



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica

Caracterización bioquímica de una aconitasa mitocondrial de mamífero

Autor: Br. Santiago Mansilla Marchetti

Tutor: Dra. Laura Castro

Co-tutor: Dra. Verónica Tórtora

Montevideo, Uruguay
2017



CEINBIO

Centro de Investigaciones Biomédicas

Muchos agradecimientos a Laura y a Verónica por todo su apoyo y guía en la trayectoria de este trabajo y en todos los futuros.

A Karen, mi amor, a quien le agradezco de la manera más sincera por su compañía durante el desarrollo de esta tesis, y por sus incontables apoyos para mi vida.

A mi familia por estar siempre apoyando y por haber estado allí desde el comienzo. Gracias María, Mario, Joaquín y Noelia.

Al Dr. Rafael Radi y a todos mis compañeros del Departamento, aquellos que han aportado algo a este trabajo, cada uno a su manera única.

En memoria de José Gómez, el papá de Karen, que la quiso y la adoró más que a nada en el mundo.

Tabla de contenido

Resumen.....	VI
Tabla de figuras	VIII
Introducción	1
Aconitasa mitocondrial.....	1
Especies reactivas.....	8
Estrés oxidativo	9
Especies reactivas del oxígeno (ROS)	11
Especies reactivas del nitrógeno (RNS)	13
Objetivos	16
Objetivo General	16
Objetivos específicos	16
Materiales y métodos:	17
Materiales.....	17
Plásmido	18
Aislamiento del plásmido por miniprep	18

Expresión de aconitasa mitocondrial unida a GST.	20
Purificación de la mACO2	21
Determinación de la pureza	22
Western blot.....	23
Activación de la aconitasa	24
Determinación de la actividad específica.....	24
Gel de actividad aconitasa.....	24
Dependencia de la actividad con el pH	26
Preparación de la aconitasa para la exposición a oxidantes.....	26
Exposición a oxidantes	26
Resultados y discusión	28
Purificación del plásmido	28
Análisis de la secuencia	29
Purificación de la aconitasa mitocondrial.	33
Determinación de peso molecular	36
Actividad aconitasa.....	39
Determinación del K_M de la aconitasa mitocondrial murina	41
Gel de actividad aconitasa.....	47
Exposición a $ONOO^-$ y determinación de la constante de reacción.....	48

Exposición a H ₂ O ₂ y determinación de la constante de reacción	50
Reactivación de la aconitasa tras la exposición a oxidantes.....	53
Conclusiones y perspectivas	55
Bibliografía	57

Resumen

La aconitasa mitocondrial (ACO2), es una enzima esencial del ciclo de Krebs que cataliza la isomerización reversible de citrato a isocitrato mediante un intermediario *cis*-aconitato. Esta enzima, que posee un centro [4Fe-4S] en su sitio activo, ha sido identificada como uno de los principales blancos de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, siendo preferencialmente modificada e inactivada por oxidantes durante el envejecimiento y en patologías que cursan con disfunción mitocondrial. El objetivo de este trabajo fue la expresión, purificación y caracterización bioquímica de una ACO2 de mamífero expresada como proteína de fusión con glutatión S-transferasa.

Se logró purificar una ACO2 recombinante murina, con una pureza del 91%. Se obtuvo información importante sobre el plásmido y el gen codificante ya que no se contaba con información suficiente al comenzar el trabajo; y se determinó el peso molecular de la enzima de $90,1 \pm 5,3$ kDa. Se determinó la actividad enzimática por ensayo directo, acoplado y gel de actividad, pudiéndose determinar los K_M para los tres sustratos: 624 ± 28 μM para citrato, 838 ± 33 μM para isocitrato y $11,7 \pm 1,1$ μM para *cis*-aconitato.

Se calcularon las constantes de reacción de segundo orden de la ACO2 murina con peroxinitrito y peróxido de hidrógeno obteniéndose valores de $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente, en el orden de los reportados previamente para otras especies. La inactivación de la ACO2 murina mostró ser

reversible tras la incubación con hierro, azufre y un agente reductor en condiciones anaerobias, evidenciando la reactividad de los oxidantes con el centro ferrosulfurado.

Palabras clave: aconitasa mitocondrial, ACO₂, caracterización, estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

Tabla de figuras

Figura 1. <i>Reacciones catalizadas por la aconitasa</i>	1
Figura 2. <i>Mecanismo de reacción de la aconitasa</i>	2
Figura 3. <i>Estructura de la ACO2</i>	4
Figura 4. <i>Sitio activo de la aconitasa</i>	5
Figura 5. <i>Reacción del clúster [4Fe-4S] con $O_2^{\bullet-}$</i>	6
Figura 6. <i>Especies reactivas del oxígeno a nivel celular</i>	10
Figura 7. <i>Potenciales de reducción de las especies derivadas del oxígeno</i>	11
Figura 8. <i>Reacciones involucradas en el gel de actividad</i>	25
Figura 9. <i>Purificación del plásmido de la mACO2-GST por miniprep</i>	28
Figura 10. <i>Plásmido pGEX-4T1</i>	32
Figura 11. <i>Purificación de la ACO2 murina, SDS-Page y Western blot</i>	33
Figura 12. <i>Gráfico para determinación de peso molecular por SDS-Page</i>	36
Figura 13. <i>Esquema representativo de la proteína de fusión</i>	38
Figura 14. <i>Actividad aconitasa</i>	40
Figura 15. <i>Cinética michaeliana de la mACO2 para citrato</i>	43
Figura 16. <i>Cinética michaeliana de la mACO2 para isocitrato</i>	44
Figura 17. <i>Cinética michaeliana de la mACO2 para cis-aconitato</i>	45
Figura 18. <i>Gel de actividad aconitasa</i>	47
Figura 19. <i>Inhibición de la aconitasa mitocondrial por $ONOO^-$</i>	49
Figura 20. <i>Constante de reacción entre la aconitasa mitocondrial y $ONOO^-$</i>	49

Figura 21. <i>Constante de reacción entre la aconitasa mitocondrial y H_2O_2.....</i>	50
Figura 22. <i>Inactivación de la mACO2 por el oxígeno molecular</i>	52
Figura 23. <i>Reactivación de la enzima tras la incubación con $ONOO^-$ y H_2O_2.....</i>	53

Introducción

Aconitasa mitocondrial

La aconitasa mitocondrial [citrato (isocitrato) hidrolasa, EC.4.2.1.3], es una enzima localizada en la matriz mitocondrial que cataliza la isomerización reversible de citrato a isocitrato mediante un intermediario *cis*-aconitato en el ciclo de Krebs¹ (figura 1). En condiciones de equilibrio a pH 7,4 y 25 °C la proporción de sustratos es de 91% citrato, 6% isocitrato y 3% *cis*-aconitato ($\Delta G^{\circ} = 6,3$ kJ/mol), pero a pesar de la baja concentración de isocitrato, a nivel celular, la reacción es favorecida por el rápido consumo del mismo en el siguiente paso del ciclo de Krebs (oxidación de isocitrato por la isocitrato deshidrogenasa [$\Delta G^{\circ} = -8,4$ kJ/mol])².

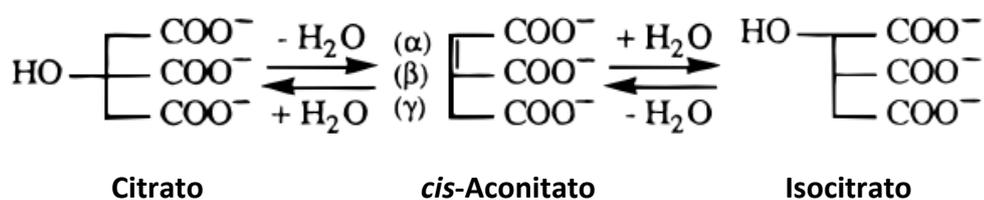


Figura 1. Reacciones catalizadas por la aconitasa¹.

Para la catálisis, la enzima requiere de un grupo prostético $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ donde tres de los cuatro átomos de hierro están coordinados por cisteínas proteicas

mientras que el cuarto átomo (Fe_{α}), se une a los grupos carboxilo e hidroxilo de sus sustratos, o al agua. El centro ferrosulfurado de la aconitasa no participa en reacciones redox, como lo hace en la mayoría en las enzimas, sino que se une a un grupo OH del citrato o del isocitrato para facilitar su eliminación.

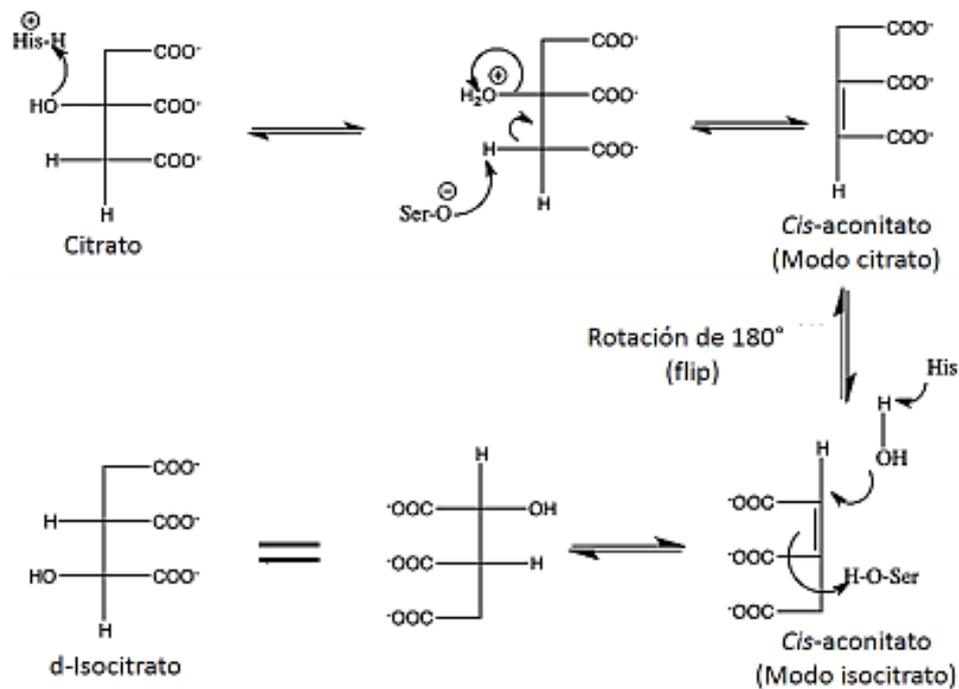


Figura 2. Mecanismo de reacción de la aconitasa¹.

El mecanismo de reacción (figura 2), se puede dividir en tres fases, una de deshidratación, una de rotación y otra de rehidratación. (I) En la deshidratación, el grupo OH unido al centro Fe-S es protonado y removido formando el

cis-aconitato (“modo citrato” si el sustrato es citrato o “modo isocitrato” si es isocitrato). (II) Para la rehidratación es necesario que la molécula rote 180° para cambiar su “modo”, lo que no ocurre en un solo paso. Una molécula de *cis*-aconitato desplaza la unida, lo que puede resultar en un cambio del “modo”. (III) Una vez que éste se une de manera adecuada, es rehidratado formando el producto final¹.

La reacción catalizada por la aconitasa es estereoespecífica. El isocitrato posee dos carbonos asimétricos, por lo que partiendo de citrato sería posible la formación de cuatro posibles esteroisómeros de isocitrato, pero la reacción solo produce uno de estos, el D-isocitrato. La enzima tiene un sitio de unión asimétrico para el citrato, lo que permite que el sustrato se una solamente en una orientación específica. De esta manera la transferencia del grupo hidroxilo ocurre solamente si están dadas las condiciones apropiadas de orientación³.

La aconitasa mitocondrial es una proteína altamente conservada y presenta una gran homología entre mamíferos, siendo la porcina la más estudiada hasta la fecha. La aconitasa mitocondrial porcina, cuyo peso es de 83 kDa (figura 3), se encuentra dividida en cuatro dominios, de los cuales los primeros 3 desde el extremo N-terminal están fuertemente asociados y forman una cavidad donde está localizado el sitio activo de la enzima. El dominio C-terminal está unido a los otros tres por un segmento denominado “hinge-linker” (bisagra de unión) y su

forma es complementaria a la superficie formada por los otros tres, sin embargo la interface está ocupada con moléculas de solvente¹.

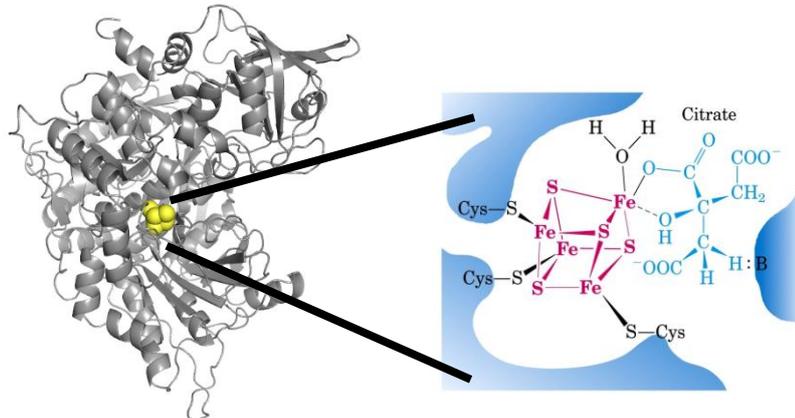


Figura 3. Estructura de la ACO2. Cristalografía de la ACO2 de corazón de cerdo, junto a la estructura del centro [4Fe-4S]. Debido a la pérdida de este centro durante la purificación este centro se descompone, por lo que es necesario un paso de activación previo incubando la enzima en un medio anaerobio con un donador de hierro, azufre y un agente reductor a pH 7,8, como el de la matriz mitocondrial. Modificada de Lehninger 5ta edición⁴. Estructura molecular generada con la herramienta Pymol⁵, a partir de la estructura de código 5ACN de PDB⁶.

