

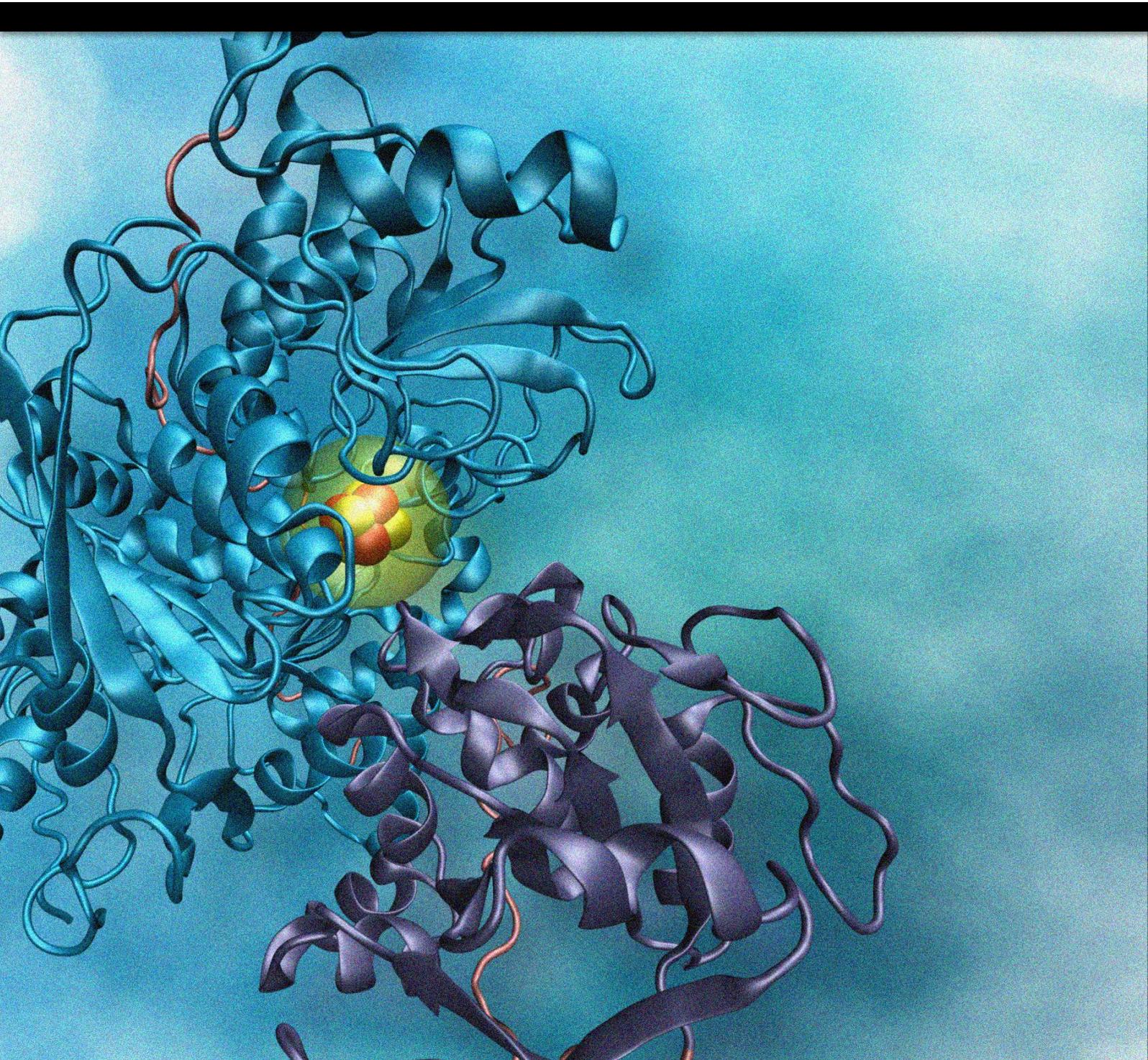
Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
PEDECIBA – Universidad de la República

Caracterización y consecuencias funcionales de las modificaciones postraduccionales de la aconitasa mitocondrial humana

Lic. Santiago Mansilla

Tutora: Dra. Laura Castro. Cotutora: Dra. Verónica Tórtora

Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República
Montevideo, Uruguay
2024



Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mi amada esposa Karen y nuestro querido hijo Sebastián. A Karen, por su incansable apoyo, comprensión y paciencia en cada etapa del desarrollo de este trabajo. A Sebastián, por enseñarme el verdadero significado de la dedicación y la responsabilidad, incluso a tan temprana edad.

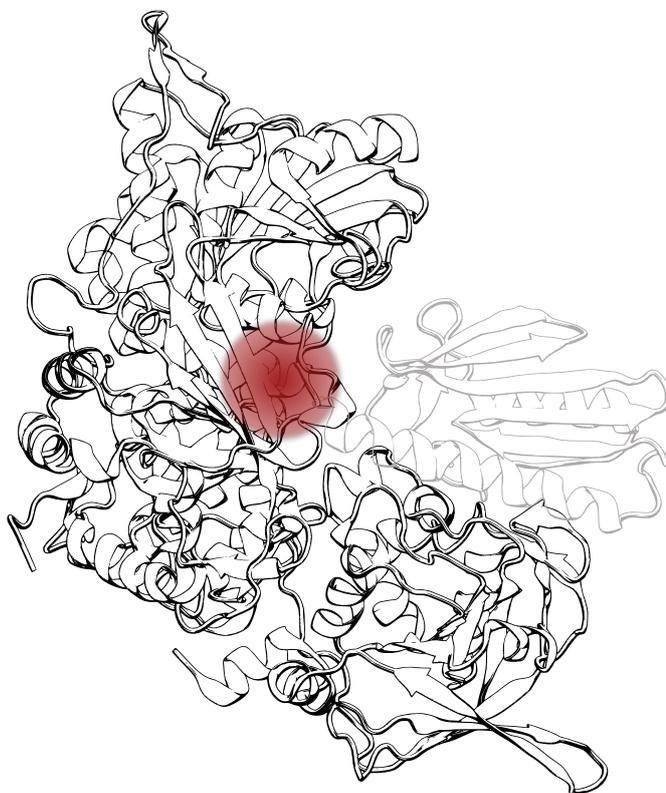
A mi madre, a mi padre, a mis hermanos: Noelia y Joaquín.

A mis tutoras, Laura, Verónica y a Ari, por su orientación, su dedicación y los momentos compartidos.

A mis queridos compañeros de laboratorio, al CEINBIO, al Departamento de Bioquímica y el de Métodos Cuantitativos, al IQUIFIB, y a todos los colaboradores quienes han compartido conmigo este viaje lleno de descubrimientos y desafíos.

Finalmente, quiero dedicar este trabajo a todas aquellas personas que, de una u otra manera, han contribuido a la realización de esta tesis. Sus aportes, grandes o pequeños, han dejado una huella indeleble en este trabajo y en mi desarrollo como investigador.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.



Índice

| | |
|--|----|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción..... | 4 |
| 2.1. La aconitasa mitocondrial (ACO2) | 4 |
| 2.2. Estructura de la ACO2, mecanismo catalítico y evaluación de la actividad aconitasa | 9 |
| 2.3. Modificaciones postraduccionales no oxidativas de la ACO2 | 14 |
| 2.3.1. Fosforilación | 14 |
| 2.3.2. Succinación..... | 15 |
| 2.3.3. Acetilación..... | 15 |
| 2.3.4. Glucosilación | 16 |
| 2.3.5. Consideraciones finales sobre las modificaciones postraduccionales de la ACO2..... | 17 |
| 2.4. Rol de la ACO2 en patologías mitocondriales | 18 |
| 2.5. Fundamentación del proyecto de tesis | 21 |
| 3. Objetivos | 22 |
| 3.1. Objetivo general | 22 |
| 3.2. Objetivos específicos | 22 |
| 4. Materiales y métodos | 23 |
| 4.1. Reactivos | 23 |
| 4.2. Sistema de expresión para la ACO2 humana | 23 |
| 4.3. Purificación de ADN plasmídico (<i>miniprep</i>) y transformación de células competentes..... | 23 |
| 4.4. Anticuerpos | 24 |
| 4.5. Western blot..... | 24 |
| 4.6. Espectrofotometría | 25 |
| 4.7. Constantes de reacción con oxidantes..... | 25 |
| 4.8. Frataxina y variantes | 26 |
| 4.9. Espectroscopía de fluorescencia | 26 |
| 4.10. Espectroscopía de dicroísmo circular | 27 |
| 4.11. Métodos de modelado molecular | 27 |
| 4.11.1. Generación de parámetros y estructuras iniciales..... | 27 |
| 4.11.2. Simulaciones de dinámica molecular | 29 |
| 4.11.3. Interacción ACO2-FXN | 30 |
| 4.12. Digestión proteica y análisis por espectroscopía de masa | 31 |
| 4.13. Expresión de la SIRT3 humana..... | 32 |
| 4.14. ELISA de interacción proteína-proteína..... | 32 |
| 4.15. Cultivos celulares | 34 |
| 4.16. Evaluación de la actividad aconitasa en fibroblastos senescentes | 34 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.17. | Evaluación de la actividad aconitasa y el control de flujo metabólico de células espermáticas | 35 |
| 4.18. | Análisis estadístico y gráficos | 36 |
| 5. | Resultados y discusión | 37 |
| 5.1. | Caracterización bioquímica, estructural y dinámica de la ACO2 humana | 37 |
| 5.1.1. | Clonado y preparación del sistema de expresión | 37 |
| 5.1.2. | Expresión y purificación | 39 |
| 5.1.3. | Caracterización bioquímica | 42 |
| 5.1.4. | Reactividad con oxidantes de relevancia biológica | 45 |
| 5.1.5. | Caracterización estructural | 49 |
| 5.1.6. | Estudios <i>in silico</i> de la ACO2 | 54 |
| 5.2. | Estudio de la acetilación de la ACO2 | 62 |
| 5.3. | Interacción con la frataxina (FXN) | 73 |
| 5.3.1. | Estudio de las características bioquímicas de la ACO2 en presencia de la FXN | 74 |
| 5.3.2. | Ensayos de interacción proteína-proteína para la caracterización de la interacción ACO2-FXN | 79 |
| 5.3.3. | Estudios <i>in silico</i> de la interacción ACO2-FXN..... | 82 |
| 5.4. | Roles y aplicación del análisis de la ACO2 en modelos celulares..... | 87 |
| 5.4.1. | La ACO2 en un modelo de senescencia celular inducida por el oncogén RAS | 87 |
| 5.4.2. | Estudio de la ACO2 en el proceso de capacitación espermática | 90 |
| 6. | Conclusiones | 97 |
| 7. | Agradecimientos y financiación..... | 100 |
| 8. | Referencias bibliográficas | 101 |
| 9. | Comunicaciones y trabajos publicados asociados al trabajo de tesis | 114 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Oxidación y reducción del centro Fe-S de la ACO2</i> | 5 |
| Figura 2. <i>La ACO2 como blanco de especies reactivas mitocondriales</i> | 7 |
| Figura 3. <i>Técnicas espectroscópicas utilizables para la evaluación de proteínas Fe-S</i> | 10 |
| Figura 4. <i>Estructura de la ACO2</i> | 11 |
| Figura 5. <i>Reacción catalizada por la ACO2</i> | 12 |
| Figura 6. <i>Ensayos utilizables para la medida de actividad aconitasa</i> | 13 |
| Figura 7. <i>Optimización de la concentración de anticuerpo anti-FXN para el ensayo de ELISA proteína-proteína</i> | 33 |
| Figura 8. <i>Esquema del ELISA de interacción proteína-proteína</i> | 33 |
| Figura 9. <i>Secuencia y estructura de la ACO2 humana recombinante</i> | 38 |
| Figura 10. <i>Clonado y expresión de la ACO2 humana</i> | 38 |
| Figura 11. <i>Expresión, purificación e identificación de la ACO2 humana</i> | 40 |
| Figura 12. <i>Eluidos de la purificación de la ACO2 humana tras la cromatografía IMAC</i> | 41 |
| Figura 13. <i>Corte con trombina de la cola de histidina de la ACO2</i> | 42 |
| Figura 14. <i>Caracterización bioquímica de la ACO2 humana</i> | 43 |
| Figura 15. <i>Parámetros de Michaelis-Menten de la ACO2 humana</i> | 44 |
| Figura 16. <i>Constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones de ACO2 humana con oxidantes</i> | 46 |
| Figura 17. <i>Reactivación de la ACO2 tratada con oxidantes biológicamente relevantes</i> | 48 |
| Figura 18. <i>Desplegamiento de la ACO2 inducido por temperatura</i> | 50 |
| Figura 19. <i>Estudios espectroscópicos de la activación de la ACO2</i> | 52 |
| Figura 20. <i>Titulación de la unión del ANS a la ACO2</i> | 53 |
| Figura 21. <i>Parámetros desarrollados para el centro Fe-S de la ACO2</i> | 55 |
| Figura 22. <i>Comparación de las propiedades dinámicas de los estados $[4Fe-4S]^{2+}$ y $[3Fe-4S]^+$ de la ACO2</i> | 56 |
| Figura 23. <i>Titulación simulada de la histidina catalítica de la ACO2</i> | 58 |
| Figura 24. <i>Restricciones harmónicas aplicadas en las simulaciones de la ACO2 con sus sustratos</i> .. | 60 |
| Figura 25. <i>Interacción de la ACO2 con sus sustratos</i> | 61 |
| Figura 26. <i>Lisinas relevantes acetiladas en la ACO2 según la bibliografía</i> | 63 |
| Figura 27. <i>Impacto de la acetilación en la actividad de la ACO2</i> | 64 |
| Figura 28. <i>Evaluación del rol del sustrato de la ACO2 en la acetilación</i> | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura 29. Residuos de la [3Fe-4S] ⁺ -ACO2 acetilados detectados por espectrometría de masas | 67 |
| Figura 30. Análisis de espectrometría de masas de la acetilación con acetil-CoA de la ACO2..... | 68 |
| Figura 31. Expresión de la SIRT3 humana recombinante | 69 |
| Figura 32. Regulación de la actividad de la MnSOD por acetilación | 70 |
| Figura 33. Incubación de la [3Fe-4S] ⁺ -ACO2 acetilada con la desacetilasa SIRT3 | 71 |
| Figura 34. Pérdida de la actividad ACO2 mediada por acetilación..... | 72 |
| Figura 35. Activación de la ACO2 mediada por FXN | 75 |
| Figura 36. Desplegamiento de la ACO2 en presencia de FXN | 77 |
| Figura 37. Espectros UV-visible de la ACO2 y la FXN | 77 |
| Figura 38. Activación de la ACO2 mediada por FXN evaluada por espectroscopía | 78 |
| Figura 39. ELISA de interacción proteína-proteína para el complejo ACO2-FXN..... | 79 |
| Figura 40. Interacción entre la ACO2 y la FXN evaluada por anisotropía de fluorescencia | 81 |
| Figura 41. Complejos ACO2-FXN predichos por AlphaFold2-Multimer..... | 83 |
| Figura 42. Modelo de docking para el complejo ACO2-FXN | 84 |
| Figura 43. Puntaje HADDOCK para los 5 clusters de complejos predichos | 85 |
| Figura 44. Diagrama de la inactivación y reactivación mediada por FXN de la ACO2 | 86 |
| Figura 45. Evaluación de la actividad aconitasa en fibroblastos senescentes | 89 |
| Figura 46. Técnicas utilizadas para lograr la lisis y medida de actividad aconitasa en células espermáticas | 92 |
| Figura 47. Puesta a punto del protocolo para medida de actividad ACO2 en células espermáticas | 93 |
| Figura 48. Inactivación de la ACO2 en el proceso de capacitación espermática | 94 |
| Figura 49. Consumo de oxígeno mitocondrial inducido por la aconitasa en espermatozoides humanos no capacitados | 96 |
| Figura 50. Caracterización y regulación redox de la ACO2 humana..... | 97 |
| Figura 51. Rol de la ACO2 en el metabolismo energético de la célula con senescencia inducida por el oncogén RAS..... | 99 |
| Figura 52. Metabolismo oxidativo mitocondrial en la capacitación espermática..... | 99 |

Abreviaturas

AA: antimicina A

AF2: AlphaFold2

ACO1/IRP1: aconitasa citosólica/proteína de unión a IRE (*"iron regulatory protein 1"*).

ACO2: aconitasa mitocondrial

ACOD1/IRFG1: aconitato descarboxilasa 1

ATF3: factor de transcripción dependiente de AMPc 3 (*"activating transcription factor 3"*)

CID: fragmentación por colisión (*"collision-induced fragmentation"*)

DCF: diclorofluoresceína

DIG: digitonina

DM: dinámica molecular

DTT: ditioneitol

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EPR: Resonancia paramagnética electrónica (*"electron paramagnetic resonance"*)

Fe-S: ferrosulfurado

FRDA: ataxia de Friedreich

FXN: frataxina

HDAC3: histona desacetilasa 3

IDH: isocitrato deshidrogenasa

IMAC: cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (*"Immobilized metal affinity chromatography"*)

IRE: elementos de respuesta al hierro (*"Iron Responsive Elements"*)

MM: Michaelis-Menten

mOGT: O-GlcNAc transferasa mitocondrial (*"mitochondrial O-GlcNAc transferase"*)

MRM: buffer de respiración mitocondrial

MSA: alineamiento de múltiples secuencias (*"multiple sequence alignment"*)

NCoR1: corepresor del receptor nuclear 1 (*"nuclear receptor corepressor 1"*)

NMR: resonancia magnética nuclear (*"nuclear magnetic resonance"*)

NRF2: actor nuclear eritroide 2 (*"Nuclear factor erythroid 2-related factor 2"*)

NR1D1: receptor nuclear subfamilia 1 grupo D (*"nuclear receptor subfamily 1 group D"*)

OPD: o-fenilendiamina dihidrocloruro

PKA: proteín-kinasa A

PKC: proteín-kinasa C

PMSF: fluoruro de metilsulfonio

ROS: especies reactivas del oxígeno (*"reactive oxygen species"*)

RMSD: desviación cuadrática media (*"root-mean-square deviation"*)

RMSF: fluctuación cuadrática media (*"root-mean-square fluctuation"*)

RNS: especies reactivas del nitrógeno (*"reactive nitrogen species"*)

SIRT3: sirtuina 3

SOD: superóxido dismutasa

UTR: región no traducida (*"untranslated region"*)

WT: variante salvaje (*"wild type"*)

XO: xantina oxidasa

βME: β-mercaptoetanol

1. Resumen

La aconitasa mitocondrial (ACO2) es una enzima del ciclo de Krebs que cataliza la isomerización reversible de citrato a isocitrato mediante un intermediario *cis*-aconitato. Esta enzima posee un centro ferrosulfurado $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ en su sitio activo que es esencial para la catálisis y que además ha sido identificado como uno de los principales blancos de las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno. La ACO2 es preferencialmente modificada e inactivada por oxidantes durante el envejecimiento y durante patologías que cursan con disfunción mitocondrial. Además, dado que la inactivación por oxidantes puede ser reversible, se la ha postulado como un sensor redox. Hasta el inicio de esta tesis, no había reportes realizados con la ACO2 humana, por lo que este trabajo abordó como objetivos generales expresar, purificar y realizar la caracterización bioquímica, funcional y estructural de la ACO2 humana, además de investigar algunas de sus funciones esenciales a nivel celular, tales como su papel modulador en el metabolismo y su función como sensor redox mitocondrial.

Se obtuvo la ACO2 humana recombinante con un alto nivel de pureza ($> 99\%$) que presentó un pH óptimo de 8.5, en concordancia con el pH alcalino de la matriz mitocondrial. La actividad enzimática aumentó gradualmente a medida que se aumentó la temperatura hasta alcanzar los $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo, a temperaturas superiores, la ACO2 mostró signos de agregación. Se determinaron las K_M para los tres sustratos de la enzima: $950 \pm 90\text{ }\mu\text{M}$ para el citrato, $100 \pm 10\text{ }\mu\text{M}$ para el isocitrato y $7.9 \pm 0.7\text{ }\mu\text{M}$ para el *cis*-aconitato.

Se calcularon las constantes de reacción de segundo orden de la ACO2 humana con peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, radical carbonato y superóxido, obteniendo constantes del orden de 10^2 , 10^5 , 10^8 y $10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente, en el orden de los reportados previamente para otras especies, verificando la alta sensibilidad de la ACO2 a oxidantes. La inactivación de la ACO2 humana con estos oxidantes fue reversible bajo condiciones anaerobias tras la incubación con hierro, azufre y un agente reductor.

Se identificaron diferencias significativas respecto a la temperatura de *melting* (T_m), de la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 activa, respecto a la $[3\text{Fe-4S}]^+$ -ACO2 inactivada oxidativamente (51.1 ± 0.5 y $43.6 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente), brindando evidencia de cambios estructurales, o cambios en el desplegamiento de la enzima. Estos dos estados también mostraron diferencias respecto a la exposición de parches hidrofóbicos, evidenciado por el aumento en la intensidad de fluorescencia de la sonda ANS al incubarse con la $[3\text{Fe-4S}]^+$ -ACO2, respecto a la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2.

Se desarrollaron parámetros para los centros ferrosulfurados de la ACO2 que permitieron la realización de simulaciones de dinámica molecular para evaluar las diferencias entre los estados del centro Fe-S de la ACO2, encontrándose que la $[3\text{Fe-4S}]^+$ -ACO2 inactiva posee un mayor nivel de apertura y exposición del centro ferrosulfurado, en conjunto con una dinámica global de la proteína de tipo *breathing*, de mayor magnitud para el estado inactivo.

Se evaluó el impacto de la acetilación por acetil-CoA en la ACO2 humana, encontrándose que esta modificación llevó a una pérdida de la actividad de la ACO2 (hasta un 30% tras la incubación con 1.5 mM acetil-CoA). Las lisinas acetiladas que presentaron una modificación dosis-respuesta respecto a la concentración de acetil-CoA fueron la 86, 401, 458, 462 y 776. Por otra parte, la 138, 245, 520, 628 y 651-652 (el mismo péptido), fueron detectadas en niveles similares para todas las concentraciones de acetil-CoA.

Se obtuvo numerosa evidencia sobre la existencia de la interacción física entre la ACO2 humana y la frataxina humana (FXN), proteína participante de la biosíntesis *de novo* de centros ferrosulfurados en la mitocondria. Se mostró que la FXN recombinante cargada con hierro es capaz de activar a la ACO2, incluso cuando la misma resulta previamente inactivada por peroxinitrito. Adicionalmente, mediante experimentos de fluorescencia intrínseca, ELISA de interacción proteína-proteína y anisotropía de fluorescencia, se confirmó la interacción física hierro dependiente entre ambas proteínas. Esto fue complementado mediante estudios *in silico*, donde se generaron modelos del complejo ACO2-FXN mediante AlphaFold2.0-Multimer, y mediante *docking* utilizando el webserver HADDOCK 2.0. Estos estudios sugirieron que la interacción entre la ACO2 y la FXN se encuentra sustentada en la coevolución entre ambas proteínas, así como también, se obtuvieron modelos que acercan lo suficiente el centro ferrosulfurado inactivo de la ACO2 y la región ácida de la FXN (la cual tiene asignado el rol de unión a hierro) para sustentar un mecanismo de transferencia de hierro. Nuestros resultados apoyan que la FXN además de participar en la biosíntesis de centros Fe-S en la mitocondria, participaría en la reactivación de la ACO2 oxidada.

Además, se estudió la actividad aconitasa en modelos celulares que cursan con un aumento en la producción de oxidantes endógenos: 1) un modelo de senescencia celular inducida por el oncogén RAS, y 2) células espermáticas que transcurren el proceso de capacitación. Se logró determinar en ambos casos, el aumento de los niveles de superóxido mitocondrial en estado estacionario, en comparación con los controles, evaluando la actividad y expresión de la ACO2. En el modelo de senescencia inducida por el oncogén RAS, la inhibición de la ACO2 se acompañó por cambios en metabolitos y enzimas que confirman un redireccionamiento del citrato desde la mitocondria hacia

el citosol. Esto se acompaña con una disminución en la biosíntesis de ácidos grasos y un aumento en la actividad de la SIRT6, sugiriendo que el aumento en los niveles de citrato impactará en la acetilación proteica en este caso. Por otra parte, la evaluación de la ACO2 en espermatozoides humanos permitió confirmar que la producción de especies oxidantes mitocondriales es esencial para el proceso de capacitación espermática. Durante este proceso, la síntesis de ATP y la respiración mitocondrial se encuentran aumentadas a pesar de la inhibición de la ACO2, sustentando que la ACO2 no ejerce un control metabólico en estas células.

En resumen, este estudio proporciona una visión integral de la ACO2 humana desde su expresión y purificación, su caracterización estructural, funcional e interacción con proteínas mitocondriales asociadas y su papel potencial en la modulación del metabolismo mitocondrial.

Palabras clave: aconitasa mitocondrial, proteína ferrosulfurada, biología redox, biología computacional, modificaciones postraduccionales, interacción proteína-proteína

2. Introducción

2.1. La aconitasa mitocondrial (ACO2)

La eficiencia del metabolismo energético celular es fundamental para la función y supervivencia celular. Una de las enzimas críticas en este proceso es la aconitasa mitocondrial (ACO2, citrato (isocitrato) hidrolasa, EC.4.2.1.3), la cual desempeña un papel esencial en el ciclo de Krebs al catalizar la isomerización reversible de citrato a isocitrato pasando por un intermediario *cis*-aconitato. En la mayoría de los tejidos de mamífero, bajo condiciones de equilibrio a pH 7.4 y 25 °C, la relación entre los sustratos se mantiene de acuerdo con la reacción en equilibrio de la ACO2: 88% citrato \leftrightarrow 4% *cis*-aconitato \leftrightarrow 8% isocitrato, resultando en la característica relación citrato/isocitrato de aproximadamente 10/1. Pese a que esta reacción es endergónica ($\Delta G^{\circ} = 6.3$ kJ/mol), a nivel celular la reacción es favorecida por el rápido consumo del isocitrato en el siguiente paso del ciclo de Krebs (oxidación del isocitrato por la isocitrato deshidrogenasa (IDH); $\Delta G^{\circ} = -8.4$ kJ/mol)[1,2].

La ACO2 posee, como grupo prostético, un centro ferrosulfurado (Fe-S) cúbico $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ligado a tres cisteínas proteicas por enlaces Fe-S, mientras que el cuarto hierro, denominado Fe_{α} , se encuentra expuesto al solvente siendo capaz de unir átomos de oxígeno de sus sustratos o del agua[3,4]. Mientras que la integridad de este centro es esencial para la catálisis, la presencia de este Fe_{α} no coordinado con residuos proteicos lo vuelven uno de los blancos preferenciales de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) en la mitocondria. La oxidación del centro Fe-S de la ACO2, con la consecuente pérdida del Fe_{α} , lleva a la formación de un centro $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ inactivo; sin embargo, esta reacción puede ser revertida tanto *in vitro* como *in vivo* mediante la adición de un átomo de Fe^{2+} y un reductor que le provea un electrón, como, por ejemplo, el glutatión o el ácido ascórbico, muy abundantes en la mitocondria[5] (Figura 1). En condiciones fisiológicas, la relación de aconitasa inactiva respecto a la total se encuentra en el entorno al 10-15%. Aunque la inactivación de la ACO2 ha sido sumamente caracterizada en la literatura, los procesos y elementos participantes en la reactivación todavía no son del todo comprendidos. Se ha postulado que la frataxina (FXN), uno de los componentes involucrados en biosíntesis *de novo* de centros Fe-S, podría participar en la reparación de la $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -ACO2[6]. Sin embargo, este resultado ha sido cuestionado[7].

