puccio, H. (2013). Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Disease Models and Mechanisms*, *000*(3), 1–14. doi:10.1242/dmm.010900
- Hider, R. C., & Kong, X. (2013). Iron speciation in the cytosol: an overview. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, *42*(9), 3220–9. doi:10.1039/c2dt32149a
- Hider, R. C., & Kong, X. L. (2011). Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *24*(6), 1179–87. doi:10.1007/s10534-011-9476-8
- Hinerfeld, D., Traini, M. D., Weinberger, R. P., Cochran, B., Doctrow, S. R., Harry, J., & Melov, S. (2004). Endogenous mitochondrial oxidative stress: neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice. *Journal of Neurochemistry*, *88*(3), 657–67.
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., ... Verdin, E. (2010). SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*, *464*(7285), 121–5. doi:10.1038/nature08778
- Hoek, J. B., & Rydström, J. (1988). Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *The Biochemical Journal*, *254*(1), 1–10.

- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(24), 13963–6.
- Hoppel, C. L., Tandler, B., Fujioka, H., & Riva, A. (2009). Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10), 1949–56. doi:10.1016/j.biocel.2009.05.004
- Hosomi, A., Goto, K., Kondo, H., Iwatsubo, T., Yokota, T., Ogawa, M., ... Inoue, K. (1998). Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *Neuroscience Letters*, 256(3), 159–62.
- Huang, J., Dizin, E., & Cowan, J. A. (2008). Mapping iron binding sites on human frataxin: implications for cluster assembly on the ISU Fe-S cluster scaffold protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 13(5), 825–36. doi:10.1007/s00775-008-0369-4
- Huang, M. L.-H., Becker, E. M., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Ponka, P., & Richardson, D. R. (2009). Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16381–6. doi:10.1073/pnas.0906784106
- Huebner, K., Saldívar, J. C., Sun, J., Shibata, H., & Druck, T. (2011, January). Hits, Fhits and Nits: beyond enzymatic function. *Advances in Enzyme Regulation*. doi:10.1016/j.advenzreg.2010.09.003
- Humphrey, G. F. (1957). The distribution and properties of transhydrogenase from animal tissues. *The Biochemical Journal*, 65(3), 546–50.
- Huss, J. M., Kopp, R. P., & Kelly, D. P. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 40265–74. doi:10.1074/jbc.M206324200
- Huss, J. M., Torra, I. P., Staels, B., Giguère, V., & Kelly, D. P. (2004). Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biology*, 24(20), 9079–91. doi:10.1128/MCB.24.20.9079-9091.2004
- Huynen, M. A., Snel, B., Bork, P., & Gibson, T. J. (2001). The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Human Molecular Genetics*, 10(21), 2463–8. doi:10.1093/hmg/10.21.2463
- Hwang, S. J., & Kim, W. (2013). Mitochondrial Dynamics in the Heart as a Novel Therapeutic Target for Cardioprotection. *Chonnam Medical Journal*, 49(3), 101–107. doi:10.4068/cmj.2013.49.3.101
- IJlst, L., Ruitter, J. P., Hoovers, J. M., Jakobs, M. E., & Wanders, R. J. (1996). Common missense mutation G1528C in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. Characterization and expression of the mutant protein, mutation analysis on genomic DNA and chromosomal localization of the mitochondrial trifunctional protein alpha. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(4), 1028–33. doi:10.1172/JCI118863
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 125–38. doi:10.1038/nrm2336
- Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J. R., Heath, W., & King, G. L. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 11059–63.
- Iozzo, P. (2011). Myocardial, perivascular, and epicardial fat. *Diabetes Care*, 34 Suppl 2, S371–9. doi:10.2337/dc11-s250
- Irazusta, V., Cabiscol, E., Reverter-Branchat, G., Ros, J., & Tamarit, J. (2006). Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12227–32. doi:10.1074/jbc.M511649200

- Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Cabisco, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2010). Proteomic strategies for the analysis of carbonyl groups on proteins. *Current Protein & Peptide Science*, *11*(8), 652–658. doi:10.2174/138920310794557664
- Irazusta, V., Obis, E., Moreno-Cermeño, A., Cabisco, E., Ros, J., & Tamarit, J. (2010). Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, *48*(3), 411–20. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.010
- Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *356*(1), 1–11. doi:10.1006/abbi.1998.0755
- Isnard, R., Kalotka, H., Dürr, A., Cossée, M., Schmitt, M., Pousset, F., ... Komajda, M. (1997). Correlation between left ventricular hypertrophy and GAA trinucleotide repeat length in Friedreich's ataxia. *Circulation*, *95*(9), 2247–9.
- Jaburek, M., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Garlid, K. D., & Jezek, P. (2004). Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(51), 53097–102. doi:10.1074/jbc.M405339200
- Jacobson, S. L., & Piper, H. M. (1986). Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *18*(7), 661–78.
- Jayadev, S., & Bird, T. D. (2013). Hereditary ataxias: overview. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *15*(9), 673–83. doi:10.1038/gim.2013.28
- Jenkitkasemwong, S., Wang, C.-Y., Mackenzie, B., & Knutson, M. D. (2012). Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *25*(4), 643–55. doi:10.1007/s10534-012-9526-x
- Jeong, D., Kim, T. S., Chung, Y. W., Lee, B. J., & Kim, I. Y. (2002). Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. *FEBS Letters*, *517*(1-3), 225–228. doi:10.1016/S0014-5793(02)02628-5
- Jideama, N. M., Noland, T. A., Raynor, R. L., Blobe, G. C., Fabbro, D., Kazanietz, M. G., ... Kuo, J. F. (1996). Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*, 23277–23283. doi:10.1074/jbc.271.38.23277
- Jiralerspong, S., Liu, Y., Montermini, L., Stifani, S., & Pandolfo, M. (1997). Frataxin shows developmentally regulated tissue-specific expression in the mouse embryo. *Neurobiology of Disease*, *4*(2), 103–13. doi:10.1006/nbdi.1997.0139
- Jones, J., Estirado, A., Redondo, C., Bueno, C., & Martínez, S. (2012). Human adipose stem cell-conditioned medium increases survival of Friedreich's ataxia cells submitted to oxidative stress. *Stem Cells and Development*, *21*(15), 2817–26. doi:10.1089/scd.2012.0029
- Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Minajeva, A., & Ventura-Clapier, R. (2001). Energetic Crosstalk Between Organelles: Architectural Integration of Energy Production and Utilization. *Circulation Research*, *89*(2), 153–159. doi:10.1161/hh1401.093440
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, *46*, 3–19. doi:10.1007/s00125-002-1009-0
- Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signalling*, *11*(1), 1–14.
- Karbownik, M., Reiter, R. J., Garcia, J. J., Cabrera, J., Burkhardt, S., Osuna, C., & Lewiński, A. (2001). Indole-3-propionic acid, a melatonin-related molecule, protects hepatic microsomal membranes from iron-induced oxidative damage: relevance to cancer reduction. *Journal of Cellular Biochemistry*, *81*(3), 507–13.
- Khan, R. J., Andermann, E., & Fantus, I. G. (1986). Glucose intolerance in Friedreich's ataxia: association with insulin resistance and decreased insulin binding. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *35*, 1017–1023. doi:10.1016/0026-0495(86)90037-5

- Khdour, O. M., Lu, J., & Hecht, S. M. (2011). An acetate prodrug of a pyridinol-based vitamin E analogue. *Pharmaceutical Research*, *28*(11), 2896–909. doi:10.1007/s11095-011-0491-9
- Kienesberger, P. C., Pulini, T., Nagendran, J., & Dyck, J. R. B. (2013). Myocardial triacylglycerol metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *55*, 101–10. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.06.018
- Kipps, A., Alexander, M., Colan, S. D., Gauvreau, K., Smoot, L., Crawford, L., ... Blume, E. D. (2009). The longitudinal course of cardiomyopathy in Friedreich's ataxia during childhood. *Pediatric Cardiology*, *30*, 306–310. doi:10.1007/s00246-008-9305-1
- Kirby, K., Hu, J., Hilliker, A. J., & Phillips, J. P. (2002). RNA interference-mediated silencing of Sod2 in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(25), 16162–7. doi:10.1073/pnas.252342899
- Kirches, E., Andrae, N., Hoefer, A., Kehler, B., Zarse, K., Leverkus, M., ... Mawrin, C. (2011). Dual role of the mitochondrial protein frataxin in astrocytic tumors. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *91*(12), 1766–76. doi:10.1038/labinvest.2011.130
- Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., ... Zuckerman, B. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, *8*(4), 445–544.
- Knowles, C. J., Cebova, M., & Pinz, I. M. (2013). Palmitate diet-induced loss of cardiac caveolin-3: a novel mechanism for lipid-induced contractile dysfunction. *PloS One*, *8*(4), e61369. doi:10.1371/journal.pone.0061369
- Koeppen, A. H. (1998). The hereditary ataxias. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *57*(6), 531–43.
- Koeppen, A. H. (2002). *The neuropathology of inherited ataxias*. In: *The cerebellum and its disorders*. (M. Manto & M. Pandolfo, Eds.) (pp. 387–405). New York: Cambridge University Press. doi:http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511666469.027
- Koeppen, A. H. (2011). Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *Journal of the Neurological Sciences*, *303*(1-2), 1–12. doi:10.1016/j.jns.2011.01.010
- Koeppen, A. H., & Mazurkiewicz, J. E. (2013). Friedreich ataxia: neuropathology revised. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *72*(2), 78–90. doi:10.1097/NEN.0b013e31827e5762
- Koeppen, A. H., Morral, J. A., Davis, A. N., Qian, J., Petrocine, S. V., Knutson, M. D., ... Li, D. (2009). The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol*, *118*, 763–776.
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2009). *Berne & Levy Physiology, Updated Edition*.
- Koga, H., Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *24*(8), 3052–65. doi:10.1096/fj.09-144519
- Kohwi, Y., & Kohwi-Shigematsu, T. (1991). Altered gene expression correlates with DNA structure. *Genes & Development*, *5*(12B), 2547–54.
- Kolwicz, S. C., & Tian, R. (2011). Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, *90*(2), 194–201. doi:10.1093/cvr/cvr071
- Korshunov, S. S., Korkina, O. V., Ruuge, E. K., Skulachev, V. P., & Starkov, A. A. (1998). Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂· and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Letters*, *435*(2-3), 215–8.
- Korzeniewski, B. (1998). Regulation of ATP supply during muscle contraction: theoretical studies. *The Biochemical Journal*, *330* (Pt 3, 1189–95.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O., & Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nature Genetics*, *16*(4), 345–51. doi:10.1038/ng0897-345
- Koutnikova, H., Campuzano, V., & Koenig, M. (1998). Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Human Molecular Genetics*, *7*(9), 1485–9.