El sitio activo de la enzima está compuesto, además de por el centro Fe-S, por 21 aminoácidos pertenecientes a los cuatro dominios. Estas cadenas laterales comprenden una gran cavidad polar que al interactuar con el sustrato forma una compleja red de enlaces de hidrógeno (figura 4). Todo esto podría ser en parte, la razón del gran tamaño de la proteína¹.

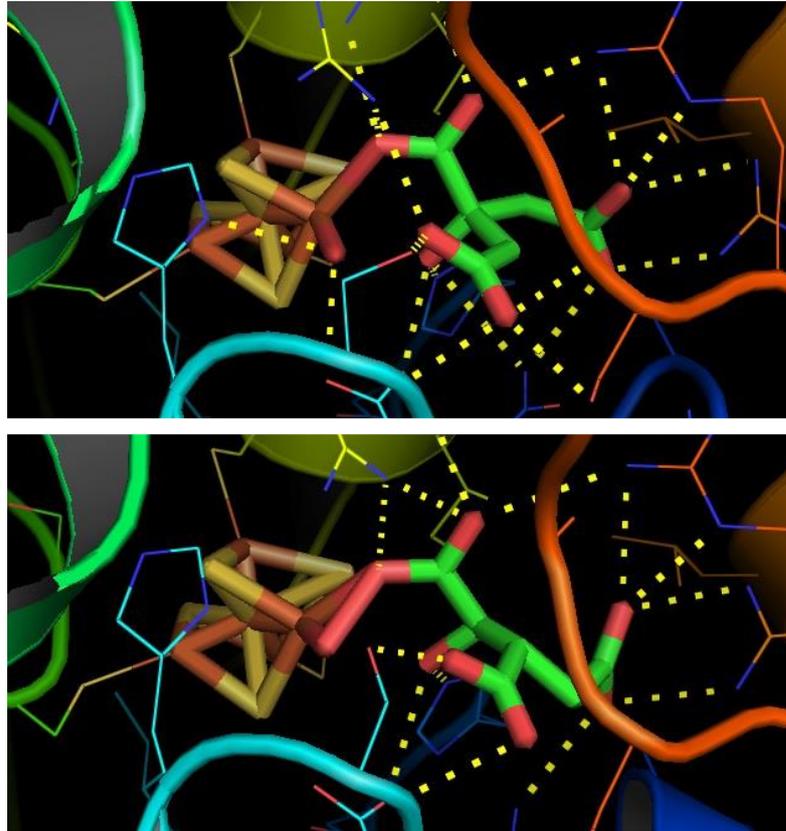


Figura 4. *Sitio activo de la aconitasa.* Se visualiza el centro Fe-S y los aminoácidos localizados en el sitio activo en presencia de citrato (arriba) e isocitrato (abajo). Las líneas amarillas punteadas muestran la interacción entre el sustrato y los residuos adyacentes ^{7,8}.

La aconitasa es una enzima esencial, particularmente sensible al daño oxidativo siendo preferencialmente modificada e inactivada por oxidantes mitocondriales durante el envejecimiento y en patologías que cursan con disfunción mitocondrial⁹. La alta reactividad de la aconitasa con los oxidantes mitocondriales se debe a la presencia del centro [4Fe-4S] con el Fe_α lábil en su sitio activo. En particular, esta enzima ha sido identificada como uno de los principales blancos del radical superóxido (O₂^{•-}) (figura 5).

Por ser esta reacción altamente selectiva, se ha utilizado a la relación entre la ACO2 activa e inactiva como método para determinar la concentración de $O_2^{\bullet-}$ intramitocondrial¹⁰. La reactividad se le atribuye al carácter electrofílico del Fe_{α} , la gran nucleofilia del $O_2^{\bullet-}$, el aumento del potencial oxidativo del $O_2^{\bullet-}$ en su estado de unión al hierro y la sensibilidad de los enlaces hierro-azufre a la oxidación¹¹.

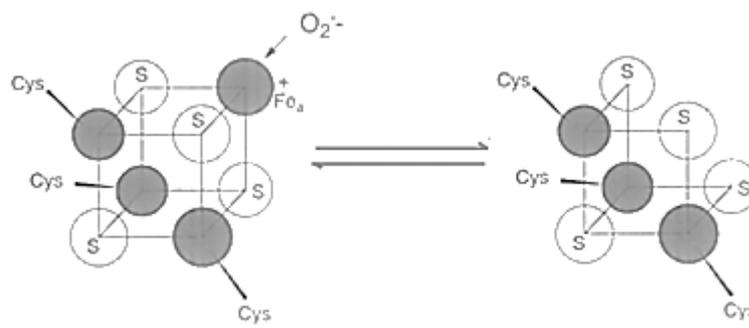


Figura 5. Reacción del clúster [4Fe-4S] con $O_2^{\bullet-}$. Pérdida del hierro lábil del centro Fe-S con la consecuente formación de un centro [3Fe-4S] inactivo y la liberación de hierro. La reacción es reversible ya que es posible reconstituir el centro al incubar la enzima con hierro, azufre y DTT en condiciones anaerobias¹¹.

Además como ha sido mostrado por nuestro grupo, la actividad de la aconitasa es sensible al óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) y el radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), especies de las cuales hablaremos más adelante¹².

La aconitasa mitocondrial porcina presenta una identidad de secuencia del 97% con la aconitasa humana. Los residuos que integran el sitio activo son altamente conservados entre especies no solo de mamíferos sino también entre plantas y bacterias¹.

Al menos en levaduras, esta enzima también cumple un rol importante en la asociación y el mantenimiento del ADN mitocondrial mediante la formación de nucleoides¹³. Además, es capaz de unirse a ARN de origen viral estabilizándolo y promoviendo la traducción de proteínas virales¹⁴.

Se ha visto que la aconitasa mitocondrial es susceptible a la acetilación no enzimática por metabolitos como el acetil-CoA, lo cual modularía su actividad funcionando como sensor de la disponibilidad de nutrientes¹⁵.

La deficiencia de aconitasa está relacionada con miopatías y baja resistencia al ejercicio físico¹⁶. Recientemente se ha descubierto que determinadas variantes de la aconitasa son causantes del síndrome de degeneración cerebelo-retinal infantil, caracterizado por diversos síntomas neurológicos y musculares¹⁷.

La aconitasa tiene una isoforma citosólica (ACO1), denominada también como IRP1 (iron regulatory protein 1). Esta enzima responde a los niveles de hierro intracelular alternándose entre dos estados funcionales: la que posee el centro ferrosulfurado con actividad aconitasa y la apoproteína que funciona como regulador postranscripcional. Ante niveles bajos de hierro, la apoproteína se une a IREs (Iron Responsive Elements) localizados en las UTR (UnTranslated Regions) del 5' o 3' del ARN mensajero de proteínas involucradas en la captación, la utilización y el almacenamiento del hierro como la ferritina o los receptores de transferrina¹⁸. El rol de la actividad aconitasa de la ACO1 permite conservar el balance entre el NADPH generado desde el isocitrato por la isocitrato

deshidrogenasa con el acetyl-CoA generado del citrato por la citrato liasa, regulando la glucólisis, la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos¹⁹.

Especies reactivas

En 1954, Rebeca Gerschman publicó un artículo en la revista Science, donde postuló que la toxicidad producida por altas presiones de oxígeno y la producida por rayos-X podrían compartir un mecanismo de acción vía radicales libres. También allí se demuestra que diferentes sustancias que protegen contra el daño por rayos-X también aumentan el tiempo de vida de ratones expuestos a altas presiones de oxígeno²⁰. Posteriormente, en 1956, Denham Harman propuso el concepto de que los radicales libres tenían un rol en el proceso de envejecimiento²¹. Este trabajo fue uno de los que impulsó la investigación del campo de los radicales libres en los sistemas biológicos.

McCord y Fridovich descubrieron en 1969 la enzima superóxido dismutasa (SOD), la primer enzima hallada cuyo sustrato era un radical libre²². Desde entonces se ha acumulado evidencia sobre cómo los sistemas vivos no solo se han adaptado a la coexistencia con los radicales libres, sino que han desarrollado diversos mecanismos para su uso en funciones fisiológicas.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las especies reactivas del nitrógeno (RNS), son subproductos del metabolismo celular normal. Algunas de las

funciones fisiológicas que involucran radicales libres o derivados incluyen la regulación del tono vascular, detección de la tensión de oxígeno y regulación de funciones controladas por la concentración de oxígeno, la transducción de señales y la respuesta ante el estrés oxidativo, asegurando la homeostasis redox. Por otra parte, cuando se producen en cantidades superiores, son capaces de dañar los lípidos celulares, proteínas, o incluso el ADN, afectando el funcionamiento normal de las células e iniciando procesos patológicos²³.

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo puede definirse como la pérdida del equilibrio entre oxidantes y la capacidad de los sistemas biológicos de detoxificar los reactivos intermedios o de reparar el daño resultante²⁴.

Esto puede producir daños en los tejidos y es un factor que contribuye de gran manera en diversas enfermedades crónicas humanas, entre las que se encuentran el cáncer, la enfermedad de Parkinson, aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y la diabetes entre otras²⁵.

El delicado balance entre los efectos perjudiciales y beneficiosos de los radicales libres es un aspecto muy importante para los seres vivos y es mantenido mediante mecanismos denominados “regulación redox”. Estos procesos

protegen a los organismos y mantienen la “homeostasis redox” controlando el estado redox *in vivo* (figura 6)²³.

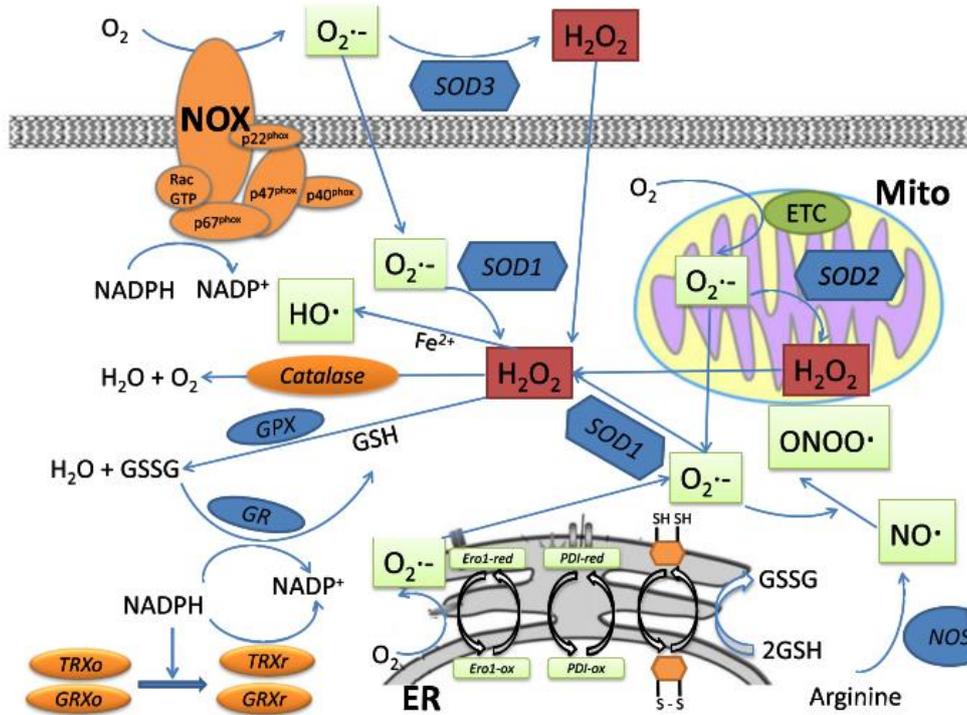


Figura 6. Especies reactivas del oxígeno a nivel celular. Las ROS celulares están conformadas por especies radicales y no radicales. Son formadas principalmente en tres sitios: la cadena de transporte de electrones (ETC), el retículo endoplásmico (ER) y el complejo NOX. Las ROS (superóxido [O₂^{•-}], peroxinitrito [ONOO⁻], peróxido de hidrógeno [H₂O₂], radical hidroxilo [*OH], óxido nítrico [*NO]) son eliminadas por un gran número de enzimas detoxificantes entre las que se incluye la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPX). El NADPH y el glutatión (GSH) participan en el mantenimiento del estado redox reducido. En el estado reducido tanto las tiorredoxinas (TRx) como las glutaredoxinas (GRx) reducen los disulfuros y se oxidan. Las GRx vuelven a reducirse utilizando glutatión (GSH), el cual a su vez es regenerado por la NADPH-glutatión reductasa (NADPH-GR). Por su parte, las TRx son reducidas nuevamente por la NADPH tiorredoxina reductasa (NADP-TRxR). Las óxido nítrico sintasas (NOS) son enzimas clave para la producción y la regulación del óxido nítrico²⁶.

Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados. Son por lo general inestables, tienden a ser altamente reactivos y poseen vida media corta.

El oxígeno molecular es un di-radical estable que posee dos electrones desapareados localizados en orbitales pi antienlazantes. Una consecuencia de esto es que no es posible transferir al oxígeno más de un electrón a la vez. El oxígeno es un aceptor electrónico débil, lo que conlleva que no pueda fácilmente oxidar aminoácidos y ácidos nucleicos, sin embargo debido a sus electrones desapareados, puede reaccionar con metales de transición y metales orgánicos. Muchas de las propiedades del oxígeno molecular y sus especies reducidas se derivan de sus potenciales de reducción y la estructura de sus orbitales moleculares (figura 7).

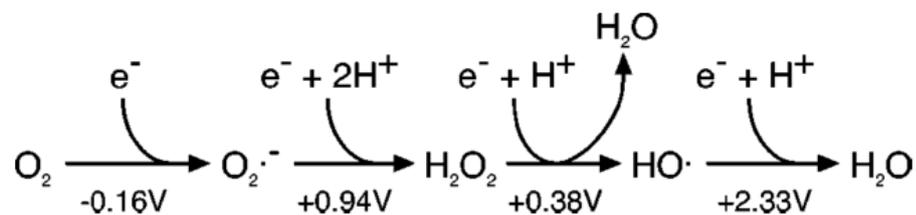


Figura 7. Potenciales de reducción de las especies derivadas del oxígeno²⁷.

En condiciones normales, las ROS intracelulares son generadas principalmente en la cadena respiratoria. Durante la transducción de la energía, algunos

electrones escapan de la cadena de transporte electrónica llegando al oxígeno. Las ROS dan cuenta del 1 al 2% del consumo de oxígeno mitocondrial²⁸.

Las principales fuentes de ROS a nivel mitocondrial son los complejos I, III y las flavo-deshidrogenasas^{23,29}.

El anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es formado cuando el oxígeno acepta un electrón. Químicamente es capaz de actuar como oxidante o como reductor y se le considera una ROS primaria. Es capaz de interactuar con otras moléculas formando ROS secundarias, ya sea directamente o en procesos catalizados por enzimas o metales.

Las enzimas superóxido dismutasas (SODs), catalizan la reacción de dismutación del superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), con una constante de velocidad de las más altas conocidas para una reacción enzimática, del orden de $10^9 M^{-1}s^{-1}$ ²³. Además se encuentran en concentraciones altas en el medio intracelular, superiores a $10 \mu M$, por lo que la reacción con cualquier otro blanco potencial debe ser suficientemente rápida para competir con esta vía^{25,28}.

La única especie capaz de dañar directamente la mayor parte de las biomoléculas es el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Este es formado cuando un ión ferroso transfiere un electrón al H_2O_2 , vía la reacción de Fenton:



El radical hidroxilo es capaz de oxidar a la mayor parte de las moléculas orgánicas a una velocidad controlada por difusión. Su mayor impacto reside en las modificaciones que es capaz de hacerle al ADN, ya que una lesión al ADN es potencialmente mutagénica o incluso letal²⁷.

Especies reactivas del nitrógeno (RNS)

Las RNS son las especies derivadas del radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), el cual es producido en los tejidos biológicos por enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), que catalizan la conversión de arginina a citrulina con la formación de $\cdot\text{NO}$. Esta molécula funciona como mediador en la regulación del tono vascular, neurotransmisión e inmunidad, entre otros efectos metabólicos y señalizadores.

La reacción del $\cdot\text{NO}$ con $\text{O}_2\cdot^-$ conduce a la formación de peroxinitrito (ONOO^-). Esta reacción ocurre biológicamente incluso en presencia de las SODs, indicando que ocurre a una velocidad que compite con la dismutación del $\text{O}_2\cdot^-$ ³⁰.

El ONOO^- está en equilibrio con su forma protonada, el ácido peroxinitroso (ONOOH) siendo su pKa de 6,8, por tanto en condiciones fisiológicas, ambas formas estarán presentes. El ONOOH puede descomponerse por homólisis, formando el radical dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y $\cdot\text{OH}$ ³⁰.

El $\cdot\text{OH}$ como se mencionó previamente, es un oxidante muy potente, y reacciona con un gran número de biomoléculas a muy alta velocidad. A su vez el $\cdot\text{NO}_2$ también es un oxidante fuerte, y es un intermediario clave en reacciones de nitración^{23,30}.

Otra de las especies oxidantes que juega un papel importante en interacción con las RNS, es el radical carbonato ($\text{CO}_3\cdot^-$). Ha sido demostrado que su formación ocurre en presencia de ONOO^- y CO_2 , por lo que podría generarse en muchas condiciones biológicamente relevantes. Ya que los sistemas biológicos presentan concentraciones milimolares de CO_2 , es razonable proponer que el $\text{CO}_3\cdot^-$ tiene una gran implicancia biológica²⁹. En presencia de CO_2 , el ONOO^- forma el aducto nitroso-peroxocarboxilato (ONOOCO_2^-), el cual por homólisis rinde $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{CO}_3\cdot^-$ ¹⁹.

Las proteínas mitocondriales son uno de los principales blancos de especies nitrantes derivadas del óxido nítrico, lo que resulta en la formación de 3-nitrotirosina, una modificación postraducciona que puede tener efectos tanto a nivel estructural como funcional. La nitración ocurre en un proceso de dos pasos: inicialmente la tirosina es oxidada a radical tirosilo por oxidantes como el $\text{CO}_3\cdot^-$, el $\cdot\text{OH}$ o el $\cdot\text{NO}_2$ o por radicales peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) en membranas. Posteriormente se da la adición del $\cdot\text{NO}_2$ al radical tirosilo en una reacción de terminación radical-radical⁹.

El $\text{CO}_3^{\cdot-}$ es un oxidante de un electrón, más selectivo frente al anillo fenol de la tirosina que el $\cdot\text{OH}$, por lo que la nitración por peroxinitrito tiende a aumentar en presencia de CO_2^9 .

Objetivos

Objetivo general

Purificar y realizar la caracterización bioquímica de una aconitasa mitocondrial de mamífero, y evaluar su sensibilidad a especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

Objetivos específicos

1. Expresar la aconitasa mitocondrial recombinante (mACO2) a partir de un plásmido que codifica para la proteína de fusión aconitasa 2-glutatión S-transferasa (mACO2-GST).
2. Purificar la aconitasa mitocondrial con alto rendimiento y grado de pureza.
3. Reconstruir el centro ferro-sulfurado, y efectuar medidas de actividad de la aconitasa mitocondrial.
4. Realizar la caracterización cinética de la aconitasa mitocondrial.
5. Exponer la aconitasa mitocondrial a sistemas oxidantes definidos, evaluar su actividad y determinar de las constantes de reacción.

Materiales y métodos:

Materiales

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. (USA): triptona, hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de sodio (NaCl) ampicilina, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Trizma base, citrato de sodio, isocitrato de sodio, *cis*-aconitato de sodio, Tritón X-100, azida de sodio, sulfato amónico ferroso ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$), sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), ditioneitol (DTT), cloruro de magnesio (MgCl_2), NADP^+ , isocitrato deshidrogenasa, trombina bovina, dodecil sulfato de sodio (SDS), metil tiazol tetrazolio (MTT), fenazina metosulfato (PMS), glicina, borato, EDTA, bromuro de etidio, medio Luria-Bertoni (LB) y LB-agar.

El peroxinitrito, fue sintetizado en nuestro laboratorio en un reactor de flujo detenido a partir de NaNO_2 y H_2O_2 según se describe en ³². Soluciones de NaNO_2 (0,6 M) y H_2O_2 (0,6 M) fueron bombeadas juntas y el ácido peroxinitroso formado fue rápidamente atrapado en NaOH 1,5 mM. La solución es conservada a -80 °C. El H_2O_2 remanente de la síntesis fue eliminado por la adición de dióxido de manganeso (MnO_2) granular que, una vez que reaccionó, fue separado por centrifugación. Su concentración fue determinada espectrofotométricamente a 302 nm en NaOH 5 mM fresco ($\epsilon = 1.670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

El extracto de levadura, DNAsa I, Tween 20, agarosa, y bis-acrilamida fueron adquiridos de Panreac Applichem GmbH. (Hannover, Alemania).

La resina glutatión agarosa fue adquirida de Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon, USA) y la Sephadex G-25 de Sigma-Aldrich Co.

El anticuerpo primario α -aconitasa 2 (ab71440), fue obtenido de Abcam (Cambridge, UK). El anticuerpo secundario α -conejo (IRDye 800CW) fue adquirido de Li-Cor (Lincoln, Nebraska USA).

El gas argón se adquirió en AGA (Montevideo, Uruguay).

Las soluciones se prepararon en agua desionizada (Barnstead Smart2Pure).

Plásmido

El plásmido con el gen de la aconitasa mitocondrial de mamífero recombinante unida a glutatión S-transferasa (mACO2-GST), con sitio de corte para trombina y resistencia a ampicilina fue cedido por el Dr. Javier Santos (IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina), obtenido de la Dra. Hélène Puccio del IGBMC (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Francia). Los donantes no dieron detalles sobre la secuencia de la construcción del plásmido.

Aislamiento del plásmido por miniprep

Protocolo modificado del manual Molecular Cloning de Maniatis³³. Se partió de 4 mL de cultivo crecido durante toda la noche en LB con ampicilina 0,1 mg/mL. Las células (*E. coli* BL21 Star) previamente transformadas con el plásmido, fueron centrifugadas a 12.000 rpm por 30 segundos a 4 °C para su sedimentación. Se resuspendieron en 100 µL de una solución 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA con ARNasa 0,1 mg/mL. Se dejaron por 20 minutos a 37 °C para que actuara la ARNasa.

Se agregaron 200 µL de una solución 0,2 N NaOH y 1% SDS en frío durante 5 minutos y posteriormente se añadieron 150 µL de una solución de buffer acetato 3 M, pH 4,8 – 5,2 y se incubó en hielo 5 minutos nuevamente.

Se centrifugó a 12.000 rpm 5 minutos para sedimentar el ADN nuclear. Se transfirieron 400 µL del sobrenadante a un tubo nuevo y se precipitó el ADN plasmídico con 800 µL de etanol 100%. Se centrifugó a 12.000 rpm y se lavó con etanol 70%.

Se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 30 µL de H₂O desionizada. El resultado se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, revelado con bromuro de etidio.

Secuenciación del plásmido

Los primers para la secuenciación completa del plásmido fueron diseñados utilizando la secuencia del ADNc de la aconitasa mitocondrial humana extraída de GenBank – NCBI (GI: 47678260). Como no se tenía información de cómo fue clonada la enzima en el plásmido, se diseñaron 6 primers que permitirían secuenciar de forma completa la aconitasa y parte del plásmido de expresión, identificando si la cola de GST estaba localizada en el extremo amino o carboxilo terminal. Los primers fueron enviados a sintetizar por Macrogen (Seúl, Corea del sur).

El plásmido fue secuenciado por el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo y los resultados fueron analizados utilizando el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de NCBI³⁴.

Expresión de aconitasa mitocondrial unida a GST.

Se contaba con las células (*E. coli* BL21 star de Invitrogen), ya transformadas, por lo que para la expresión se inocularon los precultivos de LB con ampicilina 0,1 mg/mL desde un cultivo en placa, y se dejaron crecer toda la noche.

Los medios 2xYT (1,6% triptona/triptosa, 1% extracto de levadura, 0,5% NaCl, 0,1 mg/mL de ampicilina, a pH 7,4), se inocularon con los precultivos y se dejaron

crecer a 37 °C en agitación constante (220 rpm) hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm de 0,6 a 0,8 donde se indujo la expresión con IPTG 0,5 mM. Se disminuyó la temperatura a 25 °C y se dejó toda la noche bajo agitación.

Las células fueron sedimentadas por centrifugación a 4.500 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Se resuspendieron en 30 mL de PBS 1x y se agregaron PMSF y ADNasa. Posteriormente fueron sonicadas en dos ciclos de 60 segundos y uno de 30 segundos en hielo para lisar las células.

Se centrifugó a 8.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos y se descartó el pellet. Finalmente se filtró el sobrenadante y se agregó más PMSF para prevenir la actividad de proteasas remanentes.

Purificación de la mACO2

La purificación de la mACO2-GST fue realizada por cromatografía de afinidad utilizando una columna de glutatión-agarosa en la cual queda retenida la cola de GST.

Tras equilibrar la columna con PBS – Tritón 1%, se pasaron 3 veces por la columna 5 mL de lisado celular, dejando equilibrar 5 minutos en cada pasada debido a la cinética lenta de unión entre la GST y el glutatión.

Posteriormente se eluyó con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 y 5 mM de glutatión y se colectaron las fracciones. Se concentró la enzima utilizando un concentrador Spin-X de Corning, utilizando buffer con MgCl_2 0,1 M para separar el glutatión de la GST, y posteriormente con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 para remover el MgCl_2 .

Se cuantificó el concentrado y se cortó con 5 U/mg de proteína de fusión de trombina bovina durante 2 horas a temperatura ambiente y se detuvo con el agregado de PMSF 1 μM .