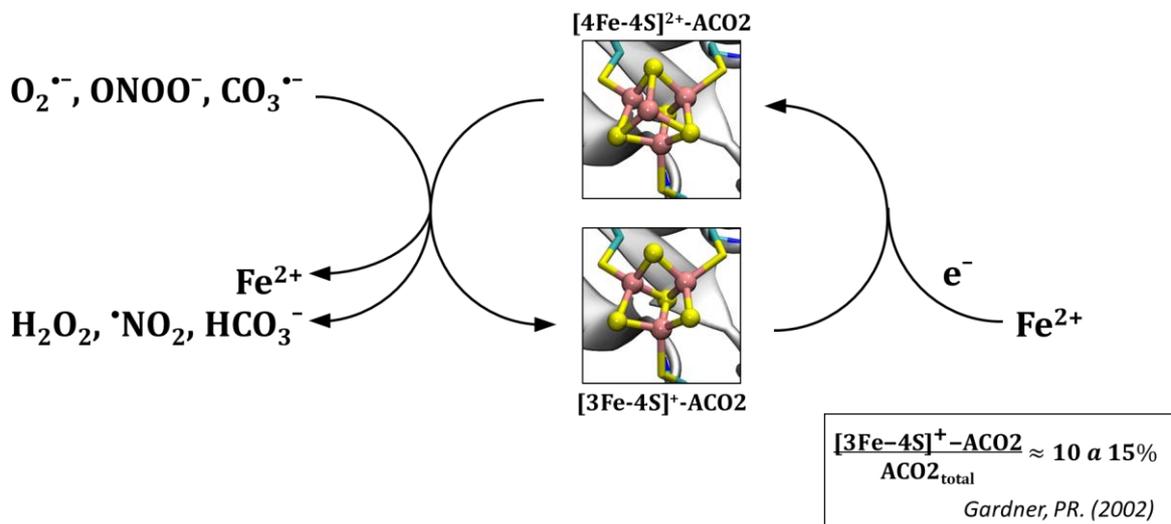


Figura 1. Oxidación y reducción del centro Fe-S de la ACO2. Los oxidantes aniónicos como el radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, ONOO^- y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ reaccionan rápidamente con el clúster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ de la ACO2 con una constante de velocidad de segundo orden que varía de 10^5 a $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dando como resultado una enzima inactiva que contiene un centro $[3\text{Fe-4S}]^+$. Durante este proceso, un ion de hierro (Fe_a) se libera como Fe^{2+} y se producen oxidantes secundarios. La reactivación de la enzima puede lograrse *in vitro* o *in vivo* mediante la adición de Fe^{2+} y un agente reductor que proporcione un electrón adicional (e^-), como el glutatión. La formación de H_2O_2 y HCO_3^- requiere H^+ del medio, y la reacción del ONOO^- produce H_2O además de $\bullet\text{NO}_2$. En condiciones fisiológicas, la relación de ACO2 inactiva respecto a la total es del entorno al 10-15%. Modificado de[5].

La ACO2 presenta una isoforma citosólica conocida como ACO1, también denominada IRP1 (*iron regulatory protein 1*). Aunque ambas son capaces de catalizar la misma reacción enzimática, son codificadas por genes distintos situados en diferentes cromosomas y comparten una identidad de secuencia de solamente 30%. Asimismo, la forma madura de la ACO1/IRP1 tiene un peso molecular de 98.4 kDa (889 residuos), lo que supone 136 residuos más que la forma madura de la ACO2 (753 residuos)[8]. Particularmente, la ACO1/IRP1 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 o el almacenamiento del hierro como la ferritina o los receptores de transferrina[9]. Se ha propuesto, que el rol de la actividad aconitasa de la ACO1 permite conservar el balance entre el NADPH generado desde el isocitrato por la IDH con el acetil-CoA generado del citrato por la citrato liasa, regulando la glucólisis, la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos[10]. La regulación del estado de la ACO1/IRP1 también puede darse por la reacción con el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), sin embargo, esta es mucho menos sensible en comparación a la ACO2[11].

Las mitocondrias constituyen el principal sitio de producción de ROS a nivel intracelular, por la reducción parcial del oxígeno al $O_2^{\bullet-}$ en la cadena de transporte electrónico y las flavin-deshidrogenasas del ciclo de Krebs[12–16]. Durante mucho tiempo se propuso al $O_2^{\bullet-}$ como una especie importante en la toxicidad por oxígeno, pero los blancos específicos de este radical eran esquivos hasta que se identificó como uno de ellos a la ACO2 y otras deshidratasas con centros Fe-S[17–19]. La ACO2 es extremadamente sensible a la inactivación por el $O_2^{\bullet-}$, y además, por la alta especificidad de esta reacción, se ha utilizado la actividad de la ACO2 como método para medir la concentración de $O_2^{\bullet-}$ en estado estacionario o la formación de ROS mitocondriales en modelos celulares[20,21].

También la ACO2 reacciona con óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), producto de las óxido nítrico sintasas, y con especies derivadas del mismo como el peroxinitrito ($ONOO^-$) y radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$)[22,23]. La presencia de la ACO2 oxidada y nitrada en diversos modelos animales de sepsis, inflamación, envejecimiento y diabetes la revelan como un blanco preferencial de especies nitro-oxidativas[24–26].

El $O_2^{\bullet-}$ y $ONOO^-$ reaccionan rápidamente con el centro $[4Fe-4S]^{2+}$ con constantes de segundo orden en el rango de entre 10^8 a $10^5 M^{-1}s^{-1}$ llevando a la formación del centro $[3Fe-4S]^+$ catalíticamente inactivo, pero tras esta inactivación, la ACO2 es capaz de reactivarse *in vivo*. Por otra parte, el $^{\bullet}NO$ y nitrosotioles (como el nitrosoglutatión) reaccionan a altas concentraciones con el centro $[4Fe-4S]^{2+}$ con constantes de reacción menores (0.65 y $0.23 M^{-1}s^{-1}$) pero llevan a la disrupción total e irreversible del centro Fe-S[27].

Por la capacidad de la ACO2 de inactivarse oxidativamente y reactivarse, junto con su papel en el metabolismo intermediario, se ha sugerido que podría actuar como un reóstato redox, influyendo en la regulación del flujo de electrones y carbono a través del Ciclo de Krebs (Figura 2)[28].

En los últimos años, también se ha destacado el rol inmunomodulador del metabolito itaconato, un metabolito derivado del intermediario de la reacción catalizada por la ACO2[29]. El itaconato es un metabolito producido por la descarboxilación del *cis*-aconitato catalizada por la aconitato descarboxilasa 1 (ACOD1 o IRFG1), cuya expresión se da principalmente en macrófagos activados. La producción de itaconato es capaz de limitar la succinato deshidrogenasa (SDH), ya que funciona como inhibidor competitivo, bloqueando los procesos inflamatorios mediados por succinato (HIF1 α e IL-1 β). Además, el itaconato es capaz de inducir las proteínas antiinflamatorias NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) y ATF3 (*activating transcription factor 3*). Específicamente en

este contexto, la ACO2 suele encontrarse parcialmente inactiva principalmente por la alta producción de $\cdot\text{NO}$, lo que implica una acumulación de citrato y una caída en los niveles de α -cetoglutarato[30].

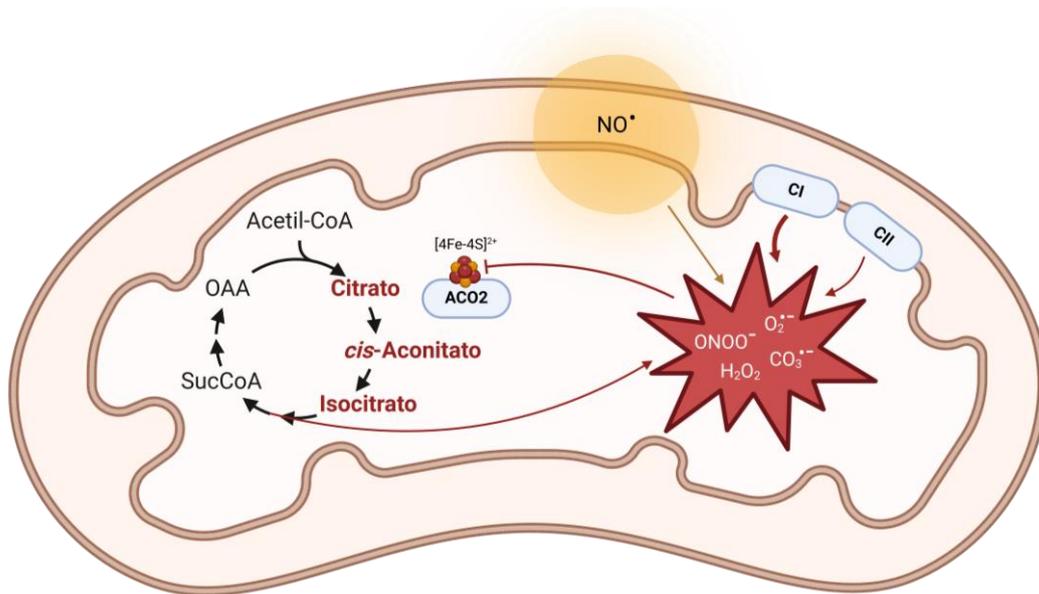


Figura 2. La ACO2 como blanco de especies reactivas mitocondriales. La ACO2, enzima localizada en la matriz mitocondrial, cataliza la isomerización reversible de citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs, siendo esencial para el metabolismo celular. Su centro Fe-S [4Fe-4S]²⁺, es un blanco de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno llevándola a un estado [3Fe-4S]⁺ inactivo, tras la pérdida del Fe_α del centro. La principal fuente de las especies reactivas son las deshidrogenasas del ciclo de Krebs y los complejos I y II de la cadena de transporte electrónica.

También se ha descrito a la ACO2 como proteína asociada al ADN mitocondrial[31]. En levaduras se ha determinado que la ACO2 es una de las proteínas involucradas en la formación de nucleoides, participando en el mantenimiento del ADN_{mt}, función independiente de la actividad catalítica de la enzima[32]. Esto todavía no ha sido verificado en vertebrados.

Se ha observado que en células de mamífero la expresión de la ACO2 se encuentra regulada a nivel de la traducción por el nivel de hierro intracelular, lo que ha sido demostrado por el aumento de su expresión al incubar células con hemina (fuente de hierro) en comparación a células tratadas con deferoxamina (quelante de hierro)[33]. Posteriormente, fue descrito que uno de los mediadores en esta regulación es la ACO1/IRP1, ya que el ARNm de la ACO2 contiene un IRE en la 5' UTR al que la ACO1/IRP1 se une (con una afinidad relativamente baja en comparación a los IRE de otras proteínas como por ejemplo la L/H-ferritinas o la ferroportina), disminuyendo así su traducción[34]. La remoción del IRE de la ACO2 o su extensión contribuyen a la modulación en la expresión de la enzima debido a cambios en la estabilidad termodinámica y, por tanto, el tiempo de vida del ARNm.

Igualmente, la expresión de la ACO2 no es solamente regulada por el IRE, sino también por mecanismos independientes del IRE. La mutación de los residuos que unen el centro Fe-S de la ACO2 (Cys385, Cys448, Cys451), por serina, redujo la expresión de la ACO2, pero se mantuvo controlada por los niveles de hierro. Sin embargo, esta regulación fue eliminada cuando se mutó el IRE en el 5' UTR de la ACO2[35].

Se ha reportado tanto en ratones como en humanos, que la transcripción de la ACO2 es controlada por NR1D1 (receptor nuclear subfamilia 1, grupo D, miembro 1), lo que le confiere a este último su función reguladora sobre el metabolismo mitocondrial. NR1D1 opera como un represor transcripcional al reclutar a NCoR1 (corepresor del receptor nuclear 1) y a HDAC3 (histona desacetilasa 3), teniendo un rol importante en la regulación del ciclo circadiano central a través de la represión de BMAL1. BMAL1 (Brain and Muscle ARNT-Like 1) es una proteína clave en la regulación del reloj circadiano en los mamíferos. Junto con CLOCK, otra proteína central, BMAL1 forma un complejo que actúa como un activador transcripcional, promoviendo la expresión de genes que controlan los ritmos circadianos, como PER y CRY. La ACO2 presenta un motivo de unión para NR1D1 en su promotor, observándose además, que la sobreexpresión de NR1D1 conlleva la represión de la ACO2, mientras que la mutación del promotor de la ACO2 resulta en la supresión de su regulación por NR1D1[36].

2.2. Estructura de la ACO2, mecanismo catalítico y evaluación de la actividad aconitasa

La ACO2 humana traducida contiene 780 aminoácidos(*), de los cuales 27 del extremo N-terminal corresponden a un péptido señal que la dirige a la mitocondria[37]. La forma madura de la ACO2 es monomérica y posee 753 aminoácidos con un peso molecular de 82.4 kDa. La secuencia, el plegamiento y estructura de la ACO2 se encuentran altamente conservados dentro de los mamíferos[37], y la identidad de secuencia entre la ACO2 porcina, la cual es la más estudiada en la literatura, coincide en un 97% con su homóloga humana.

El análisis de la ACO2 y la caracterización de su centro Fe-S iniciaron con la detección de una señal de EPR (espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica) proveniente de dicho centro debido al carácter paramagnético del centro $[3\text{Fe-4S}]^+$, sin embargo, el centro en su estado $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ no presenta señal (Figura 3A). Posteriormente, se emplearon diversas técnicas espectroscópicas para profundizar en la caracterización de este centro Fe-S, tales como la espectroscopía de Mössbauer, la resonancia electrónica de doble resonancia nuclear (ENDOR) y el dicroísmo circular magnético (MCD) a baja temperatura[4]. Adicionalmente, varias proteínas Fe-S, incluida la ACO2, presentan espectros de dicroísmo circular (CD) en la región ubicada entre los 350 y los 800 nm de diversas características que dependen del tipo de centro Fe-S y su contexto (Figura 3B-D). Este tipo de señales también son evidenciables para centros $[2\text{Fe-2S}]$, los cuales son precursores de la biosíntesis de centros de tipo $[4\text{Fe-4S}]$ [38].

La estructura cristalográfica de la ACO2 porcina con su centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ fue resuelta por primera vez por Robbins y Stout en 1988 utilizando cristalografía de rayos X (PDB ID: 6ACN). Antes de eso, habían resuelto la estructura de la enzima inactiva (PDB ID: 5ACN), proporcionando así evidencia directa de una interconversión de sus centros Fe-S, confirmando evidencia previa analítica, bioquímica y espectroscópica, que respaldaba que el clúster Fe-S de la ACO2 podía existir en diferentes estados[39].

(*) Por convención, como la bibliografía referenciada en esta tesis varía en la utilización de la numeración aminoacídica incluyendo o no el péptido señal (27 aminoácidos), se utilizará la numeración de la ACO2 incluyéndolo, y utilizando la numeración tal como aparece para la ACO2 humana en la base de datos UniProt con el ID Q99798.

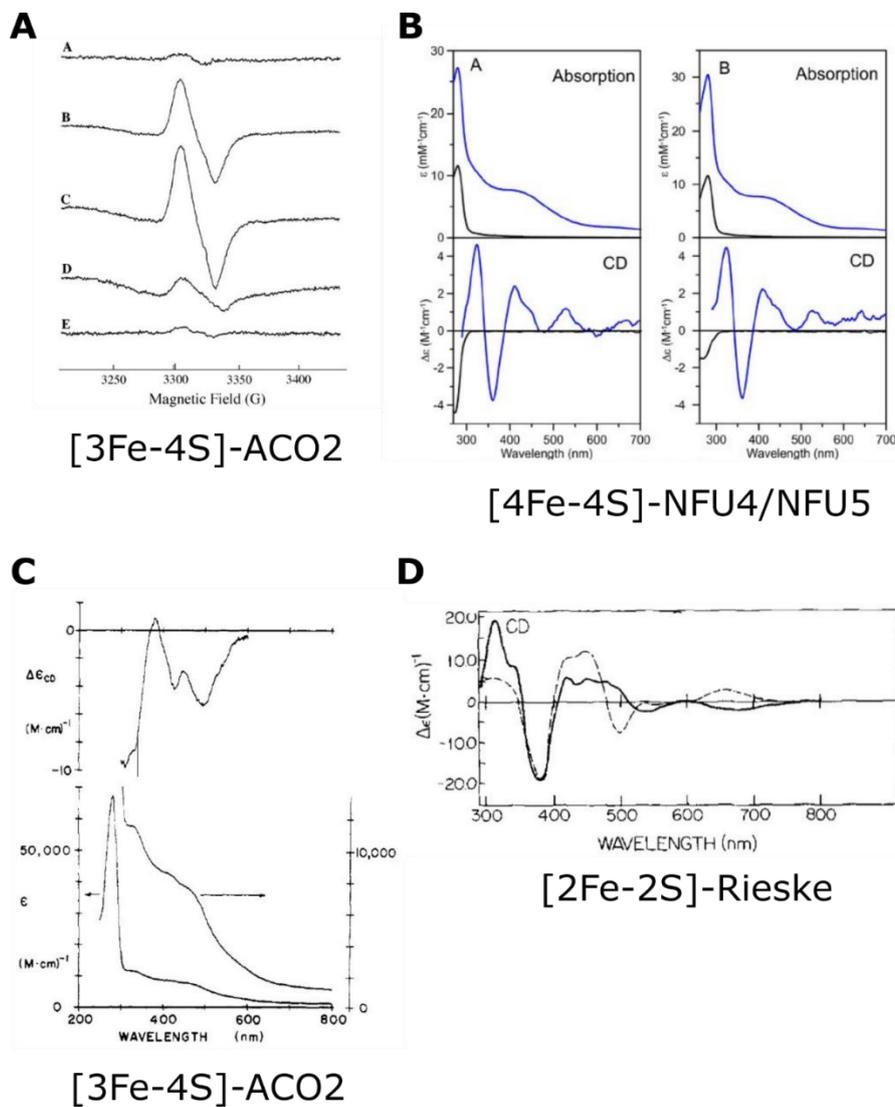


Figura 3. Técnicas espectroscópicas utilizables para la evaluación de proteínas Fe-S. A) Extraído de Han, 2005: espectros de EPR de la $[4Fe-4S]^{2+}$ -ACO2 antes (A) y después del tratamiento con $30 \mu M$ a $1 mM$ de $ONOO^-$ (B-D), o con $500 \mu M$ $ONOO^-$ en presencia del citrato $50 mM$ (sustrato). B) Extraído de Azam, 2020: espectros UV-Vis y de CD de las proteínas NFU4 y NFU5. C) Extraído de Piszkiwicz, 1981: espectros de CD y UV-Vis de la ACO2 porcina D) Extraído de Fee, 1984: Espectro de CD de la proteína Rieske.

El plegamiento de la ACO2 consiste en 4 dominios globulares, con un dominio bisagra (*hinge-linker*) que conecta el dominio 3 con el 4 (Figura 4, izquierda). El centro Fe-S se encuentra ligado a tres cisteínas del dominio 3 (Cys385, Cys448, Cys451) y se encuentra dentro de una cavidad formada por los dominios 1 a 3 (Figura 4, derecha). Por su parte, el dominio 4, funciona como una “tapa” y su superficie es complementaria a esta cavidad.

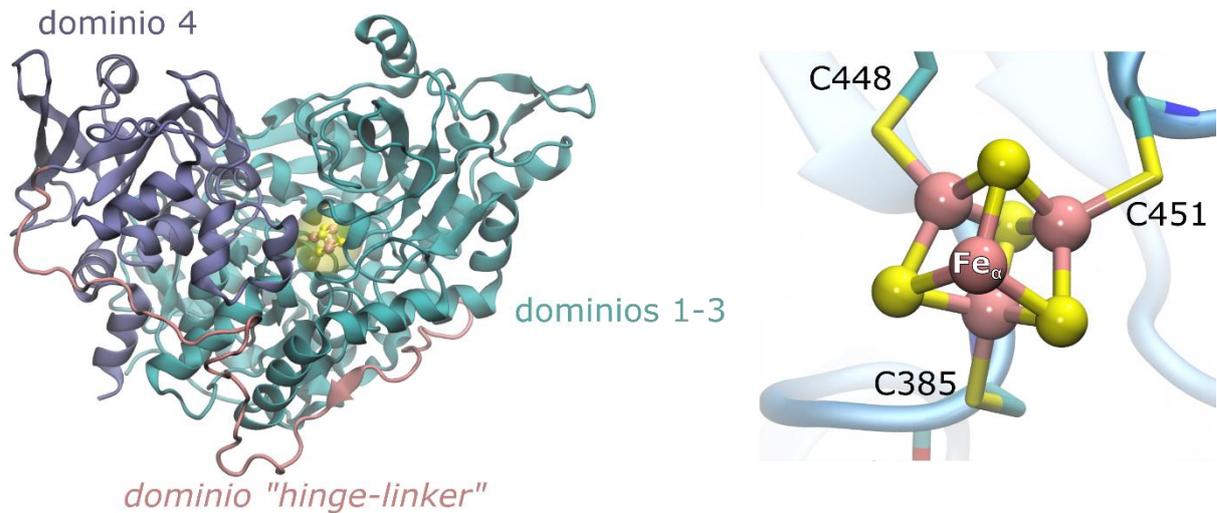


Figura 4. Estructura de la ACO2. A la izquierda se muestra la estructura tridimensional de la ACO2 de cerdo (PDB ID: 6ACN). A la derecha se muestra el centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ activo de la ACO2 en el sitio activo ligado a cisteínas proteicas mediante enlaces Fe-S. El cuarto hierro, denominado Fe_α no se encuentra unido a cisteínas y puede unir hidroxilos de sus sustratos o del agua. Además, es el átomo que se libera al inactivarse la ACO2 oxidativamente. Modificado de[5].

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. Todo esto podría ser, en parte, la razón del gran tamaño de la proteína[4].

El mecanismo catalítico de la ACO2 se ha propuesto basándose en estructuras cristalográficas de la enzima junto con sus sustratos e inhibidores. Además, los distintos mecanismos de reacción propuestos han sido evaluados utilizando datos cinéticos experimentales y mutaciones puntuales de los residuos involucrados (Figura 5)[3].

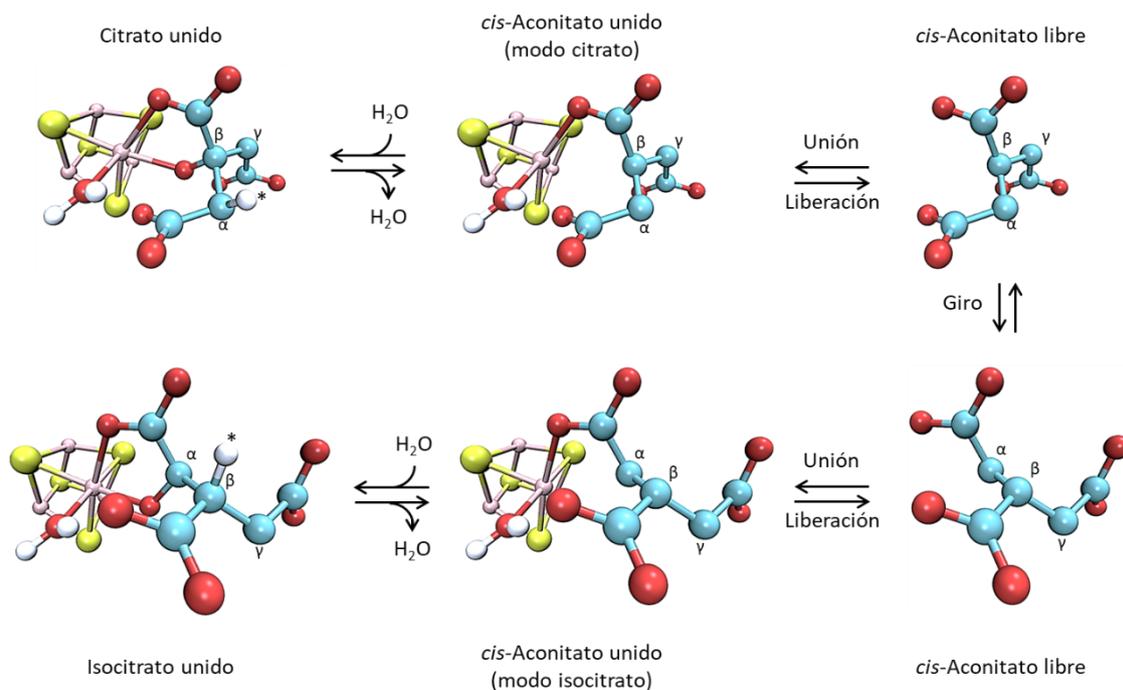


Figura 5. Reacción catalizada por la ACO2. El citrato se une a la ACO2 de forma estereoespecífica. Una vez unido se elimina un grupo hidroxilo y un hidrógeno (*) en una reacción de deshidratación donde la His128 actúa como el ácido y la Ser669 como la base. En este paso, una molécula de agua es liberada para dar paso a la formación de *cis*-aconitato unido al centro Fe-S en "modo citrato". Posteriormente, el *cis*-aconitato debe girar y unirse al clúster en un "modo isocitrato". De esta forma es hidratado en una reacción de hidratación complementaria que lleva a la formación de isocitrato. Solo una de las estructuras representadas corresponde a una estructura cristalina existente (complejo con citrato), mientras que las otras fueron modeladas en base a evidencia experimental. Modificado de[5].

La Ser669, actuando como base general, se cree que está desprotonada cuando el sustrato se une al centro Fe-S y se forma Fe-OH₂ en la esfera de coordinación. La Ser669 entonces abstrae el protón del carbono α del citrato para formar *cis*-aconitato. La eliminación conjugada del grupo hidroxilo y la ruptura del enlace β C-OH resultan en la desprotonación de la His128. El par His128-Asp129 activa la molécula de agua coordinada con el centro Fe-S para proporcionar un hidróxido al *cis*-aconitato. Luego, la Ser669 protona el carbono β de este intermediario para formar isocitrato[40].

Hasta el momento, toda la información referida al mecanismo catalítico de la ACO2 se basa en las técnicas mencionadas y nunca se ha caracterizado utilizando técnicas computacionales, como por ejemplo métodos de mecánica cuántica (QM), de mecánica clásica (MM).

Debido a su mecanismo catalítico y a la presencia del doble enlace del *cis*-aconitato ($\epsilon_{240} = 3.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), es posible medir la actividad aconitasa por espectrofotometría UV-visible (Figura 6). Este método, denominado ensayo "directo", implica la evaluación de la formación de *cis*-aconitato a partir del consumo de citrato o isocitrato, o la medición del consumo de *cis*-aconitato, a través del cambio en la absorbancia a 240 nm. En casos donde estén presentes otros compuestos

que interfieren con la medida de absorbancia a 240 (ej. lisados celulares), puede utilizarse el ensayo “acoplado”, que involucra el uso de un exceso de IDH, donde se evalúa la reducción de NADP⁺ a NADPH por medición de la absorbancia a 340 nm[41].

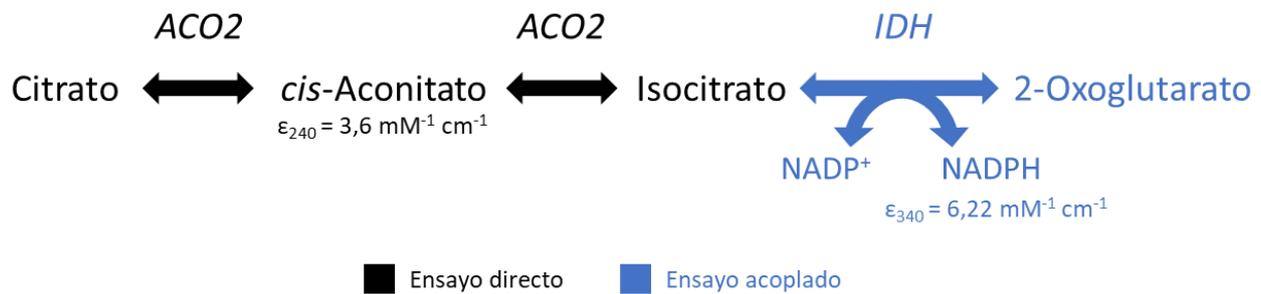


Figura 6. Ensayos utilizables para la medida de actividad aconitasa. El ensayo directo sigue la producción o consumo de *cis*-aconitato por absorbancia a 240 nm. En condiciones donde estén presentes moléculas que absorben también a 240 nm (ej. lisados celulares), puede utilizarse el ensayo acoplado, que hace uso de un exceso de isocitrato deshidrogenasa (IDH), la cual oxida el isocitrato producido por la ACO2 conjuntamente con la reducción de NADP⁺ a NADPH. El NADPH puede seguirse por absorbancia a 340 nm.

Adicionalmente, existen kits comerciales que se fundamentan en métodos colorimétricos para la determinación de la actividad aconitasa. Sin embargo, la mayoría de estos involucran una incubación previa de las muestras con soluciones que contienen Fe²⁺ y agentes reductores, lo que implica que esta metodología conduce a una sobreestimación de la actividad aconitasa real, ya que determina la actividad total en lugar de la que realmente presentan las muestras. Es decir, el equilibrio de la ACO2 entre su estado activo [4Fe-4S]²⁺ e inactivo [3Fe-4S]⁺ se desplaza hacia la formación del estado activo [4Fe-4S]²⁺.

2.3. Modificaciones postraduccionales no oxidativas de la ACO2

Además de las modificaciones oxidativas que pueden encontrarse en la ACO2 (Tabla 1), se han identificado otras modificaciones postraduccionales en esta enzima, siendo sus consecuencias funcionales parcialmente estudiadas.

| Tabla 1. Modificaciones postraduccionales de la ACO2 en condiciones de estrés oxidativo | | |
|---|--------------------------|---|
| Modificación | Consecuencia | Referencias |
| Reacción del centro Fe-S con O_2 , $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $ONOO^-$, $CO_3^{\bullet-}$ | Inhibición reversible | Flint, 1993; Castro, 1994; Gardner, 1994; Tórtora, 2007 |
| Reacción del centro Fe-S con $^{\bullet}NO$, GSNO | Inhibición irreversible | Tórtora, 2007 |
| Nitración de tirosinas | No modifica la actividad | Tórtora, 2007; Han, 2005 |
| Glutacionilación de cisteínas | Actividad disminuida | Han, 2005 |

A continuación, se profundiza en las modificaciones postraduccionales no oxidativas más relevantes reportadas en la ACO2.