- Kovac, S., Anderson, G. J., & Baldwin, G. S. (2011). Gastrins, iron homeostasis and colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1813*(5), 889–95. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.02.007
- Krishnan, J., Suter, M., Windak, R., Krebs, T., Felley, A., Montessuit, C., ... Krek, W. (2009). Activation of a HIF1alpha-PPARGamma axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metabolism*, *9*, 512–524. doi:10.1016/j.cmet.2009.05.005
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research*, *531*(1-2), 81–92.
- Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E. A., Altun, G., Laurent, L. C., ... Gottesfeld, J. M. (2010). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA·TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*, *7*(5), 631–7. doi:10.1016/j.stem.2010.09.014
- Kumari, D., & Usdin, K. (2012). Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clinical Epigenetics*, *4*, 2. doi:10.1186/1868-7083-4-2
- Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., & Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(10), 1928–39. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.007
- Labuda, M., Poirier, J., & Pandolfo, M. (1999). A missense mutation (W155R) in an American patient with Friedreich Ataxia. *Human Mutation*, *13*(6), 506–506. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:6<506::AID-HUMU20>3.0.CO;2-E
- Lagedrost, S. J., Sutton, M. S. J., Cohen, M. S., Satou, G. M., Kaufman, B. D., Perlman, S. L., ... Lynch, D. R. (2011). Idebenone in Friedreich ataxia cardiomyopathy—results from a 6-month phase III study (IONIA). *American Heart Journal*, *161*(3), 639–645.e1. doi:10.1016/j.ahj.2010.10.038
- Lamarche, J. B., Côté, M., & Lemieux, B. (1980). The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *7*(4), 389–96.
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews. Immunology*, *4*(3), 181–9. doi:10.1038/nri1312
- Lane, D. J. R., Huang, M. L.-H., Ting, S., Sivagurunathan, S., & Richardson, D. R. (2013). Biochemistry of cardiomyopathy in the mitochondrial disease Friedreich's ataxia. *The Biochemical Journal*, *453*(3), 321–36. doi:10.1042/BJ20130079
- Lapice, E., Masulli, M., & Vaccaro, O. (2013). Iron deficiency and cardiovascular disease: an updated review of the evidence. *Current Atherosclerosis Reports*, *15*(10), 358. doi:10.1007/s11883-013-0358-0
- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R., & Culotta, V. C. (1995). Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(3), 1382–8.
- Lardinois, O. M. (1995). Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, *22*(3), 251–74.
- Laurindo, F. R. M., Araujo, T. L. S., & Abrahão, T. B. (2014). Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*(17), 2755–75. doi:10.1089/ars.2013.5605
- Leicester, D., & Herrmann, J. M. (Eds.). (2007). *Mitochondria: Practical Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Vasa (p. 592). Humana Press.
- Leidgens, S., De Smet, S., & Foury, F. (2010). Frataxin interacts with Isu1 through a conserved tryptophan in its beta-sheet. *Human Molecular Genetics*, *19*(2), 276–86. doi:10.1093/hmg/ddp495
- Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B. F., Knight, S. A. B., Camadro, J.-M., & Dancis, A. (2003). Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Human Molecular Genetics*, *12*(8), 879–89.
- Levi, S., & Arosio, P. (2004). Mitochondrial ferritin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(10), 1887–9. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.020

- Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., ... Drysdale, J. (2001). A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(27), 24437–40. doi:10.1074/jbc.C100141200
- Li, D. S., Ohshima, K., Jiralerspong, S., Bojanowski, M. W., & Pandolfo, M. (1999). Knock-out of the *cyaY* gene in *Escherichia coli* does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Letters*, *456*(1), 13–6.
- Li, J., Wang, H., & Rosenberg, P. A. (2009). Vitamin K prevents oxidative cell death by inhibiting activation of 12-lipoxygenase in developing oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, *87*(9), 1997–2005. doi:10.1002/jnr.22029
- Li, K., Besse, E. K., Ha, D., Kovtunovych, G., & Rouault, T. A. (2008). Iron-dependent regulation of frataxin expression: implications for treatment of Friedreich ataxia. *Human Molecular Genetics*, *17*(15), 2265–73. doi:10.1093/hmg/ddn127
- Li, L., Voullaire, L., Sandi, C., Pook, M. A., Ioannou, P. A., Delatycki, M. B., & Sarsero, J. P. (2013). Pharmacological screening using an FXN-EGFP cellular genomic reporter assay for the therapy of Friedreich ataxia. *PloS One*, *8*(2), e55940. doi:10.1371/journal.pone.0055940
- Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., ... Epstein, C. J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*, *11*(4), 376–81. doi:10.1038/ng1295-376
- Limongelli, G., Masarone, D., D'Alessandro, R., & Elliott, P. M. (2011). Mitochondrial diseases and the heart: an overview of molecular basis, diagnosis, treatment and clinical course. *Future Cardiology*, *8*(1), 71–88. doi:10.2217/fca.11.79
- Lin, F.-J., Qin, J., Tang, K., Tsai, S. Y., & Tsai, M.-J. (2011). Coup d'Etat: an orphan takes control. *Endocrine Reviews*, *32*(3), 404–21. doi:10.1210/er.2010-0021
- Lin, L., Kim, S. C., Wang, Y., Gupta, S., Davis, B., Simon, S. I., ... Knowlton, A. A. (2007). HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *293*, H2238–H2247. doi:10.1152/ajpheart.00740.2007
- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(6), 3077–82. doi:10.1073/pnas.0630588100
- Liu, J., Verma, P. J., Evans-Galea, M. V., Delatycki, M. B., Michalska, A., Leung, J., ... Pébay, A. (2011). Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Friedreich Ataxia Patients. *Stem Cell Reviews and Reports*, *7*(3), 703–713. doi:10.1007/s12015-010-9210-x
- Liu, K., & Czaja, M. J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death and Differentiation*, *20*(1), 3–11. doi:10.1038/cdd.2012.63
- Liu, L., Shi, X., Bharadwaj, K. G., Ikeda, S., Yamashita, H., Yagyu, H., ... Goldberg, I. J. (2009). DGAT1 expression increases heart triglyceride content but ameliorates lipotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(52), 36312–23. doi:10.1074/jbc.M109.049817
- Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Thomas, D. D., & Lancaster, J. R. (1998). Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(5), 2175–9. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Liuzzi, J. P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M. D., & Cousins, R. J. (2006). Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(37), 13612–7. doi:10.1073/pnas.0606424103
- Llorens, J. V., Navarro, J. A., Martínez-Sebastián, M. J., Baylies, M. K., Schneuwly, S., Botella, J. A., & Moltó, M. D. (2007). Causative role of oxidative stress in a *Drosophila* model of Friedreich ataxia. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *21*(2), 333–44. doi:10.1096/fj.05-5709com

- Lodi, R., Rajagopalan, B., Blamire, A. M., Cooper, J. M., Davies, C. H., Bradley, J. L., ... Schapira, A. H. (2001). Cardiac energetics are abnormal in Friedreich ataxia patients in the absence of cardiac dysfunction and hypertrophy: an in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *Cardiovascular Research*, *52*(1), 111–9.
- Loh, P. G., Yang, H.-S., Walsh, M. A., Wang, Q., Wang, X., Cheng, Z., ... Song, H. (2009). Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pcd4. *The EMBO Journal*, *28*, 274–285. doi:10.1038/emboj.2008.278
- Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H.-L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R., ... Schwer, B. (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(24), 8807–14. doi:10.1128/MCB.01636-07
- López-Arlandis, J. M., Vílchez, J. J., Palau, F., & Sevilla, T. (1995). Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis. *Neuroepidemiology*, *14*(1), 14–9.
- López-Bastida, J., Perestelo-Pérez, L., Montón-Alvarez, F., & Serrano-Aguilar, P. (2008). Social economic costs and health-related quality of life in patients with degenerative cerebellar ataxia in Spain. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, *23*(2), 212–7. doi:10.1002/mds.21798
- Loschen, G., Azzi, A., & Flohé, L. (1973). Mitochondrial H₂O₂ formation: Relationship with energy conservation. *FEBS Letters*, *33*(1), 84–88. doi:10.1016/0014-5793(73)80165-6
- Louch, W. E., Sheehan, K. A., & Wolska, B. M. (2011). Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *51*(3), 288–298. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.012
- Lu, C., & Cortopassi, G. (2007). Frataxin knockdown causes loss of cytoplasmic iron-sulfur cluster functions, redox alterations and induction of heme transcripts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *457*(1), 111–22. doi:10.1016/j.abb.2006.09.010
- Lufino, M. M. P., Silva, A. M., Németh, A. H., Alegre-Abarrategui, J., Russell, A. J., & Wade-Martins, R. (2013). A GAA repeat expansion reporter model of Friedreich's ataxia recapitulates the genomic context and allows rapid screening of therapeutic compounds. *Human Molecular Genetics*, *22*(25), 5173–87. doi:10.1093/hmg/ddt370
- Lynch, D. R., Perlman, S. L., & Meier, T. (2010). A phase 3, double-blind, placebo-controlled trial of idebenone in friedreich ataxia. *Archives of Neurology*, *67*(8), 941–7. doi:10.1001/archneurol.2010.168
- Lynch, D. R., Regner, S. R., Schadt, K. A., Friedman, L. S., Lin, K. Y., & St John Sutton, M. G. (2012). Management and therapy for cardiomyopathy in Friedreich's ataxia. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, *10*(6), 767–77. doi:10.1586/erc.12.57
- Lynch, D. R., Willi, S. M., Wilson, R. B., Cotticelli, M. G., Brigatti, K. W., Deutsch, E. C., ... Sciascia, T. (2012). A0001 in Friedreich ataxia: biochemical characterization and effects in a clinical trial. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, *27*(8), 1026–33. doi:10.1002/mds.25058
- Maccarinelli, F., Gammella, E., Asperti, M., Regoni, M., Biasiotto, G., Turco, E., ... Cairo, G. (2014). Mice lacking mitochondrial ferritin are more sensitive to doxorubicin-mediated cardiotoxicity. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*.
- Maejima, Y., Kuroda, J., Matsushima, S., Ago, T., & Sadoshima, J. (2011). Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *50*(3), 408–16. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.12.018
- Maeng, O., Kim, Y. C., Shin, H.-J., Lee, J.-O., Huh, T.-L., Kang, K., ... Lee, H. (2004). Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase protects macrophages from LPS-induced nitric oxide and reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *317*(2), 558–64. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.075
- Manfredi, G., Yang, L., Gajewski, C. D., & Mattiazzi, M. (2002). Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods (San Diego, Calif.)*, *26*(4), 317–26. doi:10.1016/S1046-2023(02)00037-3