Para remover la GST libre y la proteína de fusión sin cortar, se pasó nuevamente la proteína cortada por la columna de glutatión agarosa de siguiendo la misma metodología pero colectando la fracción que no se adhirió a la columna.

Se volvió a concentrar la enzima para remover el Tritón, se alicuotó y se almacenó a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para evitar la degradación y el agregado.

Determinación de la pureza

La pureza fue verificada por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% y haciendo teñidos con azul de Coomasie. El valor numérico es obtenido mediante el software ImageJ³⁵.

Western blot

La enzima fue separada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y posteriormente transferida a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 mm, Hybond-C extra; Amersham) mediante transferencia semi-seca por 2 horas en un buffer de transferencia con SDS.

La membrana fue bloqueada durante toda la noche a 4 °C con solución de PBS, 3% leche, 0,3% Tween (solución de bloqueo).

Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo de conejo α -aconitasa 2 (dilución 1 en 2.000 en solución de bloqueo), durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Luego de lavar la membrana con PBS, 0,1% Tween (solución de lavado), se incubó la membrana con el anticuerpo secundario de cabra α -anticuerpo de conejo (IRDye 800CW, dilución 1 en 15.000 en buffer de lavado) durante una hora con agitación. El exceso de anticuerpo fue removido por 4 lavados con buffer de lavado.

Las membranas fueron reveladas mediante la detección de la sonda infrarroja, usando un equipo Odyssey Infrared Imaging System.

Activación de la aconitasa

Durante la purificación la enzima pierde el Fe_α , o incluso el centro Fe-S entero; la reconstrucción del mismo se realiza incubando la enzima con hierro y azufre en presencia de un agente reductor. Se incubó la enzima con sulfato amónico ferroso 500 μM , sulfuro de sodio 500 μM , y DTT 10 mM en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,8 bajo flujo de argón durante 30 minutos en un vial anaerobio.

Determinación de la actividad específica

La actividad aconitasa se determinó siguiendo la aparición o desaparición de *cis*-aconitato a 240 nm ($\epsilon = 3,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) partiendo de citrato, isocitrato o *cis*-aconitato en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,8 (ensayo directo) o mediante ensayo acoplado a isocitrato deshidrogenasa, siguiendo la reducción de NADP^+ a 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)³⁶. Todas las medidas de actividad se realizaron a 25 °C. La dosificación de proteínas se realizó por el método de Bradford³⁷.

Gel de actividad aconitasa

Se puso a punto un protocolo para la realización de un gel de actividad aconitasa, el cual consiste en un gel nativo utilizando el ensayo acoplado en presencia de

Dependencia de la actividad con el pH

Se determinó la actividad aconitasa a distintos pH utilizando buffers acético (pH 3,9 y 4,8), fosfato (pH 6,2, 6,8 y 7,4), Tris-HCl (pH 7,8 y 8,6) y glicina (pH 9,2 y 10,2) determinando el consumo de *cis*-aconitato 500 μ M. El pH fue medido luego del agregado de *cis*-aconitato y la actividad se midió a 25 °C.

Preparación de la aconitasa para la exposición a oxidantes

El exceso de hierro, glutatión y otros contaminantes producidos durante la purificación y activación de la enzima fueron eliminados por gel filtración, utilizando una columna con Sephadex G-25 en cámara hipóxica (Coy Instruments), con buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 degaseado. Las fracciones se colectan en viales anaerobios en presencia de concentraciones de oxígeno menores al 1%. Se determinó la actividad en los eluidos para detectar la presencia de la enzima y se trabajó con dicha fracción.

Exposición a oxidantes

Exposición a ONOO⁻: La enzima se dividió en viales anaerobios burbujeados con argón, y se diluyó con buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 previamente degaseado. Se incubó la enzima con concentraciones crecientes de una solución de ONOO⁻

en NaOH 5 mM previamente degaseado y agregado en bolo, vortexeando tras el agregado, en viales preparados en cámara hipóxica. La influencia de H₂O₂ y nitrito contaminantes o de productos estables de la descomposición del ONOO⁻ (como el nitrato) se descartó dejando que el ONOO⁻ se descompusiera en buffer anaerobio antes de agregar la enzima activa (ensayo de adición reversa). A cada una de las fracciones expuestas a ONOO⁻ se les determinó la actividad remanente en Tris-HCl 100 mM a pH 7.8 y 25 °C. Las simulaciones cinéticas realizadas para hallar la constante de reacción de la ACO2 murina con el ONOO⁻ fueron realizadas utilizando la herramienta Gepasi³⁹, y las reacciones y constantes presentadas en la sección de resultados (tabla 5).

Exposición a H₂O₂: La enzima se expuso a diferentes concentraciones de H₂O₂ en viales anaerobios preparados en cámara hipóxica, y se siguió la pérdida de actividad en el tiempo en Tris-HCl 100 mM a pH 7.8 y 25 °C. Los datos fueron normalizados respecto a la pérdida de actividad del control sin H₂O₂. El H₂O₂ se cuantificó en el momento por absorbancia a 240 nm utilizando un ϵ de 43,6 M⁻¹cm⁻¹¹⁰ y se diluyó en el mismo buffer Tris-HCl degaseado.

Resultados y discusión

Purificación del plásmido

Se purificó el plásmido con buen rendimiento y pureza a partir de bacterias *E. coli* BL21-star previamente transformadas. El resultado puede apreciarse en la figura 9.

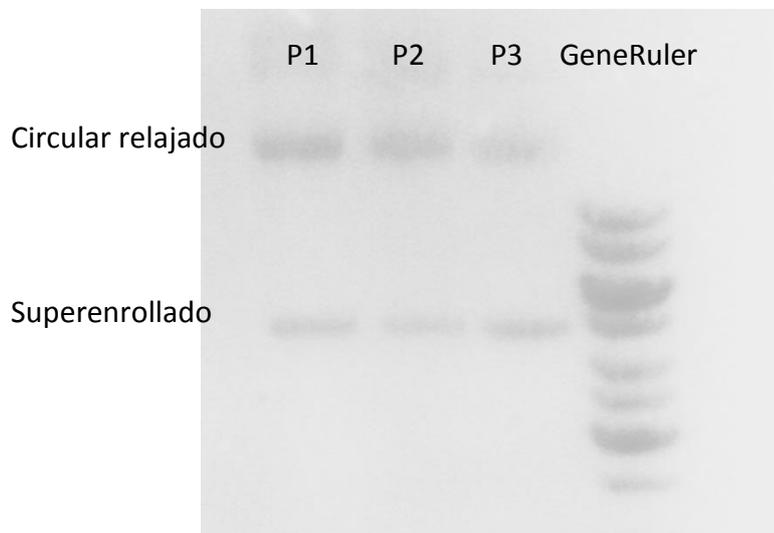


Figura 9. Purificación del plásmido de la *mACO2-GST* por miniprep. Se muestra el gel de agarosa al 1%. Las tres muestras (P1, P2 y P3) son muestras purificadas independientemente. Fueron preparadas por miniprep casera, partiendo cada una de 4 mL de cultivo crecido a 37 °C ON. Cada uno de los pellets de ADN plasmídico fue resuspendido en 30 μ L de H₂O y se corrieron 5 μ L por carril. Del marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb de Fermentas), se cargaron también 5 μ L.

En el gel pueden visualizarse dos bandas en las purificaciones, donde la banda de menor movilidad electroforética podría corresponderse con la forma circular del plásmido y la segunda con la forma superenrollada.

Análisis de la secuencia

El plásmido fue cedido a nuestro laboratorio como codificante de la aconitasa mitocondrial humana, sin embargo, en los trabajos publicados del grupo de la Dra. Hélène Puccio⁴⁰ no queda claro ni la especie de la aconitasa ni el plásmido utilizado para la construcción, por lo tanto se decidió secuenciar el mismo. Se diseñaron cebadores (primers), utilizando la herramienta Primer3plus basándonos en el gen de la aconitasa mitocondrial humana obtenido de la base de datos de GenBank. Los 4 primers (Ga1 a Ga4) se plantearon de manera tal que se pudieran utilizar para secuenciar el gen completo y los plásmidos Agr y Agf para determinar si la cola de GST estaba localizada en el extremo C- o N-terminal de la aconitasa⁴¹.

Ga1: 5' GAAATTGAGCGAGGCAAGTC 3'
Ga2: 5' CACCCAAAGATGTGATCCTG 3'
Ga3: 5' CAAGTGCAAGTCCCAGTTCA 3'
Ga4: 5' ACCACTGACCACATCTCAGC 3'
Agf: 5' CCTGTGGACAAGCTGACCAT 3'
Agr: 5' ACCACCCAACATGTTGTGCT 3'

Tras analizar la secuencia nucleotídica de los fragmentos secuenciados, se determinó la identidad del gen, la cual coincidió con el gen de la aconitasa mitocondrial murina (*mus musculus*) y no con el gen humano (*homo sapiens*) como se pensaba (tabla 1).

No todos los cebadores generados lograron hibridarse al plásmido y rendir secuencia. Los cebadores Ga2 y Ga3 hibridan tanto con el gen humano como con el gen murino, mientras que Ga1 y Ga4 no hibridan con el gen murino pero sí con

el humano ya que así fueron diseñados (tabla 1). Esto fue verificado comparando la secuencia de los primers con la secuencias de los genes.

Tabla 1. Análisis de la secuenciación

Secuencia obtenida ^a	Identidad con el gen Humano (%)	Identidad con el gen murino (%)
Sec_Ga1 ^b	-	-
Sec_Ga2	90 (263/293)	100 (293/293)
Sec_Ga3	88 (238/272)	99 (270/272)
Sec_Ga4 ^b	-	-

a) Hace referencia a los productos de secuenciación de los primers Ga1 a Ga4

b) Secuencias faltantes, el primer no rindió secuencia.

Las secuencias generadas por los cebadores Ga2 y Ga3 coincidieron con la secuencia murina correspondiente al código de acceso NM_080633.2, la cual tiene una identidad de secuencia del 90-91% con el gen humano (CR456365.1).

En lo que refiere a la secuencia aminoacídica de la aconitasa mitocondrial, la murina (Q99KI0) y la humana (Q99798), tienen una identidad (mismos residuos en la misma posición), del 97%, y un 98% de positivos (aminoácidos similares en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas). Además, el número de aminoácidos es el mismo (780) de los cuáles 27 son parte del péptido señal que indica como destino intracelular la mitocondria, y 753 son los que se encuentran en la proteína activa.

Ambas proteínas son lo suficientemente similares como para asumir que el trabajo sobre la variante murina puede arrojar resultados fácilmente trasladables a la variante humana. En la tabla 2 se presentan varios parámetros de ambas proteínas para su comparación.

Tabla 2. Comparación entre ACO2 humana y murina.

	ACO2 Humana	ACO2 Murina
Número de aminoácidos	753 aminoácidos	
Peso Molecular	82425,78 Da	82463,88 Da
Punto isoelectrico teórico	6,85	7,40
Número total de aminoácidos cargados negativamente (pH 7,4)	89	88
Número total de aminoácidos cargados positivamente (pH 7,4)	86	88
Coefficiente de extinción molar teórico	80790 M ⁻¹ cm ⁻¹	79300 M ⁻¹ cm ⁻¹
Vida media estimada	0,8 horas (reticulocito de mamífero, <i>in vitro</i>) 10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>)	
Índice de inestabilidad	34,63 (Estable)	33,15 (Estable)
Índice alifático	86,16	85,76
Hidropatía (GRAVY) (Hidrofílica:-2:+2:Hidrofóbica)	-0,368 (Hidrofílica)	

Datos calculados utilizando la herramienta ProtParam de ExPASy⁴².

A partir de los resultados de la secuenciación y la expresión parcial de GST (se menciona más adelante), fue posible determinar que la cola de GST se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína. Por las características del plásmido (resistencia a ampicilina, GST en el N-terminal, sitio de corte para trombina), y estudiando los plásmidos utilizados en el artículo y el material complementario del artículo de H. Puccio (2012), se pudo determinar que el plásmido es el pGEX-4T1 (figura 10).