2.3.1. Fosforilación

La fosforilación es la modificación postraduccionales más abundante en las proteínas, con más de 250.000 sitios de fosforilación reportados en el proteoma y más de 500 genes codificantes para kinasas en el humano. Esta modificación consiste en la adición reversible de un grupo fosfato, la cual puede ocurrir comúnmente en serinas, treoninas y tirosinas, y suele tener efectos significativos en las proteínas, particularmente en la regulación de su actividad enzimática (revisado en[42]). A nivel mitocondrial se han identificado al menos 25 proteín-kinasas con sustratos mitocondriales, incluyendo la proteín-kinasa A (PKA), la proteín-kinasa C (PKC), la kinasa inducida por PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) (PINK1), entre otras[43]. Se ha encontrado evidencia que identifica a la ACO2 como un blanco de la FGR tirosín-kinasa, un miembro de la familiar de las Src proteín-kinasas, modificando los residuos Tyr71, Tyr544 y Tyr665 en mitocondrias de cerebro de rata. Notablemente, estos residuos se encuentran altamente conservados, por lo que podrían ser importantes en la estabilidad o actividad catalítica de la ACO2 humana[44]. También se ha detectado a la ACO2 fosforilada en músculo esquelético de humanos y en músculo cardíaco de ratas con diabetes tipo 1[45,46]. En estos modelos, la fosforilación enzimática de las serinas Ser471 y Ser690 de la ACO2, fue un proceso encontrado posterior a la activación de la PKC y que en

condiciones *in vitro*, puede ser fosforilada por la PKC β_2 . Particularmente se ha encontrado que esta modificación promovería la activación de la aconitasa en el sentido reverso (de isocitrato a citrato).

2.3.2. Succinación

La succinación es una modificación, irreversible y espontánea *in vivo*, que resulta de la reacción del fumarato con grupos sulfhidrilos mediante una adición de Michael, por lo que a nivel biológico esto resulta en la formación de un enlace tioéter con residuos de cisteína. La producción por esta vía de S-(2-succino) cisteína, es a lo que se denomina "succinación". Al ser un tioéter, no un tioéster, no es reversible por transesterificación con glutatión u otros tioles celulares. El rol de esta modificación como regulador es propuesto debido a que el fumarato es un metabolito intermediario del ciclo de Krebs y a que el mismo puede presentar gran variación en condiciones de estrés. Por ejemplo, este aumenta 10 veces en fibroblastos durante la diferenciación a adipocitos, y puede aumentar hasta 6 veces en músculo durante el ejercicio. La modificación de los niveles de fumarato responde fuertemente a la relación NADH/NAD⁺, por lo que también puede variar en la hipoxia, el distrés respiratorio o el alcoholismo, entre otras condiciones[47].

En cultivos de fibroblastos de ratón deficientes en fumarasa, y que por lo tanto, acumulan fumarato a nivel intracelular, se identificó a la ACO₂ succinada en las cisteínas 448 y 451, y en menor cantidad en la 385, todas ellas participantes en la coordinación del centro Fe-S, por lo que esta modificación impediría la coordinación del centro Fe-S, y por tanto, vuelve a la ACO₂ catalíticamente inactiva[48].

2.3.3. Acetilación

La acetilación es una modificación postraducciona reversible que puede ocurrir tanto de forma enzimática como no enzimática. En el núcleo y el citosol, la acetilación es regulada por las acciones opuestas de acetiltransferasas y desacetilasas, sin embargo, en la mitocondria, se ha planteado que la acetilación ocurre mayoritariamente de forma espontánea tras la reacción del acetil-CoA con las lisinas. Esta reacción espontánea se encuentra favorecida por los altos niveles de acetil-CoA (0.1 a 1.5 mM) y el pH alcalino de la matriz mitocondrial (7.9-8.0)[49]. Por otra parte, la reversión de esta modificación es realizada a nivel mitocondrial por la desacetilasa sirtuina 3 (SIRT3), la cual presenta gran inespecificidad y desacetila aproximadamente 65% de los 2.200 sitios acetilados del proteoma mitocondrial[49].

Particularmente, la ACO₂ ha sido hallada en estudios de acetiloma en rata, ratón y humano[50–52], sin embargo, los sitios de acetilación reportados y a los que se les atribuyen roles regulatorios varían de forma importante en la literatura. Particularmente un artículo de Fernandes en 2015[53]

presenta resultados de modelos de acetilación química *in vitro* (anhídrido acético o acetil-CoA), acetilando mitocondrias aisladas de corazón de rata o mediante un modelo *in vivo* de ratones alimentados con dieta alta en grasas. En ambos casos se observa allí un aumento de la actividad de la ACO2 que es revertido por tratamiento con la SIRT3 o por reversión del tipo de dieta en los ratones. Dichas muestras son sometidas a un estudio de proteómica para identificar los residuos acetilados y además mediante el estudio de la conservación de las lisinas, sugieren el rol de la acetilación de la lisina 144 (dominio 1) como responsable de esta modulación de la actividad. El mecanismo planteado implica la modificación de una interacción de esta lisina con la Gln541 localizada en el dominio 4 de la ACO2. Esta lisina también fue observada en[54].

En otro trabajo, la Lys258 es a la que se le asigna un rol regulatorio, ya que la encuentran acetilada y con actividad aumentada en una línea celular de cáncer de próstata. Reemplazar dicha lisina por arginina previene la acetilación y lleva a la enzima a presentar una menor actividad. A su vez, su actividad también disminuye al ser tratada con SIRT3[55]. Esta lisina se encuentra localizada en el dominio 3, en la interfase con el dominio 4, por lo que la modificación de este residuo podría también afectar la dinámica de la enzima.

2.3.4. Glucosilación

La O-Glucosilación es un tipo de glucosilación que se produce por la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) sobre el grupo hidroxilo de serina o treonina de algunas proteínas. En un estudio masivo de glucosilación de proteínas mitocondriales en rata, se encontró a la ACO2 glucosilada[56]. Posteriormente se encontró que en células HeLa, la ACO2 presenta glucosilación disminuida tras el silenciamiento de la expresión de la O-GlcNAc transferasa mitocondrial (mOGT), por lo que esta es la enzima candidata a modificar de esta forma a la ACO2[57].

La sialilación, es un tipo de glucosilación, donde el azúcar adicionado de forma covalente a la proteína es el ácido siálico[58]. Esta modificación es catalizada por enzimas con actividad sialiltransferasas, glucoproteínas con dominios transmembrana, normalmente asociadas al complejo de Golgi, que utilizan como reactivo el CMP-ácido siálico. El ácido siálico es un monosacárido con nueve carbonos y carga negativa, que se adiciona en un residuo de asparagina (N-glucosilación) o en serina o treonina (O-glucosilación). Ha sido reportado que la actividad de la ACO2 decrece hasta un 20%, ante un aumento en la sialilación de la Asp612, durante el proceso de capacitación en células espermáticas de ratón. En dicho reporte, se postuló además a la sialilación

de la ACO₂ como la responsable del switch metabólico de las células de un metabolismo oxidativo a uno más glucolítico durante este proceso de capacitación[59].

2.3.5. Consideraciones finales sobre las modificaciones postraduccionales de la ACO₂

Dado que 1) el H₂O₂ puede modular las cascadas de fosforilación y 2) que factores que aumentan la concentración intramitocondrial de fumarato (aumento de la relación NADH/NAD, aumento del potencial de membrana y de la relación ATP/ADP) producen también un aumento en la formación de ROS mitocondriales; es probable que la fosforilación, la succinación y la acetilación de la ACO₂ también estén relacionadas con la modulación redox mitocondrial[60]. La modificación de los residuos de la ACO₂ puede producir cambios que pueden potencialmente impactar en la función de la ACO₂ humana y, además, pueden funcionar como señalización metabólica o funcionar simplemente como biomarcadores de cambios generales.

2.4. Rol de la ACO2 en patologías mitocondriales

En los últimos años, varias enzimopatías del ciclo de Krebs han sido reportadas como causantes de encefalopatías en humanos. Entre ellas se incluyen las deficiencias de la fumarasa, la succinato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa, la succinil-CoA sintetasa y la ACO2. Las características clínicas producidas por este tipo de enzimopatías suelen incluir convulsiones, debilidad muscular y defectos del crecimiento y del desarrollo[61].

Las variantes patogénicas (mutantes) de la ACO2 humana fueron identificadas inicialmente en el síndrome de degeneración cerebelosa-retiniana infantil, una condición neurodegenerativa severa de inicio temprano con convulsiones y retraso psicomotor profundo asociado con degeneración progresiva del cerebro, cerebelo y nervio óptico[62]. Posteriormente, fueron halladas otras presentaciones clínicas relacionadas con variantes de la ACO2 en individuos con condiciones neuromusculares y síndromes de paraplejia espástica hereditaria[63,64]. La mayoría de estos pacientes presentaban atrofia óptica, lo que destaca la sensibilidad del nervio óptico a la disfunción de la ACO2. Esto fue confirmado con la identificación de mutaciones en la ACO2 de individuos independientes que desarrollaron atrofia óptica[63,65–67].

Estudios indican que aproximadamente 5 de cada 100 casos de neuropatías ópticas hereditarias sin diagnóstico molecular corresponden a la presencia de variantes en el gen de la ACO2, destacando la necesidad de considerar esta enzima a la hora de mejorar los métodos de diagnóstico en esta patología[68]. La mayoría de las mutantes patogénicas identificadas, conllevan una pérdida significativa de la actividad aconitasa y de la respiración celular dependiente de piruvato/citrato, con además, la depleción del ADN mitocondrial[32,68]. Adicionalmente, se ha observado que las variantes presentan modificaciones en la estructura, dinámica molecular o interacción con sus sustratos[68].

Se ha propuesto que la medida de la actividad de la ACO2 puede ser utilizada como biomarcador pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La necesidad de biomarcadores pronósticos en ELA surge debido a la gran heterogeneidad en los periodos de supervivencia de los pacientes. Estudios han demostrado que el daño mitocondrial por radicales libres juega un papel crucial en la neurodegeneración en ELA, por lo que la evaluación de la actividad ACO2, por su sensibilidad a estas especies, puede reflejar el nivel de disfunción mitocondrial[69].

Una implicación adicional de la ACO2 en una patología, que encontramos particularmente intrigante y que, de hecho, sirvió como catalizador para una parte significativa de este proyecto, fue su relación

con la ataxia de Friedreich (FRDA). Este trastorno neurodegenerativo hereditario se caracteriza clásicamente por una ataxia (afectación del control y la coordinación muscular) progresiva de la marcha y un deterioro en capacidad de mantener correctamente la postura corporal, así como otros síntomas y signos neurológicos[70]. El gen causante de este trastorno corresponde al que codifica para la FXN. En el 98% de los casos, los portadores de ataxia de Friedreich presentan una expansión repetida de trinucleótidos (GAA) en el primer intrón del gen, lo que conduce a su silenciamiento y a una reducción de la transcripción del gen FXN entre un 70% y un 95%. Los individuos sanos tienen hasta 43 repeticiones GAA, mientras que los pacientes con FRDA tienen de 44 a 1700[71]. La FXN es una proteína de 14.3 kDa a la cual varios trabajos asignan el rol de funcionar como un activador cinético de la L-cisteína desulfurasa (NFS1), la cual forma parte del supercomplejo de síntesis de centros Fe-S [2Fe-2S] en la matriz mitocondrial[72–74]. En la literatura también se ha reportado que la FXN puede unir átomos de hierro, ya que posee varios motivos de unión a hierro particularmente en su región “*acidic ridge*” rica en glutamato y aspartato. Estudios de perturbación por NMR con ¹⁵N-FXN, han identificado los residuos participantes de la interacción con el hierro[75,76]. La FXN humana en particular, también mediante estudios de NMR, ha mostrado la capacidad de unir tanto Fe²⁺ como Fe³⁺[77]. La disminución en los niveles de FXN lleva a la caída en los niveles de proteínas que contienen centros Fe-S, siendo impactada fuertemente la ACO2, aunque esto es dependiente del tejido observado[78,79]. El fenotipo de las células con niveles disminuidos de FXN implica una viabilidad celular disminuida, el aumento de la producción de ROS y la liberación de citoquinas involucradas en la neuroinflamación[80]. Destacablemente, en líneas celulares derivadas de pacientes con FRDA, la sobreexpresión de FXN logra revertir el fenotipo celular, incluyendo el aumento en la actividad de la ACO2[80].

El vínculo entre la ACO2 y las afectaciones neurológicas previamente mencionadas puede respaldarse en antecedentes de nuestro grupo, donde se demostró que, en cerebro de rata, la ACO2 es un punto clave en la regulación del control metabólico, regulando el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa[60]. Bajos niveles de inhibición de la ACO2 en estos tejidos pueden impactar fuertemente en la energética de este órgano, llevando a las alteraciones indicadas.

El involucramiento de la ACO2 en el cáncer también ha sido estudiado en la literatura. Las células malignas priorizan la producción de energía vía glucólisis en lugar del ciclo de Krebs, por lo que los metabolitos intermediarios son utilizados en reacciones anabólicas[81]. En el carcinoma de células renales se observó una reducción de los niveles de expresión de la ACO2 tanto en células primarias como metastásicas en comparación con los tejidos sanos. Sin embargo, en estas últimas, se ha

identificado una correlación positiva entre la expresión de la ACO2 y una peor supervivencia de los pacientes[82]. Este hallazgo sugiere un posible papel de la ACO2 como indicador pronóstico en el carcinoma de células renales. También, se ha descubierto este rol pronóstico de la ACO2 también en el cáncer gástrico[83], y se ha reportado que la ACO2 se encuentra diferencialmente expresada en tumores respecto a tejidos sanos en cáncer de próstata[55], cáncer de mama[84] y cáncer colorrectal[85]. A su vez, alteraciones en el gen de la ACO2, como mutaciones, duplicaciones o inserciones, se han detectado en varios tipos de cáncer[86].

Esto implica que los niveles de expresión y/o la actividad de la ACO2 proporcionan información valiosa para el diseño de estrategias terapéuticas, pudiendo resultar en un marcador diagnóstico, predictivo o de respuesta a inmunoterapia en algunos casos[86].

Particularmente, las células prostáticas tienden a acumular citrato (sustrato de la ACO2), ya que este compuesto es un producto final en estas células y se secreta para formar parte del semen. Esta acumulación en los niveles de sustrato de la ACO2 no se debe a cambios en los niveles de la enzima, sino a la inhibición de la misma por el Zn^{2+} , el cual también se acumula en estas células[87,88]. En el caso de las células cancerosas de próstata, los niveles de Zn^{2+} disminuyen, lo que provoca una pérdida de la inhibición de la ACO2, reactivando el ciclo de Krebs. Como consecuencia, las células cambian su metabolismo, adoptando uno que depende de la oxidación del citrato[89].

2.5. Fundamentación del proyecto de tesis

Este proyecto de tesis aborda aspectos novedosos de los mecanismos de interacciones de especies oxidantes con una proteína mitocondrial que puede mediar la disfunción mitocondrial y muerte celular por especies nitro-oxidativas, pero que actúa también como sensor/reóstato redox redireccionando el metabolismo.

Si bien la ACO2 no ha sido considerada históricamente como una de las enzimas reguladoras del ciclo de Krebs, bajo determinadas condiciones metabólicas y tipos de tejidos, la modulación de la actividad de la ACO2 desempeña un papel crucial en la regulación del metabolismo celular, particularmente en el redireccionamiento de carbono. Aunque se han realizado estudios *in vivo*, la mayoría de estos han sido llevados a cabo en modelos animales o celulares, se necesita más investigación para comprender completamente el papel de la ACO2 en la regulación de las funciones celulares y tisulares.

Por ejemplo, la inhibición de la ACO2 conlleva la acumulación de citrato en la mitocondria, lo que promueve su exportación al citosol donde es utilizado como sustrato para la síntesis lipídica[90] o su excreción para formar parte del líquido seminal por parte de las células productoras de citrato del epitelio prostático normal[88].

Hasta el planteo de esta tesis, la ACO2 humana no se había obtenido en forma pura ni se había expresado de forma recombinante, siendo la mayoría de los trabajos encontrados en la literatura sobre homólogos de mamíferos, levaduras o bacterias.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Realizar la caracterización bioquímica, funcional y estructural de la aconitasa mitocondrial humana (ACO2) y estudiar su relevancia como moduladora del metabolismo mitocondrial.

3.2. Objetivos específicos

1. Realizar la caracterización bioquímica, estructural y dinámica de la ACO2
2. Evaluar el impacto de modificaciones postraduccionales en la estructura y función de la ACO2
3. Estudiar la interacción entre la ACO2 y la frataxina humana (FXN)
4. Evaluar el rol metabólico de la ACO2 en modelos celulares:
 - a. Un modelo de senescencia celular inducida por el oncogén RAS
 - b. El proceso de capacitación que transcurren las células espermáticas

4. Materiales y métodos

4.1. Reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (USA) a menos que se especifique. 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[91]. Su concentración fue determinada por espectrofotometría a 302 nm en NaOH 5 mM fresco ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El gas argón y nitrógeno fueron adquiridos de AGA (Montevideo, Uruguay). Las soluciones fueron preparadas con agua destilada y desionizada (Barnstead Smart2Pure).

4.2. Sistema de expresión para la ACO2 humana

La preparación, obtención de las cepas de almacenamiento con la construcción y la puesta a punto del sistema de expresión de la ACO2 se encuentran desarrollados en las secciones 5.1.1 y 5.1.2 de *Resultados y discusión*.

4.3. Purificación de ADN plasmídico (*miniprep*) y transformación de células competentes

Para la preparación de las bacterias de expresión a partir de la cepa de almacenamiento, tanto para la ACO2 como para la SIRT3 se siguió el siguiente protocolo:

Partiendo de 2-3 mL de cultivo crecido durante 16 h, se centrifugaron las células a 14000 rpm por 1 minuto y se removió el sobrenadante por aspiración con pipeta. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron, por agitación en vórtex, en 100 μL de una solución Tris-HCl pH 8, conteniendo glucosa 50 mM y EDTA 10 mM (solución 1). A esto se le agregaron 200 μL de una solución preparada en el momento que contenía NaOH 0.2 N y SDS 1%. Se mezcló el tubo por inversión (15 veces) y se dejó reposar 5 minutos. Se adicionó 150 μL de una solución compuesta de 60 mL de acetato de potasio 5 M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de H_2O . Se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 minutos. El tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos y 400 μL de sobrenadante se transfirieron a un nuevo tubo de 1.5 mL donde se agregó 1 μL de ARNasa, dejándose 60 minutos a 37 °C. Se agregaron 800 μL de etanol 100% frío, se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar a 12000 rpm 5 min, removiendo el sobrenadante con pipeta. El precipitado fue lavado con etanol 75% frío y centrifugado, se retiró el sobrenadante con pipeta y se secó 20 min en estufa a 37 °C.

Finalmente, se resuspendió el ADN plasmídico en 20-50 μL de H_2O y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser utilizado para transformación de células competentes.

La transformación de bacterias *E. coli* BL21(DE3) fue realizada por protocolo de *shock* térmico. Para esto se descongelaron 50 μL de células y se mantuvieron a 4 °C por 10 minutos. Se agregaron 2 μL de ADN plasmídico y se realizaron 3 incubaciones: la primera, 20 minutos a 4 °C; la segunda, 1.5 minutos a 42 °C, y la tercera, 2 minutos a 4 °C. Se agregaron 500 μL de LB y se realizó una última incubación a 37 °C por 50 minutos bajo agitación. Finalmente se sembraron 50 μL en una placa de LB-agar con el antibiótico apropiado (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina para bacterias transformadas con el plásmido de la ACO2 humana o 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina para bacterias transformadas con el plásmido de la SIRT3).

4.4. Anticuerpos

Los anticuerpos de conejo anti-ACO2 (ab71440), anti-IgG de conejo (IRDye 800 CW) y anti-SIRT3 (#5490), fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, UK), Li-Cor (Lincoln, Nebraska, USA) y Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA), respectivamente.

El suero anti-FXN de conejo fue producido en el laboratorio del Dr. Javier Santos, tal como fue descrito en[92].

4.5. Western blot

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida de entre 8 y 12% y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro 0.45 μm , Hybond-C extra; Amersham), mediante transferencia semiseca por 2 horas en buffer de transferencia con SDS. Las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS, leche 3%, Tween 0.3% (solución de bloqueo). Posteriormente se incubaron con los anticuerpos correspondientes (en TBS, BSA 5%, Tween 0.1%). Las membranas se lavaron 4 veces con TBS, Tween 0.1% (solución de lavado), y posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios (IRDye, dilución 1 en 15.000 en buffer de lavado) durante una hora con agitación. El exceso de anticuerpo fue removido con 4 lavados con buffer de lavado. Las membranas fueron reveladas mediante la detección de sondas infrarrojas, usando un equipo Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) y analizadas con el programa Image Studio Lite (LI-COR Biosciences).

4.6. Espectrofotometría

Las medidas de actividad y los espectros de absorbancia fueron realizados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis, modelo UV-2450, con *peltier* con temperatura controlada.

4.7. Constantes de reacción con oxidantes

Se utilizaron diferentes estrategias para determinar las constantes a 25 °C con cada oxidante. La concentración de ACO₂ utilizada se encontró siempre en el rango entre 0.4 y 2 μM. En todos los casos, la estrategia de medida consistió en evaluar la actividad de la ACO₂ midiendo su velocidad enzimática a partir del consumo de *cis*-aconitato tras la incubación con oxidantes. Para esto, la ACO₂ purificada e inactiva fue incubada con Fe²⁺ y DTT en condiciones anaeróbicas (activación) y posteriormente se le realizó una cromatografía de exclusión molecular en una cámara hipóxica para remover los excesos de Fe²⁺ y DTT que pudieran interferir con la reacción.

Para determinar la constante de reacción con el ONOO⁻, la ACO₂ activa se diluyó en buffer Tris 100 mM, pH 7.6, previamente desgaseado y se alícuotó. Posteriormente a dichas alícuotas se les agregó ONOO⁻ mediante adición en bolo y fueron agitadas. Los efectos de contaminantes de la síntesis de ONOO⁻ (como el H₂O₂), o productos estables de la descomposición del ONOO⁻, fueron descartados mediante un ensayo de adición reversa, donde el ONOO⁻ fue primero incubado en el buffer para permitir su descomposición antes de agregar la ACO₂. La constante de reacción fue obtenida al comparar los resultados experimentales contra curvas simuladas. La simulaciones fueron posibles gracias a que las constantes para la descomposición del ONOO⁻ y otras reacciones que lo involucran ya se encuentran reportadas en la bibliografía[27].

Para la constante de reacción con el CO₃^{•-}, la ACO₂ fue tratada como con el ONOO⁻ pero en presencia de HCO₃⁻ 25 mM. Bajo estas condiciones, a pH 7.4, la concentración de CO₂ calculada es de 1.5 mM, similar a su concentración fisiológica mitocondrial. Para determinar la constante de reacción se siguió el mismo procedimiento que con el ONOO⁻.

Por su parte, para la constante de reacción con el H₂O₂, la ACO₂ fue expuesta a diferentes concentraciones de H₂O₂ en viales anaeróbicos y se siguió la pérdida de actividad enzimática. El H₂O₂ fue diluido a partir de un stock inmediatamente antes de su uso y la concentración de la dilución fue determinada por absorbancia a 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [93]).

Por último, para determinar la constante de reacción con $O_2^{\bullet-}$, se utilizó un ensayo de competencia con la cobre/zinc superóxido dismutasa (SOD) utilizando el procedimiento propuesto en[22]. Brevemente, la ACO2 fue expuesta a un flujo de $O_2^{\bullet-}$, producido por xantina oxidasa (XO; 0.65 mU), en presencia de xantina (150 μ M). La competición de la ACO2 y la SOD por el $O_2^{\bullet-}$ fue evaluada en presencia de catalasa (0.5 μ M). Bajo estas condiciones la siguiente ecuación es válida:

$$\frac{F[A]}{(1 - F_i)k_s} = \frac{1}{k_d}[C]$$

Donde A es la concentración de ACO2, C es la concentración de SOD, F es la proporción de ACO2 inhibida a una cierta concentración de competidor (S), y k_s y k_d son las constantes de reacción del $O_2^{\bullet-}$ con el competidor ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [94]) y la ACO2 respectivamente.

4.8. Frataxina y variantes

La FXN humana (residuos 90-210) y su variante marcada con Texas red (H177C), fueron provistas por el Dr. Javier Santos del Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, Argentina, en el marco de una colaboración internacional que involucró la realización de dos pasantías de corta duración en su laboratorio (2020 y 2021). La producción de esta proteína se encuentra reportada en[95].

4.9. Espectroscopía de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas con el espectrómetro de fluorescencia FP-8500 (Jasco Inc.), con *peltier* termorregulado para cubetas. Para la fluorescencia intrínseca, la longitud de onda de excitación se fijó en 295 nm. Para la sonda 1-anilino-8-naftalensulfonato (ANS), se excitó a 380 nm. Se utilizaron anchos de banda de excitación y emisión de 2.5 nm y una velocidad de escaneo de 100 nm/min.

Las medidas de anisotropía de fluorescencia fueron realizadas en un espectrómetro FP-8300 con polarizador automático (Jasco Inc.). Los anchos de banda fueron ajustados a 10 nm para maximizar la intensidad de señal. La concentración de FXN marcada con sonda Texas Red, fue ajustada a 5 μ M. La excitación fue realizada a 590 nm y los experimentos fueron realizados a 15 °C. La anisotropía de fluorescencia (r) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$r = \frac{I_{vh} - GI_{vh}}{I_{vv} - 2GI_{vh}}$$

donde I_{vv} es la intensidad de la luz detectada con polarizadores de excitación y emisión montados verticalmente, I_{vh} es la intensidad de la luz detectada con el polarizador de excitación instalado verticalmente y el polarizador de emisión montado horizontalmente. El factor G en la ecuación (2) para cada muestra se determinó midiendo la intensidad de la luz detectada, I_{hv} e I_{hh} , con el polarizador de emisión instalado horizontal y verticalmente, respectivamente, bajo el polarizador de excitación montado horizontalmente y calculando $G = I_{hv}/I_{hh}$ [96]. Bajo la suposición de que hay un único sitio de unión para la interacción entre la FXN y la ACO2, las curvas de titulación de anisotropía con ACO2 se ajustaron utilizando la siguiente ecuación:

$$r_{obs} = r_0 + \frac{\Delta r_{PL}[ACO2]_T}{K_d + [ACO2]_T}$$

donde r_{obs} corresponde al valor observado de anisotropía, r_0 es el valor inicial de anisotropía de la FXN libre marcada con Texas Red, $[ACO2]_T$ es la concentración total de ACO2, K_d corresponde a la constante de disociación para el evento de unión y Δr_{PL} corresponde a $(r_{PL} - r_P)([FXN]_T)$, siendo r_{PL} y r_P los valores de anisotropía del complejo y de la ACO2, y $[FXN]_T$ la concentración total de FXN marcada con Texas Red[97]. Antes de su uso, todas las soluciones se centrifugaron durante 20 minutos a 15000g para sedimentar las partículas que dispersan la luz.

4.10. Espectroscopía de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se obtuvieron utilizando un espectrómetro de CD Chirascan V100 (Applied Photophysics). Se utilizó una cubeta de 10 mm de longitud de trayectoria para las mediciones. La configuración del software incluyó un tiempo por punto de 0.2 s, un tamaño de paso y un ancho de banda de 1 nm. Todos los espectros mostrados son la acumulación de al menos 3 repeticiones.

4.11. Métodos de modelado molecular

4.11.1. Generación de parámetros y estructuras iniciales

El modelo computacional para la ACO2 humana se generó por homología tomando como punto de partida la estructura de la ACO2 porcina depositada en PDB (Protein Data Bank) con el PDB ID 6ACN, realizando las 24 mutaciones puntuales correspondientes mediante el *plugin* FoldX[98] del programa YASARA View[99]. Este enfoque selecciona el rotámero óptimo para cada aminoácido

mutado a partir de una base de datos que contiene el programa. Posteriormente se realizó una minimización estructural para obtener el modelo final.

Al modelo de la ACO₂ obtenido, se le adicionaron los seis aminoácidos remanentes del corte de la cola de histidina (5'-GSHMAS-3') para tener un modelo lo más cercano posible al utilizado experimentalmente. El sistema fue colocado en una caja octaédrica truncada de dimensiones 106 x 106 x 106 Å, con aguas TIP3P[100]. Se agregaron iones (NaCl) para neutralizar y tener una concentración de 150 mM siguiendo el protocolo reportado en[101]. Los parámetros para los residuos nativos corresponden al campo de fuerza parm99 de AMBER.