- Mannella, C. A. (2008). Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 171–9. doi:10.1196/annals.1427.020
- Mariotti, C., Solari, A., Torta, D., Marano, L., Fiorentini, C., & Di Donato, S. (2003). Idebenone treatment in Friedreich patients: one-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, 60(10), 1676–9.
- Marmolino, D., Acquaviva, F., Pinelli, M., Monticelli, A., Castaldo, I., Filla, A., & Coccozza, S. (2009). PPAR-gamma agonist Azelaoyl PAF increases frataxin protein and mRNA expression: new implications for the Friedreich's ataxia therapy. *Cerebellum (London, England)*, 8(2), 98–103. doi:10.1007/s12311-008-0087-z
- Marmolino, D., Manto, M., Acquaviva, F., Vergara, P., Ravella, A., Monticelli, A., & Pandolfo, M. (2010). PGC-1alpha down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia. *PLoS One*, 5(4), e10025. doi:10.1371/journal.pone.0010025
- Martelli, A., Friedman, L. S., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Perlman, S. L., Lynch, D. R., ... Puccio, H. (2012). Clinical data and characterization of the liver conditional mouse model exclude neoplasia as a non-neurological manifestation associated with Friedreich's ataxia. *Disease Models & Mechanisms*, 5(6), 860–9. doi:10.1242/dmm.009829
- Martelli, A., & Puccio, H. (2014). Dysregulation of cellular iron metabolism in Friedreich ataxia: from primary iron-sulfur cluster deficit to mitochondrial iron accumulation. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 130. doi:10.3389/fphar.2014.00130
- Martelli, A., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., & Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Human Molecular Genetics*, 16(22), 2651–8. doi:10.1093/hmg/ddm163
- Martin, M., Colman, M. J. R., Gómez-Casati, D. F., Lamattina, L., & Zabaleta, E. J. (2009). Nitric oxide accumulation is required to protect against iron-mediated oxidative stress in frataxin-deficient Arabidopsis plants. *FEBS Letters*, 583(3), 542–8. doi:10.1016/j.febslet.2008.12.039
- Martin, O. J., Lai, L., Soundarapandian, M. M., Leone, T. C., Zorzano, A., Keller, M. P., ... Kelly, D. P. (2014). A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth. *Circulation Research*, 114(4), 626–36. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302562
- Martinus, R. D., Garth, G. P., Webster, T. L., Cartwright, P., Naylor, D. J., Høj, P. B., & Hoogenraad, N. J. (1996). Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 240, 98–103. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0098h.x
- Mathur, A., Sims, H. F., Gopalakrishnan, D., Gibson, B., Rinaldo, P., Vockley, J., ... Strauss, A. W. (1999). Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. *Circulation*, 99(10), 1337–43.
- Matsushima, S., Tsutsui, H., & Sadoshima, J. (2014). Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends in Cardiovascular Medicine*.
- McAndrew, R. P., Wang, Y., Mohsen, A.-W., He, M., Vockley, J., & Kim, J.-J. P. (2008). Structural basis for substrate fatty acyl chain specificity: crystal structure of human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9435–43. doi:10.1074/jbc.M709135200
- McCommis, K. S., Douglas, D. L., Krenz, M., & Baines, C. P. (2013). Cardiac-specific hexokinase 2 overexpression attenuates hypertrophy by increasing pentose phosphate pathway flux. *Journal of the American Heart Association*, 2(6), e000355. doi:10.1161/JAHA.113.000355
- McCormack, J. G., & Denton, R. M. (1990). The role of mitochondrial Ca²⁺ transport and matrix Ca²⁺ in signal transduction in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1018(2-3), 287–91.
- McDermott-Roe, C., Ye, J., Ahmed, R., Sun, X.-M., Serafín, A., Ware, J., ... Cook, S. a. (2011). Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function. *Nature*, 478(7367), 114–8. doi:10.1038/nature10490
- McKie, A. T. (2008). The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 6), 1239–41. doi:10.1042/BST0361239

- Meier, T., Perlman, S. L., Rummey, C., Coppard, N. J., & Lynch, D. R. (2012). Assessment of neurological efficacy of idebenone in pediatric patients with Friedreich's ataxia: data from a 6-month controlled study followed by a 12-month open-label extension study. *Journal of Neurology*, 259(2), 284–91. doi:10.1007/s00415-011-6174-y
- Meimaridou, E., Kowalczyk, J., Guasti, L., Hughes, C. R., Wagner, F., Frommolt, P., ... Metherell, L. A. (2012). Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nature Genetics*, 44(7), 740–2. doi:10.1038/ng.2299
- Melancon, S. B., Dallaire, L., Potier, M., Vanasse, M., Marois, P., Geoffroy, G., & Barbeau, A. (1982). Oral lecithin and linoleic acid in Friedreich's ataxia: I. Design of the study, material and methods. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 9(2), 151–4.
- Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., ... Giacomello, A. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation Research*, 95(9), 911–21. doi:10.1161/01.RES.0000147315.71699.51
- Meyer, C., Schmid, G., Görlitz, S., Ernst, M., Wilkens, C., Wilhelms, I., ... Schöls, L. (2007). Cardiomyopathy in Friedreich's ataxia—assessment by cardiac MRI. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(11), 1615–22. doi:10.1002/mds.21590
- Michael, S., Petrocine, S. V, Qian, J., Lamarche, J. B., Knutson, M. D., Garrick, M. D., & Koeppe, A. H. (2006). Iron and iron-responsive proteins in the cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Cerebellum (London, England)*, 5(4), 257–67. doi:10.1080/14734220600913246
- Min, K. C., Kovall, R. A., & Hendrickson, W. A. (2003). Crystal structure of human alpha-tocopherol transfer protein bound to its ligand: implications for ataxia with vitamin E deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 14713–8. doi:10.1073/pnas.2136684100
- Minajeva, A., Ventura-Clapier, R., & Veksler, V. (1996). Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 432(5), 904–12.
- Minárik, P., Tomásková, N., Kollárová, M., & Antalík, M. (2002). Malate dehydrogenases—structure and function. *General Physiology and Biophysics*, 21(3), 257–65.
- Mincheva-Tasheva, S., Obis, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2013). Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein. *Human Molecular Genetics*, 23(7), 1829–41. doi:10.1093/hmg/ddt576
- Miranda, C. J., Santos, M. M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., ... Pandolfo, M. (2002). Frataxin knockin mouse. *FEBS Letters*, 512, 291–297. doi:10.1016/S0014-5793(02)02251-2
- Mirel, D. B., Marder, K., Graziano, J., Freyer, G., Zhao, Q., Mayeux, R., & Wilhelmsen, K. C. (1998). Characterization of the human mitochondrial aconitase gene (ACO2). *Gene*, 213(1-2), 205–18.
- Mitchell, P. (1979). Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, 206(4423), 1148–1159. doi:10.1126/science.388618
- Mitcheson, J. S., Hancox, J. C., & Levi, A. J. (1998). Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovascular Research*, 39(2), 280–300. doi:10.1016/S0008-6363(98)00128-X
- Mitcheson, J. S., Hancox, J. C., & Levi, A. J. (1996). Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 431(6), 814–27.
- Mogensen, J., Murphy, R. T., Shaw, T., Bahl, A., Redwood, C., Watkins, H., ... McKenna, W. J. (2004). Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 44, 2033–2040. doi:10.1016/j.jacc.2004.08.027
- Moncada, S., Palmer, R. M., & Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2), 109–42.

- Monnier, V. M. (1990). Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process. *Journal of Gerontology*, *45*(4), B105–11.
- Moreno-Cermeño, A., Alsina, D., Cabisco, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2013). Metabolic remodeling in frataxin-deficient yeast is mediated by Cth2 and Adr1. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1833*(12), 3326–3337. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.09.019
- Moreno-Cermeño, A., Obis, E., Bellí, G., Cabisco, E., Ros, J., & Tamarit, J. (2010). Frataxin depletion in yeast triggers up-regulation of iron transport systems before affecting iron-sulfur enzyme activities. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(53), 41653–64. doi:10.1074/jbc.M110.149443
- Morgan, M. J., & Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*, *21*(1), 103–15. doi:10.1038/cr.2010.178
- Morse, D., & Sethi, J. (2002). Carbon monoxide and human disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, *4*(2), 331–8. doi:10.1089/152308602753666389
- Moschner, C., Perlman, S., & Baloh, R. W. (1994). Comparison of oculomotor findings in the progressive ataxia syndromes. *Brain: A Journal of Neurology*, *117* (Pt 1), 15–25.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*, 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Muftuoglu, M., Mori, M. P., & Souza-Pinto, N. C. de. (2014). Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion*.
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seubert, A., ... Lill, R. (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metabolism*, *12*(4), 373–85. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.001
- Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., & Lill, R. (2002). The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Human Molecular Genetics*, *11*(17), 2025–36.
- Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S., & Nagaoka, S. (1993). Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1157*(3), 313–7.
- Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49064–73. doi:10.1074/jbc.M407715200
- Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E. S., Elliott, D. A., Elefany, A. G., & Kamp, T. J. (2012). Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circulation Research*, *111*(3), 344–58. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227512
- Murphy, B. M., Dandy, D. S., & Henry, C. S. (2009). Analysis of oxidative stress biomarkers using a simultaneous competitive/non-competitive micromosaic immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, *640*, 1–6. doi:10.1016/j.aca.2009.03.003
- Murray, T. V. A., Ahmad, A., & Brewer, A. C. (2014). Reactive oxygen at the heart of metabolism. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *24*(3), 113–120. doi:10.1016/j.tcm.2013.09.003
- Musco, G., Stier, G., Kolmerer, B., Adinolfi, S., Martin, S., Frenkiel, T., ... Pastore, A. (2000). Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin. *Structure (London, England: 1993)*, *8*(7), 695–707.
- Myers, S. A., Wang, S.-C. M., & Muscat, G. E. O. (2006). The chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors modulate genes and pathways involved in skeletal muscle cell metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(34), 24149–60. doi:10.1074/jbc.M601941200
- Nagao, M., Parimoo, B., & Tanaka, K. (1993). Developmental, nutritional, and hormonal regulation of tissue-specific expression of the genes encoding various acyl-CoA dehydrogenases and alpha-subunit of electron transfer flavoprotein in rat. *J. Biol. Chem.*, *268*(32), 24114–24124.

- Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., & Pastore, A. (2004). Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure (London, England : 1993)*, *12*(11), 2037–48. doi:10.1016/j.str.2004.08.012
- Napoli, E., Morin, D., Bernhardt, R., Buckpitt, A., & Cortopassi, G. (2007). Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendrogloma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1772*(7), 773–80. doi:10.1016/j.bbadis.2007.04.001
- Napoli, E., Taroni, F., & Cortopassi, G. A. (2006). Frataxin, iron-sulfur clusters, heme, ROS, and aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(3-4), 506–16. doi:10.1089/ars.2006.8.506
- Navarro, F., Navas, P., Burgess, J. R., Bello, R. I., De Cabo, R., Arroyo, A., & Villalba, J. M. (1998). Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *12*(15), 1665–73.
- Navarro, J. A., Llorens, J. V., Soriano, S., Botella, J. A., Schnewly, S., Martínez-Sebastián, M. J., & Moltó, M. D. (2011). Overexpression of human and fly frataxins in *Drosophila* provokes deleterious effects at biochemical, physiological and developmental levels. *PLoS One*, *6*(7), e21017. doi:10.1371/journal.pone.0021017
- Navarro, J. A., Ohmann, E., Sanchez, D., Botella, J. A., Liebisch, G., Moltó, M. D., ... Schnewly, S. (2010). Altered lipid metabolism in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, *19*(14), 2828–40. doi:10.1093/hmg/ddq183
- Neely, J. R., & Morgan, H. E. (1974). Relationship Between Carbohydrate and Lipid Metabolism and the Energy Balance of Heart Muscle. *Annual Review of Physiology*, *36*(1), 413–459. doi:10.1146/annurev.ph.36.030174.002213
- Newton, A. C., & Johnson, J. E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1376*(2), 155–72.
- Ngoh, G. a, Watson, L. J., Facundo, H. T., & Jones, S. P. (2011). Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids*, *40*(3), 895–911. doi:10.1007/s00726-010-0728-7
- Ngoh, G. A., Facundo, H. T., Zafir, A., & Jones, S. P. (2010). O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. *Circulation Research*, *107*(2), 171–85. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.224675
- Nichol, H., Gakh, O., O'Neill, H. A., Pickering, I. J., Isaya, G., & George, G. N. (2003). Structure of frataxin iron cores: an X-ray absorption spectroscopic study. *Biochemistry*, *42*(20), 5971–6. doi:10.1021/bi027021l
- Nicholls, D. G., & Chalmers, S. (2004). The integration of mitochondrial calcium transport and storage. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *36*, 277–281. doi:10.1023/B:JOB.0000041753.52832.f3
- Nicholls, D. G., Ferguson, S. J., & Ferguson, S. (2002). *Bioenergetics, Third Edition* (p. 288). Academic Press.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(1), 668–76. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.072
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science (New York, N.Y.)*, *258*(5082), 607–14. R
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, *31*(11), 1287–312.
- O'Brian, C. A., Ward, N. E., Weinstein, I. B., Bull, A. W., & Marnett, L. J. (1988). Activation of rat brain protein kinase C by lipid oxidation products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *155*, 1374–1380.
- O'Neill, H. A., Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S. M., Sampson, M., ... Isaya, G. (2005). Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry*, *44*(2), 537–45. doi:10.1021/bi048459j

- Ogata, N., Yamamoto, H., Kugiyama, K., Yasue, H., & Miyamoto, E. (2000). Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor-kappa B in human endothelial cells. *Cardiovascular Research*, *45*(2), 513–21.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., & Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, *108*(4), 1388–94. doi:10.1182/blood-2006-02-003681
- Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., & Bartsch, H. (1990). Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *28*, 647–652. doi:10.1016/0278-6915(90)90173-K
- Okere, I. C., Chandler, M. P., McElfresh, T. A., Rennison, J. H., Sharov, V., Sabbah, H. N., ... Stanley, W. C. (2006). Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *291*(1), H38–44. doi:10.1152/ajpheart.01295.2005
- Olofsson, S.-O., Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Levin, M., Perman, J., & Borén, J. (2008). Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins. *Current Opinion in Lipidology*, *19*(5), 441–7. doi:10.1097/MOL.0b013e32830dd09b
- Olson, E. N., & Schneider, M. D. (2003). Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes & Development*, *17*(16), 1937–56. doi:10.1101/gad.1110103
- Omiya, S., Hikoso, S., Imanishi, Y., Saito, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., ... Otsu, K. (2009). Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *46*(1), 59–66. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.09.714
- Onay-Besikci, A. (2006). Regulation of cardiac energy metabolism in newborn. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *287*(1-2), 1–11. doi:10.1007/s11010-006-9123-9
- Oudit, G. Y., Sun, H., Trivieri, M. G., Koch, S. E., Dawood, F., Ackerley, C., ... Backx, P. H. (2003). L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nature Medicine*, *9*(9), 1187–94. doi:10.1038/nm920
- Oudit, G. Y., Trivieri, M. G., Khaper, N., Husain, T., Wilson, G. J., Liu, P., ... Backx, P. H. (2004). Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation*, *109*(15), 1877–85.
- Oudit, G. Y., Trivieri, M. G., Khaper, N., Liu, P. P., & Backx, P. H. (2006). Role of L-type Ca²⁺ channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *84*(5), 349–64. doi:10.1007/s00109-005-0029-x
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, *87*(1), 315–424. doi:10.1152/physrev.00029.2006
- Pagon, R. A., Bird, T. D., Detter, J. C., & Pierce, I. (1985). Hereditary sideroblastic anaemia and ataxia: an X linked recessive disorder. *Journal of Medical Genetics*, *22*(4), 267–73.
- Palmer, J. W., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (1977). Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, *252*(23), 8731–9.
- Palmer, J. W., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (1985). Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *236*(2), 691–702.
- Palomo, G. M., Cerrato, T., Gargini, R., & Diaz-Nido, J. (2011). Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Human Molecular Genetics*, *20*(14), 2807–22. doi:10.1093/hmg/ddr187
- Pandey, A., Gordon, D. M., Pain, J., Stemmler, T. L., Dancis, A., & Pain, D. (2013). Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(52), 36773–86. doi:10.1074/jbc.M113.525857

- Pandol, S. J., Gorelick, F. S., & Lugea, A. (2011). Environmental and genetic stressors and the unfolded protein response in exocrine pancreatic function - a hypothesis. *Frontiers in Physiology*, 2, 8. doi:10.3389/fphys.2011.00008
- Pandolfo, M. (2006). Iron and Friedreich ataxia. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 143–146. doi:17017521
- Pandolfo, M. (2009). Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol*, 256 Suppl, 3–8.
- Pandolfo, M., & Hausmann, L. (2013). Deferiprone for the treatment of Friedreich's ataxia. *Journal of Neurochemistry*, 126 Suppl, 142–6. doi:10.1111/jnc.12300
- Pantopoulos, K., & Hentze, M. W. (1998). Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10559–63.
- Pantopoulos, K., Mueller, S., Atzberger, A., Ansorge, W., Stremmel, W., & Hentze, M. W. (1997). Differences in the regulation of iron regulatory protein-1 (IRP-1) by extra- and intracellular oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 9802–8.
- Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., & Devireddy, L. (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, 51(29), 5705–24. doi:10.1021/bi300752r
- Papanicolaou, K. N., Khairallah, R. J., Ngoh, G. A., Chikando, A., Luptak, I., O'Shea, K. M., ... Walsh, K. (2011). Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 31(6), 1309–28. doi:10.1128/MCB.00911-10
- Paradkar, P. N., Zumbrennen, K. B., Paw, B. H., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2009). Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Molecular and Cellular Biology*, 29(4), 1007–16. doi:10.1128/MCB.01685-08
- Park, S., Gakh, O., Mooney, S. M., & Isaya, G. (2002). The ferroxidase activity of yeast frataxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38589–95. doi:10.1074/jbc.M206711200
- Park, S., Gakh, O., O'Neill, H. A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G. C., & Isaya, G. (2003). Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31340–51.
- Park, T.-S., Hu, Y., Noh, H.-L., Drosatos, K., Okajima, K., Buchanan, J., ... Goldberg, I. J. (2008). Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of Lipid Research*, 49(10), 2101–12. doi:10.1194/jlr.M800147-JLR200
- Parkinson, M. H., Schulz, J. B., & Giunti, P. (2013). Co-enzyme Q10 and idebenone use in Friedreich's ataxia. *Journal of Neurochemistry*, 126 Suppl, 125–41. doi:10.1111/jnc.12322
- Parra, V., Eisner, V., Chiong, M., Criollo, A., Moraga, F., Garcia, A., ... Lavandero, S. (2008). Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovascular Research*, 77(2), 387–97. doi:10.1093/cvr/cvm029
- Pastore, A., & Puccio, H. (2013). Frataxin: a protein in search for a function. *Journal of Neurochemistry*, 126 Suppl, 43–52. doi:10.1111/jnc.12220
- Pastore, A., Tozzi, G., Gaeta, L. M., Bertini, E., Serafini, V., Di Cesare, S., ... Piemonte, F. (2003). Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich's ataxia: a potential role in the pathogenesis of the disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42588–95. doi:10.1074/jbc.M301872200
- Pastore, C., Franzese, M., Sica, F., Temussi, P., & Pastore, A. (2007). Understanding the binding properties of an unusual metal-binding protein--a study of bacterial frataxin. *The FEBS Journal*, 274(16), 4199–210. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05946.x
- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2010). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chemical Biology*, 5(1), 47–62. doi:10.1021/cb900258z
- Paupe, V., Dassa, E. P., Goncalves, S., Auchère, F., Lönn, M., Holmgren, A., & Rustin, P. (2009). Impaired nuclear Nrf2 translocation undermines the oxidative stress response in Friedreich ataxia. *PLoS One*, 4(1), e4253. doi:10.1371/journal.pone.0004253
- Payne, R. M. (2011). The heart in Friedreich's Ataxia: Basic findings and clinical implications. *Progress in Pediatric Cardiology*. doi:10.1016/j.ppedcard.2011.02.007