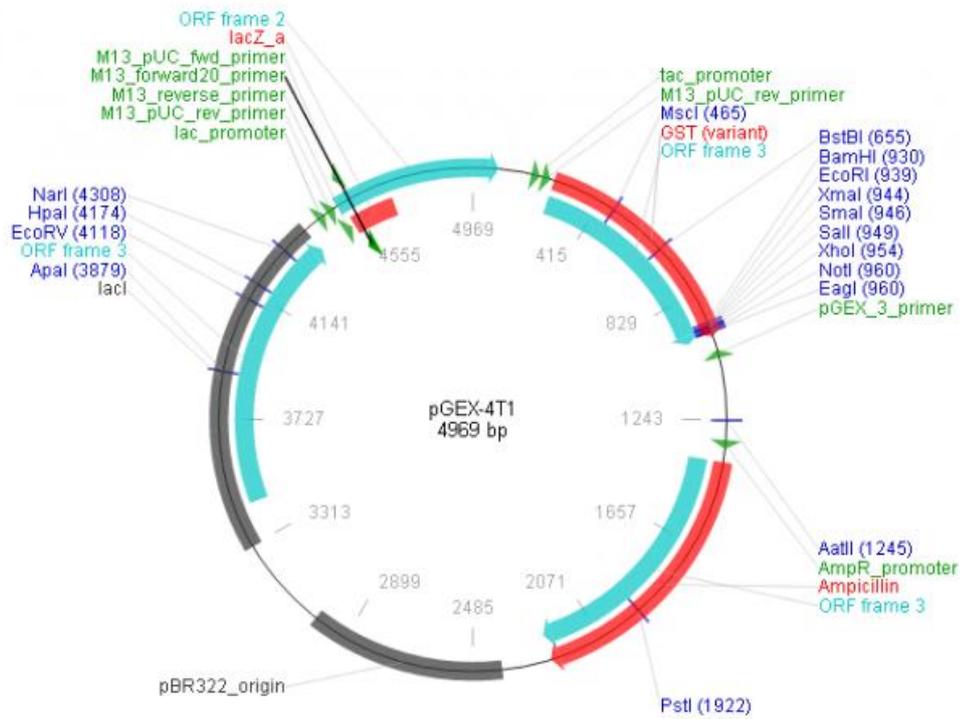


Figura 10. *Plásmido pGEX-4T1.* Plásmido donde se encuentra inserto el gen de la aconitasa mitocondrial murina. El plásmido cuenta con el gen de resistencia a ampicilina y GST próximo al sitio múltiple de clonado⁴³.

Purificación de la aconitasa mitocondrial.

La enzima logró ser expresada en *E. coli* con un rendimiento aproximado de 16 mg/L de cultivo. Se observó la expresión de la proteína de fusión con GST, pero también la de GST libre (figura 11). Como el GST está en el extremo N-terminal es posible que la síntesis de la proteína se detenga prematuramente o que ocurra el clivaje espontáneo de la proteína de fusión.

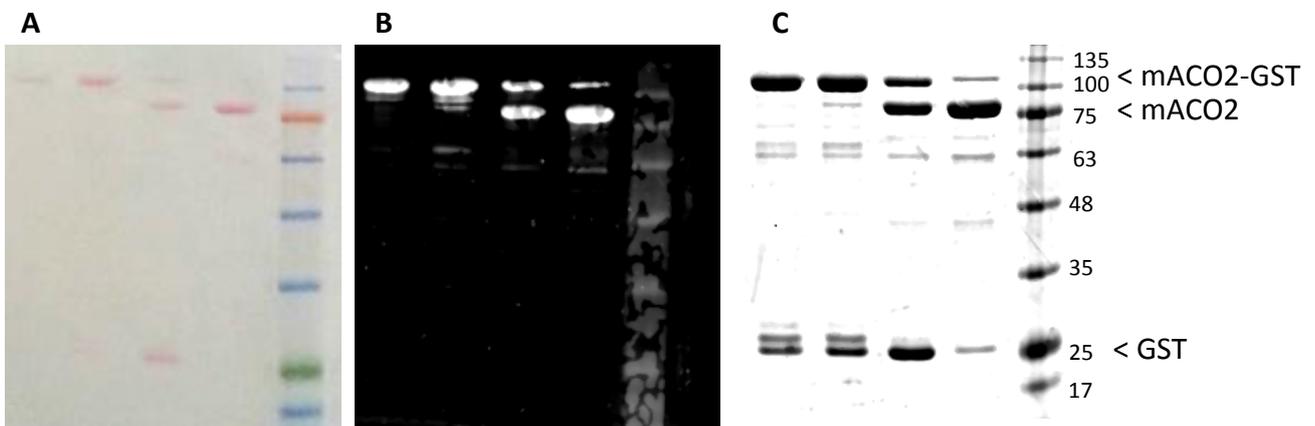


Figura 11. Purificación de la ACO2 murina, SDS-Page y Western blot. A) Tinción con Ponceau de la membrana de nitrocelulosa utilizada para la transferencia del Western blot. B) Western blot realizado con el anticuerpo α -aconitasa 2. C) Tinción del gel con azul de Coomassie. En las tres figuras se sembraron las mismas muestras: carril 1: eluido de la columna GSH-agarosa, carril 2: concentrado de los eluidos de la columna, carril 3: la proteína tras el corte con trombina, carril 4: la proteína tras el segundo pasaje por la GSH-agarosa, carril 5: marcador de peso molecular.

Utilizando la herramienta ImageJ fue posible determinar el nivel de pureza de la mACO2 tras la purificación, siendo éste de 91%. En la tabla 3 se muestra la tabla de purificación de la proteína.

El Western blot, permitió confirmar que la proteína que se visualiza en los geles es efectivamente aconitasa mitocondrial. El anticuerpo α -aconitasa 2 utilizado es capaz de unirse a aconitasa mitocondrial de humano, de rata y de ratón.

También se puede apreciar en el gel que el corte de la proteína de fusión mACO2-GST no fue completo, sin embargo los restos de proteína de fusión sin cortar pueden ser removidos junto al GST libre en el segundo pasaje por la columna de GSH-agarosa, donde la fracción que no se pega contiene solo a la mACO2 cortada.

El corte con trombina fue optimizado incubando la enzima con trombina a temperatura ambiente y tomando alícuotas cada 1 hora deteniendo la reacción con PMSF 1 mM. Posteriormente se analizaron las alícuotas por SDS-Page. Se determinó que el tiempo óptimo de corte era de 2 horas a temperatura ambiente.

Es posible confirmar también que la proteína se degrada parcialmente, ya que en el Western blot se marcan bandas de menor peso molecular (en el entorno de los 60 kDa).

Tabla 3. Tabla de purificación

Paso de purificación	Proteína Total (mg)	Concentración (mg/mL)^b	Actividad Total (U)	Actividad por mL (U/mL)^c	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Lisado ^a	140,5	56,2	248,9	99,6	1,8	1,0	100
GSH-Agarosa	5,5	1,8	7,9	2,6	1,4	0,8	3
Corte con trombina	5,5	1,7	10,1	3,1	1,8	1,0	4
GSH-Agarosa	0,8	0,2	6,0	1,7	7,8	4,4	2

- a) Partiendo de 2,5 mL de lisado bacteriano (200 mL de cultivo bacteriano)
 b) Determinado por el método de Bradford
 c) Actividad determinada como se describe en la sección de materiales y métodos
 Esta tabla fue realizada a partir de una única purificación

Determinación de peso molecular

Se determinó el peso molecular de la mACO2-GST, la mACO2 y la GST mediante el análisis de los geles de electroforesis y espectrometría de masas.

Se estudiaron 5 geles que fueron corridos con proteínas de diferentes expresiones y purificaciones. En base al marcador de peso molecular, se realizaron los gráficos de logaritmo del peso molecular en función del factor de retardo (R_f = migración relativa de la proteína/distancia de migración del frente de corrida) y se interpolaron los R_f de las proteínas de interés utilizando la ecuación del ajuste lineal (figura 12).

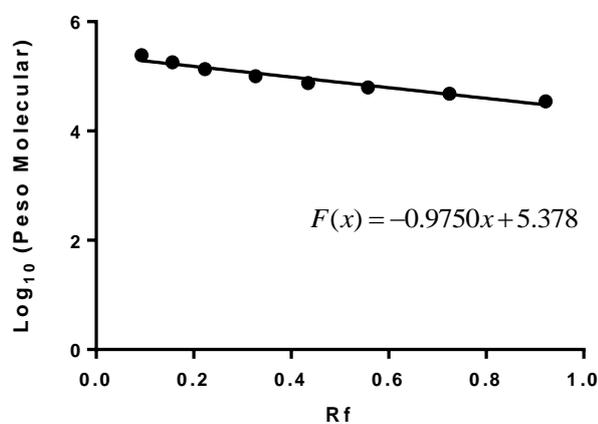


Figura 12. Gráfico para determinación de peso molecular por SDS-Page. Se muestra un ejemplo para uno de los geles. Los valores presentados se calcularon a partir de 5 geles independientes.

Los pesos moleculares calculados fueron $(114,8 \pm 7,6)$, $(90,1 \pm 5,3)$ y $(25,7 \pm 0,6)$ kDa para la mACO2-GST, la mACO2 y la GST respectivamente ($\bar{x} \pm$ desviación estándar).

La proteína de fusión fue llevada al Servicio de Espectrometría de Masas del CEINBIO, donde fue analizada por un espectrómetro de masa de tipo ESI, triple cuadrupolo (Applied Biosystems). Ya que al momento del análisis no se contaba con el alto nivel de pureza actual de la aconitasa mitocondrial tras el corte con trombina de la cola de GST, solo se envió la mACO2-GST previo al corte.

El estudio por espectrometría de masas permitió determinar con más precisión el peso molecular de la mACO2-GST. El valor obtenido fue de 111.095 ± 50 Da, el cual entra en el rango del valor obtenido por el análisis del gel.

Además, en base a la secuencia, se sabe que la GST del plásmido pGEX-4T1 es una proteína de 239 aminoácidos con un peso molecular de 27.898,33 Da, la cual posee en su aminoácido 224 el sitio de corte para trombina y de allí al 239 se encuentra el sitio múltiple de clonado. Una vez clivado, el GST tiene un peso de 26.166,44 Da que puede visualizarse en el gel y es concordante con el valor calculado en los geles.

Al restarle dicho valor al peso de la mACO2-GST determinado por espectrometría de masas se obtiene el peso de la mACO2 después de la trombolización, siendo éste de 84.928 ± 50 Da, de los cuales, por la secuencia teórica de la mACO2,

82.464 Da serían de la mACO2 y 2.465 ± 50 Da de la secuencia que une las proteínas fusionadas (unos 21 o 23 aminoácidos) (Figura 13).

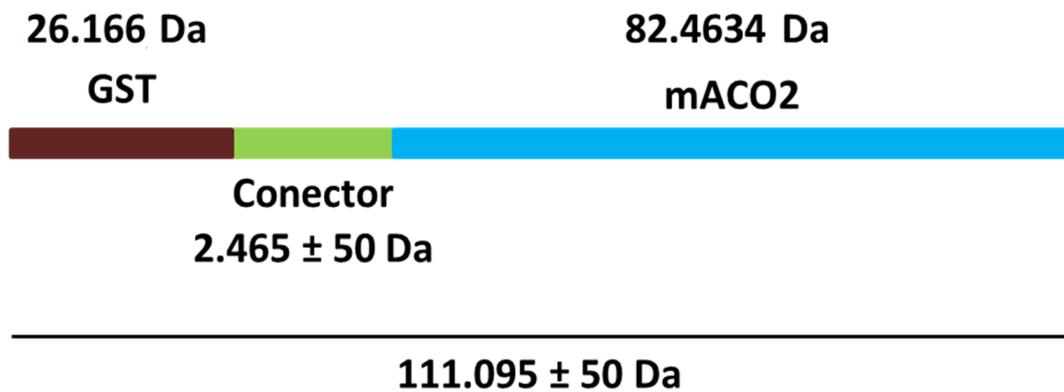


Figura 13. Esquema representativo de la proteína de fusión. Los pesos moleculares de la GST y la mACO2 fueron determinados a partir de la secuencia aminoacídica utilizando ProtParam. El valor de toda la mACO2-GST se determinó por espectrometría de masas y el del conector se calculó por diferencia.

Actividad aconitasa

La actividad aconitasa puede determinarse con cualquiera de los 3 sustratos que utiliza la enzima: citrato, *cis*-aconitato e isocitrato por la medida de absorbancia a 240 nm, donde absorbe el doble enlace del *cis*-aconitato. Dependiendo de las circunstancias puede resultar conveniente la medida por ensayo acoplado a la enzima isocitrato deshidrogenasa, ya que se sigue la aparición de NADH a 340 nm y hace posible apartarse de las longitudes de onda a las que absorben un gran número de componentes celulares. Se utiliza generalmente para medir la actividad aconitasa en células o lisados celulares.

En la figura 14-A1 y A2 se visualizan los cursos temporales individuales para las reacciones con los sustratos y del ensayo acoplado. Las concentraciones utilizadas fueron de 10 veces el K_M para el citrato y el isocitrato, y de 50 el K_M veces para el *cis*-aconitato (el cálculo de los K_M se muestra más adelante).

Otro estudio realizado fue sobre el efecto que podía tener la cola de GST sobre la actividad de la mACO2 para saber si era necesario su clivaje. En la figura 14-B se muestran los resultados de la medida de actividad antes y después del corte con trombina sin la remoción de la GST (se ajustó por la trombina agregada). La diferencia fue significativa ($p < 0,0001$), siendo mayor la actividad específica tras el clivaje de la GST, por lo que se decidió agregar el paso del corte con trombina.

Se estudió también el efecto del pH sobre la actividad de la enzima (figura 14-C). La enzima presentó un pH óptimo de aproximadamente 8,0 manteniéndose

relativamente constante en el entorno de 7,0 a 9,0. La ubicación intracelular de esta aconitasa hace que se aproveche al máximo su capacidad (el pH mitocondrial es 7,8⁴⁴). Por tanto el buffer seleccionado para trabajar con la enzima, tanto en la activación como en las medidas de actividad es un Tris-HCl pH 7,8.

El buffer Tris-HCl fue elegido por sobre el buffer fosfato ya que según se ha visto en la literatura, este último previene el ensamblaje del centro ferrosulfurado. El fosfato compite con la proteína por el hierro en el sistema aunque se ha visto que no se pierde actividad al incubar con buffer fosfato si la enzima ya tiene formado el centro 4Fe-4S⁴⁵.