Los parámetros para los centros Fe-S ([3Fe-4S]⁺ y [4Fe-4S]²⁺) fueron desarrollados tomando como base el trabajo de Carvalho, A., *et al.*[102]. Generalmente, la obtención y generalización de parámetros para centros de este tipo presenta cierta dificultad debido a la complejidad de los sistemas debido a factores como:

1. **La polarización de spin:** la distribución desigual de electrones con espines opuestos. En los centros Fe-S, los electrones pueden tener espines que no están apareados, lo cual afecta las propiedades magnéticas y electrónicas del complejo.
2. **Covalencia del enlace Fe-S:** el grado en que los electrones son compartidos entre el hierro y el azufre en los enlaces. En los centros Fe-S, la naturaleza covalente de los enlaces puede influir en la estabilidad y reactividad del complejo.
3. **Contaminación de spin:** refiere a la presencia de contribuciones no deseadas de estados de spin de mayor multiplicidad en las funciones de onda calculadas, lo que lleva a una sobreestimación de la energía del sistema y a resultados menos precisos.
4. **Acoplamiento de spin:** el acoplamiento de spin es la interacción entre los espines de los electrones en un sistema. En los centros Fe-S, los espines de los electrones en diferentes átomos de hierro pueden acoplarse de diversas maneras, afectando las propiedades magnéticas y electrónicas del complejo.
5. **Deslocalización de la valencia:** la extensión de los electrones de valencia sobre varios átomos en lugar de estar localizados en un solo enlace o átomo. En los centros Fe-S, los electrones pueden estar deslocalizados sobre el centro, lo cual puede influir en la conductividad y otras propiedades electrónicas del complejo; resultando en un desafío a la hora de asignar cargas atómicas.

En el trabajo de Carvalho[102], se presentan parámetros compatibles con el campo de fuerza AMBER que fueron desarrollados utilizando cálculos de DFT (*density functional theory*) para distintos tipos de centros Fe-S, incluido uno cúbico, similar al de la ACO2 activa, pero ligado mediante enlaces Fe-S con todos sus cuatro hierros unidos a azufres metilados, por lo que presenta una simetría que no se condice con el átomo de Fe $_{\alpha}$, que en la ACO2 no une cisteínas y se encuentra expuesto al solvente. Se tomaron de allí los parámetros presentados para distancia y ángulos (constantes y valores de equilibrio) y las cargas de los átomos involucrados. Para considerar la asimetría del centro de la ACO2 activa, se deslocalizó parcialmente la carga positiva sobre el Fe $_{\alpha}$. Asimismo, para el centro inactivo [3Fe-4S]⁺ se tomaron los valores tal como aparecen en el trabajo referenciado, ya que es de similares características.

Por su parte, los parámetros para los sustratos, fueron desarrollados mediante un procedimiento RESP estándar[103,104]. Brevemente, los sustratos fueron optimizados bajo solvente implícito en el nivel de teoría B3LYP/6-31G* y las cargas parciales fueron computadas utilizando el potencial electrostático restringida a un nivel de teoría HF/6-31G*. Las distancias y ángulos de equilibrio, así como las constantes de fuerza, fueron computadas utilizando los mismos métodos que para las cargas. Todos los cálculos de estructura electrónica fueron realizados utilizando Gaussian09[105].

4.11.2. Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) se realizaron utilizando un *cut-off* de 9 Å y el método de suma de malla de partículas Ewald (PME) para tratar las interacciones electrostáticas. Las longitudes de los enlaces de hidrógeno se mantuvieron en sus distancias de equilibrio utilizando el algoritmo SHAKE, mientras que la temperatura y la presión se mantuvieron constantes con un termostato de Langevin y un baróstato, respectivamente, como se implementa en el programa AMBER18[106]. El sistema se minimizó, se calentó de 0 a 300 K (20 ps) y se equilibró (0.2 ns). Después de estos pasos, se realizaron de 3 a 6 réplicas de una simulación de DM de 1 μ s de duración a temperatura constante (300 K) y presión (1 bar). El análisis se realizó incluyendo todos los datos de las diferentes réplicas.

Para estimar el pKa de la histidina catalítica de la ACO2 (His128), aplicamos un enfoque de dinámica molecular a pH constante[107]. Las curvas de titulación de pH se obtuvieron aplicando el siguiente protocolo[108]: se realizaron simulaciones de 10 ns de duración a pH constante desde pH 4 hasta 14, con un paso de 0.2 unidades de pH (500 ns en total). Entre pH 8 y 9, los pasos se redujeron a 0.1 unidades de pH y 5 ns para muestrear mejor el punto de inflexión. Durante la simulación, en

cada fotograma (paso de tiempo = 2 ps), el estado de protonación del residuo se seleccionó mediante muestreo de Monte Carlo basado en las diferencias de energía calculadas entre los estados de protonación posibles. La fracción protonada en cada paso de pH se calculó dividiendo el número de fotogramas con el residuo protonado por el número total de fotogramas.

El movimiento de apertura de la ACO2 se siguió midiendo el ángulo entre los centros de masa de dos grupos de residuos ubicados en láminas beta antiparalelas altamente rígidas: el grupo 1 ubicado en el dominio 3 (Arg378, Val379, Gly380, Thr467, Ile468, Val469, His487, Ala488, Phe489) y el grupo 2 ubicado en el dominio 4 (Leu585, Ile586, K587, Val658, Val659, Ile660, Ala685, Ile686, Ile687), utilizando el centro Fe–S como vértice del ángulo.

Los cálculos de energía libre de unión se realizaron a nivel de MM/GBSA[109] para las simulaciones con sustratos en el sitio activo. Los modelos iniciales se crearon utilizando la información de moléculas similares a sustratos en el sitio activo de la ACO2 porcina (ID del PDB: 6ACN). Inicialmente, se aplicaron una serie de restricciones armónicas diseñadas en base a datos experimentales[40] para mantener las posiciones de los sustratos. Después de minimizar y equilibrar, y permitir que el modo de unión del sustrato ajustara sus conformaciones, las constantes de fuerza de las restricciones armónicas se desactivaron gradualmente (de $k = 50$ a 0 kcal/mol), durante una simulación de DM de 500 ns de duración.

Los análisis se realizaron utilizando el módulo cpptraj[110] de AMBER18 y el paquete bio3d en R (v2.4–3)[111]. Las visualizaciones estructurales fueron realizadas utilizando el programa VMD 1.9.4[112].

4.11.3. Interacción ACO2-FXN

Para la predicción del complejo ACO2-FXN utilizando AF2-Multimer v3, se utilizó el Google Colab *ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 using MMseqs2*[113], disponible en el enlace: <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>. Las secuencias aminoacídicas fueron obtenidas y preparadas en formato FASTA. Como *query* se utilizó la secuencia de la ACO2 humana madura (UniProt ID: Q99798): N-QRAKV...KELQQ-C y la secuencia de la FXN 90-210 (UniProt ID: Q16595): N-LDETT...SGKDA-C, asumiendo la formación de un complejo con estequiometría 1:1. El alineamiento de múltiples secuencias (MSA) fue realizado con MMseqs2 y HHSearch, accedidas en agosto de 2023. Las predicciones estructurales fueron evaluadas utilizando las puntuaciones de confianza pLDDT y PAE. Los parámetros adicionales utilizados fueron *num_recycles = 3*, *max_msa = auto*, *num_seeds = 1*. La región ácida de la FXN, región rica en Glu y

Asp (secuencia original “90-LDETTYERLAEETLDSL-117”), fue mutada a “90-LAATTYARLAAATLASL-117”, para evaluar la importancia de esta región en la formación del complejo.

Posteriormente, los experimentos de *docking* entre la ACO2 y la FXN fueron realizados con HADDOCK 2.4[114,115], en el webserver accesible en <https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/>. Como punto de partida, se utilizaron estructuras provenientes de las simulaciones de DM para la ACO2 activa e inactiva y la estructura de la FXN humana (PDB ID: 1EKG). Los residuos participantes en la interacción proteína-proteína (residuos activos) fueron seleccionados a partir de los complejos predichos por AF2-Multimer, e incluyeron a los residuos 90 a 117 de la FXN (región ácida), y los residuos de la ACO2 ubicados en la cavidad formada entre los dominios 1 a 3 y el dominio 4 (residuos 193, 194, 228, 248-258, 285-292, 349-359, 364, 367, 371, 373, 451, 452, 470, 472-480, 482-490, 586-600, 616-631, 659-671, 674, 678, 686-696, 699, 708, 709, 712, 715). Los complejos generados fueron evaluados en base a el puntaje HADDOCK (*HADDOCK score*), y el puntaje Z (el número de desvíos estándar que el puntaje HADDOCK de un determinado *cluster* de estructuras se encuentra separado del promedio de todos los *clusters*). Los mejores 5 *clusters* fueron inspeccionados visualmente, y se seleccionaron estructuras representativas del mejor *cluster* para ser expuestas en las figuras.

4.12. Digestión proteica y análisis por espectroscopía de masa

La ACO2 (20 µg), fue secada utilizando un desecador Speedvac y posteriormente disuelta en 20 µL de urea 8 M en Tris 50 mM, pH 8. Se redujo la muestra con 2 µL de DTT 450 mM e incubando por 45 min a temperatura ambiente. Las cisteínas reducidas fueron alquiladas incubando la muestra con 5 µL de iodoacetamida 500 mM durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se diluyeron las muestras con 150 µL de NH₄HCO₃ 50 mM pH 8, llevando la concentración de urea a 0.8-0.9 M. La digestión se llevó a cabo agregando una relación 1:50 (tripsina:ACO2) e incubando toda la noche a 37 °C. La reacción de digestión fue terminada con 4 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 10%. Los péptidos fueron entonces purificados utilizando tips con filtros C18 (Stage-Tips), y las muestras se analizaron en la Plataforma de Espectrometría de Masas del CEINBIO, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

4.13. Expresión de la SIRT3 humana

Obtuvimos el plásmido para realizar la expresión bacteriana de la SIRT3 humana de Addgene, depositado allí por el Dr. John Denu, de la Universidad de Wisconsin (Addgene plasmid #13736[137]). El plásmido fue recibido en bacterias E. coli DH5alpha en un tubo con agar. La bacteria fue repicada en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y fueron crecidas toda la noche. Allí se realizó una la extracción de ADN plasmídico siguiendo un procedimiento estándar (ver sección Materiales y métodos).

La expresión y purificación de la SIRT3 fue realizada de forma análoga a la ACO2 ya que la SIRT3 también posee cola de histidina para poder ser purificada por cromatografía de afinidad (IMAC). La comprobación de la expresión e identidad de la proteína se verificó por la aparición de una banda de 28 kDa (peso molecular de la SIRT3 madura) y por dot blot, utilizando un anticuerpo anti-SIRT3 (Cell Signaling, #5490, dil. 1:1000).

4.14. ELISA de interacción proteína-proteína

Este ensayo fue realizado en base al protocolo descrito en[116]. Primeramente, la ACO2 5 µg/mL fue inmovilizada en una placa de 96 pocillos a 100 µL/pocillo en un buffer PIPES 10 mM pH 7.0 con KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM (buffer A). La placa se selló e incubó a 4 °C durante la noche y luego se lavó para remover la proteína no unida. La placa fue bloqueada agregando buffer A con Tween-20 0.1% y BSA 0.1% (buffer B) durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con buffer A conteniendo Tween-20 0.1% (buffer T). Después de ese paso, se agregaron diluciones seriadas de FXN o BSA como control a los pocillos (100 µL/pocillo) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente bajo aire, en presencia de DTT 10 mM y en presencia o ausencia de Fe²⁺ 200 µM. Después de la incubación se lavó la placa nuevamente con buffer T y la FXN fue detectada usando un suero de conejo anti-FXN y un anticuerpo anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham, NA934V, dil. 1/9000) a una dilución previamente optimizada (Figura 7).

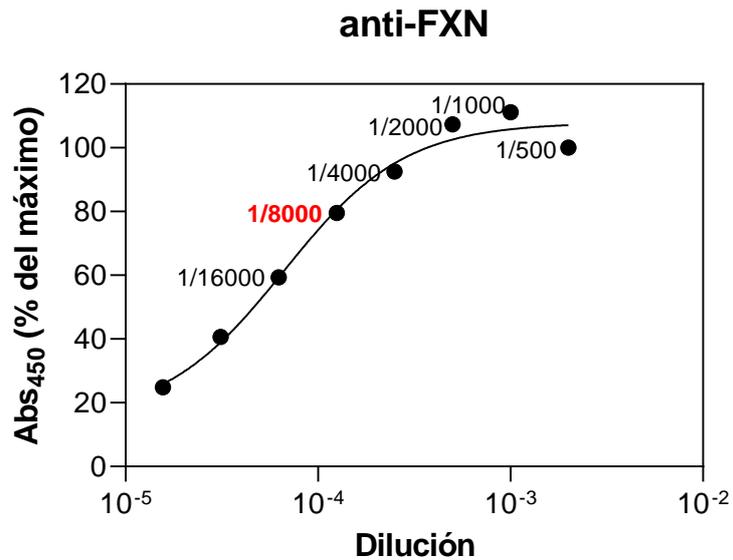


Figura 7. Optimización de la concentración de anticuerpo anti-FXN para el ensayo de ELISA proteína-proteína. La FXN (5 µg/mL) se inmovilizó en la placa de ELISA y posteriormente se bloqueó con BSA 1% en buffer T. Se agregaron diluciones seriadas del suero anti-FXN de conejo y finalmente se reveló con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a HRP. La dilución del suero 1/8000 fue la seleccionada para utilizar en el ensayo para estudiar la interacción entre la ACO2 y la FXN.

Finalmente, el ensayo se reveló a 450 nm utilizando el sustrato cromogénico o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) siguiendo las indicaciones del fabricante (P-3804, Sigma-Aldrich). La configuración del ELISA utilizado se presenta en la Figura 8.

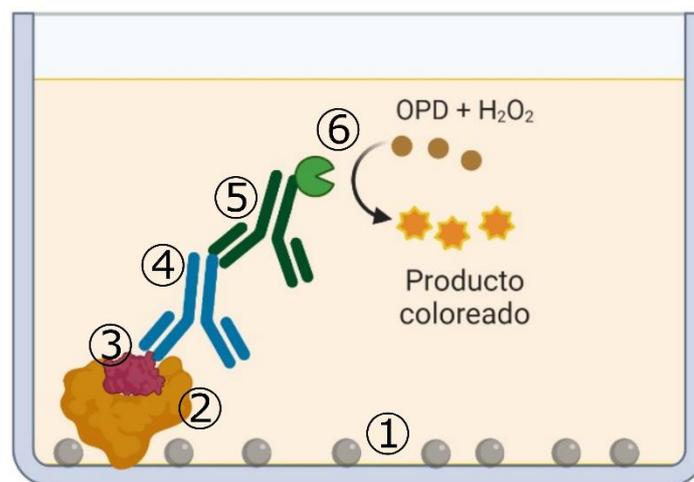


Figura 8. Esquema del ELISA de interacción proteína-proteína. 1: placa de ELISA bloqueada con BSA, 2: ACO2, 3: FXN, 4: suero de conejo anti-FXN, 5: anticuerpo anti IgG de conejo, 6: HRP.

4.15. Cultivos celulares

Las células IMR-90 (ATCC® CCL-186), derivadas de fibroblastos pulmonares humanos, fueron obtenidas de ATCC (Manassas, Virginia, USA) y utilizadas luego de 10 pasajes en cultivo y a un nivel duplicación de población (PDL) de 25. Las células fueron subcultivadas semanalmente con una densidad de 0.5×10^6 células por placa de 10 cm. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen*) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), penicilina 50 U/mL y estreptomycin 50 µg/mL. Las células se mantuvieron a 37 °C, en una incubadora con CO₂ (95% aire, 5% CO₂). Las IMR fueron inoculadas con lentivirus portadores de H-RAS (G12V) y seleccionadas con puromicina. El oncogén RAS se expresó como proteína de fusión junto al dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos, por lo que para la inducción de la expresión de H-RAS (G12V), se incubaron las células con 200 nM de 4-hidroxitamoxifeno durante 14 días. El medio y el inductor fueron recambiados cada 2-3 días. Al plazo de los 14 días, fue posible observar la detención de la proliferación y tinción positiva en el ensayo de β-galactosidasa (marcador de senescencia).

Este procedimiento fue realizado por la Dra. Inés Marmisolle (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina).

4.16. Evaluación de la actividad aconitasa en fibroblastos senescentes

Las fracciones subcelulares se obtuvieron adaptando el protocolo propuesto en [117]. Se utilizaron dos placas de cultivo (140 mm) de fibroblastos IMR-90 por condición. Las células se lavaron con PBS frío, se levantaron y se resuspendieron en buffer de fraccionamiento (FB: sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, citrato de sodio 2 mM y succinato de sodio 1 mM), y se homogeneizaron utilizando un Potter-Elvehjem. El homogeneizado se centrifugó a 1500g por 10 minutos para sedimentar los núcleos y células no lisadas. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 13000g por 10 minutos para obtener las fracciones enriquecidas en citosol y mitocondria. El precipitado que contiene la fracción enriquecida en mitocondrias fue resuspendido en 200 µL de FB conteniendo 1% de Tritón X-100.

La actividad aconitasa se midió inmediatamente en ambas fracciones por ensayo directo a partir de la formación de *cis*-aconitato usando como sustrato isocitrato 8 mM. El ensayo se realizó tanto en presencia como en ausencia del inhibidor competitivo de la ACO₂, fluorocitrato 35 mM. Esto se llevó a cabo con el fin de discernir si los cambios de absorbancia observados provenían exclusivamente

de la reacción de interés o si podían ser atribuidos a otras reacciones que pudieran estar ocurriendo simultáneamente[27].

4.17. Evaluación de la actividad aconitasa y el control de flujo metabólico de células espermáticas

Las muestras de semen humano fueron obtenidas frescas a partir de donantes de la clínica Fertilab y Reprovita (Montevideo, Uruguay). El procesamiento de las muestras y protocolo de capacitación se encuentran en la publicación realizada en enero de 2024[118]. Estos procedimientos fueron realizados por la Ing. Pilar Irigoyen y la Dra. Rossana Sapiro (Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina), quienes contaban con la aprobación del protocolo por parte del Comité de Ética de la Facultad de Medicina y los consentimientos informados de parte de los donantes.

Para realizar la capacitación *in vitro* de las células espermáticas, las mismas fueron expuestas incubadas en el medio Biggers Whiten Whittingham (BWW) (NaCl 95 mM, KCl 4.6 mM, CaCl₂ 1.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, glucosa 5.6 mM, piruvato de sodio 0.27 mM, HEPES 20 mM, NaHCO₃ 25 mM, lactato de sodio 44 mM y BSA 0.3%, pH 7.4) durante 4 h a 37 °C[119].

Las suspensiones celulares obtenidas, tanto de células capacitadas (CAP) como no capacitadas (NC), fueron centrifugadas a 500g durante 10 min y se resuspendieron en buffer de lisis frío (Tris-HCl 10 mM, sacarosa 0.25 M, citrato 2 mM, succinato 1 mM, pH 7.4). Posteriormente las células fueron lisadas por sonicación durante 30 segundos a 4 °C e incubadas en hielo por 20 minutos con 0.5% de Tritón X-100. Finalmente, las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 15000g y se midió la actividad aconitasa inmediatamente o tras ser almacenadas a -80 °C hasta un máximo de 10 días. No se observó una disminución en la actividad aconitasa bajo estas condiciones de almacenamiento. Los pares NC y CAP fueron ensayados siempre juntos. La concentración de proteína fue evaluada por el método de Bradford y western blot.

La actividad aconitasa se midió utilizando el ensayo acoplado a la IDH, siguiendo la formación de NADPH a 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La reacción se realizó en un volumen final de 1 mL en una mezcla de reacción conteniendo buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.8, NADP⁺ 0.2 mM, MgCl₂ 0.6 mM, IDH 0.5 – 1 U y citrato de sodio 5 mM.

Para evaluar el control de flujo metabólico que ejerce la ACO₂ sobre la respiración, se midió el consumo de oxígeno de 24×10^6 células espermáticas mediante respirometría de alta resolución

(Oxygraph-2K; Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Austria). Para esto, las células espermáticas fueron centrifugadas y resuspendidas tras su aislamiento en buffer de respiración mitocondrial (MRM: BSA 0.1%, KH_2PO_4 5 mM, EGTA 1 mM, MOPS 5 mM y sacarosa 300 mM, pH 7.4). La respiración basal fue medida durante 5 minutos y posteriormente se agregó digitonina 22.5 μM para permeabilizar las células. Luego, fueron añadidos de forma consecutiva dosis de fluorocitrato (inhibidor irreversible de la ACO₂). Esta titulación consistió en tres agregados de 1.5 μL de fluorocitrato stock 10 mM (concentraciones finales: 7.5, 15 y 22.5 μM). El efecto de la inhibición de la ACO₂ sobre la respiración se confirmó observando la recuperación de la respiración por agregado de isocitrato 5 mM. El isocitrato es el sustrato de la IDH, enzima que cataliza el siguiente paso de la reacción de la ACO₂ en el ciclo de Krebs[60].

4.18. Análisis estadístico y gráficos

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism (v8.4.3). Los gráficos fueron realizados utilizando también GraphPad Prism, BioRender.com o Inkscape (inkscape.org). Los datos fueron analizados utilizando pruebas paramétricas en caso de que el análisis exploratorio cumpliera los criterios de aplicación de las mismas, o sus alternativas no paramétricas en caso contrario. En cada figura se encuentra especificado el método estadístico aplicado. Se consideraron estadísticamente significativos valores p menores a 0.05. En todos los casos, los resultados se representaron mediante la media \pm error estándar de la media. En todos los experimentos, el n representa el número de repeticiones independientes realizadas del experimento (incubaciones, exposiciones, tratamientos, etc.). Todos los experimentos fueron realizados con un $n \geq 3$.

5. Resultados y discusión

5.1. Caracterización bioquímica, estructural y dinámica de la ACO2 humana

5.1.1. Clonado y preparación del sistema de expresión

Para poder cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo, el primer paso consistió en obtener la ACO2 humana recombinante con un buen rendimiento de purificación y alto nivel de pureza. Por este motivo, la primera actividad desarrollada fue la puesta a punto de un sistema de expresión para la ACO2 humana recombinante. Esto fue realizado en el marco de una pasantía en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo, en colaboración con la Dra. María Laura Chiribao y el Dr. Carlos Robello.

En primer lugar, diseñamos los *primers* para la amplificación de la ACO2 humana utilizando la herramienta web Primer3Plus[120], tomando como base la secuencia para la ACO2 humana madura obtenida de la base de datos GenBank (ID: CR536568.1) (Figura 9).

El *primer forward* (5'-TAAGCAgctagcCAACGGGCCAAGGTGGCGAT-3', sitio de restricción para Nhe en minúsculas) y el *primer reverse* (5'-TGCTTgaagcttTCACTGTTGCAGTTCCTTCA-3', sitio de restricción para HindIII) fueron adquiridos de IDT (Coralville, Iowa, USA). El gen fue clonado desde cDNA de la línea celular THP1 (monocitos humanos) (Figura 10A) a un vector pGEM-T (Promega, US) utilizando *kits* comerciales (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) y posteriormente fue amplificado en células *E. coli* TOP10 electrocompetentes. El plásmido que contenía a la ACO2 fue doblemente digerido con NheI y HindIII (Figura 10B) y el amplicón fue ligado al plásmido de expresión pET28(c)+ (cola de histidina en el extremo N-terminal y resistencia a kanamicina). Finalmente, se transformaron con este plásmido células *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes.

El plásmido fue secuenciado en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo, donde se verificó su integridad (secuencia coincidente con la esperada y correcto sitio de inserción).

Para evaluar la eficacia del sistema de expresión generado se realizaron pruebas de expresión en pequeña escala (cultivos de las bacterias de 10 mL de medio Luria Bertani [LB]) induciendo con el agregado de 0.5 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se observó la aparición de una banda con el peso molecular esperado para la ACO2 (83 kDa) (Figura 10C).

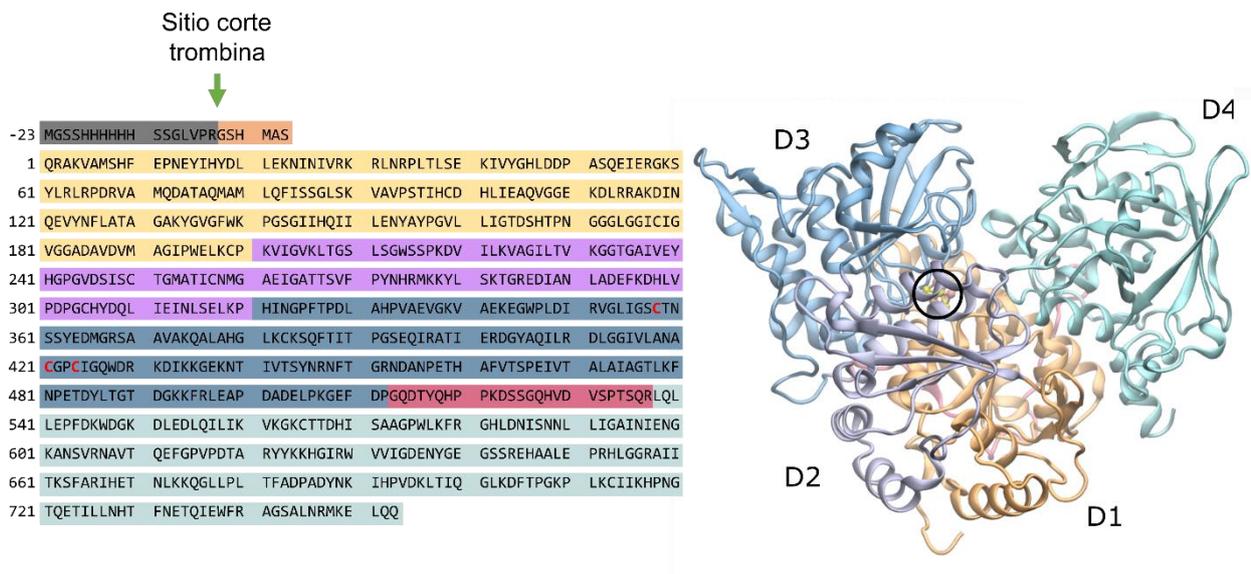


Figura 9. Secuencia y estructura de la ACO2 humana recombinante. Gris: región que contiene la cola de histidina. Naranja: residuos adicionales agregados durante el clonado que se conservan en la ACO2 recombinante madura luego del corte con trombina. La estructura se encuentra coloreada según los dominios de la ACO2, encontrándose el dominio “hinge-linker” o bisagra, representado en la parte trasera de la figura en rosado. En la secuencia se encuentran marcadas con rojo las cisteínas que unen el centro Fe-S. La localización del centro Fe-S se encuentra señalada con un círculo.

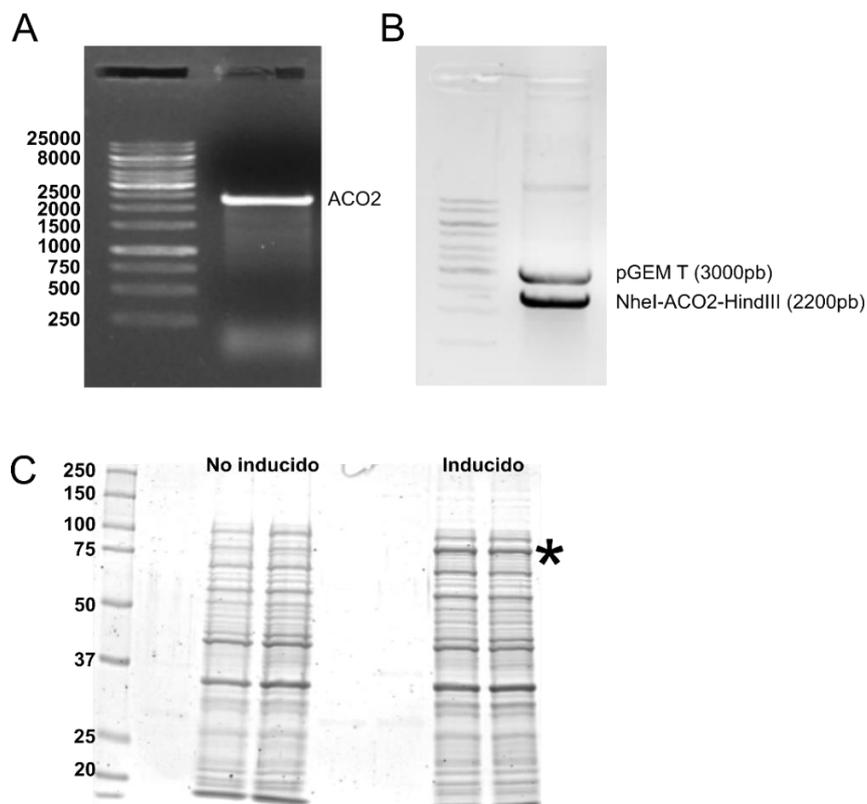


Figura 10. Clonado y expresión de la ACO2 humana. A-B) Geles de agarosa al 1% revelados con bromuro de etidio. Se muestran: la banda obtenida para la ACO2 con los *primers forward* y *reverse* a partir del ADN copia de la línea celular THP1, y las bandas correspondientes al plásmido y el fragmento obtenido tras la doble restricción con NheI y HindIII. C) Gel de poliacrilamida al 8% revelado con azul de Coomassie. 2 colonias independientes de bacterias BL21(DE3) transformadas, fueron inducidas con 0.5 mM de IPTG durante 4 h a 37 °C, y se observó la aparición de una banda (marcada con un asterisco) entre los 75 y los 100 kDa, concordante con el peso de la ACO2 humana (83 kDa).