- Peng, C., Lu, Z., Xie, Z., Cheng, Z., Chen, Y., Tan, M., ... Zhao, Y. (2011). The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *10*(12), M111.012658. doi:10.1074/mcp.M111.012658
- Perdomini, M., Belbellaa, B., Monassier, L., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Cartier, N., ... Puccio, H. (2014). Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nature Medicine*, *20*(5), 542–7.
- Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., & Pook, M. A. (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *Journal of Neurochemistry*, *126 Suppl*, 65–79. doi:10.1111/jnc.12219
- Pérez-Sampietro, M., Casas, C., & Herrero, E. (2013). The AMPK family member Snf1 protects *Saccharomyces cerevisiae* cells upon glutathione oxidation. *PLoS One*, *8*(3), e58283. doi:10.1371/journal.pone.0058283
- Perlman, S. L. (2012). A review of Friedreich ataxia clinical trial results. *Journal of Child Neurology*, *27*(9), 1217–22. doi:10.1177/0883073812453872
- Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B., & Gelbard, H. A. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, *50*(2), 98–115. doi:10.2144/000113610
- Pianese, L., Tammara, A., Turano, M., De Biase, I., Monticelli, A., & Coccozza, S. (2002). Identification of a novel transcript of X25, the human gene involved in Friedreich ataxia. *Neuroscience Letters*, *320*(3), 137–40. R
- Piemonte, F., Pastore, A., Tozzi, G., Tagliacozzi, D., Santorelli, F. M., Carrozzo, R., ... Bertini, E. (2001). Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *European Journal of Clinical Investigation*, *31*(11), 1007–11.
- Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., & Gupta, M. P. (2014). Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging. *Circulation Research*, *114*(2), 368–78. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300536
- Pilz, S., Tomaschitz, A., Drechsler, C., Dekker, J. M., & März, W. (2010). Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, *54*(8), 1103–13. doi:10.1002/mnfr.200900474
- Pineda, M., Arpa, J., Montero, R., Aracil, A., Domínguez, F., Galván, M., ... Artuch, R. (2008). Idebenone treatment in paediatric and adult patients with Friedreich ataxia: long-term follow-up. *European Journal of Paediatric Neurology : EJPN : Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, *12*(6), 470–5. doi:10.1016/j.ejpn.2007.11.006
- Piquereau, J., Caffin, F., Novotova, M., Prola, A., Garnier, A., Mateo, P., ... Joubert, F. (2012). Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovascular Research*, *94*(3), 408–17. doi:10.1093/cvr/cvs117
- Poetter, K., Jiang, H., Hassanzadeh, S., Master, S. R., Chang, A., Dalakas, M. C., ... Epstein, N. D. (1996). Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nature Genetics*, *13*, 63–69. doi:10.1038/ng0596-63
- Pook, M. A., Al-Mahdawi, S., Carroll, C. J., Cossée, M., Puccio, H., Lawrence, L., ... Chamberlain, S. (2001). Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics*, *3*(4), 185–93.
- Pook, M. A., Carvajal, J. J., Doudney, K., Hillermann, R., & Chamberlain, S. (1997). Exon-intron structure of a 2.7-kb transcript of the STM7 gene with phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity. *Genomics*, *42*(1), 170–2. doi:10.1006/geno.1997.4726
- Pougovkina, O., Te Brinke, H., Ofman, R., van Cruchten, A. G., Kulik, W., Wanders, R. J. A., ... de Boer, V. C. J. (2014). Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation. *Human Molecular Genetics*. doi:10.1093/hmg/ddu059
- Prentice, A. M. (2008). Iron metabolism, malaria, and other infections: what is all the fuss about? *The Journal of Nutrition*, *138*(12), 2537–41. doi:10.3945/jn.108.098806

- Prischi, F., Giannini, C., Adinolfi, S., & Pastore, A. (2009). The N-terminus of mature human frataxin is intrinsically unfolded. *The FEBS Journal*, 276(22), 6669–76. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07381.x
- Prohaska, J. R., & Gybina, A. A. (2004). Intracellular copper transport in mammals. *The Journal of Nutrition*, 134(5), 1003–6.
- Pryor, W. A., Houk, K. N., Foote, C. S., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Squadrito, G. L., & Davies, K. J. A. (2006). Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(3), R491–511. doi:10.1152/ajpregu.00614.2005
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., ... Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nature Genetics*, 27, 181–186. doi:10.1038/84818
- Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Siu, A. W., & Garcia, J. J. (2000). Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. *Journal of Pineal Research*, 29(1), 54–61.
- Rajagopalan, B., Francis, J. M., Cooke, F., Korlipara, L. V. P., Blamire, A. M., Schapira, A. H. V., ... Cooper, J. M. (2010). Analysis of the factors influencing the cardiac phenotype in Friedreich's ataxia. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 25, 846–852. doi:10.1002/mds.22864
- Ramirez, L., Zabaleta, E. J., & Lamattina, L. (2010). Nitric oxide and frataxin: two players contributing to maintain cellular iron homeostasis. *Annals of Botany*, 105(5), 801–10. doi:10.1093/aob/mcp147
- Ramirez, R. L., Qian, J., Santambrogio, P., Levi, S., & Koeppen, A. H. (2012). Relation of cytosolic iron excess to cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *The American Journal of Cardiology*, 110(12), 1820–7. doi:10.1016/j.amjcard.2012.08.018
- Ramjiawan, A., Bagchi, R. A., Albak, L., & Czubyryt, M. P. (2013). Mechanism of cardiomyocyte PGC-1 α gene regulation by ERR α . *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 91(3), 148–54. doi:10.1139/bcb-2012-0080
- Reid, T. J., Murthy, M. R., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W. D., & Rossmann, M. G. (1981). Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(8), 4767–71.
- Rhee, S. G., Yang, K.-S., Kang, S. W., Woo, H. A., & Chang, T.-S. (2005). Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(5-6), 619–26. doi:10.1089/ars.2005.7.619
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 986–1000. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449
- Richardson, D. R. (2005). 24p3 and its receptor: dawn of a new iron age? *Cell*, 123(7), 1175–7. doi:10.1016/j.cell.2005.12.008
- Richardson, D. R., Lane, D. J. R., Becker, E. M., Huang, M. L.-H., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., ... Ponka, P. (2010). Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10775–82. doi:10.1073/pnas.0912925107
- Richardson, T. E., Kelly, H. N., Yu, A. E., & Simpkins, J. W. (2013). Therapeutic strategies in Friedreich's ataxia. *Brain Research*, 1514, 91–7. doi:10.1016/j.brainres.2013.04.005
- Ristow, M., Mulder, H., Pomplun, D., Schulz, T. J., Müller-Schmehl, K., Krause, A., ... Pfeiffer, A. F. H. (2003). Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(4), 527–34. doi:10.1172/JCI18107
- Ristow, M., Pfister, M. F., Yee, A. J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C. Y., ... Kahn, C. R. (2000). Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12239–43. doi:10.1073/pnas.220403797

- Riva, A., Tandler, B., Loffredo, F., Vazquez, E., & Hoppel, C. (2005). Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *289*(2), H868–72. doi:10.1152/ajpheart.00866.2004
- Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., & de Medina, F. S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry*, *401*(2), 318–20.
- Ross, P. D., & McCarl, R. L. (1984). Oxidation of carbohydrates and palmitate by intact cultured neonatal rat heart cells. *The American Journal of Physiology*, *246*(3 Pt 2), H389–97.
- Rossi, A. M., Eppenberger, H. M., Volpe, P., Cotrufo, R., & Wallimann, T. (1990). Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(9), 5258–66.
- Rostovtseva, T. K., Gurnev, P. A., Chen, M.-Y., & Bezrukov, S. M. (2012). Membrane lipid composition regulates tubulin interaction with mitochondrial voltage-dependent anion channel. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(35), 29589–98.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., ... Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature Genetics*, *17*(2), 215–7. doi:10.1038/ng1097-215
- Rouault, T. A. (2012). Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Disease Models & Mechanisms*, *5*(2), 155–64. doi:10.1242/dmm.009019
- Rouault, T. A. (2013). Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Neuroscience*, *14*(8), 551–64. doi:10.1038/nrn3453
- Rufini, A., Fortuni, S., Arcuri, G., Condò, I., Serio, D., Incani, O., ... Testi, R. (2011). Preventing the ubiquitin-proteasome-dependent degradation of frataxin, the protein defective in Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, *20*(7), 1253–61. doi:10.1093/hmg/ddq566
- Runko, A. P., Griswold, A. J., & Min, K.-T. (2008). Overexpression of frataxin in the mitochondria increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *FEBS Letters*, *582*(5), 715–9. doi:10.1016/j.febslet.2008.01.046
- Rustin, P., Bonnet, D., Rötig, A., Munnich, A., & Sidi, D. (2004). Idebenone treatment in Friedreich patients: one-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, *62*(3), 524–5; author reply 525; discussion 525.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J. M., & Munnich, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *228*, 35–51. doi:10.1016/0009-8981(94)90055-8
- Ryter, S. W. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews*, *86*(2), 583–650. doi:10.1152/physrev.00011.2005
- Saccà, F., Piro, R., De Michele, G., Acquaviva, F., Antenora, A., Carlomagno, G., ... Filla, A. (2011). Epoetin alfa increases frataxin production in Friedreich's ataxia without affecting hematocrit. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *26*(4), 739–42. doi:10.1002/mds.23435
- Sack, M. N., Disch, D. L., Rockman, H. A., & Kelly, D. P. (1997). A role for Sp and nuclear receptor transcription factors in a cardiac hypertrophic growth program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(12), 6438–43.
- Sakamoto, N., Ohshima, K., Montermini, L., Pandolfo, M., & 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. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(29), 27171–7. doi:10.1074/jbc.M101879200
- Saks, V. A., Kaambre, T., Sikk, P., Eimre, M., Orlova, E., Paju, K., ... Seppet, E. (2001). Intracellular energetic units in red muscle cells. *The Biochemical Journal*, *356*(Pt 2), 643–57.
- Saks, V., Kuznetsov, A., Andrienko, T., Usson, Y., Appaix, F., Guerrero, K., ... Vendelin, M. (2003). Heterogeneity of ADP diffusion and regulation of respiration in cardiac cells. *Biophysical Journal*, *84*(5), 3436–56. doi:10.1016/S0006-3495(03)70065-4