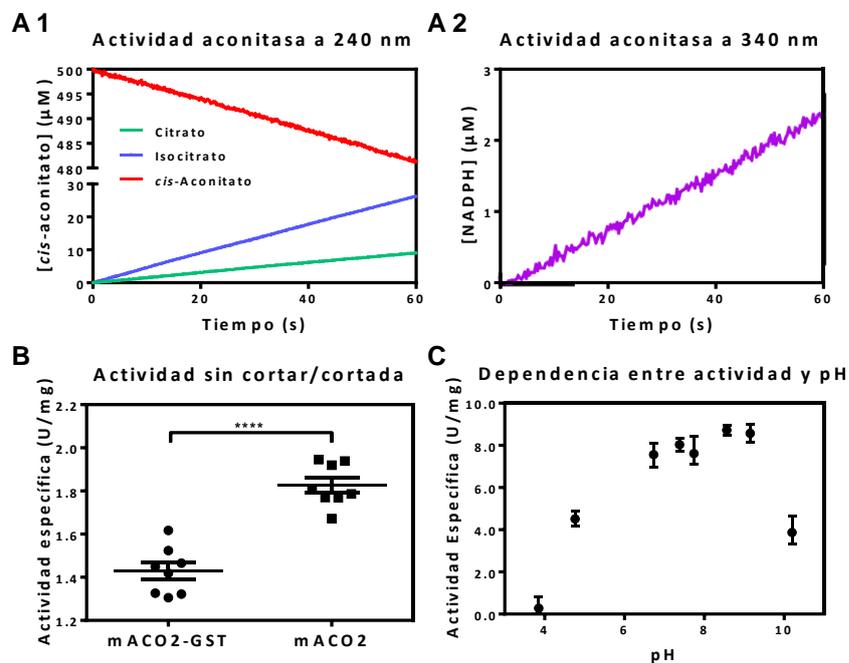


Figura 14. Actividad aconitasa. A1) Los ensayos directos (utilizando citrato 6 mM, isocitrato 8 mM y *cis*-aconitato 500 μ M), se realizaron siguiendo la aparición o desaparición de *cis*-aconitato por absorbancia a 240 nm como se explica en la sección de metodología. A2) El ensayo acoplado se realizó agregando isocitrato deshidrogenasa y citrato en exceso y siguiendo la aparición del NADPH a 340 nm. B) Se estudió la actividad utilizando como sustrato *cis*-aconitato 500 μ M antes y después del corte con trombina (n=8, $p < 0,0001$). C) Se utilizaron buffers a distintos pH y se determinó la actividad por consumo de *cis*-aconitato 500 μ M (n=4). Las diferencias en actividad específica se deben a que las enzimas utilizadas en los ensayos son de diferentes purificaciones.

Determinación del K_M de la aconitasa mitocondrial murina

Se determinaron las constantes de Michaelis y Menten (K_M) para los tres sustratos de la aconitasa, graficando las velocidades iniciales de generación o consumo de *cis*-aconitato en función de concentraciones crecientes de sustrato (Figura 15-17). Se verificó que los datos pudieran ser ajustados efectivamente a una hipérbola rectangular utilizando las linealizaciones de Lineweaver y Burk ($1/\text{velocidad inicial vs. } 1/[\text{sustrato}]$), y Hanes y Woolf ($[\text{sustrato}]/\text{velocidad inicial vs. } [\text{sustrato}]$)⁴⁶⁻⁴⁸.

Se hicieron ensayos en diferentes días activando diferentes alícuotas de aconitasa purificada. Como la activación no siempre es igual de efectiva y para aumentar el número de datos para los gráficos, se normalizaron en función de la velocidad máxima y los resultados de 6 días distintos se graficaron juntos.

Como puede apreciarse, la enzima presenta un comportamiento Michaeliano para los tres sustratos en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7,8. Los valores de K_M presentados son los obtenidos del ajuste a la ecuación de Michaelis y Menten y su desviación estándar asociada: $624 \pm 28 \mu\text{M}$ para citrato, $838 \pm 33 \mu\text{M}$ para isocitrato y $11,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ para *cis*-aconitato.

Estos valores no han sido previamente reportados para *Mus musculus* pero si en otros mamíferos como *Bos taurus*, *Rattus norvegicus* y *Oryctolagus cuniculus*, siendo los valores obtenidos del orden similar a los que se encuentran en bases de datos (tabla 4)⁴⁹.

Tabla 4. K_M determinado para mamíferos

Organismo	Citrato (mM)	<i>cis</i>-Aconitato (mM)	Isocitrato (mM)
<i>Bos taurus</i> ^a	0,14	0,0048	0,012
<i>Rattus norvegicus</i> ^a	0,48	-	0,12
<i>Oryctolagus cuniculus</i> ^a	0,9	0,009	0,32
<i>Mus musculus</i> ^b	0,62	0,01	0,84

a) Extraídos de la base de datos BRENDA⁴⁹

b) Valores obtenidos en nuestro trabajo

Citrato

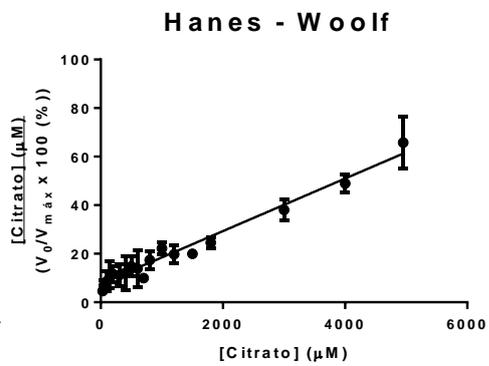
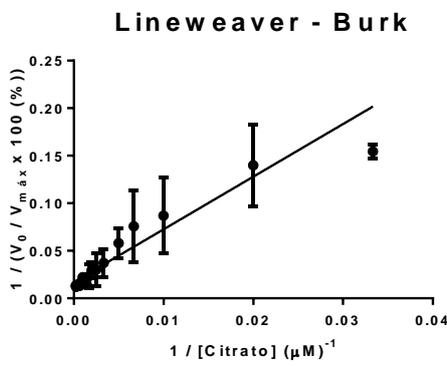
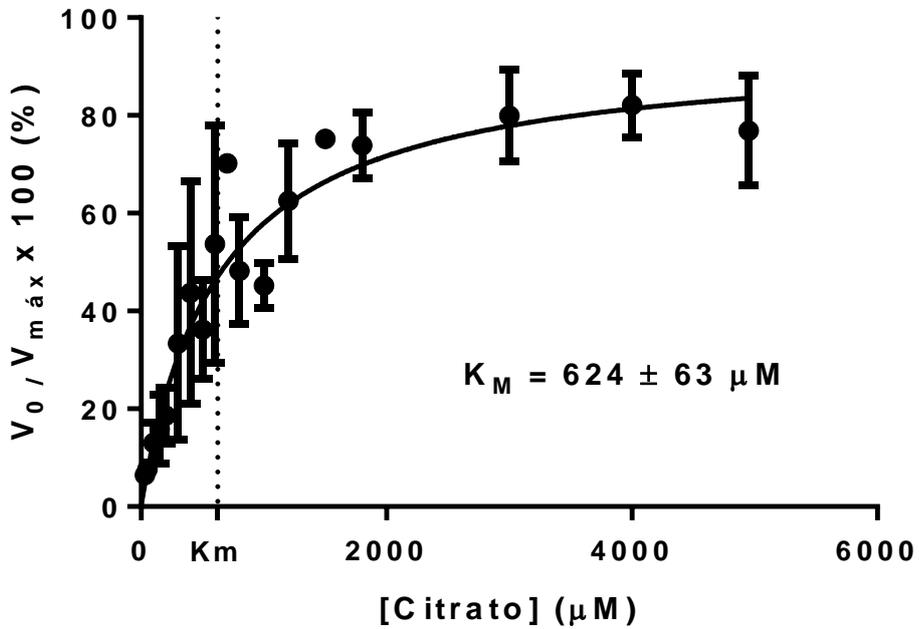


Figura 15. Cinética michaeliana de la mACO2 para citrato. Se juntaron datos de actividad de seis días y alícuotas diferentes normalizados por actividad máxima, cada punto está repetido 10-18 veces.

Isocitrato

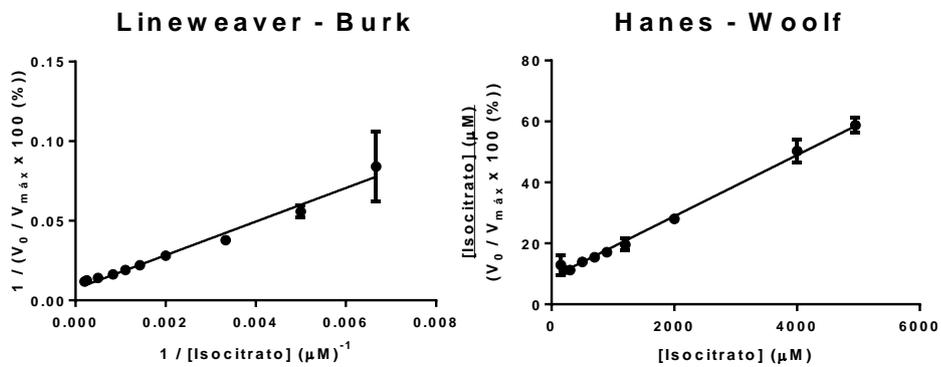
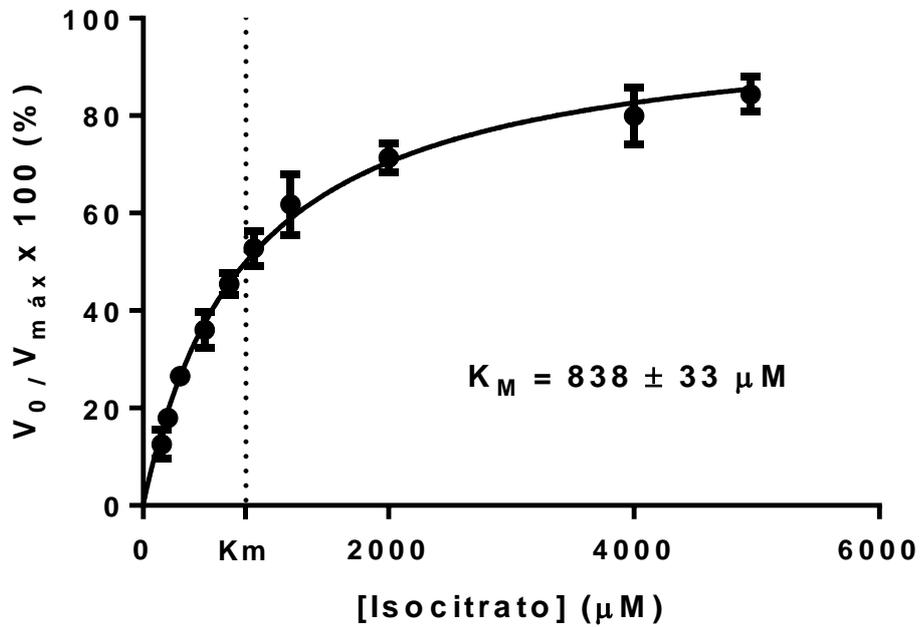


Figura 16. Cinética michaeliana de la mACO2 para isocitrato. Se juntaron datos de actividad de seis días y alícuotas diferentes normalizados por actividad máxima, cada punto está repetido 10-18 veces.

cis-Aconitato

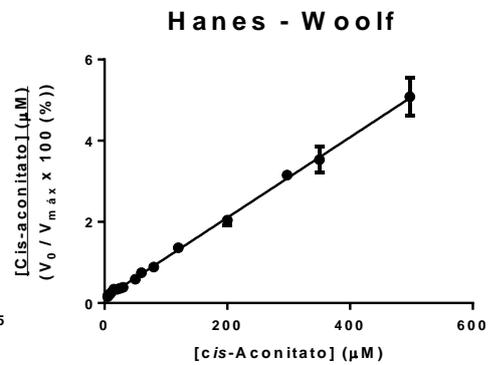
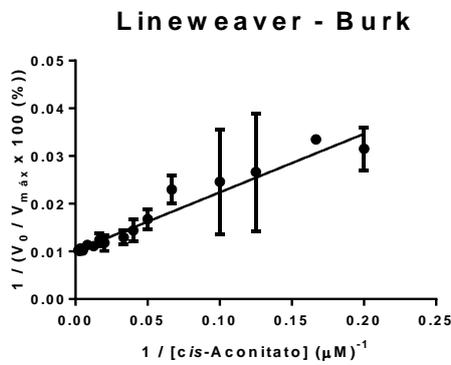
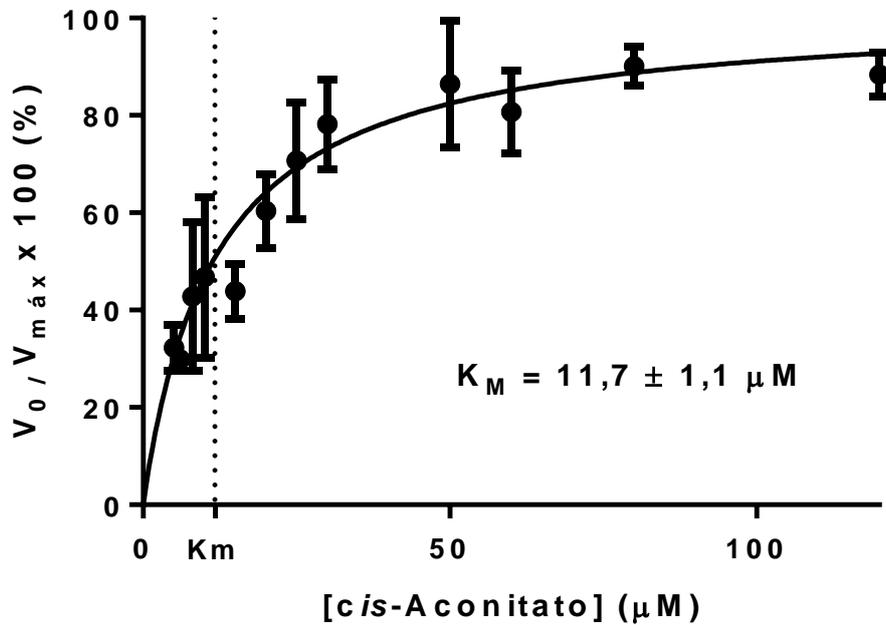


Figura 17. Cinética michaeliana de la mACO2 para *cis*-aconitato. Se juntaron datos de actividad de seis días y alícuotas diferentes normalizados por actividad máxima, cada punto está repetido 10-18 veces (los puntos de concentración mayor a 100 μM no se muestran en el gráfico de Michaelis y Menten por encontrarse en etapa de saturación).