5.1.2. Expresión y purificación

Habiendo obtenido buenos indicadores sobre el éxito del proceso de preparación del sistema de expresión, realizamos la expresión de proteína escalando la inducción a un mayor volumen.

Las células *E. coli* BL21(DE3) (25 mL), conteniendo la construcción para la ACO2, fueron crecidas dentro de un agitador en medio LB durante 18 horas a 37°C y 220 rpm en tubos de 50 mL suplementados con kanamicina (30 µg/mL). Estos cultivos fueron utilizados como inóculo para matraces de 1 L con el mismo medio y concentración de antibiótico y posteriormente fueron crecidos en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm, de 0.5 a 1, momento en el cual se le agregó IPTG 0.5 mM para inducir la expresión de la ACO2. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación a 4500g durante 20 minutos a 4 °C y resuspendidas en PBS, conteniendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1 mM y 0.1 mg/mL de DNAsa. La suspensión de bacterias se lisó por sonicación y la fracción soluble fue colectada tras centrifugar a 15000g durante 20 min a 4 °C y posteriormente filtrada (filtro de 20 µm).

Para optimizar el rendimiento de expresión de la ACO2, se realizó la misma bajo diferentes condiciones y se evaluaron las eficiencias mediante SDS-PAGE (Figura 11A). Entre las condiciones ensayadas, se probó la suplementación con sulfato amónico ferroso ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂) como fuente de Fe²⁺ y sulfuro de sodio (Na₂S·9H₂O) como fuente de azufre, ya que algunos protocolos recomiendan esto para la expresión de proteínas Fe-S[121]. Se evaluaron muestras de bacterias luego del lisado (fracción total) o el sobrenadante de las muestras lisadas tras un ciclo de centrifugación de 10 min a 15000g (fracción soluble) para evaluar si la proteína se estaba expresando de forma soluble o en cuerpos de inclusión no solubles.

En el gel, la banda correspondiente a la ACO2, presentó mayor densidad en la fracción total para todas las condiciones, sin embargo, en la fracción soluble se obtuvo igualmente un buen nivel de expresión. La expresión durante 4 horas a 37°C no mejoró notoriamente al suplementar con Fe²⁺ 1 mM y azufre 16.1 mM, ni en la fracción total ni en la soluble, aunque sí fue notoriamente mejor al realizar la expresión a 25°C durante 18 horas, no solo respecto al nivel de proteína total, sino también a la mayor proporción de proteína soluble respecto a la fracción total.

Para la verificación de la identidad de la ACO2 se realizó un western blot utilizando un anticuerpo anti-ACO2 humana, el cual efectivamente marcó la banda localizada en el rango esperado para la ACO2 madura (Figura 11B).

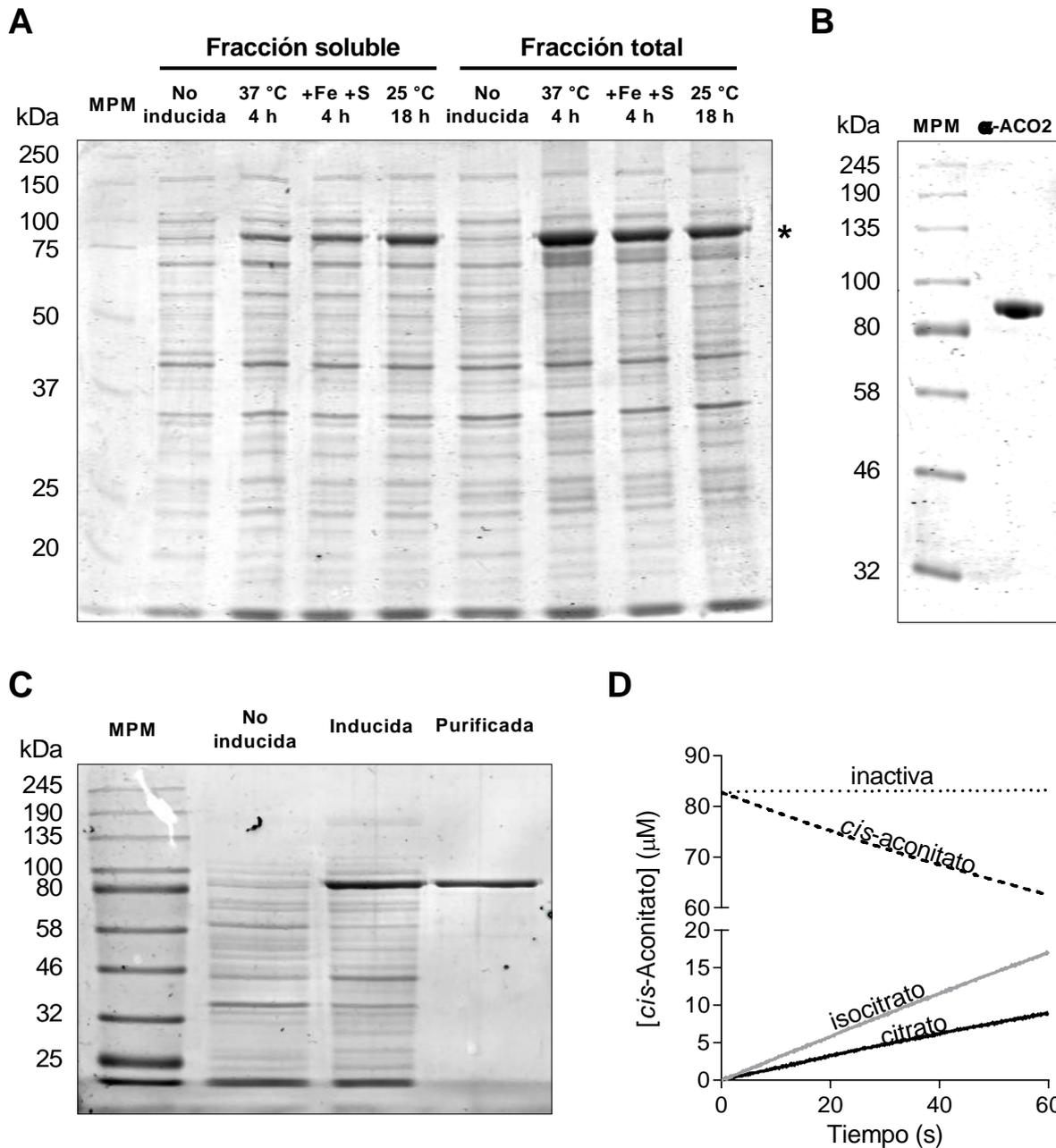


Figura 11. Expresión, purificación e identificación de la ACO2 humana. A) SDS-PAGE reductor al 10% revelado con azul de Coomassie. Fueron corridos el lisado de bacterias completo (fracción total) y la fracción soluble del lisado. La banda de peso molecular correspondiente a la ACO2 se encuentra marcada con un asterisco. B) Western blot del carril 5 del panel A (25 °C, 18 h). C) SDS-PAGE realizado en las mismas condiciones ya mencionadas mostrando la muestra tras la purificación por IMAC. D) Actividad aconitasa ensayada en la ACO2 purificada. La actividad fue medida siguiendo la aparición o desaparición de *cis*-aconitato, a 25 °C, utilizando concentraciones saturantes de sustratos (citrato 10 mM, *cis*-aconitato 200 μM e isocitrato 1 mM). La curva señalada como "inactiva", muestra la actividad de la ACO2 cuando no se realiza la incubación con Fe²⁺ y DTT en anaerobiosis.

Debido a que el sistema de expresión de la ACO2 se diseñó para que la misma tuviera una extensión aminoterminal de polihistidina, el proceso de purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Para esto se utilizó una columna His-Trap (GE Healthcare,

Illinois, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. La proteína fue eluida utilizando un gradiente de imidazol y posteriormente fue dializada contra un buffer Tris 50 mM, pH 8, con NaCl 100 mM. En este paso los eluidos presentaron una coloración amarronada típica de las proteínas que contienen centros Fe-S (Figura 12). Posteriormente, identificamos esta coloración como un indicador precoz de la efectividad de la expresión.



Figura 12. Eluidos de la purificación de la ACO2 humana tras la cromatografía IMAC.

Como segundo paso de la purificación, se separaron contaminantes de bajo peso molecular mediante una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna PD-10 con resina Sephadex G-25. En la Figura 11C se presentan los resultados de la purificación.

La pureza de la proteína final (>99%), fue evaluada mediante SDS-PAGE. Adicionalmente, mediante espectrometría de masas (Servicio de Espectrometría de Masas, CEINBIO), el peso determinado para la ACO2 humana recombinante fue de 83002 ± 6 Da, siendo su peso teórico 82996 Da (fueron considerados los residuos remanentes tras el corte de la cola de histidina). La ACO2 humana recombinante logró ser expresada con un rendimiento en el entorno de 20 mg/L de cultivo.

Como último paso de la purificación, debido a que el agregado de Fe^{2+} es un paso necesario para poder medir la actividad de la ACO2, y ya que este podría llegar a unirse a la cola de histidina interfiriendo en los experimentos, se decidió cortar la misma. Para esto se incubó a la ACO2 con trombina en una relación 500:1 durante 1, 2 o 4 horas a 37 °C. Ya a la hora logró verse un cambio en la movilidad de la ACO2, en una magnitud correspondiente al tamaño de la cola de histidina (1.9 kDa) (Figura 13).

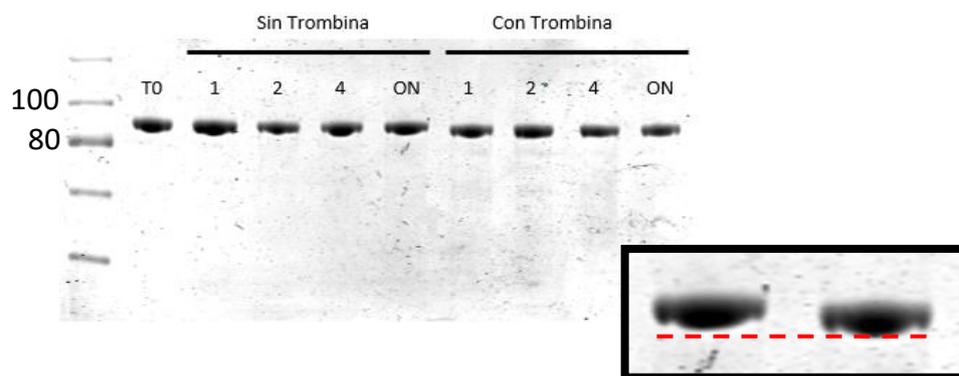


Figura 13. Corte con trombina de la cola de histidina de la ACO2. SDS-PAGE 10%, revelado con azul de Coomassie.

Trabajos anteriores con otras ACO2 reportan la sensibilidad de la enzima ante la inactivación por el oxígeno atmosférico[54], por lo que la enzima purificada obtenida se encontraba inactiva. Para la reactivación de la misma, se la incubó con sulfato amónico ferroso 200 μM como fuente de Fe^{2+} y ditioneitol (DTT) 10 mM como donador de electrones. Esta incubación se realizó en buffer Tris-HCl 25 mM, pH 7.4, suplementado con NaCl 100 mM, bajo flujo de argón durante 1 hora en un vial anaerobio para evitar la inactivación por O_2 . Alícuotas de la $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 fueron extraídas del vial mediante jeringas Hamilton *gas-tight* (para prevenir el ingreso de aire al vial anaerobio) y agregadas a cubetas de espectrofotómetro con sustratos en el mismo buffer Tris-HCl pH 7.8. La actividad aconitasa se determinó siguiendo la aparición o desaparición de *cis*-aconitato a 240 nm ($\epsilon = 3.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [55]) partiendo de citrato, isocitrato o *cis*-aconitato (Figura 11D). Como en reportes previos, cuando no fue realizada esta incubación, la muestra no presentó actividad.

Para algunos experimentos en donde el exceso de Fe^{2+} y DTT pudieran llegar a interferir (ej. la determinación de las constantes de reacción de la ACO2 con oxidantes), los excedentes fueron removidos mediante una gel-filtración (Sephadex G-25) llevada a cabo en una cámara hipóxica (Coy instruments) bajo atmósfera de nitrógeno con niveles de O_2 por debajo del 2%.

5.1.3. Caracterización bioquímica

Para realizar la caracterización de las propiedades bioquímicas de la ACO2 se comenzó con la determinación de sus características cinéticas. La alta sensibilidad del ensayo de actividad aconitasa, permitió medir actividad con concentraciones de ACO2 en el entorno de 20 nM. La activación en presencia de 500 μM de disulfuro de sodio no mostró mayor actividad (Figura 14A), implicando que la ACO2 purificada se encuentra principalmente en el estado $[\text{3Fe-4S}]^+$ y no en algún otro estado

más degradado del centro Fe-S. Esto también se sustenta en el hecho de que la actividad específica de los distintos lotes de purificación fue similar.

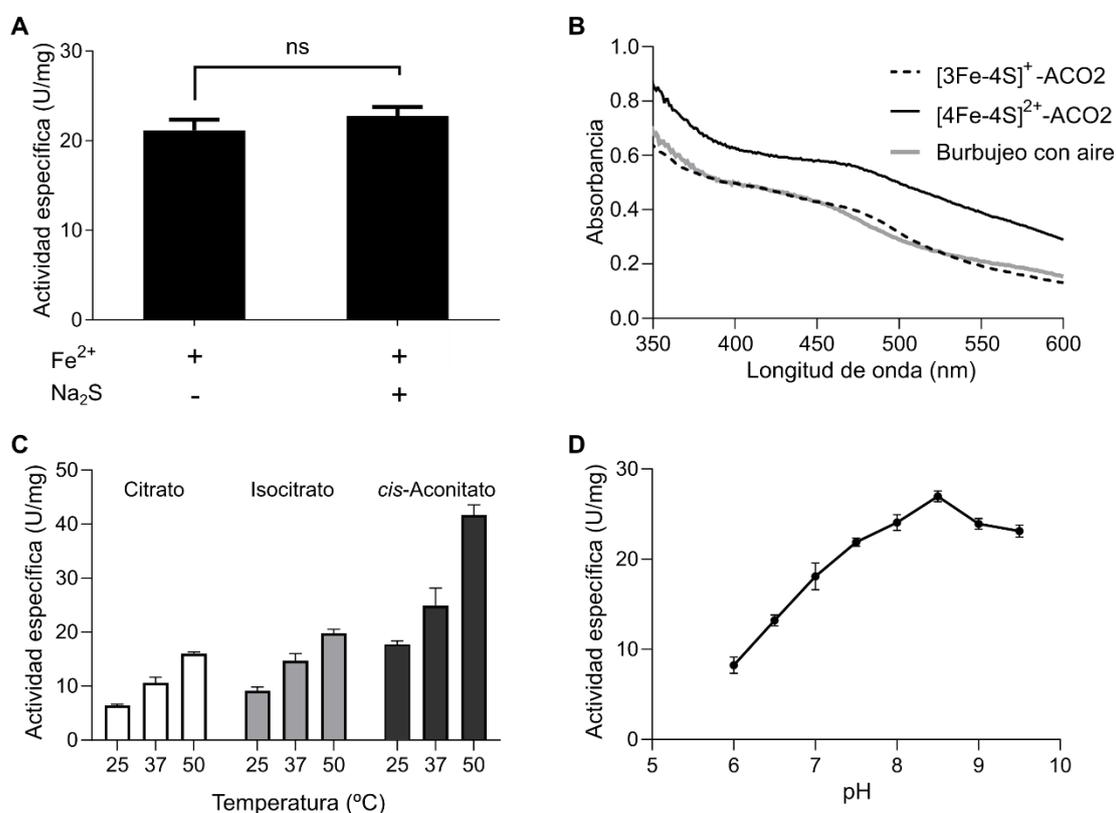


Figura 14. Caracterización bioquímica de la ACO2 humana. A) Actividad específica de la ACO2 medida por ensayo directo (a partir de *cis*-aconitato), luego de la incubación con Fe^{2+} 200 μM , DTT 10 mM y Na_2S 50 μM . Medidas repetidas para 3 lotes diferentes de ACO2. Prueba t para muestras independientes. B) Espectro UV-Visible de la $[\text{3Fe-4S}]^+-\text{ACO}_2$ y la misma muestra tras la incubación con Fe^{2+} y DTT ($[\text{4Fe-4S}]^{2+}-\text{ACO}_2$). La muestra reactivada fue posteriormente burbujeadada con aire para promover su inactivación por reacción con el O_2 . C) La actividad de la ACO2 se midió a diferentes temperaturas utilizando sus 3 sustratos tras ser previamente equilibrada. Se siguió el consumo o producción de *cis*-aconitato. Las concentraciones de sustratos fueron de 10 K_M (ver Figura 15) y se utilizó una concentración de 20 nM de enzima. D) Se midió la actividad aconitasa utilizando 200 μM de *cis*-aconitato en buffer PIPES (pH 6.0 y 6.5), HEPES (pH 7.0 y 7.5), Tris-HCl (pH 8.0 a 9.5) a 25 °C.

Ya que la ACO2 presentó coloración y que previamente se ha observado que otras proteínas Fe-S, incluyendo la ACO2 porcina, absorben en el entorno a los 400 y 600 nm[122,123], evaluamos esta característica en la ACO2 humana recombinante. Se observó un hombro ancho en esta región, similar a la observada en la literatura (Figura 14B). Esta característica es producto del gran número de transiciones electrónicas y átomos metálicos del centro Fe-S.

Para continuar la caracterización de la cinética de la ACO2, estudiamos la dependencia de la actividad con la temperatura y el pH bajo condiciones saturantes de sustratos. La actividad de la ACO2 mostró ser dependiente con la temperatura hasta los 50 °C (Figura 14C). A temperaturas

mayores, la actividad disminuye debido a la agregación de la proteína, la cual es evidenciable por inspección visual y también fue confirmada por SDS-PAGE (se muestra más adelante en la Figura 18). En la literatura se ha reportado la agregación e inestabilidad térmica de la ACO2 en mitocondrias intactas a 37 °C, mientras que la agregación que presenta es completa al ser incubadas a 45°C, una condición donde la mayoría de las otras proteínas de la matriz mitocondrial permanecen solubles[124]. Por otra parte, el pH óptimo de la ACO2 fue de 8.5 (Figura 14D), similar al reportado para otras aconitasas de mamíferos[125] y alcalino tal como el pH de la matriz mitocondrial.

La ACO2 reactivada, fue utilizada para estudiar las constantes cinéticas con sus sustratos (citrato, *cis*-aconitato e isocitrato), exhibiendo cinéticas de tipo Michaelis-Menten (MM). Ajustando la ecuación de MM a los datos experimentales, se determinaron las constantes de MM (K_M), el número de recambio (k_{cat}) y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) para sus 3 sustratos (Figura 15).

Las eficiencias catalíticas difirieron en un orden de magnitud entre citrato, isocitrato y *cis*-aconitato (10^4 , 10^5 y 10^6 s⁻¹M⁻¹), debido principalmente a diferencias en las K_M (Tabla 2).

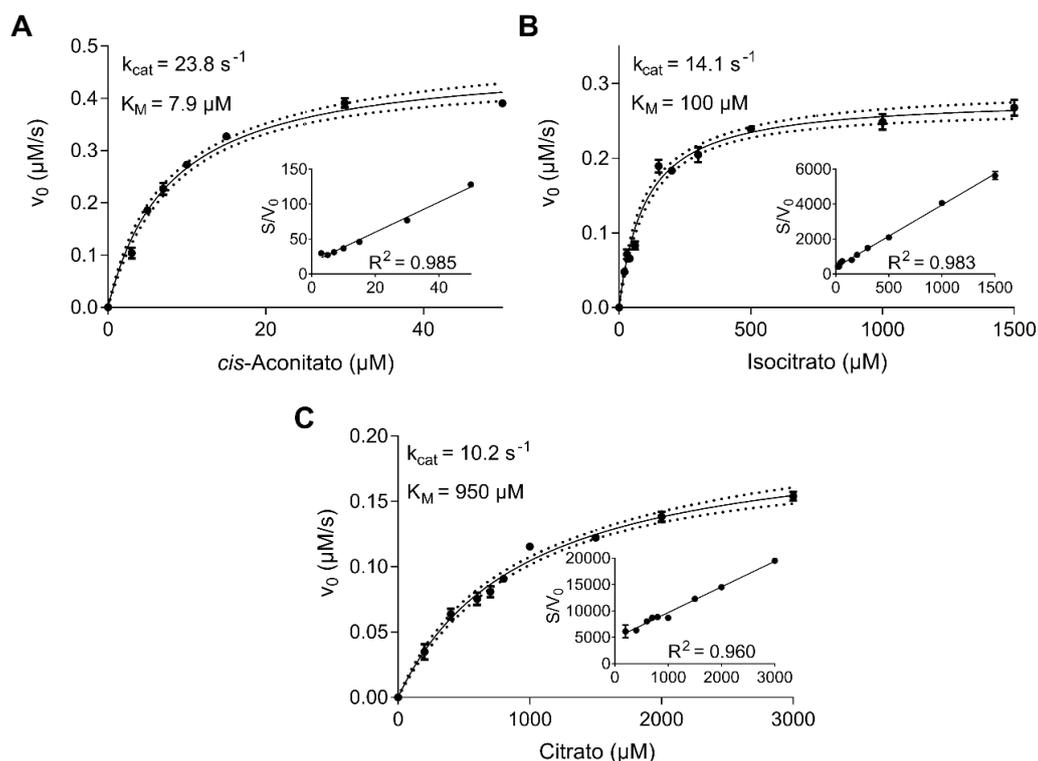


Figura 15. Parámetros de Michaelis-Menten de la ACO2 humana. Alícuotas de ACO2 incubada con hierro y DTT fueron extraídas de un vial anaeróbico y agregados a una cubeta con los sustratos de la enzima para un volumen final de 1 mL. Las reacciones fueron seguidas espectrofotométricamente midiendo el consumo o formación de *cis*-aconitato, utilizando diferentes concentraciones de sustratos y midiendo la actividad durante 1 minuto: A) *cis*-aconitato, B) isocitrato, C) citrato. La actividad fue medida en buffer HEPES 20 mM, pH 7.8, conteniendo 150 mM NaCl y la concentración de ACO2 fue de 20 nM. La ecuación de MM fue ajustada a los datos experimentales. La línea punteada representa la banda de 95% de confianza para el ajuste. La linealización de Hanes y Woolf (s/v_0 vs S) y su coeficiente de determinación (R^2) se presentan para validación del análisis.

| Tabla 2. Parámetros cinéticos de la ACO ₂ humana | | | | | |
|---|---------------------|---------------------------------------|---|---------------------|------------------------------|
| Sustrato | K _M (μM) | k _{cat} (sec ⁻¹) | k _{cat} /K _M (sec ⁻¹ M ⁻¹) | Organismo | Referencia |
| cis-Aconitato | 7,9 ± 0,7* | 23,8 ± 0,7* | (3,0 ± 0,2) × 10 ⁶ * | <i>Homo sapiens</i> | Este trabajo |
| | 4,8 a 99 | | | <i>Bos taurus</i> | Gluzker, 1971; Schloss, 1984 |
| | 15 a 120 | | | <i>Sus scrofa</i> | Gluzker, 1971 |
| | 90 | | | <i>O. cuniculus</i> | Gluzker, 1971 |
| Isocitrato | 100 ± 10* | 14,1 ± 0,4* | (1,4 ± 0,1) × 10 ⁵ * | <i>Homo sapiens</i> | Este trabajo |
| | 12 a 139 | | | <i>Bos taurus</i> | Gluzker, 1971; Schloss, 1984 |
| | 200 a 480 | | | <i>Sus scrofa</i> | Gluzker, 1971 |
| | 320 | | | <i>O. cuniculus</i> | Gluzker, 1971 |
| Citrato | 950 ± 90* | 10,2 ± 0,4* | (1,07 ± 0,06) × 10 ⁴ * | <i>Homo sapiens</i> | Este trabajo |
| | 140 a 950 | | | <i>Bos taurus</i> | Gluzker, 1971; Schloss, 1984 |
| | 620 a 3600 | | | <i>Sus scrofa</i> | Gluzker, 1971 |
| | 900 | | | <i>O. cuniculus</i> | Gluzker, 1971 |

* Los valores son representados mediante la media ± error estándar de la media para 2 o 3 experimentos independientes. Las constantes fueron obtenidas por regresión no lineal tal como recomienda Johnson, 2019.

5.1.4. Reactividad con oxidantes de relevancia biológica

Debido a la alta sensibilidad del centro Fe-S reportado para la ACO₂ de varias especies, con especies oxidantes, buscamos determinar las constantes de segundo orden para las reacciones de la ACO₂ humana con varios oxidantes de relevancia biológica. Para evitar reacciones secundarias producidas entre estos oxidantes con el reductor DTT, y el exceso de Fe²⁺ libre, añadidos durante el paso de reactivación, fue necesario llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25) en condiciones hipóxicas (<2% O₂), mediante el uso de una cámara hipóxica (ver *Materiales y métodos*).

Para estimar las constantes con ONOO⁻ y CO₃^{•-} se obtuvieron curvas experimentales de inactivación de la ACO₂ y se usó el programa GEPASI para ajustarlas mediante la simulación curvas de inactivación para la ACO₂ tomando en consideración las reacciones y constantes previamente reportadas y resumidas en la tabla 3. Este enfoque es válido ya que el sitio activo de la ACO₂ se encuentra sumamente conservado entre mamíferos[4]. Los datos experimentales estuvieron de acuerdo con constantes del orden de 10⁸ y 10⁵ M⁻¹s⁻¹ para el CO₃^{•-} y el ONOO⁻ respectivamente (Figura 16A-B).

| Reacción | k |
|---|---|
| 1) $\text{ONOO}^- + \text{ACO}_2 \rightarrow \text{ACO}_2 \text{ inactiva} + \cdot\text{NO}_2$ | Variable |
| 2) $\text{CO}_3^{\cdot-} + \text{ACO}_2 \rightarrow \text{ACO}_2 \text{ inactiva} + \text{HCO}_3^-$ | Variable |
| 3) $\text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ | $0,18 \text{ s}^{-1}$ |
| 4) $\text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \cdot\text{OH}$ | $0,08 \text{ s}^{-1}$ |
| 5) $\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{ONOOCO}_2^-$ | $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ |
| 6) $\text{ONOOCO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{CO}_2$ | $1,25 \times 10^9 \text{ s}^{-1}^*$ |
| 7) $\text{ONOOCO}_2^- \rightarrow \cdot\text{NO}_2 + \text{CO}_3^{\cdot-}$ | $6,5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}^*$ |

* Valor calculado tomando la descomposición del ONOOCO_2^- ($k = 1,9 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$) y la eficiencia radicalaria (~34%). Las constantes utilizadas se encuentran reportadas en [27].

La constante de reacción con H_2O_2 fue obtenida al graficar las constantes de inactivación (k_{obs}) de la ACO_2 expuesta a diferentes concentraciones de H_2O_2 . La constante de segundo orden para esta reacción se encontró en el orden de $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figura 16C).