- Sala, A. C. (2013). *Revista del Col·legi de Biòlegs de Catalunya*, 20.
- Salameh, A., & Dhein, S. (2005). Culture of Neonatal Cardiomyocytes. In S. Dhein, F. Mohr, & M. Delmar (Eds.), *Practical Methods in Cardiovascular Research SE - 29* (pp. 568–576). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/3-540-26574-0_29
- Salehi, M. H., Kamalidehghan, B., Houshmand, M., Yong Meng, G., Sadeghizadeh, M., Aryani, O., & Nafissi, S. (2014). Gene Expression Profiling of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) Complex I in Friedreich Ataxia (FRDA) Patients. *PLoS ONE*, 9(4), e94069. doi:10.1371/journal.pone.0094069
- Salin, H., Fardeau, V., Piccini, E., Lelandais, G., Tanty, V., Lemoine, S., ... Devaux, F. (2008). Structure and properties of transcriptional networks driving selenite stress response in yeasts. *BMC Genomics*, 9, 333. doi:10.1186/1471-2164-9-333
- Santambrogio, P., Biasiotto, G., Sanvito, F., Olivieri, S., Arosio, P., & Levi, S. (2007). Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 55(11), 1129–37. doi:10.1369/jhc.7A7273.2007
- Santos, C. X., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A. C., & Shah, A. M. (2011). Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(7), 777–93. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003
- Santos, M. M., Ohshima, K., & Pandolfo, M. (2001). Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Human Molecular Genetics*, 10(18), 1935–44.
- Santos, R., Lefevre, S., Sliwa, D., Seguin, A., Camadro, J.-M., & Lesuisse, E. (2010). Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13, 651–690. doi:10.1089/ars.2009.3015
- Sato, Y., Arai, H., Miyata, A., Tokita, S., Yamamoto, K., Tanabe, T., & Inoue, K. (1993). Primary structure of alpha-tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(24), 17705–10.
- Satoh, H. (2001). [Ca²⁺]_i-dependent actions of taurine in spontaneously beating rabbit sino-atrial nodal cells. *European Journal of Pharmacology*, 424(1), 19–25. R
- Sazanov, L. A., & Hinchliffe, P. (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5766), 1430–6. doi:10.1126/science.1123809
- Scaloni, A., Zolla, L., Møller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A., & Rao, R. S. P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics*, 74(11), 2228–2242.
- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777–83. doi:10.1093/emboj/19.8.1777
- Schaper, J., Meiser, E., & Stammeler, G. (1985). Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circulation Research*, 56(3), 377–391. doi:10.1161/01.RES.56.3.377
- Schernthaner, G., Currie, C. J., & Schernthaner, G.-H. (2013). Do we still need pioglitazone for the treatment of type 2 diabetes? A risk-benefit critique in 2013. *Diabetes Care*, 36 Suppl 2, S155–61. doi:10.2337/dcS13-2031
- Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., & Puccio, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Human Molecular Genetics*, 17(22), 3521–31. doi:10.1093/hmg/ddn244
- Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donzé, M., Reutenauer, L., & Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One*, 6(1), e16199. doi:10.1371/journal.pone.0016199
- Schneider, C., Pratt, D. A., Porter, N. A., & Brash, A. R. (2007). Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chemistry & Biology*, 14(5), 473–88. doi:10.1016/j.chembiol.2007.04.007

- Schoenle, E. J., Boltshauser, E. J., Baekkeskov, S., Landin Olsson, M., Torresani, T., & von Felten, A. (1989). Preclinical and manifest diabetes mellitus in young patients with Friedreich's ataxia: no evidence of immune process behind the islet cell destruction. *Diabetologia*, *32*, 378–381. doi:10.1007/BF00277262
- Schönekeß, B. O., Allard, M. F., Henning, S. L., Wambolt, R. B., & Lopaschuk, G. D. (1997). Contribution of glycogen and exogenous glucose to glucose metabolism during ischemia in the hypertrophied rat heart. *Circulation Research*, *81*(4), 540–9.
- Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2007). Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1767*(8), 1032–40. doi:10.1016/j.bbabi.2007.04.005
- Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2008). Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, *45*(3), 231–41. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.029
- Schuelke, M., Elsner, A., Finckh, B., Kohlschütter, A., Hübner, C., & Brigelius-Flohé, R. (2000). Urinary alpha-tocopherol metabolites in alpha-tocopherol transfer protein-deficient patients. *Journal of Lipid Research*, *41*(10), 1543–51.
- Schulz, J. B., Dehmer, T., Schöls, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., ... Bogdanov, M. B. (2000). Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology*, *55*(11), 1719–21.
- Schulz, T. J., Thierbach, R., Voigt, A., Drewes, G., Mietzner, B., Steinberg, P., ... Ristow, M. (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(2), 977–81. doi:10.1074/jbc.M511064200
- Sciarretta, S., Volpe, M., & Sadoshima, J. (2014). NOX4 regulates autophagy during energy deprivation. *Autophagy*, *10*(4), 699–701. doi:10.4161/auto.27955
- Sciarretta, S., Zhai, P., Shao, D., Zablocki, D., Nagarajan, N., Terada, L. S., ... Sadoshima, J. (2013). Activation of NADPH oxidase 4 in the endoplasmic reticulum promotes cardiomyocyte autophagy and survival during energy stress through the protein kinase RNA-activated-like endoplasmic reticulum kinase/eukaryotic initiation factor 2 α /activating transcripti. *Circulation Research*, *113*(11), 1253–64. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301787
- Segretain, D., Rambourg, A., & Clermont, Y. (1981). Three dimensional arrangement of mitochondria and endoplasmic reticulum in the heart muscle fiber of the rat. *The Anatomical Record*, *200*(2), 139–51. doi:10.1002/ar.1092000204
- Selles, J., Massheimer, V., Santillan, G., Marinissen, M. J., & Boland, R. (1997). Effects of calcitriol and its analogues, calcipotriol (MC 903) and 20-epi-1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (MC 1288), on calcium influx and DNA synthesis in cultured muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, *53*(12), 1807–14.
- Senthivayagam, S., McIntosh, A. L., Moon, K. C., & Atshaves, B. P. (2013). Plin2 inhibits cellular glucose uptake through interactions with SNAP23, a SNARE complex protein. *PLoS One*, *8*(9), e73696. doi:10.1371/journal.pone.0073696
- Seppet, E. K., Eimre, M., Anmann, T., Seppet, E., Peet, N., Käambre, T., ... Saks, V. A. (2005). Intracellular energetic units in healthy and diseased hearts. *Experimental and Clinical Cardiology*, *10*(3), 173–83.
- Seppet, E. K., Kaambre, T., Sikk, P., Tiivel, T., Vija, H., Tonkonogi, M., ... Saks, V. A. (2001). Functional complexes of mitochondria with Ca,MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1504*(2-3), 379–95.
- Seznec, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., ... Puccio, H. (2005). Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Human Molecular Genetics*, *14*(4), 463–74. doi:10.1093/hmg/ddi042
- Seznec, H., Simon, D., Monassier, L., Criqui-Filipe, P., Gansmuller, A., Rustin, P., ... Puccio, H. (2004). Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Human Molecular Genetics*, *13*(10), 1017–24. doi:10.1093/hmg/ddh114

- Shan, Y., & Cortopassi, G. (2012). HSC20 interacts with frataxin and is involved in iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Human Molecular Genetics*, *21*(7), 1457–69. doi:10.1093/hmg/ddr582
- Shan, Y., Schoenfeld, R. A., Hayashi, G., Napoli, E., Akiyama, T., Iodi Carstens, M., ... Cortopassi, G. A. (2013). Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich's ataxia YG8R mouse model. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(13), 1481–93. doi:10.1089/ars.2012.4537
- Shapcott, D., Melancon, S., Butterworth, R. F., Khoury, K., Collu, R., Breton, G., ... Barbeau, A. (1976). Glucose and insulin metabolism in Friedreich's ataxia. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *3*, 361–364.
- Sharma, S., Adroque, J. V., Golfman, L., Uray, I., Lemm, J., Youker, K., ... Taegtmeyer, H. (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *18*(14), 1692–700. doi:10.1096/fj.04-2263com
- Shaw, B. F., Schneider, G. F., Bilgiçer, B., Kaufman, G. K., Neveu, J. M., Lane, W. S., ... Whitesides, G. M. (2008). Lysine acetylation can generate highly charged enzymes with increased resistance toward irreversible inactivation. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *17*(8), 1446–55. doi:10.1110/ps.035154.108
- Shearer, M. J., & Newman, P. (2014). Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, *55*(3), 345–62. doi:10.1194/jlr.R045559
- Sheeran, F. L., Rydström, J., Shakhparonov, M. I., Pestov, N. B., & Pepe, S. (2010). Diminished NADPH transhydrogenase activity and mitochondrial redox regulation in human failing myocardium. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1797*(6-7), 1138–48. doi:10.1016/j.bbabi.2010.04.002
- Sheftel, A. D., & Lill, R. (2009). The power plant of the cell is also a smithy: the emerging role of mitochondria in cellular iron homeostasis. *Annals of Medicine*, *41*(2), 82–99. doi:10.1080/07853890802322229
- Sheftel, A. D., Zhang, A.-S., Brown, C., Shirihai, O. S., & Ponka, P. (2007). Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood*, *110*(1), 125–32. doi:10.1182/blood-2007-01-068148
- Shelton, M. D., Chock, P. B., & Mieyal, J. J. (2005). Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(3-4), 348–66. doi:10.1089/ars.2005.7.348
- Shen, T., Zheng, M., Cao, C., Chen, C., Tang, J., Zhang, W., ... Xiao, R.-P. (2007). Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(32), 23354–61. doi:10.1074/jbc.M702657200
- Shepherd, D., & Garland, P. B. (1969). The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *The Biochemical Journal*, *114*(3), 597–610.
- Shi, H., Bencze, K. Z., Stemmler, T. L., & Philpott, C. C. (2008). A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5880), 1207–10. doi:10.1126/science.1157643
- Shi, W., & Chance, M. R. (2008). Metallomics and metalloproteomics. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *65*(19), 3040–8. doi:10.1007/s00018-008-8189-9
- Shibata, M., Yoshimura, K., Furuya, N., Koike, M., Ueno, T., Komatsu, M., ... Uchiyama, Y. (2009). The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *382*(2), 419–23. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.039
- Shimomura, K., Galvanovskis, J., Goldsworthy, M., Hugill, A., Kaizak, S., Lee, A., ... Cox, R. D. (2009). Insulin secretion from beta-cells is affected by deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Methods in Enzymology*, *457*, 451–80. doi:10.1016/S0076-6879(09)05025-3
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., ... Puccio, H. (2004). Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal

- autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(8), 1987–95. doi:10.1523/JNEUROSCI.4549-03.2004
- Smith, L. L. (1991). Another cholesterol hypothesis: cholesterol as antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, 11(1), 47–61.
- Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M., & Field, L. J. (1996). Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *The American Journal of Physiology*, 271(5 Pt 2), H2183–9.
- Soragni, E., Herman, D., Dent, S. Y. R., Gottesfeld, J. M., Wells, R. D., & Napierala, M. (2008). Long intronic GAA*TTC repeats induce epigenetic changes and reporter gene silencing in a molecular model of Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research*, 36(19), 6056–65. doi:10.1093/nar/gkn604
- Soragni, E., Xu, C., Cooper, A., Plasterer, H. L., Rusche, J. R., & Gottesfeld, J. M. (2011). Evaluation of histone deacetylase inhibitors as therapeutics for neurodegenerative diseases. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 793, 495–508. doi:10.1007/978-1-61779-328-8_32
- Soragni, E., Xu, C., Plasterer, H. L., Jacques, V., Rusche, J. R., & Gottesfeld, J. M. (2012). Rationale for the development of 2-aminobenzamide histone deacetylase inhibitors as therapeutics for Friedreich ataxia. *Journal of Child Neurology*, 27(9), 1164–73. doi:10.1177/0883073812448533
- Souri, M., Aoyama, T., Orii, K., Yamaguchi, S., & Hashimoto, T. (1996). Mutation analysis of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency: identification and characterization of mutant VLCAD cDNAs from four patients. *American Journal of Human Genetics*, 58(1), 97–106.
- Spiteller, G. (2002). Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, 30–44.
- Stanley, C. A., Hale, D. E., Coates, P. M., Hall, C. L., Corkey, B. E., Yang, W., ... Baker, L. (1983). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in children with non-ketotic hypoglycemia and low carnitine levels. *Pediatric Research*, 17(11), 877–84. doi:10.1203/00006450-198311000-00008
- Stanley, W. C., Khairallah, R. J., & Dabkowski, E. R. (2012). Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 15(2), 122–6. doi:10.1097/MCO.0b013e32834fdaf7
- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological Reviews*, 85, 1093–1129. doi:10.1152/physrev.00006.2004
- Starkov, A. A., & Fiskum, G. (2003). Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of Neurochemistry*, 86(5), 1101–7.
- Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., & Beal, M. F. (2004). Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(36), 7779–88. doi:10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004
- Stastna, M., Chimenti, I., Marbán, E., & Van Eyk, J. E. (2010). Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. *Proteomics*, 10(2), 245–53. doi:10.1002/pmic.200900515
- Stastna, M., & Van Eyk, J. E. (2012). Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. *Proteomics*, 12(4-5), 722–35. doi:10.1002/pmic.201100346
- Stehling, O., Elsässer, H.-P., Brückel, B., Mühlhoff, U., & Lill, R. (2004). Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Human Molecular Genetics*, 13(23), 3007–15. doi:10.1093/hmg/ddh324
- Stehling, O., & Lill, R. (2013). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(7), 1–17.

- Stehling, O., Wilbrecht, C., & Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie*, *100C*, 61–77. doi:10.1016/j.biochi.2014.01.010
- Steinberg, S. F. (2012). Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *27*(3), 130–9. doi:10.1152/physiol.00009.2012
- Stokke, M. K., Rivelsrud, F., Sjaastad, I., Sejersted, O. M., & Swift, F. (2012). From global to local: a new understanding of cardiac electromechanical coupling. *Tidsskrift for Den Norske Lægeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, Ny Række*, *132*(12-13), 1457–60. doi:10.4045/tidsskr.11.1353
- Sturm, B., Bistrich, U., Schranzhofer, M., Sarsero, J. P., Rauen, U., Scheiber-Mojdehkar, B., ... Petrat, F. (2005). Friedreich's ataxia, no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts: a decrease in antioxidative capacity? *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(8), 6701–8. doi:10.1074/jbc.M408717200
- Sturm, B., Stupphann, D., Kaun, C., Boesch, S., Schranzhofer, M., Wojta, J., ... Scheiber-Mojdehkar, B. (2005). Recombinant human erythropoietin: effects on frataxin expression in vitro. *European Journal of Clinical Investigation*, *35*(11), 711–7. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01568.x
- Sugiyama, Y., Fujita, T., Matsumoto, M., Okamoto, K., & Imada, I. (1985). Effects of idebenone (CV-2619) and its metabolites on respiratory activity and lipid peroxidation in brain mitochondria from rats and dogs. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, *8*(12), 1006–17.
- Sun, C. N., Dhalla, N. S., & Olson, R. E. (1969). Formation of gigantic mitochondria in hypoxic isolated perfused rat hearts. *Experientia*, *25*(7), 763–4.
- Sun, J., & Trumpower, B. L. (2003). Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *419*(2), 198–206.
- Suno, M., & Nagaoka, A. (1984). Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound, idebenone (CV-2619). *Japanese Journal of Pharmacology*, *35*(2), 196–8.
- Sylvén, C., Lin, L., Kallner, A., & Jansson, F. (1989). Regional distribution of citrate synthase and lactate dehydrogenase isoenzymes in the bovine heart. *Acta Physiologica Scandinavica*, *136*(3), 331–337. doi:10.1111/j.1748-1716.1989.tb08673.x
- Szczepaniak, L. S., Dobbins, R. L., Metzger, G. J., Sartoni-D'Ambrosia, G., Arbique, D., Vongpatanasin, W., ... Victor, R. G. (2003). Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, *49*(3), 417–23. doi:10.1002/mrm.10372
- Tahara, E. B., Navarete, F. D. T., & Kowaltowski, A. J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology & Medicine*, *46*(9), 1283–97. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008
- Takekoshi, S., Kambayashi, Y., Nagata, H., Takagi, T., Yamamoto, Y., & Watanabe, K. (1995). Activation of protein kinase C by oxidized diacylglycerols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *217*(2), 654–60. doi:10.1006/bbrc.1995.2824
- Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., & Ros, J. (2006). Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Analytical Biochemistry*, *351*, 149–151.
- Tan, G. (2001). Frataxin expression rescues mitochondrial dysfunctions in FRDA cells. *Human Molecular Genetics*, *10*(19), 2099–2107. doi:10.1093/hmg/10.19.2099
- Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D.-F., Karbowski, M., & Youle, R. J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of Cell Biology*, *191*(7), 1367–80. doi:10.1083/jcb.201007013
- Tapia, L., González-Agüero, M., Cisternas, M. F., Suazo, M., Cambiazo, V., Uauy, R., & González, M. (2004). Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *The Biochemical Journal*, *378*(Pt 2), 617–24. doi:10.1042/BJ20031174
- Tazir, M., Bellatache, M., Nouioua, S., & Vallat, J.-M. (2013). Autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease: from genes to phenotypes. *Journal of the Peripheral Nervous System: JPNS*, *18*(2), 113–29. doi:10.1111/jns5.12026

- Teekakirikul, P., Kelly, M. a, Rehm, H. L., Lakdawala, N. K., & Funke, B. H. (2013). Inherited cardiomyopathies: molecular genetics and clinical genetic testing in the postgenomic era. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 15(2), 158–70. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.09.002
- Thierbach, R., Schulz, T. J., Isken, F., Voigt, A., Mietzner, B., Drewes, G., ... Ristow, M. (2005). Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Human Molecular Genetics*, 14(24), 3857–64.
- Tian, R. (2003). Transcriptional regulation of energy substrate metabolism in normal and hypertrophied heart. *Current Hypertension Reports*, 5(6), 454–8.
- Tomassini, B., Arcuri, G., Fortuni, S., Sandi, C., Ezzatizadeh, V., Casali, C., ... Testi, R. (2012). Interferon gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Human Molecular Genetics*, 21(13), 2855–61. doi:10.1093/hmg/dds110
- Tonin, A. M., Amaral, A. U., Busanello, E. N. B., Grings, M., Castilho, R. F., & Wajner, M. (2013). Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial trifunctional protein deficiencies uncouple oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45(1-2), 47–57. doi:10.1007/s10863-012-9481-9
- Tozzi, G., Nuccetelli, M., Lo Bello, M., Bernardini, S., Bellincampi, L., Ballerini, S., ... Piemonte, F. (2002). Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Archives of Disease in Childhood*, 86(5), 376–9.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(1), 4–15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024
- Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., & Panfili, E. (1998). Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59(4), 753–8.
- Tsushima, R. G., Wickenden, A. D., Bouchard, R. A., Oudit, G. Y., Liu, P. P., & Backx, P. H. (1999). Modulation of iron uptake in heart by L-type Ca²⁺ channel modifiers: possible implications in iron overload. *Circulation Research*, 84(11), 1302–9.
- Turrens, J. F., Alexandre, A., & Lehninger, A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237(2), 408–14.
- Turrens, J. F., & Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 191(2), 421–427.
- Twig, G., Hyde, B., & Shirihai, O. S. (2008). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777(9), 1092–7. doi:10.1016/j.bbabi.2008.05.001
- Uchida, K., & Stadtman, E. R. (1993). Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6388–93.
- Ussher, J. R., Jaswal, J. S., & Lopaschuk, G. D. (2012). Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. *Circulation Research*, 111(5), 628–41.
- Van der Lee, K. A., Vork, M. M., De Vries, J. E., Willemsen, P. H., Glatz, J. F., Reneman, R. S., ... Van Bilsen, M. (2000). Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *Journal of Lipid Research*, 41(1), 41–7.
- Van der Vusse, G. J., Glatz, J. F., Stam, H. C., & Reneman, R. S. (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiological Reviews*, 72(4), 881–940.
- Varikmaa, M., Bagur, R., Kaambre, T., Grichine, A., Timohhina, N., Tepp, K., ... Guzun, R. (2014). Role of mitochondria-cytoskeleton interactions in respiration regulation and mitochondrial organization in striated muscles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837(2), 232–45. doi:10.1016/j.bbabi.2013.10.011
- Vázquez-Acevedo, M., Antaramian, A., Corona, N., & González-Halphen, D. (1993). Subunit structures of purified beef mitochondrial cytochrome bc₁ complex from liver and heart. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 25(4), 401–10.