Puede apreciarse una mayor dispersión en los gráficos de Lineweaver-Burk lo cual es esperado ya que los puntos que tienen un gran peso son aquellos con un mayor valor de $1/[\text{sustrato}]$, los cuales tienden a tener un mayor error asociado por ser los de baja velocidad. Esto no ocurre con la linealización de Hanes-Woolf aunque ésta tiene la desventaja de que al tener la concentración de sustrato en ambos ejes, errores en la medida de la concentración de sustrato se verán acentuados, lo que enfatiza por ejemplo, errores en el pipeteo.

Estos problemas asociados al ajuste lineal pueden evitarse utilizando métodos de regresión no lineal, los cuales son significativamente más precisos y ya no son computacionalmente inaccesibles.

Los gráficos de Lineweaver-Burk y Hanes-Woolf fueron realizados para verificar que los datos se ajusten a una hipérbola rectangular. Una vez verificado, los parámetros presentados (K_M) fueron los obtenidos por el ajuste de los datos a una hipérbola rectangular.

Gel de actividad aconitasa

Otra manera de estudiar la actividad aconitasa es mediante geles de actividad. Este ensayo permite identificar y caracterizar la enzima dentro de un gel. Los requisitos para estos son separaciones electroforéticas bajo condiciones compatibles con la actividad de la enzima.

Utilizando condiciones nativas, fue posible generar el gel donde se visualiza la aconitasa (figura 18). Se vio una correcta dosis respuesta, siendo mayor el tamaño de la banda a mayor cantidad de enzima.

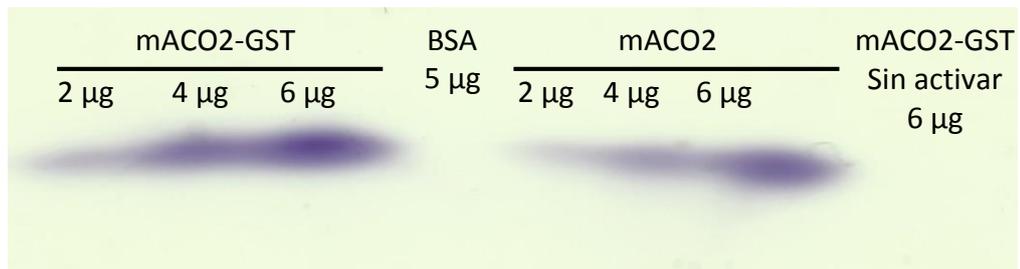


Figura 18. Gel de actividad aconitasa. Se sembraron 2, 4 y 6 µg de enzima (0,69 mU/µg para la mACO2 y 1,01 mU/mg para la mACO2-GST), y se incubaron con PMS y DTT como se explica en la sección de metodología. Los controles negativos se realizaron con BSA (seroalbúmina bovina) y la enzima sin activar.

Por la bibliografía se sabe que esta técnica es capaz de diferenciar la aconitasa mitocondrial de la citosólica, ya que migran diferencialmente, por lo que sería posible estudiar ambas en un lisado celular³⁸. Este ensayo fue probado, pero no fue puesto a punto hasta el momento.

Exposición a ONOO⁻ y determinación de la constante de reacción

La exposición de la aconitasa mitocondrial a ONOO⁻ resultó en una inhibición dependiente de la concentración de oxidante. El valor obtenido de concentración inhibitoria (IC₅₀) fue determinado por el ajuste de los valores experimentales a una exponencial de primer orden. Para 0,1 μM de enzima activa el IC₅₀ fue de 1,4 μM ONOO⁻ (figura 19). Este valor de IC₅₀, es comparable con el determinado para la aconitasa mitocondrial porcina (2,3 μM para 0,2 μM de enzima)³⁶.

La constante de reacción entre la aconitasa mitocondrial y el ONOO⁻ fue determinada utilizando simulaciones por computadora con los parámetros experimentales (figura 20) y el valor obtenido fue de $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Se asumió una cinética simple de competencia entre la descomposición del ONOO⁻ y su reacción directa con la aconitasa. Las reacciones consideradas para la simulación y sus constantes asociadas se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Reacciones consideradas para la determinación de la constante de reacción entre la aconitasa mitocondrial y el ONOO⁻

Reacción	k	Referencia
ONOO ⁻ + mACO2 → mACO2 inactiva + *NO2	Variable	
ONOO ⁻ → NO ₃ ⁻	0,18 s ^{-1a}	50
ONOO ⁻ → NO ₂ ⁻ + *OH	0,08 s ^{-1a}	50

^aValor calculado considerando la constante de descomposición del ONOO⁻ ($k = 0,26 \text{ s}^{-1}$)⁵⁰ y el rendimiento radicalar de ~30%⁵¹.
Tabla extraída de ⁵².

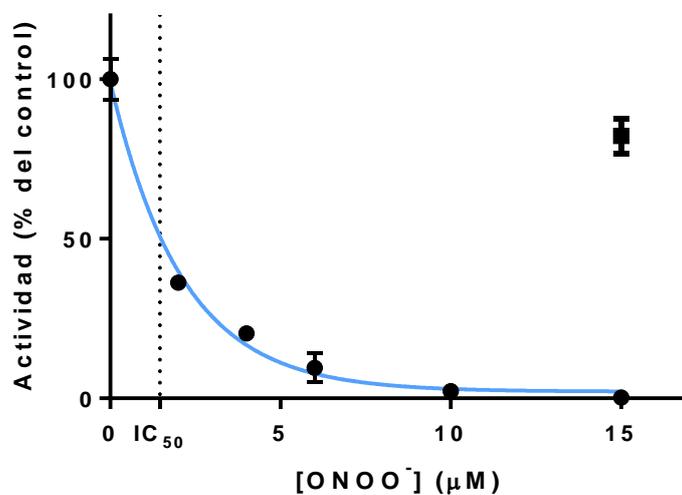


Figura 19. Inhibición de la aconitasa mitocondrial por ONOO⁻. La aconitasa mitocondrial purificada, activada y depletada de hierro, azufre y DTT libres fue expuesta a bolos de ONOO⁻ en cámara hipóxica. La actividad fue medida en condiciones aeróbicas utilizando como sustrato *cis*-aconitato 500 μM y una concentración de enzima de 0,1 μM. Se muestra también el resultado del ensayo de adición reversa (■). La línea representa el ajuste de los datos a un modelo exponencial simple.

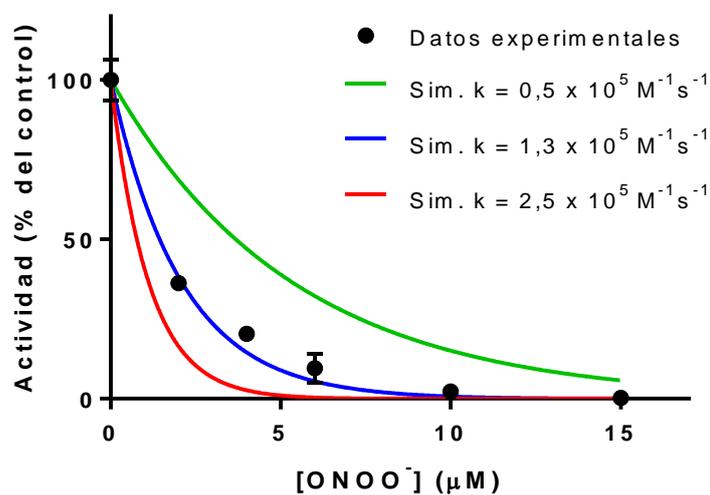


Figura 20. Constante de reacción entre la aconitasa mitocondrial y ONOO⁻. Se determinó la constante de reacción entre la aconitasa mitocondrial y el ONOO⁻ simulando las condiciones experimentales detalladas en la sección de materiales y métodos. La concentración de enzima utilizada fue de 0,1 μM. Se muestran los datos experimentales (●), junto a los ajustes a las constantes simuladas.

Exposición a H₂O₂ y determinación de la constante de reacción

Al igual que con el ONOO⁻, la pérdida de actividad fue también dependiente de la concentración de H₂O₂. La constante de reacción fue determinada al calcular la pendiente del gráfico de las k_{obs} en función de la concentración de H₂O₂ (figura 21). La concentración de enzima efectiva era de 0,8 μM. El análisis de los datos experimentales fue realizado pese a que no nos encontramos en condiciones de reacción de pseudo-primer orden, donde la concentración de oxidante debería ser mucho mayor que la de enzima.

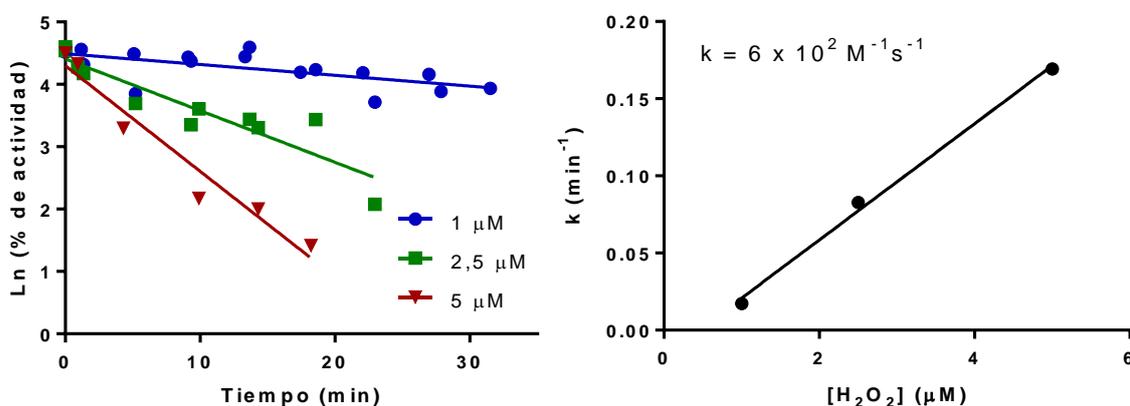


Figura 21. Constante de reacción entre la aconitasa mitocondrial y H₂O₂. Se determinó la constante de reacción entre la aconitasa mitocondrial y el H₂O₂. El gráfico de la izquierda muestra las linealizaciones de las exponenciales obtenidas para la caída de actividad aconitasa, normalizadas por la caída de la actividad del control para las distintas concentraciones de H₂O₂. En la figura de la derecha, se graficaron las pendientes obtenidas del primer gráfico, respecto a la concentración de H₂O₂. La concentración de enzima utilizada fue de 0,8 μM.

Este es el ensayo más reciente, y la rápida inactivación de la enzima ante concentraciones muy bajas de H₂O₂ y la inactivación durante el proceso de

preparación de la enzima, dificulta la toma de medidas. Este es uno de los resultados que más interesa llegar a optimizar.

La constante obtenida ($k = 6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) es del orden de la reportada para la aconitasa mitocondrial bovina ($10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁵³ y es 3 órdenes de magnitud inferior a la obtenida para el ONOO⁻ ($1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), lo que está de acuerdo con la bibliografía para otras enzimas con centros Fe-S^{53,54}.

En ambos casos, para la exposición a los oxidantes la enzima fue preparada en cámara hipóxica con una concentración de oxígeno menor a 1%. Debido a la alta sensibilidad de la enzima al oxígeno y su inactivación, los datos de inactivación por oxidantes debieron ser normalizados por un control sin oxidante.

Durante la preparación de la enzima para la exposición a oxidantes, en el pasaje por columna para remover la mezcla de activación, la enzima pierde entre un 80 y un 90% de la actividad por inactivación con el oxígeno y aproximadamente un 50% más en el fraccionamiento para la exposición con el oxidante. Estos procedimientos fueron probados tanto en cámara hipóxica, con concentraciones de oxígeno por debajo del 1%, como en burbujeo con argón teniendo resultados similares. En una ocasión un preparado recién activado de la enzima (100 μL , 2 μM mACO₂) fue expuesto a oxígeno tras la apertura del vial anaerobio y la inactivación completa se alcanzó solo 15 minutos luego (figura 22).