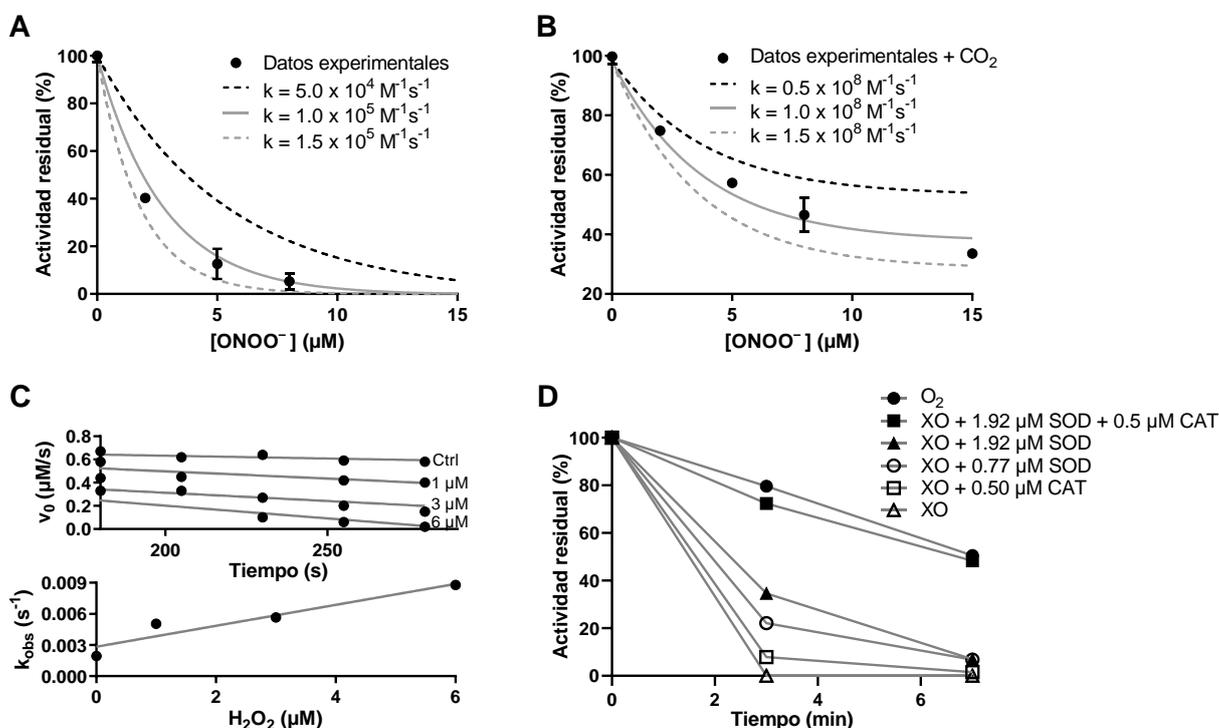


Figura 16. Constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones de ACO_2 humana con oxidantes. A-B) Para el ONOO^- y $\text{CO}_3^{\cdot-}$, las constantes de velocidad de segundo orden con la ACO_2 se obtuvieron después de incubar ACO_2 activa con una adición en bolo de ONOO^- en ausencia (A) o presencia (B) de 25 mM de HCO_3^- . La inactivación de la ACO_2 se comparó con curvas simuladas para la reacción considerando diferentes valores para la constante de reacción. C) Para calcular la constante de velocidad de reacción con H_2O_2 , se expuso ACO_2 activa a diferentes concentraciones de H_2O_2 (1, 3 y 6 μM) y se siguió la actividad durante 5 min. Las tasas de inactivación se graficaron en función de la concentración de H_2O_2 para obtener la constante de velocidad. D) La constante de velocidad de reacción para la inactivación de la ACO_2 por $\text{O}_2^{\cdot-}$ se obtuvo mediante un ensayo de competición con la CuZnSOD . La concentración de ACO_2 en todos los experimentos estuvo en el rango de 0.4 a 2 μM . La actividad fue medida mediante ensayo directo utilizando como sustrato *cis*-aconitato 200 μM . Para más detalles, ver sección *Materiales y métodos*.

Finalmente, la constante de reacción con $O_2^{\bullet-}$ fue obtenida mediante un ensayo de competencia simple para la oxidación de la ACO2 en presencia de un competidor (SOD) (Figura 7D). La actividad de la ACO2 decrece en presencia de O_2 a una determinada velocidad (círculo relleno), mientras que la presencia de un sistema generador de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (triángulo vacío) incrementa considerablemente esta velocidad, respecto a ambas especies por separado, ya que la presencia de catalasa (cuadrado vacío) o SOD (triángulo completo y círculo vacío), no protegen a la ACO2 completamente. La protección completa de la ACO2 solo se obtiene cuando simultáneamente se agregan catalasa y SOD (cuadrado relleno). Bajo estas condiciones, la tasa de inactivación de la ACO2 es similar a la observada por el oxígeno solamente. Ya que no parece haber protección adicional por encima de 1.92 μM de SOD (cuadrado relleno y triángulo relleno), es razonable asumir que la caída de actividad entre la condición XO y la de XO con SOD 1.92 μM representan el 100% de inactivación mediada por $O_2^{\bullet-}$. Por lo que es posible aplicar la ecuación presentada en *Materiales y métodos* en la condición donde hay XO y una concentración de SOD de 0.77, la cual produce solo una inhibición parcial de la ACO2. La constante de segundo orden para la reacción de la ACO2 con el $O_2^{\bullet-}$ obtenida fue de $(2.3 \pm 0.8) \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ a pH 8.4 y 25 °C (Figura 16D).

Los valores obtenidos para todas las constantes fueron similares a valores reportados para otras aconitasas (Tabla 4).

Tabla 4. Constantes de reacción de segundo orden de la ACO2 con oxidantes de relevancia biológica

| Oxidante | Constante de reacción ($M^{-1}s^{-1}$) | Organismo | Referencia |
|-------------------|--|---------------------|-----------------|
| H_2O_2 | $(4,8 \pm 2,9) \times 10^{2*}$ | <i>Homo sapiens</i> | Este trabajo |
| | 2×10^2 | <i>E. coli</i> | Flint, 1993 |
| $ONOO^-$ | $(0,9 \pm 0,2) \times 10^5*$ | <i>Homo sapiens</i> | Este trabajo |
| | $(1,1 \pm 0,2) \times 10^5$ | <i>Sus scrofa</i> | Tórtora, 2007 |
| | $(1,4 \pm 0,1) \times 10^5$ | | Castro, 1994 |
| $CO_3^{\bullet-}$ | $(1,3 \pm 0,3) \times 10^8*$ | <i>Homo sapiens</i> | Este trabajo |
| | 3×10^8 | <i>Sus scrofa</i> | Tórtora, 2007 |
| $O_2^{\bullet-}$ | $(2,3 \pm 1,7) \times 10^8*$ | <i>Homo sapiens</i> | Este trabajo |
| | 3×10^7 | <i>E. coli</i> | Hausladen, 1994 |
| | $0,8 \times 10^7$ | <i>Sus scrofa</i> | Hausladen, 1994 |
| | $(3,5 \pm 2) \times 10^6$ | | Castro, 1994 |
| | $(3 \pm 2) \times 10^6$ | <i>Bos taurus</i> | Flint, 1993 |

* Los valores presentados son la media \pm el error estándar de la media para 3 o 4 experimentos independientes. Las constantes de reacción fueron obtenidas como se explica en la sección *Materiales y métodos*.

Además, la reacción con concentraciones bajas de estos oxidantes fue reversible, ya que al incubar la enzima inactivada con Fe^{2+} y DTT durante 2 horas bajo atmósfera de argón, la enzima recuperó el 100% de su actividad (Figura 17).

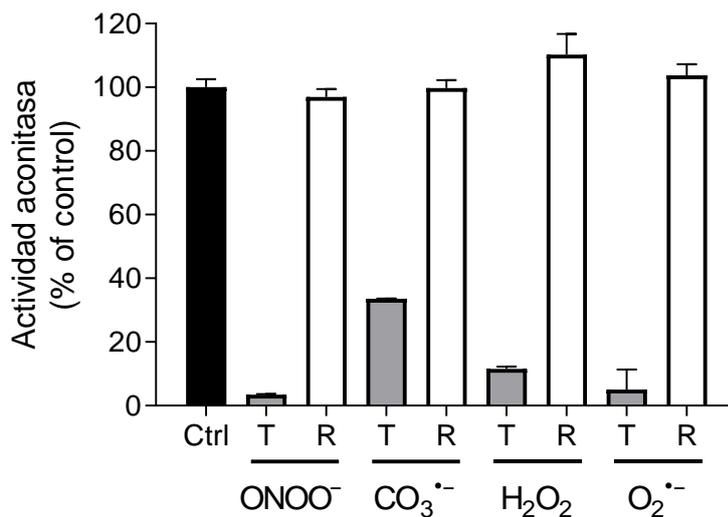


Figura 17. Reactivación de la ACO2 tratada con oxidantes biológicamente relevantes. La ACO2 tratada con oxidante (T) fue incubada con Fe²⁺ y DTT bajo una atmósfera saturada de Ar durante 2 horas y luego se midió la actividad aconitasa mediante el ensayo directo utilizando como sustrato *cis*-aconitato 200 μM (R). La ACO2 fue expuesta a 15 μM de ONOO⁻, 15 μM de ONOO⁻ en presencia de 25 mM de HCO₃⁻, 3 μM de H₂O₂, o 560 nM de O₂^{*-}, bajo las condiciones descritas en la Figura 16. Los experimentos de reactivación se repitieron al menos 2 veces para cada oxidante.

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

La reacción del centro Fe-S de la ACO2 con O₂^{*-} o CO₃^{*-}, del orden de 10⁸ M⁻¹s⁻¹, se encuentran prácticamente limitadas por difusión, siendo la constante con el O₂^{*-}, similar a la de la reacción con la SOD (10⁹ M⁻¹s⁻¹)[126], y estando todas estas constantes por encima de las correspondientes a las reacciones, por ejemplo, con aminoácidos. El O₂^{*-} es un oxidante que no es reactivo con la mayoría de los componentes celulares, una excepción son los centros Fe-S y el NO, es decir, la mayor parte de su toxicidad se debe a la formación de oxidantes secundarios (ej. ACO2, citocromo c, etc.)[127,128]. Por su parte la constante de reacción del centro Fe-S con ONOO⁻, del orden de 10⁵ M⁻¹s⁻¹, se encuentra un orden por debajo de la reacción con la cisteína peroxidática de las peroxiredoxinas (10⁶-10⁷) y un orden por encima de la reacción con la oxihemoglobina (10⁴), las cuales constituyen los mecanismos centrales de detoxificación del ONOO⁻[129].

La capacidad de recuperar su actividad tras la oxidación sustenta el rol de esta enzima como un reóstato redox capaz de modular el flujo de carbonos a través del ciclo de Krebs bajo distintas situaciones celulares. Esto también es consistente con el alto nivel de conservación del sitio activo en mamíferos[4].

5.1.5. Caracterización estructural

A continuación, se procuró investigar si el estado del centro Fe-S (activo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ o inactivo $[3\text{Fe-4S}]^+$) era capaz de impactar en la estructura o estabilidad de la ACO2. Para esto, en primer lugar, se realizaron curvas de desplegamiento inducido por temperatura. La ACO2 contiene 9 triptófanos, por lo que la medida de fluorescencia intrínseca pudo utilizarse para seguir el proceso de desplegado.

Llamativamente, este estudio permitió identificar diferencias significativas respecto a la temperatura de *melting* (T_m) de la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 en comparación con la $[3\text{Fe-4S}]^+$ -ACO2 (51.1 ± 0.5 y 43.6 ± 0.2 °C respectivamente), dónde la única diferencia entre ellas es la presencia o ausencia del Fe_α en el centro Fe-S (Figura 18A-C). Estos resultados revelaron que la $[3\text{Fe-4S}]^+$ -ACO2 presenta una mayor susceptibilidad al desplegado, respecto a la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2. Respecto a la diferencia en la intensidad de las señales observada en las Figuras 18A y 18B, la misma se debe a que los espectros para la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 deben medirse en presencia de Fe^{2+} (además de DTT), para que la encima permanezca activa a lo largo del ensayo, y se sabe que el Fe^{2+} es capaz de ejercer *quenching* sobre los Trp proteicos[130]. La enzima inactiva $[3\text{Fe-4S}]^+$ fue evaluada en el mismo buffer en presencia y ausencia de DTT, no detectando diferencias por el agregado de este último en muestras frescas de ACO2. Para hacer ambas curvas de desplegamiento comparables, se graficó e la Figura 18C, la intensidad de fluorescencia relativa a la observada a los 20 °C para cada estado de la ACO2.

La irreversibilidad del proceso de desplegado luego de los 60 °C fue confirmada (Figura 18D), por lo cual los parámetros termodinámicos no pudieron ser obtenidos a partir de estos experimentos.

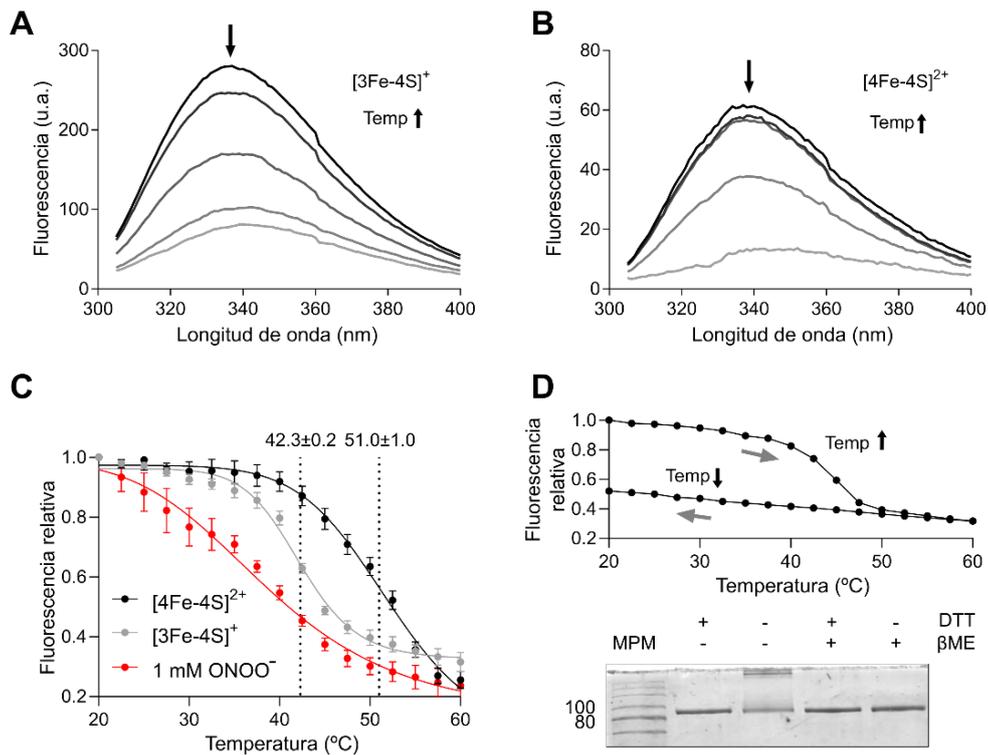


Figura 18. Desplegamiento de la ACO2 inducido por temperatura. A-B) Espectro de fluorescencia intrínseca de la ACO2 a los 10, 20, 30, 40 y 50 °C. La fluorescencia intrínseca fue medida utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm. C) Curvas de desdoblamiento de la ACO2 graficadas midiendo el área total debajo del espectro a cada temperatura. Los puntos fueron conectados para facilitar la visualización. D) Ensayo que demuestra la irreversibilidad del desdoblamiento. Esto fue observado para todos los estados de la ACO2 (se muestra un experimento representativo en la [3Fe-4S]⁺-ACO2). Las muestras utilizadas en los ensayos de desdoblamiento térmico fueron corridas en un SDS-PAGE al 10% y teñidas con azul de Coomassie. Todos los ensayos fueron realizados en buffer HEPES 20 mM, pH 7.8, conteniendo 100 mM de NaCl y 2 μM de ACO2. Los ensayos fueron realizados en buffer HEPES 50 mM, pH 7.8.

Se incubó la ACO2 (1 μM) con concentraciones altas (1 mM) de oxidantes o con concentraciones que producen un 50% de inactivación (10 μM para ONOO⁻ y 5 μM durante 10 minutos para H₂O₂), para evaluar diferencias estructurales o efectos sobre el mecanismo de desdoblamiento producidas por los oxidantes. Pudimos apreciar que, tras la reacción con altas concentraciones de oxidantes, la T_m disminuye significativamente (37-38 °C), en comparación a la ACO2 activa o inactiva (Figura 18C). Al realizar el SDS-PAGE de las muestras llevadas a 60°C se observó que, en condiciones no reductoras, se da la aparición de bandas correspondientes a agregados moleculares de la ACO2 (Figura 18D). Sin embargo, los agregados generados por H₂O₂, son revertidos al preparar las muestras para la corrida en condiciones reductoras con βME, lo que indicaría que los agregados producidos en este caso son enlaces disulfuros inespecíficos reducibles. Por otra parte, los agregados por ONOO⁻ no se revierten en dichas condiciones, lo que estaría de acuerdo con la formación de agregados por enlaces ditirosina no reducibles por βME. En las concentraciones bajas,

pero que producen inactivación casi total, no se observan estos agregados y la forma de la curva fue la de la enzima inactiva.

Estos resultados parecen indicar que el efecto de los oxidantes únicamente sobre el centro Fe-S de la ACO2 produce cambios estructurales, o por lo menos, cambios en el mecanismo de desplegamiento de la enzima. Para generar mayores perturbaciones son necesarias mayores concentraciones de oxidantes que puedan promover el agregado de la enzima y reducir aún más la T_m respecto a la de la forma inactiva. Otro evento que podría estar ocurriendo simultáneamente es la oxidación de los triptófanos y la modificación de la emisión de fluorescencia, sin embargo, no evaluamos este punto en profundidad.

Para continuar caracterizando a la ACO2 utilizamos la espectroscopía de dicroísmo circular (CD), técnica basada en la quiralidad inherente de las macromoléculas que conduce a la absorción diferencial de la luz levógira y dextrógira[131].

En primer lugar, se evaluó el espectro de CD en el UV lejano (180-250). En esta región, absorbe el enlace peptídico y, por lo tanto, el espectro de CD refleja el contenido de estructura secundaria[131]. La ACO2 en esta región (Figura 19A), presentó un espectro que al ser comparado con los espectros representativos, parece indicar una composición con aporte mayoritario de estructura secundaria alfa hélice, lo que puede ser corroborado mediante el análisis de la estructura cristalográfica (por ejemplo, la ACO2 de cerdo, PDB ID: 6ACN, está compuesta por 35% hélice alfa, 18% hojas beta, 47% otros, como revela el servidor web *2struct*[132]).

Como se presentó previamente en la Figura 14B, al estudiar el espectro UV-visible de la ACO2, la misma presenta un hombro en la región del UV-visible sensible al agregado de Fe^{2+} y DTT. Aprovechando que el espectrómetro de CD simultáneamente mide absorbancia y CD, evaluamos los espectros UV-visible y de CD en la región del UV cercano y la región visible (Figuras 19B,C). Se observó que la $[3Fe-4S]^+$ -ACO2 presenta un espectro de CD con dos picos negativos en los 325 y 500 nm de aproximadamente la misma magnitud. Al agregar Fe^{2+} 200 μM y DTT 10 mM, promoviendo así la activación, el espectro sufrió cambios importantes. A medida que se forma la $[4Fe-4S]^{2+}$ -ACO2, el espectro adquiere un mínimo negativo a los 370 nm y dos máximos con signo positivo a 425 y 610 nm, siendo estos últimos de aproximadamente la misma magnitud, pero inferior al mínimo observado en los 370 nm. La forma general de este espectro es similar a la observada en otras proteínas Fe-S (Figura 3). Los cambios en el tiempo de estos picos están representados en la Figura 19D.

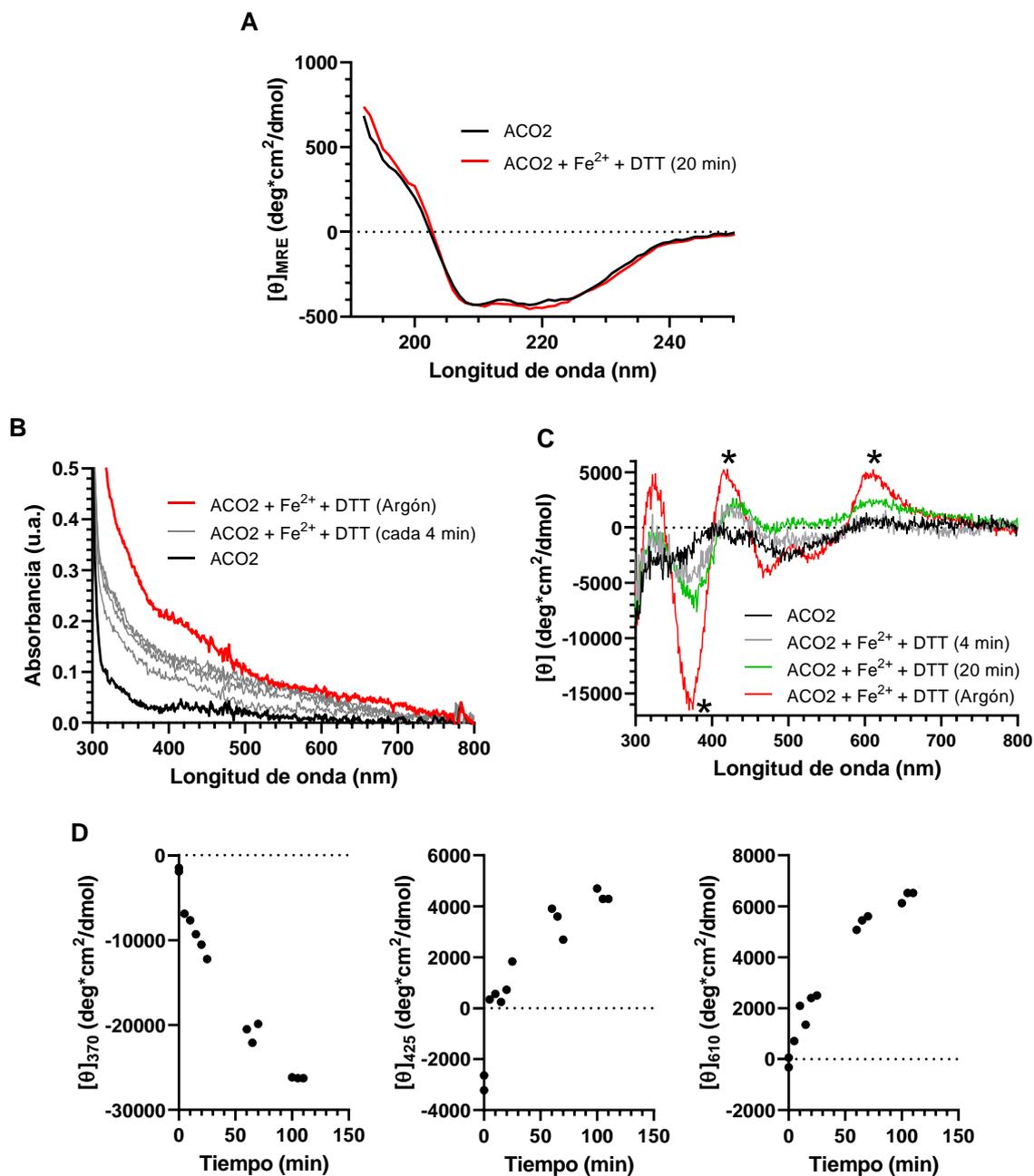


Figura 19. Estudios espectroscópicos de la activación de la ACO2. A) Espectros de CD de la [3Fe-4S]⁺-ACO2 (0.9 μM) en la región del UV lejano representado como elipticidad molar media por residuo. B) Espectro UV-visible de la [3Fe-4S]⁺-ACO2 (40 μM). Se representan los espectros de la misma muestra tras el agregado de Fe²⁺ 200 μM y DTT 10 mM durante una incubación de 20 minutos al aire, o una incubación de 2 h bajo atmósfera de argón. C) Espectros de CD en la región del UV cercano de la ACO2 (40 μM) tras el agregado de Fe²⁺ y DTT y la incubación de la cubeta en la cámara del espectrofotómetro de CD la cual se encuentra bajo atmósfera de nitrógeno. D) Cambios en la intensidad respecto al tiempo de los picos indicados con asteriscos en el panel C. En los paneles B-D, se graficó la elipticidad molar $[\theta]$ (deg*cm²/dmol) respecto a los moles de centros Fe-S, ya que este es el grupo que absorbe en la región estudiada del UV cercano.

Si bien resulta interesante y novedoso el estudio del espectro de CD en este rango para la ACO2 humana, la aplicabilidad de este método es limitada debido a la cantidad de enzima necesaria para

observar la señal del centro Fe-S. En la mayoría de los casos, como indicador del estado del centro Fe-S, la medida de actividad enzimática es suficiente debido a su alta sensibilidad.

Continuando con la evaluación de la diferencia entre los dos estados de la ACO2, se realizaron titulaciones con la sonda fluorescente 8-anilino-1-naftalenesulfonato (ANS). Las propiedades fluorescentes de este compuesto cambian al unirse a regiones hidrofóbicas de las proteínas. La reducción en la movilidad del ANS al unirse a regiones con residuos apolares produce un desplazamiento de la longitud de onda de emisión hacia el azul y un aumento en la intensidad de fluorescencia[133].

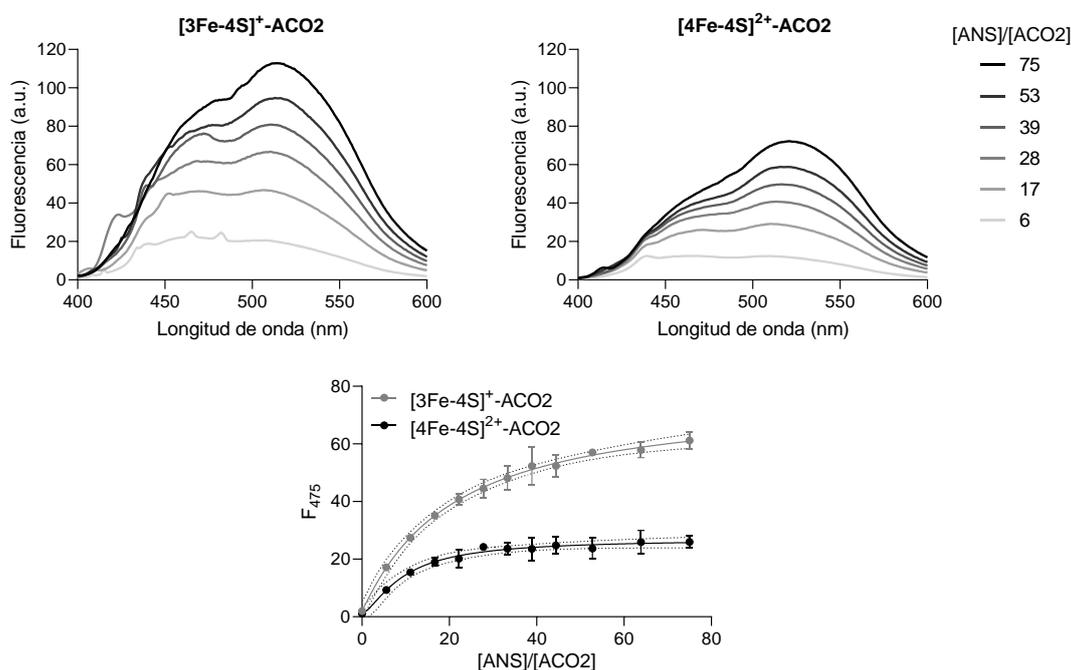


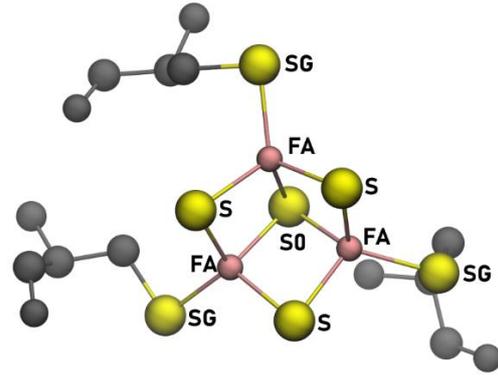
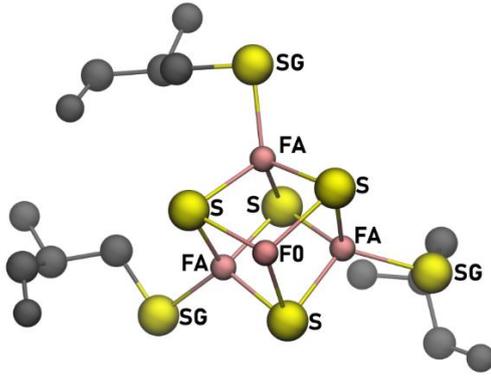
Figura 20. Titulación de la unión del ANS a la ACO2. Arriba) Espectros de fluorescencia del ANS en presencia de la ACO2. Abajo) Curvas de titulación con ANS: emisión a 475 nm en función de la relación molar [ANS]/ACO2. La fluorescencia del ANS fue medida a 20 °C y utilizando una longitud de onda de excitación de 380 nm con 4 μ M de ACO2 en HEPES 20 mM, pH 7.4. Para el espectro de la [4Fe-4S]²⁺-ACO2, la muestra se incubó previamente con 200 μ M Fe²⁺ y 10 mM DTT durante 2 h. La fluorescencia del ANS no fue afectada por la presencia de Fe²⁺. Los espectros de los buffers fueron utilizados como blanco.

Los resultados de la titulación de la ACO2 con ANS mostraron que el ANS presenta mayor intensidad de fluorescencia para la [3Fe-4S]⁺-ACO2, revelando una mayor exposición de regiones hidrofóbicas cuando la enzima se encuentra inactiva en comparación con su estado activo (Figura 20). Esta mayor exposición puede incrementar la probabilidad de interacciones proteína-proteína o agregación. En particular, la agregación de la ACO2 oxidada es evitada en la mitocondria por su degradación mediada por la proteasa Lon[134]. La actividad de esta proteasa durante la senescencia y el envejecimiento se encuentra disminuida[134,135].