- Vázquez-Manrique, R. P., González-Cabo, P., Ros, S., Aziz, H., Baylis, H. A., & Palau, F. (2006). Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *20*(1), 172–4. doi:10.1096/fj.05-4212fje
- Velasco-Sánchez, D., Aracil, A., Montero, R., Mas, A., Jiménez, L., O'Callaghan, M., ... Pineda, M. (2011). Combined therapy with idebenone and deferiprone in patients with Friedreich's ataxia. *Cerebellum (London, England)*, *10*(1), 1–8. doi:10.1007/s12311-010-0212-7
- Vendelin, M., Béraud, N., Guerrero, K., Andrienko, T., Kuznetsov, A. V., Olivares, J., ... Saks, V. A. (2005). Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a “crystal-like” pattern. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *288*(3), C757–67. doi:10.1152/ajpcell.00281.2004
- Venema, R. C., Raynor, R. L., Noland, T. A., & Kuo, J. F. (1993). Role of protein kinase C in the phosphorylation of cardiac myosin light chain 2. *The Biochemical Journal*, *294* (Pt 2), 401–6.
- Ventura, N., Rea, S., Henderson, S. T., Condo, I., Johnson, T. E., & Testi, R. (2005). Reduced expression of frataxin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, *4*(2), 109–12. doi:10.1111/j.1474-9726.2005.00149.x
- Ventura-Clapier, R., Veksler, V., & Hoerter, J. A. (1994). Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *133-134*(1), 125–144. doi:10.1007/BF01267952
- Vervoort, L. M., Ronden, J. E., & Thijssen, H. H. (1997). The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, *54*(8), 871–6.
- Von Heijne, G., Steppuhn, J., & Herrmann, R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *180*, 535–545. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14679.x
- Wagner, G. R., Pride, P. M., Babbey, C. M., & Payne, R. M. (2012). Friedreich's ataxia reveals a mechanism for coordinate regulation of oxidative metabolism via feedback inhibition of the SIRT3 deacetylase. *Human Molecular Genetics*, *21*(12), 2688–97. doi:10.1093/hmg/ddc095
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science (New York, N.Y.)*, *283*(5407), 1482–1488. doi:10.1126/science.283.5407.1482
- Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics*, *39*, 359–407. doi:10.1146/annurev.genet.39.110304.095751
- Wallimann, T., & Eppenberger, H. M. (1985). Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle. *Cell and Muscle Motility*, *6*, 239–85.
- Walter, P. B., Knutson, M. D., Paler-Martinez, A., Lee, S., Xu, Y., Viteri, F. E., & Ames, B. N. (2002). Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(4),
- Walters, M. R., Ilenchuk, T. T., & Claycomb, W. C. (1987). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by cultured adult rat ventricular cardiac muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(6), 2536–41.
- Wamelink, M. M. C., Struys, E. A., & Jakobs, C. (2008). The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *31*(6), 703–17. doi:10.1007/s10545-008-1015-6
- Wanders, R. J. A., Komen, J., & Kemp, S. (2011). Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *The FEBS Journal*, *278*(2), 182–94. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07947.x
- Wang, J., & Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *The Biochemical Journal*, *434*(3), 365–81. doi:10.1042/BJ20101825
- Wang, T., & Craig, E. A. (2008). Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(18), 12674–9. doi:10.1074/jbc.M800399200
- Wang, X. M., Terasaki, P. I., Rankin, G. W., Chia, D., Zhong, H. P., & Hardy, S. (1993). A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Human Immunology*, *37*, 264–270. doi:10.1016/0198-8859(93)90510-8

- Wang, Y., Mohsen, A.-W., Mihalik, S. J., Goetzman, E. S., & Vockley, J. (2010). Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(39), 29834–41. doi:10.1074/jbc.M110.139493
- Welinder, C., & Ekblad, L. (2011). Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *Journal of Proteome Research*, *10*(3), 1416–9. doi:10.1021/pr1011476
- Wells, L., Gao, Y., Mahoney, J. A., Vosseller, K., Chen, C., Rosen, A., & Hart, G. W. (2002). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(3), 1755–61.
- Wells, R. D. (2008). DNA triplexes and Friedreich ataxia. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *22*(6), 1625–34. doi:10.1096/fj.07-097857
- West, A.-R., & Oates, P.-S. (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *14*(26), 4101–10.
- Whisler, R. L., Goyette, M. A., Grants, I. S., & Newhouse, Y. G. (1995). Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *319*, 23–35. doi:10.1006/abbi.1995.1263
- Wilson, R. B. (2012). Therapeutic developments in Friedreich ataxia. *Journal of Child Neurology*, *27*(9), 1212–6. doi:10.1177/0883073812449691
- Wilson, R. B., Lynch, D. R., & Fischbeck, K. H. (1998). Normal serum iron and ferritin concentrations in patients with Friedreich's ataxia. *Annals of Neurology*, *44*(1), 132–4. doi:10.1002/ana.410440121
- Wilson, R. B., & Roof, D. M. (1997). Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nature Genetics*, *16*(4), 352–7. doi:10.1038/ng0897-352
- Winckler, J. (1974). [Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red (author's transl)]. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, *6*(3), 1–91.
- Wink, D. A., & Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine*, *25*(4-5), 434–56.
- Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, *45*(5), 549–61. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004
- Woodcock, E. a, & Matkovich, S. J. (2005). Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *37*(9), 1746–51.
- Xia, H., Cao, Y., Dai, X., Marelja, Z., Zhou, D., Mo, R., ... Li, K. (2012). Novel frataxin isoforms may contribute to the pathological mechanism of Friedreich ataxia. *PloS One*, *7*(10), e47847. doi:10.1371/journal.pone.0047847
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., & Stefanis, L. (2009). Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PloS One*, *4*, e5515. doi:10.1371/journal.pone.0005515
- Xiong, Y., & Guan, K.-L. (2012). Mechanistic insights into the regulation of metabolic enzymes by acetylation. *The Journal of Cell Biology*, *198*(2), 155–64. doi:10.1083/jcb.201202056
- Yamashita, N., Nishida, M., Hoshida, S., Kuzuya, T., Hori, M., Taniguchi, N., ... Tada, M. (1994). Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *The Journal of Clinical Investigation*, *94*(6), 2193–9.
- Yan, L. J., Levine, R. L., & Sohal, R. S. (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(21), 11168–72.
- Yang, G. Q., Chen, J. S., Wen, Z. M., Ge, K. Y., Zhu, L. Z., Chen, X. C., & Chen, X. S. (1984). The role of selenium in Keshan disease. *Advances in Nutritional Research*, *6*, 203–31.

- Yang, Q., & Li, Y. (2007). Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *85*, 697–706. doi:10.1007/s00109-007-0170-9
- Yin, F., Sancheti, H., & Cadenas, E. (2012). Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1817*(3), 401–9. doi:10.1016/j.bbabi.2011.12.004
- Yoon, H., Golla, R., Lesuisse, E., Pain, J., Donald, J. E., Lyver, E. R., ... Dancis, A. (2012). Mutation in the Fe-S scaffold protein Isu bypasses frataxin deletion. *The Biochemical Journal*, *441*(1), 473–80. doi:10.1042/BJ20111637
- Yoon, H., Knight, S. A. B., Pandey, A., Pain, J., Zhang, Y., Pain, D., & Dancis, A. (2014). Frataxin-bypassing Isu1: characterization of the bypass activity in cells and mitochondria. *The Biochemical Journal*.
- Yoon, T., & Cowan, J. A. (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(20), 6078–84. doi:10.1021/ja027967i
- Yoon, T., & Cowan, J. A. (2004). Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(25), 25943–6.
- Yoon, T., Dizin, E., & Cowan, J. A. (2007). N-terminal iron-mediated self-cleavage of human frataxin: regulation of iron binding and complex formation with target proteins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, *12*(4), 535–42. doi:10.1007/s00775-007-0205-2
- Zachara, N. E., O'Donnell, N., Cheung, W. D., Mercer, J. J., Marth, J. D., & Hart, G. W. (2004). Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(29), 30133–
- Zanella, I., Derosas, M., Corrado, M., Cocco, E., Cavadini, P., Biasotto, G., ... Arosio, P. (2008). The effects of frataxin silencing in HeLa cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1782*(2), 90–8. doi:10.1016/j.bbadis.2007.11.006
- Zarse, K., Schulz, T. J., Birringer, M., & Ristow, M. (2007). Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in *Caenorhabditis elegans* models of Friedreich Ataxia. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *21*(4), 1271–5. doi:10.1096/fj.06-6994com
- Zhang, A.-S., Sheftel, A. D., & Ponka, P. (2005). Intracellular kinetics of iron in reticulocytes: evidence for endosome involvement in iron targeting to mitochondria. *Blood*, *105*(1), 368–75. doi:10.1182/blood-2004-06-2226
- Zhang, J., Ye, J., Altafaj, A., Cardona, M., Bahi, N., Llovera, M., ... Sanchis, D. (2011). EndoG links Bnip3-induced mitochondrial damage and caspase-independent DNA fragmentation in ischemic cardiomyocytes. *PloS One*, *6*(3), e17998. doi:10.1371/journal.pone.0017998
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, *454*(7203), 455–62. doi:10.1038/nature07203
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L. W., ... Kim, S. H. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature*, *392*(6677), 677–84.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., ... Guan, K.-L. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5968), 1000–4. doi:10.1126/science.1179689
- Zhou, L., Vessby, B., & Nilsson, A. (2002). Quantitative role of plasma free fatty acids in the supply of arachidonic acid to extrahepatic tissues in rats. *The Journal of Nutrition*, *132*, 2626–2631.
- Zhu, H., Zhang, L., Amin, A. R., & Li, Y. (2008). Coordinated upregulation of a series of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes as a novel strategy for protecting renal tubular cells from oxidative and electrophilic stress. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *233*(6), 753–65. doi:10.3181/0801-RM-5

- Zhu, W.-Z., Van Biber, B., & Laflamme, M. A. (2011). Methods for the derivation and use of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 767, 419–31. doi:10.1007/978-1-61779-201-4_31
- Zmijewski, J. W., Landar, A., Watanabe, N., Dickinson, D. A., Noguchi, N., & Darley-Usmar, V. M. (2005). Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 6), 1385–9. doi:10.1042/BST20051385

ARTICLES

ARTICLES

Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets mitochondria and lipid metabolism.

Obis,E., Irazusta,V., Sanchís,D., Ros,J. and Tamarit,J.

Free Radic. Biol. Med. (2014), **73**, 21–33. IF: 5.710

Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein.

Mincheva-Tasheva,S., Obis,E., Tamarit,J. and Ros,J.

Hum. Mol. Genet. (2013), **23**, 1829–41. IF: 6.677

Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides.

Tamarit,J., de Hoogh A., Obis,E., Alsina,D., CabiscoI,E. and Ros,J., and

J. Proteomics (2012), **75**, 3778–3788. IF: 4.906

Frataxin depletion in yeast triggers up-regulation of iron transport systems before affecting iron-sulfur enzyme activities.

Moreno-Cermeño,A., Obis,E., Bellí,G., CabiscoI,E., Ros,J. and Tamarit,J.

J. Biol. Chem (2010), **285**, 41653–64. IF: 5.328

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

Irazusta,V., Obis,E., Moreno-Cermeño,A., CabiscoI,E., Ros,J. and Tamarit,J.

Free Radic. Biol. Med (2010), **48**, 411–20. IF: 5.707