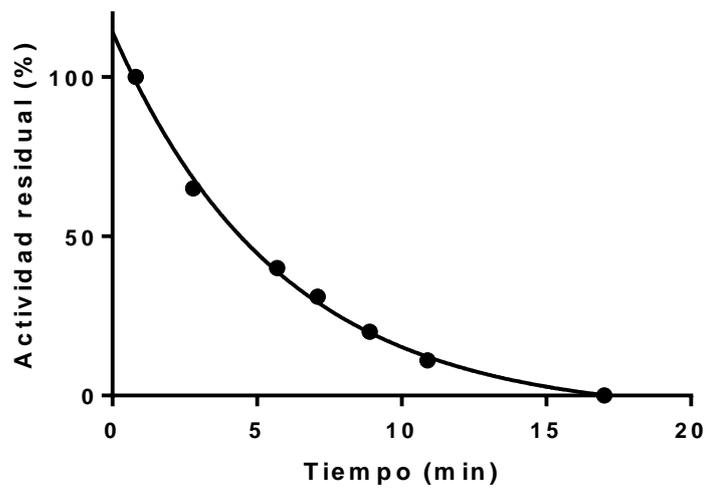


Figura 22. *Inactivación de la mACO2 por el oxígeno molecular.* Se estudió la pérdida de actividad ante la exposición de una muestra de 100 μL de mACO2 2 μM al oxígeno atmosférico tras la apertura del vial anaerobio.

Aún en condiciones de 1% oxígeno, los viales preparados como control mostraron una pérdida de actividad de casi un 50% en un plazo de 4 minutos, por lo que los datos fueron normalizados respecto al control.

Reactivación de la aconitasa tras la exposición a oxidantes.

Para evaluar si la inactivación por ONOO^- y H_2O_2 se debía principalmente a la reacción de los oxidantes con el centro ferrosulfurado se estudió la reversibilidad de la inactivación, volviendo a activar las fracciones expuestas a los oxidantes. Se seleccionó una concentración de cada uno de los oxidantes y se reactivaron mediante la incubación con hierro, azufre y DTT en condiciones anaeróbicas. La actividad fue medida utilizando como sustrato *cis*-aconitato 500 μM (figura 23). A la muestra expuesta a H_2O_2 durante 20 minutos, se la incubó con catalasa para remover el oxidante que no hubiese reaccionado. No fue necesario ningún tratamiento previo en la muestra incubada con ONOO^- ya que el mismo se descompone rápidamente.

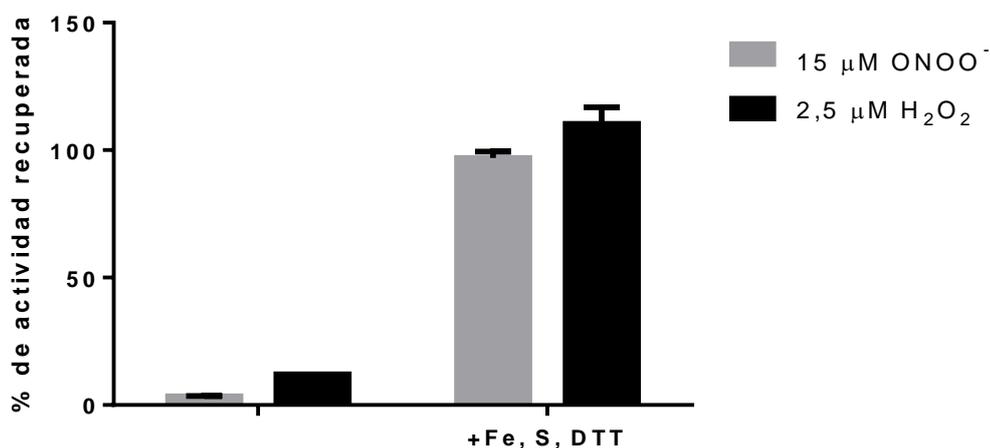


Figura 23. Reactivación de la enzima tras la incubación con ONOO^- y H_2O_2 . La enzima expuesta a oxidantes fue reactivada con hierro, azufre y DTT en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,8 y condiciones anaerobias. Posteriormente se determinó el porcentaje de actividad recuperada.

La inhibición tanto por H_2O_2 como por ONOO^- resultó ser reversible. La enzima incubada con $15 \mu\text{M ONOO}^-$ o $2,5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, fue activada nuevamente y se recuperó aproximadamente el 100% de la actividad inicial. Esto concuerda con el modelo donde el centro 4Fe-4S reacciona con estos oxidantes, llevándolo a una forma 3Fe-4S inactiva. Al restituir el hierro y el azufre con el agente reductor en condiciones anaeróbicas el centro es capaz de reensamblarse y la enzima vuelve a ser activa. Se demuestra entonces que la oxidación es reversible y que el efecto de estos oxidantes recae fuertemente sobre el centro Fe-S. Esto ha sido previamente reportado para la aconitasa mitocondrial porcina^{10,54}.

Conclusiones y perspectivas

Durante el transcurso de este trabajo, logramos purificar con alto grado de rendimiento y pureza una aconitasa mitocondrial de mamífero, la ACO2 murina. La estrategia empleada para la secuenciación del gen codificante y del plásmido fue exitosa y permitieron identificar la especie, que no estaba claramente reportada en la literatura.

La aconitasa mitocondrial murina es un modelo que posee una alta homología con la humana, lo que permite estudiarla de manera análoga. El nivel de pureza alcanzado (91%) fue obtenido recientemente tras ajustes al protocolo de purificación, en varios de los experimentos realizados se ajustaron las concentraciones de enzima por la pureza determinada por SDS-Page. La pureza obtenida hace posible que se realicen análisis estructurales y el envío al Servicio de Espectrometría de Masas para su análisis.

La enzima posee una buena actividad específica (~7 U/mg), y es detectable por gel de actividad a baja concentración (~2-12 μ U), lo que permite que se pueden realizar múltiples ensayos por purificación. La técnica del gel de actividad aconitasa fue puesta a punto durante el transcurso de este trabajo por primera vez en el laboratorio.

Fue posible obtener los K_M para los tres sustratos de la ACO2 murina (624 \pm 28 μ M para citrato, 838 \pm 33 μ M para isocitrato y 11,7 \pm 1,1 μ M para *cis*-aconitato), los cuales todavía no habían sido reportados. Esto ocurrió también

con las constantes de reacción con ONOO^- y H_2O_2 calculadas ($1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente).

La enzima mostró una gran sensibilidad ante los oxidantes, por lo que es notorio el impacto que podrían tener los mismos sobre el rol biológico de la misma en condiciones normales o patológicas.

Se pretende estudiar a futuro sobre las posibles modificaciones postraduccionales que ocurren en la ACO₂, como la acetilación de lisinas, que se ha visto que produce la activación de la enzima, o la succinilación¹⁵.

La metodología y los estudios aplicados para esta enzima son válidos y útiles para la aplicación en otras aconitasas. En un futuro se planea poder expresar en un sistema análogo la aconitasa mitocondrial humana, por lo que este trabajo sirve como base para ese entonces.

Bibliografía

1. Beinert, H., Kennedy, M. C. & Stout, C. D. Aconitase as Iron–Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem. Rev.* **96**, 2335–2374 (1996).
2. Krebs, H. A. The equilibrium constants of the fumarase and aconitase systems. *Biochem. J.* **54**, 78–82 (1953).
3. ENGLARD, S. & COLOWICK, S. P. On the mechanism of the aconitase and isocitric dehydrogenase reactions. *J. Biol. Chem.* **226**, 1047–58 (1957).
4. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. Principles of Biochemistry 5th ed. (2008).
5. Schrodinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. (2015).
6. Robbins, A. H. & Stout, C. D. Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3639–43 (1989).
7. Lloyd, S. J., Lauble, H., Prasad, G. S. & Stout, C. D. The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a: citrate complex. *Protein Sci.* **8**, 2655–62 (1999).
8. Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H. & Stout, C. D. Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* **31**, 2735–48 (1992).
9. Castro, L., Demicheli, V., Tórtora, V. & Radi, R. Mitochondrial protein tyrosine nitration. *Free Radic. Res.* **45**, 37–52 (2011).
10. Scandroglio, F., Tórtora, V., Radi, R. & Castro, L. Metabolic control analysis of mitochondrial aconitase: influence over respiration and mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic. Res.* **48**, 684–93 (2014).
11. Gardner, P. R. P. Aconitase: Sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol.* **349**, 9–23 (2002).
12. Castro, L. a, Robalinho, R. L., Cayota, a, Meneghini, R. & Radi, R. Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **359**, 215–24 (1998).
13. Chen, X. J., Wang, X. & Butow, R. a. Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13738–43 (2007).

14. Nanda, S. & Leibowitz, J. Mitochondrial Aconitase Binds to the 3' Untranslated Region of the Mouse Hepatitis Virus Genome. *J. Virol.* **75**, 3352–3362 (2001).
15. Fernandes, J. *et al.* Lysine Acetylation Activates Mitochondrial Aconitase in the Heart. *Biochemistry* (2015). doi:10.1021/acs.biochem.5b00375
16. Drugge, U., Holmberg, M., Holmgren, G., Almay, B. G. & Linderholm, H. Hereditary myopathy with lactic acidosis, succinate dehydrogenase and aconitase deficiency in northern Sweden: a genealogical study. *J. Med. Genet.* **32**, 344–7 (1995).
17. Sadat, R. *et al.* Functional cellular analyses reveal energy metabolism defect and mitochondrial DNA depletion in a case of mitochondrial aconitase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **118**, 28–34 (2016).
18. Pechter, K. B., Meyer, F. M., Serio, A. W., Stülke, J. & Sonenshein, A. L. Two roles for aconitase in the regulation of tricarboxylic acid branch gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **195**, 1525–1537 (2013).
19. Tong, W. H. & Rouault, T. A. Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: Role of iron-sulfur cluster biogenesis. *BioMetals* **20**, 549–564 (2007).
20. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. & Fenn, W. O. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science (80-)*. **119**, 623–626 (1954).
21. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
22. McCord, J. M. & Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–55 (1969).
23. Droge, W. & Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2002).
24. Sies, H. *Oxidative stress*. (Academic Press, 1985).
25. Castro, L. & Freeman, B. a. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* **17**, 161–165 (2001).
26. Ye, Z. W., Zhang, J., Townsend, D. M. & Tew, K. D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 1607–1621 (2015).
27. Imlay, J. a. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418 (2003).
28. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605 (1979).

29. Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 333–343 (2009).
30. Radi, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J. Biol. Chem.* **288**, 26464–72 (2013).
31. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97–112 (1995).
32. Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L. & Telleri, R. Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308**, 89–95 (1994).
33. Wood, E. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Biochem. Educ.* **11**, 82 (1983).
34. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–10 (1990).
35. Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. & Ram, S. J. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36–41 (2004).
36. Tórtora, V., Quijano, C., Freeman, B., Radi, R. & Castro, L. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1075–88 (2007).
37. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
38. Tong, W.-H. & Rouault, T. a. Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab.* **3**, 199–210 (2006).
39. Mendes, P. GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* **9**, 563–71 (1993).
40. Zeppieri, L. & Birck, C. Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo Fe 4 S 4 Cluster Assembly. (2013).
41. Untergasser, A. *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, e115–e115 (2012).
42. Gasteiger, E. *et al.* in *The Proteomics Protocols Handbook* (ed. Walker, J. M.) 571–607 (Humana Press, 2005). doi:10.1385/1-59259-890-0:571
43. Haun, R. S. & Moss, J. Ligation-independent cloning of glutathione S-transferase fusion genes for expression in *Escherichia coli*. *Gene* **112**, 37–43 (1992).

44. Porcelli, A. M. *et al.* pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**, 799–804 (2005).
45. DICKMAN, S. R. & CLOUTIER, A. A. Factors affecting the activity of aconitase. *J. Biol. Chem.* **188**, 379–388 (1951).
46. Michaelis, L. & Menten, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* **49**, 333–369 (1913).
47. Lineweaver, H. & Burk, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658–666 (1934).
48. Hanes, C. S. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* **26**, 1406–1421 (1932).
49. Schomburg, I. *et al.* BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res.* **32**, D431-3 (2004).
50. Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H. & Beckman, J. S. Peroxynitrite, a Cloaked Oxidant Formed by Nitric-Oxide and Superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834–842 (1992).
51. Radi, R. *Oxidative reactions of peroxynitrite in biological systems: direct attack versus the hydroxyl radical-like pathway. The Oxygen Paradox, F. Ursini and K.J.A. Davies.* (1995).
52. Tórtora, V. Inactivación de la aconitasa mitocondrial por óxido nítrico, S-nitrosoglutatión, peroxinitrito y radical carbonato: mecanismos, cinética y relevancia biológica. (Facultad de Medicina, UdeLaR, 2007).
53. Flint, D. H., Tuminello, J. F. & Emptage, M. H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**, 22369–76 (1993).
54. Castro, L., Rodriguez, M. & Radi, R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 29409–29415 (1994).