5.1.6. Estudios *in silico* de la ACO2

Para complementar los resultados experimentales obtenidos e indagar las diferencias observadas entre la $[3\text{Fe-4S}]^+$ -ACO2 y la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2, se optó por realizar simulaciones de DM clásica. Hasta el día de hoy, la estructura de la ACO2 humana no ha sido resuelta, sin embargo, la misma coincide en un 97% de su secuencia con la homóloga porcina, cuya estructura cristalográfica ha sido determinada mediante difracción de rayos X y se encuentra depositada en la base de datos PDB (PDB ID: 6ACN[3]). Tomando esta estructura como punto de partida, se desarrolló por homología un modelo de la ACO2 humana. Modelos predichos por AF2 difirieron muy poco en la estructura obtenida (ver sección *Materiales y métodos*). El avance de los métodos de predicción de estructura molecular de proteínas, en particular los que utilizan métodos de inteligencia artificial, hace que la estrategia utilizada para obtener el modelo por homología de la ACO2 humana no sea primera alternativa que se realizaría hoy en día. Por ejemplo, la predicción de la estructura de miles de proteínas, incluida la ACO2 humana, se encuentra accesible en la base de datos de AlphaFold2 (AF2)[113]. Al comparar el modelo generado por homología y el modelo predicho por AF2, se obtuvo un RMSD de 1.4 y 3.4 Å para el *backbone* y las cadenas laterales respectivamente, lo que implica una altísima similitud entre ambos modelos, por lo que el modelo predicho por AF2, podría haber sido utilizado como punto de partida, posiblemente sin introducir cambios significativos en los resultados obtenidos.

Respecto al campo de fuerza a utilizar para la realización de las simulaciones, si bien el campo de fuerza AMBER cuenta con parámetros para los residuos proteicos, estos no han sido desarrollados para el tipo particular de centro Fe-S de la ACO2. Para resolver esto, se desarrollaron parámetros para los dos estados de a ACO2 tomando como base los parámetros generados por Carvalho, A.[102] para sistemas similares (Figura 21). Estos parámetros fueron utilizados para la realización de simulaciones de DM.



| $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ | |
|------------------------|-------------|
| Átomo | Carga (S=0) |
| FA | 0.22 |
| FO | 0.28 |
| S | -0.30 |
| SG | -0.50 |

| $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ | |
|-----------------------|---------------|
| Átomo | Carga (S=5/2) |
| FA | 0.21 |
| S0 | -0.32 |
| S | -0.45 |
| SG | -0.55 |

| Enlace | r_0 | k_r |
|--------|-------|-------|
| FA-S | 2.30 | 75.3 |
| FO-S | 2.30 | 75.3 |
| SG-FA | 2.30 | 82.8 |

| Enlace | r_0 | k_r |
|--------|-------|-------|
| FA-S | 2.27 | 68.5 |
| FA-S0 | 2.33 | 52.5 |
| SG-FA | 2.35 | 56.2 |

| Ángulo | θ_0 | k_θ |
|----------|------------|------------|
| S-FA-S | 100.0 | 7.0 |
| FA-S-FA | 80.0 | 10.5 |
| S-FO-S | 100.0 | 7.0 |
| FA-S-FO | 77.0 | 10.5 |
| SG-FA-S | 117.0 | 12.1 |
| CT-SG-FA | 91.0 | 18.2 |

| Ángulo | θ_0 | k_θ |
|----------|------------|------------|
| S-FA-S | 116.0 | 10.0 |
| FA-S-FA | 69.8 | 18.0 |
| S0-FA-S | 104.0 | 11.8 |
| FA-S0-FA | 68.8 | 14.4 |
| SG-FA-S | 110.6 | 11.0 |
| CT-SG-FA | 105.1 | 8.6 |
| SG-FA-S0 | 112.0 | 5.0 |

Figura 21. Parámetros desarrollados para el centro Fe-S de la ACO2. Cargas, constantes de fuerza (k) y valores de equilibrio de enlaces (r_0) y ángulos (θ_0) utilizados en las simulaciones de DM.

Tanto el desarrollo de los parámetros necesarios, como la realización de las simulaciones y su posterior análisis fueron realizados por mí, bajo la supervisión del Dr. Ari Zeida y en colaboración con la Plataforma de Bioquímica Computacional y Estructural del CEINBIO, de la cual formo parte. La gran mayoría de estas simulaciones fueron llevadas a cabo en el Centro Nacional de Supercomputación (ClusterUY).

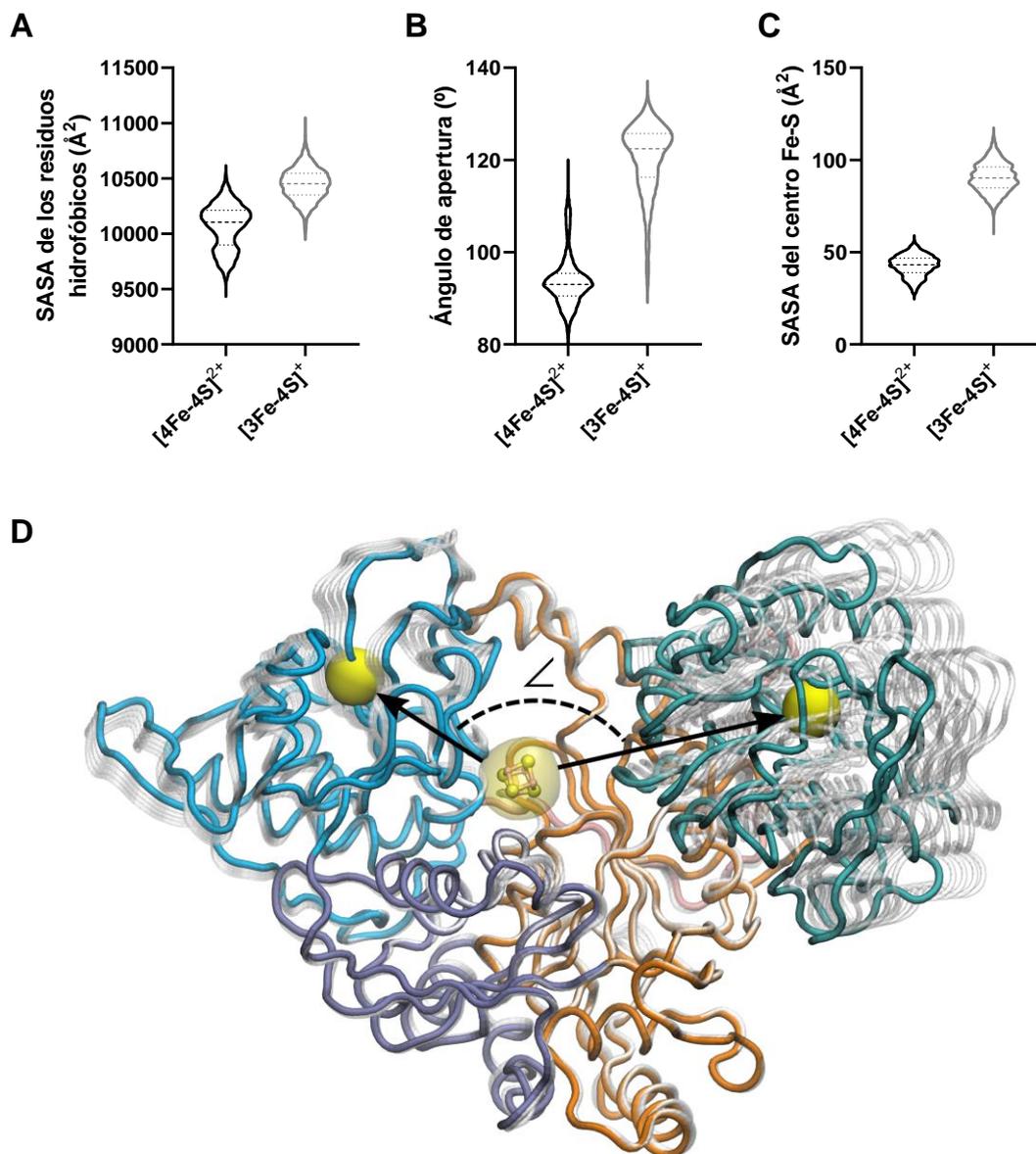


Figura 22. Comparación de las propiedades dinámicas de los estados $[4Fe-4S]^{2+}$ y $[3Fe-4S]^+$ de la ACO2. A) Área superficial accesible al solvente ("solvent-accessible surface area": SASA) de los residuos hidrofóbicos (Gly, Pro, Phe, Ala, Ile, Leu, Val, Met, Trp, Tyr). B) Ángulo de apertura de la ACO2. C) SASA del centro Fe-S para ambos estados de la ACO2. D) Primer componente principal de la dinámica de la ACO2 ("breathing"). Los colores representan los dominios de la ACO2 con el mismo esquema de colores de la Figura 1. El centro Fe-S se encuentra representado en la figura junto a dos grupos de residuos en los dominios 3 y 4 (esferas amarillas), los cuales fueron utilizados para evaluar el ángulo de apertura.

En línea con el incremento observado de la fluorescencia del ANS para la $[3\text{Fe-4S}]^+-\text{ACO}_2$, el estudio de la superficie accesible al solvente de los residuos hidrofóbicos también mostró mayor exposición para la $[3\text{Fe-4S}]^+-\text{ACO}_2$ en comparación con la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}-\text{ACO}_2$ (Figura 22A). Asimismo, el ángulo de apertura de la ACO_2 , medido como el ángulo formado entre dos grupos de residuos de los dominios 3 y 4, con vértice en el centro Fe-S, difiere aproximadamente 27° entre ambos estados de la ACO_2 , siendo mayor la apertura en el estado $[3\text{Fe-4S}]^+$ (Figura 22B). Adicionalmente, se observó un aumento en la exposición del centro Fe-S, para la $[3\text{Fe-4S}]^+-\text{ACO}_2$ (Figura 22C), lo que podría implicar una mayor accesibilidad para los *partners* moleculares que podrían colaborar en el proceso de reactivación de la ACO_2 .

Posteriormente, realizamos un análisis de componentes principales de las simulaciones de DM. Observamos que el primer modo normal de la ACO_2 , muestra un movimiento colectivo de apertura y cierre ("*breathing*") representado en la Figura 22D. El dominio 4 es el que parece tener mayor fluctuación y funcionaría como una "tapa" complementaria a la cavidad donde se encuentra el centro Fe-S.

Por otra parte, se simuló la curva de titulación para la histidina catalítica de la ACO_2 (His128). En el mecanismo catalítico de la ACO_2 , la His128 actúa como el ácido en la reacción de deshidratación del citrato/isocitrato, al donar su protón[40], por lo tanto, para que esto ocurra la His128 debe encontrarse en estado protonado. Los resultados evidenciaron valores de pKa de 8.8 y 8.3 para la $[3\text{Fe-4S}]^+-\text{ACO}_2$ y la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}-\text{ACO}_2$ respectivamente (Figura 23). Estos valores son notoriamente superiores al pKa 6.0 de la histidina libre[136], lo que indicaría que el entorno de la His128 favorece al estado protonado, lo cual se encuentra en concordancia con el mecanismo catalítico propuesto de la enzima[40].

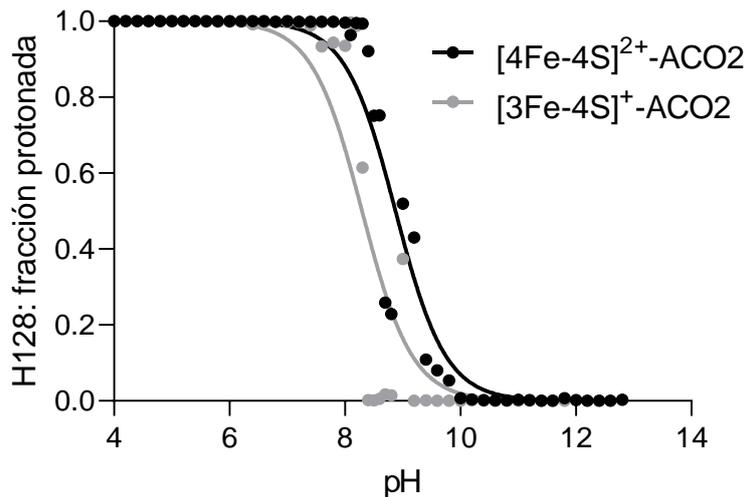
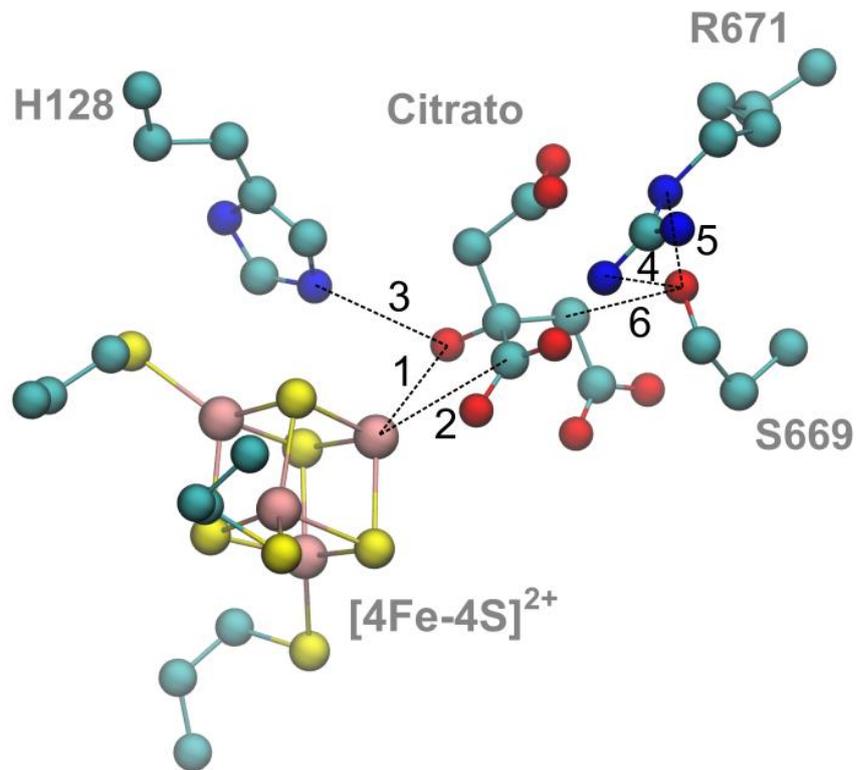


Figura 23. Titulación simulada de la histidina catalítica de la ACO2. Curvas de titulación simuladas para la His128 catalítica de la ACO2 obtenida mediante pHtMD. La ecuación de Henderson-Hasselbalch fue ajustada a los datos experimentales para obtener los valores de pKa (8.8 y 8.3 para la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}\text{-ACO2}$ y la $[3\text{Fe-4S}]^{+}\text{-ACO2}$ respectivamente).

Siendo el pH de la matriz mitocondrial de 7.8[137], puede observarse que la His128 tiene una mayor tendencia a encontrarse protonada en la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}\text{-ACO2}$, respecto a la $[3\text{Fe-4S}]^{+}\text{-ACO2}$, por lo que el estado activo de la ACO2 favorecería aún más el estado catalíticamente necesario de la His128.

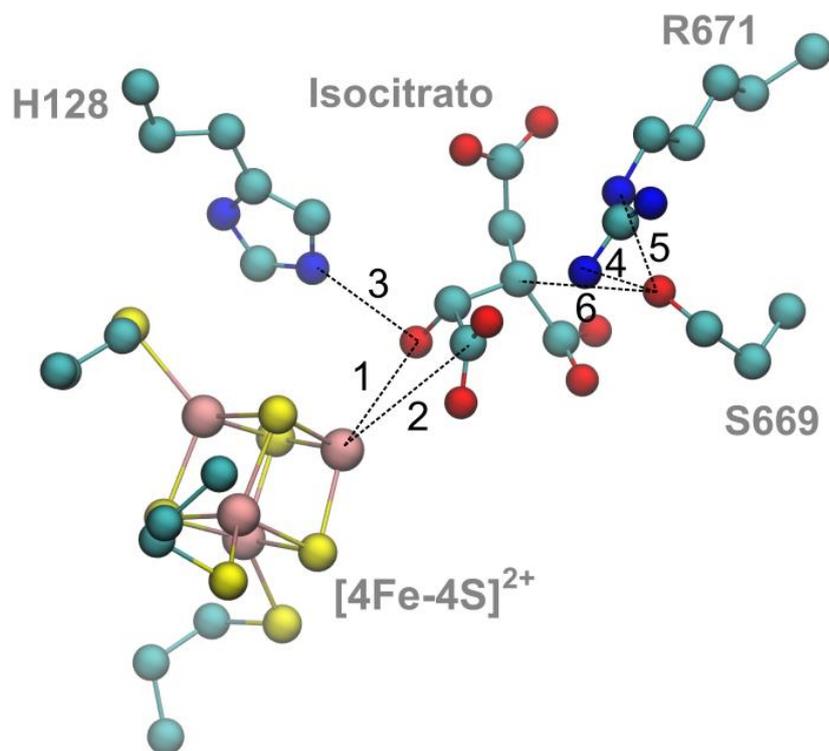
Para continuar explorando las características de la reacción de la ACO2, nos enfocamos en la diferencia observada experimentalmente de aproximadamente un orden de magnitud entre las K_M de la ACO2 para el citrato y el isocitrato (950 vs 100 μM respectivamente). Para esto se optó por realizar estimaciones de energía libre por el método de MM-GBSA[109], el cual se encuentra disponible en el paquete AMBER.

Antes de poder realizar estos cálculos, fue necesario desarrollar también los parámetros para los sustratos, por lo que se aplicó el procedimiento descrito en la sección *Materiales y métodos*. Para la definición de los modos de unión, se tomaron como base estructuras cristalográficas de otras ACO2 de mamífero las cuales presentaban unidas estos sustratos[40]: 1C96 y 1BOJ. Para las simulaciones, inicialmente se diseñaron una serie de restricciones harmónicas basadas en los modos de unión observados en las cristalografías. Después de minimizar y equilibrar, con el objetivo de permitir que los sustratos se ajustaran a su modo de unión, se disminuyeron las constantes gradualmente (primero $k = 50$ kcal/mol hasta 0) en simulaciones de DM de 500 ns. En la Figura 24 se presentan las definiciones de los átomos para los sustratos utilizados y las restricciones aplicadas.



| ACO2-Citrato, 0 a 100 ns, k = 50 | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------|--------------|------|------|------|------|
| Número de restricción | Átomo 1 | Átomo 2 | r1 | r2 | r3 | r4 |
| 1 | Fe _α | Citrato:OH | 2.40 | 2.60 | 2.60 | 2.80 |
| 2 | Fe _α | Citrato:COOH | 3.03 | 3.23 | 3.23 | 3.43 |
| 3 | H128:NE2 | Citrato:OH | 2.72 | 2.92 | 2.92 | 3.12 |
| 4 | R671:NH1 | S669:OG | 3.07 | 3.27 | 3.27 | 3.47 |
| 5 | R671:NE | S669:OG | 2.46 | 2.66 | 2.66 | 2.86 |
| 6 | Citrato:C* | S669:OG | 2.98 | 3.18 | 3.18 | 3.38 |

| ACO2-Citrato, 100 a 200 ns, k = 5 | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|--------------|------|------|------|------|
| Número de restricción | Átomo 1 | Átomo 2 | r1 | r2 | r3 | r4 |
| 1 | Fe _α | Citrato:OH | 2.10 | 2.40 | 2.80 | 3.80 |
| 2 | Fe _α | Citrato:COOH | 2.10 | 3.03 | 3.43 | 4.43 |
| 3 | H128:NE2 | Citrato:OH | 2.12 | 2.72 | 3.12 | 4.12 |
| 4 | R671:NH1 | S669:OG | 2.10 | 3.07 | 3.47 | 4.47 |
| 5 | R671:NE | S669:OG | 2.10 | 2.46 | 2.86 | 3.86 |
| 6 | Citrato:C* | S669:OG | 2.10 | 2.98 | 3.38 | 4.38 |



| ACO2-Isocitrato, 0 a 100 ns, k = 50 | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|------|------|------|------|
| Número de restricción | Átomo 1 | Átomo 2 | r1 | r2 | r3 | r4 |
| 1 | Fe _α | Isocitrato:OH | 2.50 | 2.70 | 2.70 | 2.90 |
| 2 | Fe _α | Isocitrato:COOH | 3.03 | 3.23 | 3.23 | 3.43 |
| 3 | H128:NE2 | Isocitrato:OH | 2.72 | 2.92 | 2.92 | 3.12 |
| 4 | R671:NH1 | S669:OG | 3.07 | 3.27 | 3.27 | 3.47 |
| 5 | R671:NE | S669:OG | 2.46 | 2.66 | 2.66 | 2.86 |
| 6 | Isocitrato:C* | S669:OG | 2.98 | 3.18 | 3.18 | 3.38 |

| ACO2-Isocitrato, 100 a 200 ns, k = 5 | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|------|------|------|------|
| Número de restricción | Átomo 1 | Átomo 2 | r1 | r2 | r3 | r4 |
| 1 | Fe _α | Isocitrato:OH | 2.10 | 2.50 | 2.90 | 3.90 |
| 2 | Fe _α | Isocitrato:COOH | 2.10 | 3.03 | 3.43 | 4.43 |
| 3 | H128:NE2 | Isocitrato:OH | 2.10 | 2.72 | 3.12 | 4.12 |
| 4 | R671:NH1 | S669:OG | 2.10 | 3.07 | 3.47 | 4.47 |
| 5 | R671:NE | S669:OG | 2.10 | 2.46 | 2.86 | 3.86 |
| 6 | Isocitrato:C* | S669:OG | 2.10 | 2.98 | 3.38 | 4.38 |

Figura 24. Restricciones harmónicas aplicadas en las simulaciones de la ACO2 con sus sustratos. Los átomos de los residuos proteicos fueron nombrados siguiendo las definiciones de tipos de átomos de AMBER.

En la Figura 25A, se presenta el cambio en la energía de unión a lo largo de la simulación. Lo que se observó es que, una vez removidas las restricciones, para el isocitrato a lo largo de la simulación hay poca variación de la energía de unión. Por otra parte, para el citrato (para el cual la ACO2 presenta una K_M 10 veces mayor) se desplazó de la posición original y terminó con una mayor energía de unión lo cual implica una menor afinidad. La movilidad de los residuos del sitio activo también fue mayor cuando el sustrato utilizado era el citrato (Figura 25B).

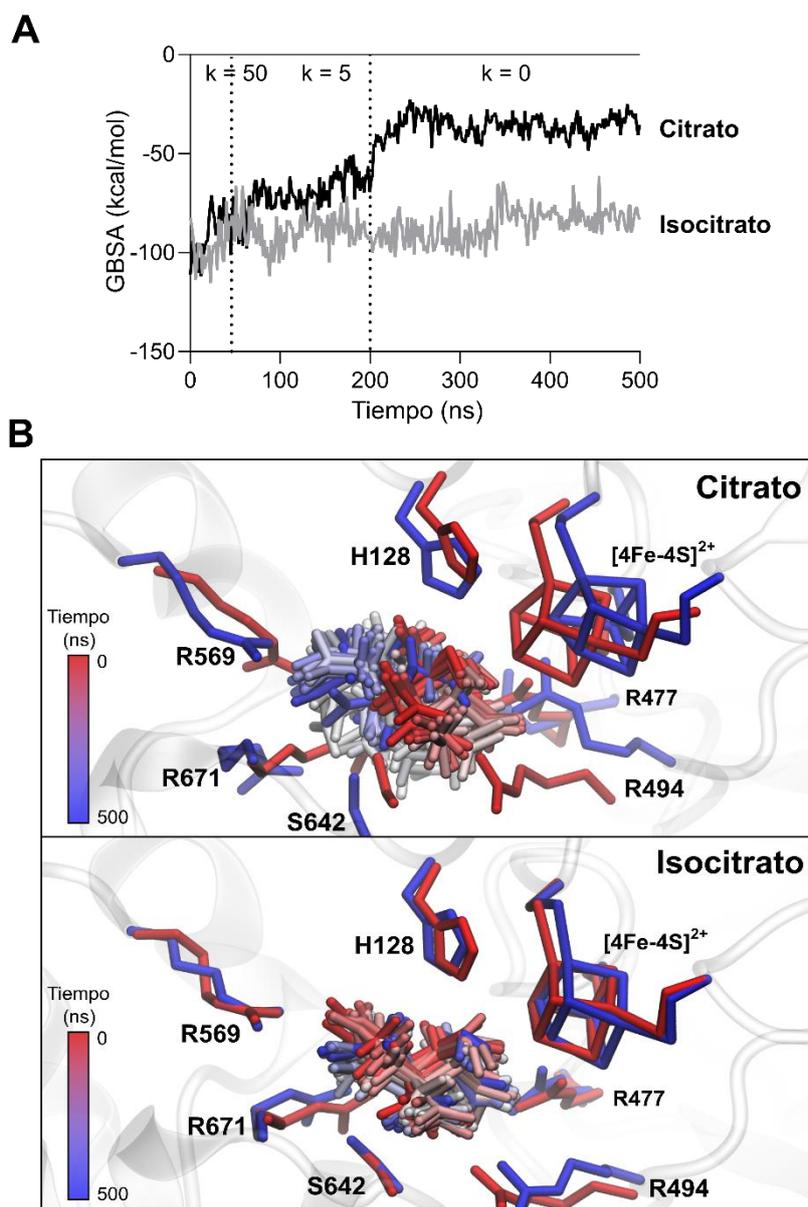


Figura 25. Interacción de la ACO2 con sus sustratos. A) Energías de unión estimada por el método de MM-GBSA para los complejos de la [4Fe-4S]²⁺-ACO2 con citrato e isocitrato. Los datos representados consisten en simulaciones de DM de 500 ns de largo. Las constantes de restricciones armónicas (k , kcal/mol) fueron cambiadas a los 100 y 200 ns para permitir que los modos de unión del sustrato al sitio activo se equilibraran. B) Representación de la unión de los sustratos al sitio activo de la ACO2. Para los residuos de la ACO2 solo se muestran el primer y el último cuadro de la simulación, mientras que, para los sustratos, se muestran 20 estructuras igualmente espaciadas en el tiempo (de rojo: inicio de la simulación, hasta azul: fin de la simulación).

5.2. Estudio de la acetilación de la ACO2

La ACO2 ha sido identificada en estudios de acetiloma en diversas especies y presenta variabilidad en los sitios de acetilación reportados. En 2015, un estudio propuso que la ACO2, en músculo cardíaco de rata, sufre un aumento de la actividad tras la acetilación química *in vitro* o *in vivo*, con la lisina 144 identificada como clave en la modulación de la actividad enzimática[53]. Otro trabajo posterior sugiere un papel regulatorio para la lisina 258, encontrada acetilada en células cancerosas de próstata, cuya mutación afecta la actividad enzimática y su sensibilidad a la desacetilasa SIRT3[55]. Estos hallazgos señalan la complejidad de la regulación de la ACO2 y su potencial implicación en procesos fisiológicos y patológicos.

Primeramente, para estudiar la conservación de las lisinas reportadas en la bibliografía se realizó un análisis de secuencias de ACO2 de mamíferos. Se obtuvieron secuencias de ACO2 de mamíferos, al utilizar el filtro de Uniprot seleccionando "MAMMALIA" como taxonomía y "ACO2" como nombre del gen (224 resultados). A partir de allí se seleccionó una secuencia única por especie (115 resultados). Se realizó un alineamiento múltiple (Clustal Omega) y se evaluaron los resultados mediante la generación de un logo de secuencias (Figura 26).

Allí se confirmó que tanto la Lys144 como la Lys258, presentan un 100% de conservación. Al estudiar la localización de estas lisinas sobre la estructura de la ACO2 puede observarse que la Lys144 se encuentra en el dominio 3, y que su modificación podría afectar la interacción con la Gln541, la cual se encuentra en la región *hinge-linker*, alterando la dinámica de la ACO2. Por otra parte, la Lys258, se encuentra próxima a la cavidad por donde el sustrato entra al sitio activo y, además, se encuentra en la interfase entre los dominios 1-3 y el dominio 4, por lo que allí también podría afectar la dinámica de *breathing* de la ACO2.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la acetilación sobre la actividad de la ACO2 humana *in vitro* se incubó la enzima recombinante en su estado $[4Fe-4S]^{2+}$ activo o $[3Fe-4S]^+$ inactivo (2 μ M), con concentraciones crecientes de acetil-CoA en el rango fisiológico (0.1 o 0.2 a 1.5 mM), durante 6 h a 37 °C en un buffer Tris-HCl pH 8.

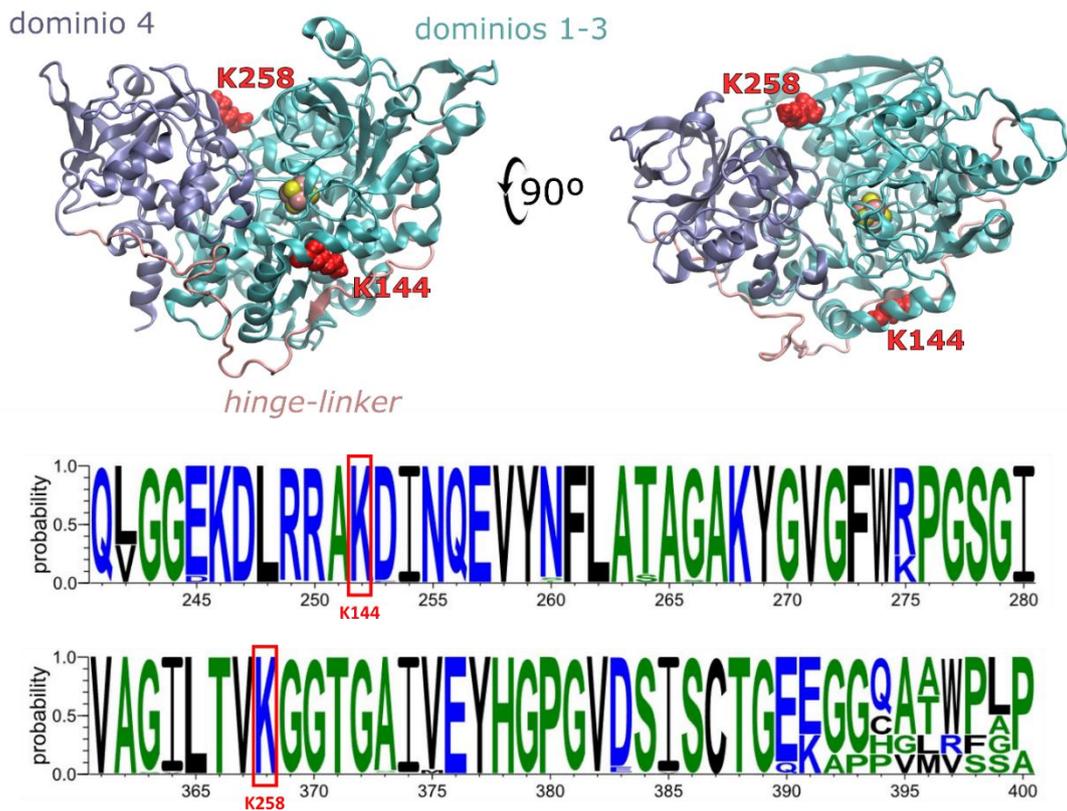


Figura 26. Lisinas relevantes acetiladas en la ACO2 según la bibliografía. Arriba) Representación de la localización de las lisinas propuestas en la literatura como claves para la regulación por acetilación/desacetilación. Abajo) Logo de secuencias parcial del alineamiento múltiple de secuencias de ACO2 de 115 mamíferos extraídas de Uniprot (la numeración del alineamiento no se corresponde con la numeración de la ACO2 humana sino que es propia del alineamiento).

Para acetilar la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2, fue necesario realizar la misma preparación de la muestra que la usada para la exposición con oxidantes, purificándola de la mezcla de activación (Fe^{2+} y DTT), debido a que el DTT puede producir la tiólisis del acetyl-CoA e interferir con el ensayo. Posteriormente, es necesario que a la enzima no pierda actividad tras el período de incubación, lo que se logró con el agregado de sustrato (citrate 10 mM), el cual estabiliza el centro Fe-S, y permite que la actividad pueda medirse luego de las 6 horas.

El nivel de acetilación se evaluó de forma global mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-acetyl-lisina (Figura 27A,B). En estas condiciones, se observó un nivel de acetilación dosis dependiente con la concentración de acetyl-CoA. Llamativamente, la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 presentó de forma replicable, mayores niveles de acetilación respecto a la $[3\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2, sin embargo, al evaluar la actividad enzimática, se observó una pérdida de la actividad de la $[3\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2, mientras que por su parte, la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 no perdió actividad (Figura 27C,D). Respecto a la pérdida de actividad de la $[3\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2, surgen dos hipótesis: 1) la acetilación impide la reactivación completa de la ACO2, 2) la ACO2 acetilada posee menos actividad enzimática. El hecho

de que la ACO2 se acetile más cuando está activa mientras que conserva su actividad, parece favorecer la primera alternativa.

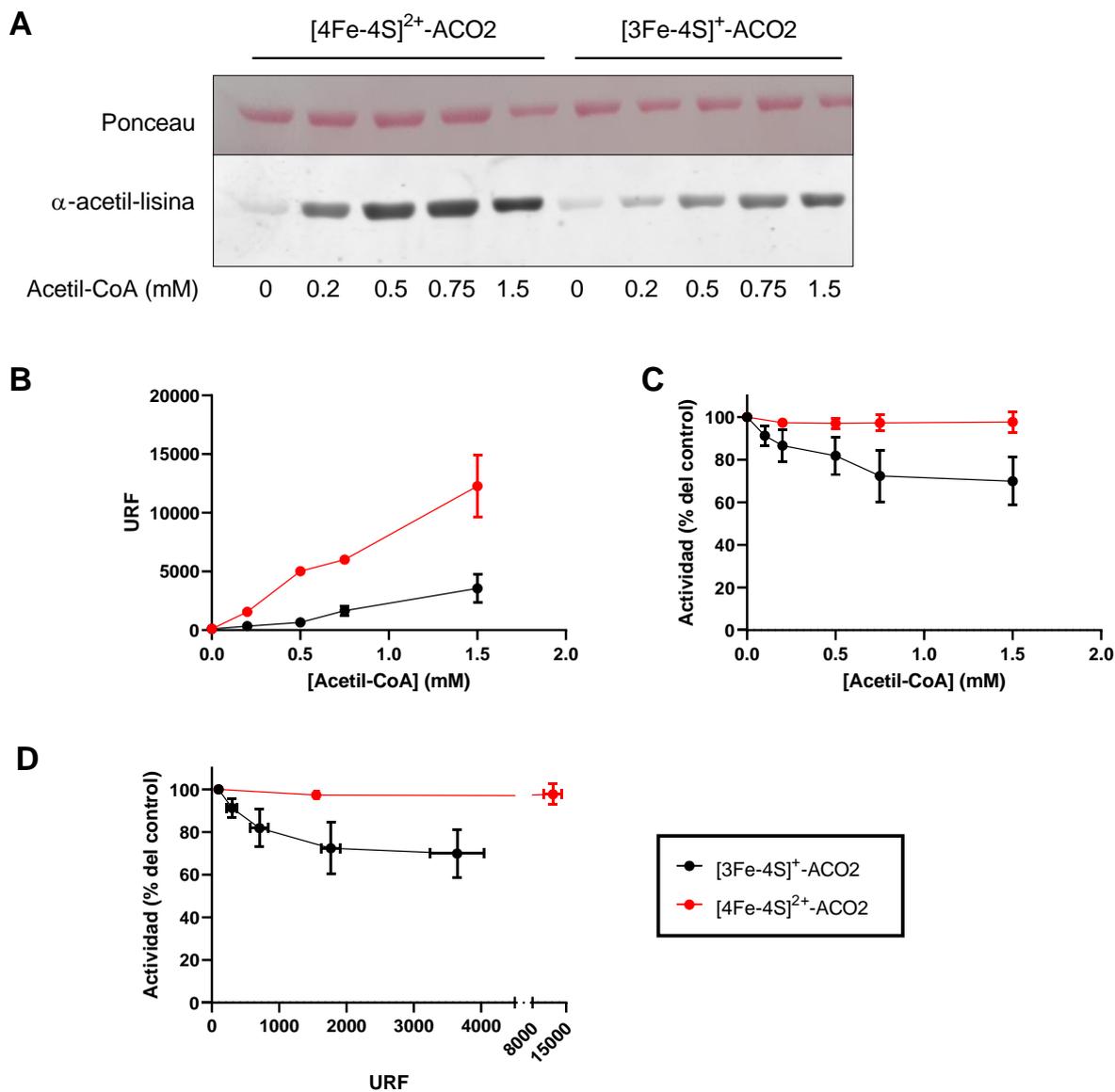


Figura 27. Impacto de la acetilación en la actividad de la ACO2. La ACO2 1 mg/mL (12 μM) activa o inactiva (ambas en presencia de citrato 10 mM para estabilizar el centro Fe-S), se incubaron con 0.2 a 1.5 mM de acetil-CoA durante 6 h a 37 °C. A) Membrana de la transferencia teñida con Ponceau para comprobar la transferencia y la cantidad de proteína, y debajo el revelado con el anticuerpo anti-acetil-lisina. B) Cuantificación del western blot del panel A (n = 6). C) Actividad aconitasa de las muestras dependiente de la concentración de acetil-CoA (n = 7). Para evaluar la actividad de la ACO2 inactiva acetilada primeramente fue activada incubándola con Fe²⁺ y DTT en condiciones anaeróbicas. D) Actividad en función de la cuantificación de la señal del anticuerpo anti-acetil-lisina. Los gráficos representan el promedio (círculo relleno) y las barras el error estándar de la media. La actividad aconitasa fue ensayada mediante el ensayo directo utilizando como sustrato *cis*-aconitato 200 μM.

Para evaluar si el citrato agregado a la [4Fe-4S]²⁺-ACO2 interfería con el ensayo, se agregó el mismo también a la [3Fe-4S]⁺-ACO2 durante la incubación con el acetil-CoA y posteriormente se evaluó la acetilación y se activó para evaluar la actividad enzimática (Figura 28).

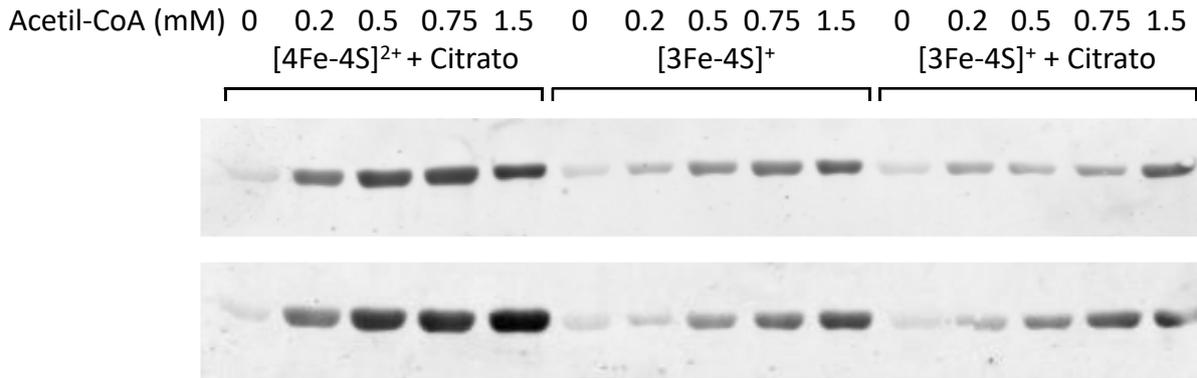
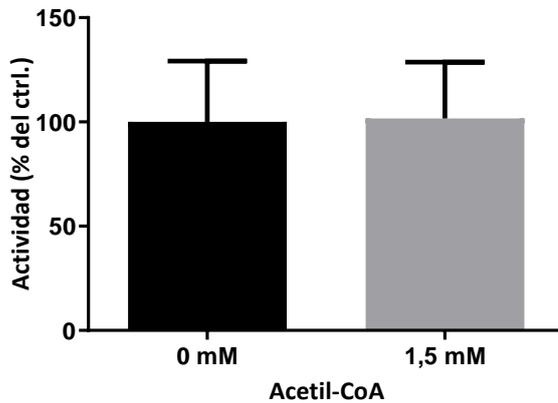
A**B**

Figura 28. Evaluación del rol del sustrato de la ACO2 en la acetilación. Las muestras fueron tratadas al igual que en la figura previa, pero en presencia de citrato 10 mM. A) Western blot anti-acetil-lisina. B) Actividad aconitasa como porcentaje del control no acetilado (n = 2 acetilaciones independientes). La actividad fue medida mediante ensayo directo utilizando como sustrato *cis*-aconitato 200 μ M.

Interesantemente, el citrato no impactó en el nivel de acetilación de la $[3\text{Fe-4S}]^+\text{-ACO2}$ (Figura 28A), pero su presencia protegió a la ACO2 de la pérdida de actividad (Figura 28B).

Entre las condiciones que evaluamos, la actividad presentó una disminución máxima de aproximadamente un 30% con 1.5 mM de acetil-CoA ($[3\text{Fe-4S}]^+\text{-ACO2}$, en ausencia de citrato). Si bien esta caída podría no parecer biológicamente relevante, una pérdida de la actividad aconitasa de esta magnitud podría llegar a tener un impacto sobre el ciclo de Krebs y la respiración mitocondrial dependiendo del tejido. Particularmente en el cerebro o el músculo cardíaco, donde caídas de la actividad de la ACO2 en el entorno del 5% ya logran tener un impacto en la respiración mitocondrial[60].

La identidad de residuos entre la ACO2 de rata y la humana es muy alta (96%), por lo tanto, es probable que la diferencia radique en el patrón de acetilación de la enzima, teniendo en cuenta la presencia de desacetilasas mitocondriales en las condiciones *in vivo* (sirtuinas 3, 4 y 5).

Posteriormente, nos planteamos identificar las lisinas sensibles a la acetilación. Para esto se digirió la muestra con tripsina y se analizó, primeramente, en el Servicio de Bioquímica y Proteómica analíticas del Institut Pasteur de Montevideo con la Dra. Rosario Durán, donde se buscaron los iones correspondientes a los péptidos acetilados. Debido a que la tripsina corta enlaces peptídicos luego de una arginina o lisina, la acetilación de la lisina inhibe la digestión, por lo que la estrategia de análisis consistió en utilizar un algoritmo de búsqueda que evaluara la posibilidad de que la tripsina se saltara 1 o 2 cortes, de forma tal de mejorar la cobertura de la secuencia. La Figura 29 muestra los residuos acetilados identificados a distintas concentraciones de acetil-CoA. Es posible que algunos de los residuos que se acetilaran no hayan sido detectados porque los péptidos modificados tras la digestión hayan sido demasiado grandes o no tuvieran buena señal. Se observó una caída importante de la cobertura al incubar con 1.5 mM de acetil-CoA, posiblemente por el impedimento en el corte de la tripsina al estar acetiladas las lisinas. Incluso en este caso, se hallaron nuevas lisinas acetiladas en esas condiciones, pero varias otras quedaron fuera de cobertura.

| Acetil-CoA (mM) | 0.1 | 0.5 | 1.5 |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|
| Cobertura | 66% | 65% | 29% |
| Lisina acetiladas (nro de residuo) | - | 68 | FDC |
| | 86 | - | 86 |
| | - | - | 138 |
| | 144 | 144 | FDC |
| | 233 | 233 | FDC |
| | 245 | 245 | FDC |
| | 250 | 250 | FDC |
| | - | - | 304 |
| | - | - | 305 |
| | - | 309 | 309 |
| | 370 | 370 | FDC |
| | 401 | 401 | 401 |
| | - | - | 458 |
| | - | - | 461 |
| | - | - | 462 |
| | - | 465 | 465 |
| | 520 | 520 | 520 |
| | - | 521 | 521 |
| | - | 534 | FDC |
| | - | 549 | FDC |
| | 573 | 573 | FDC |
| | 587 | 587 | FDC |
| | - | - | 628 |
| | - | - | 651 |
| | - | - | 652 |
| | 689 | 689 | 689 |
| | 700 | - | 700 |
| | 701 | 701 | 701 |
| 717 | 717 | FDC | |
| 723 | 723 | FDC | |
| 730 | 730 | FDC | |
| - | 736 | FDC | |
| - | 744 | FDC | |
| - | - | 776 | |

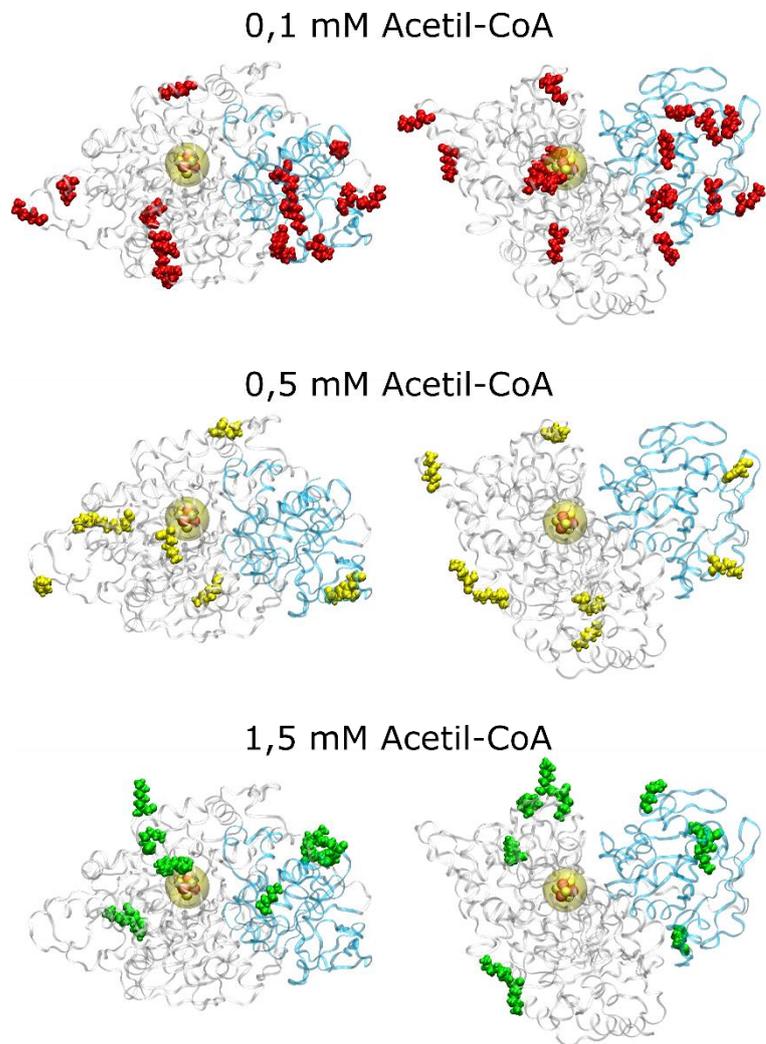


Figura 29. Residuos de la $[3Fe-4S]^+$ -ACO2 acetilados detectados por espectrometría de masas. Resultados del análisis por espectrometría de masas para la detección de lisinas acetiladas de la ACO2 luego de la incubación con acetil-CoA. La tabla indica la cobertura de secuencia (porcentaje del total de la secuencia aminoacídica cubierta por el análisis), y el número de residuo acetilado. A mayor concentración de acetil-CoA, la cobertura decrece debido a que la tripsina no corta en la lisina acetilada. FDC: lisina presuntamente acetilada, pero "Fuera De Cobertura" del análisis. A la derecha se representan las lisinas en la estructura de la ACO2. Según la concentración de acetil-CoA a la que tuvo que ser expuesta para modificarse. Rojo: más sensible (se modifican a baja concentración de acetil-CoA); amarillo: sensibilidad media; verde: sensibilidad baja (requiere altas concentraciones de acetil-CoA para ser detectadas).

A continuación, contando con las características de los péptidos (masa/carga), realizamos experimentos específicos para detectar una lista de residuos acetilados y evaluar la dosis respuesta de la incubación con acetil-CoA. Esto fue realizado en la Plataforma de Espectrometría de Masas del CEINBIO con el Dr. Mauricio Mastrogiovanni.

La muestra de ACO2 humana fue digerida con tripsina y posteriormente, se buscaron mediante espectrometría de masas, péptidos con una variación de +42 m/z. Esa diferencia surge de que, al producirse la fragmentación por colisión (CID), la acetil-lisina produce un ion imonio con una relación masa/carga de 143.118 m/z y un derivado cíclico de 126.091 m/z, que pueden ser utilizados para confirmar la presencia de acetil-lisina y diferenciarla de residuos trimetilados[138].

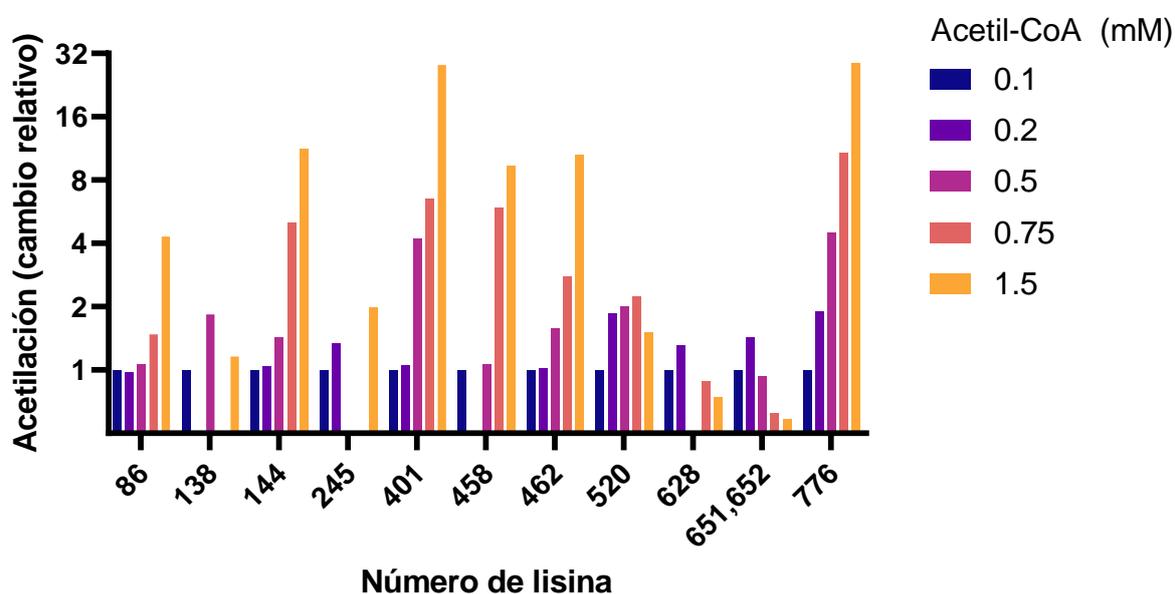


Figura 30. Análisis de espectrometría de masas de la acetilación con Acetil-CoA de la [3Fe-4S]⁺-ACO2. Cambio relativo para la señal (área) de los péptidos acetilados que revelan las lisinas acetiladas en la ACO2. Las áreas de los iones acetilados se relativizaron a un control de carga interno (péptido no acetilado) en cada una de las 5 condiciones. Además, se presentan como cambio relativo respecto a la condición de 0.1 mM de acetil-CoA.

Bajo las condiciones ensayadas se evaluó la dosis-respuesta en la modificación de la abundancia de la lisina acetilada respecto a la concentración de acetil-CoA (Figura 30). Se encontró acetilada la Lys144 ya con 0.1 mM de acetil-CoA, pero no la Lys258, reportada en la literatura (sí se encontró el péptido sin modificar: VAGILTVK, en todas las condiciones ensayadas). Se detectó la Ac-Lys144 aumentada hasta casi 10 veces, presentando un nivel de acetilación dependiente de la concentración de acetil-CoA. Esta dependencia también se detectó para las lisinas 86, 401, 458, 462 y 776. Por otra parte, la 138, 245, 520, 628, y 651-652 (el mismo péptido) fueron detectadas en niveles similares para todas las concentraciones de acetil-CoA. Ya que las lisinas 138, 628 y 651-652 se encontraron en el primer experimento acetiladas solo con 1.5 mM de acetil-CoA, es posible que

estas acetilaciones sean minoritarias, mientras que la Lys245 y la Lys520 ya se encontraban a 0.1 mM, es posible que se acetilaran y se saturara rápidamente, mostrando ser sitios de acetilación favorecidos.

Adicionalmente, para evaluar si la actividad de la ACO2 podía ser recuperada tras la inactivación, se buscó realizar la reversión de la reacción mediante la desacetilasa hSIRT3 (sirtuina 3 humana). Esta aproximación *in vitro* ha sido utilizada en otros reportes y, además, se ha reportado que la represión de SIRT3 es capaz de potenciar la activación de la ACO2 en cáncer de próstata[55].

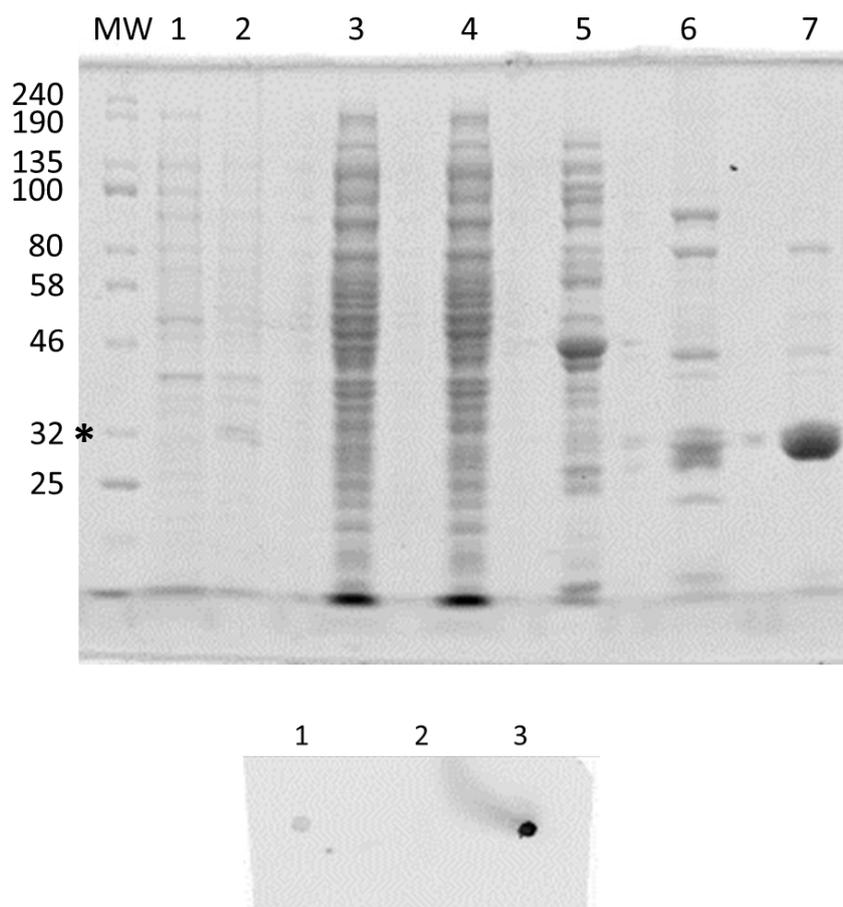


Figura 31. Expresión de la SIRT3 humana recombinante. Arriba) SDS-PAGE 8% revelado con Coomassie. 1 y 2: bacterias enteras no inducidas e inducidas con 0.5 mM IPTG lisadas en buffer de muestra 4X (SDS 10% + beta-mercaptoetanol 10%), durante 5 min a 95 °C. 3: lisado total de bacterias inducidas con 0.5 mM IPTG. 4: fracción que no se pegó a la columna de níquel. 5: lavado. 6: fracción eluida con 70 mM imidazol. 7: fracción eluida con 105 mM imidazol. El peso de la banda correspondiente a la SIRT3 se encuentra marcado con un asterisco. Abajo) Dot blot con anticuerpo anti-SIRT3 (dil. 1 en 1000). 1: ACO2, 2: tioredoxina humana (TRX), 3: carril 7 del SDS-PAGE.

Como control de que la SIRT3 purificada se encontraba activa, se utilizó el procedimiento de acetilación con acetil-CoA y desacetilación en la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), la cual se encuentra reportada como regulada por esta modificación postraduccional (Figura 32)[139].

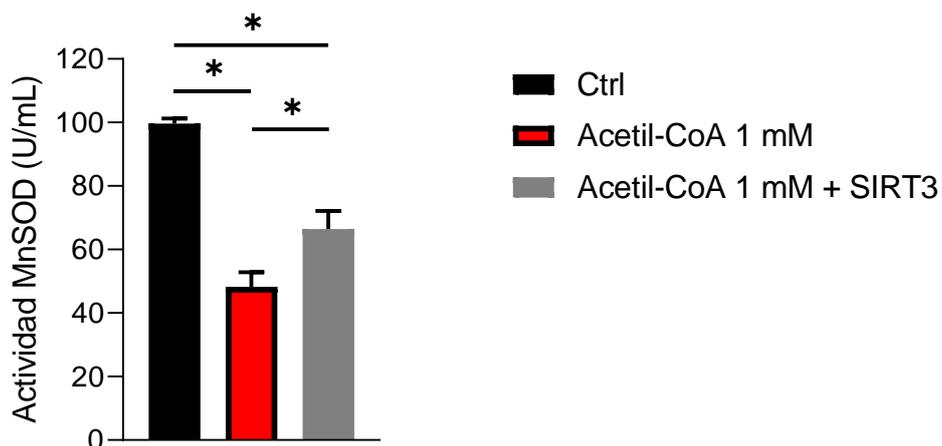


Figura 32. Regulación de la actividad de la MnSOD por acetilación. MnSOD 2 μ M fue incubada durante 6 h a 37 °C en presencia de acetil-CoA 1 mM. El tratamiento produjo una caída en la actividad enzimática que fue parcialmente revertida por la incubación con 10 μ g de SIRT3, durante 30 minutos a temperatura ambiente en presencia de 5 mM de NAD⁺.

Una vez determinado que la SIRT3 obtenida se encontraba activa, evaluamos su efecto al desacetilar ACO2 previamente acetilada. La reacción de desacetilación se llevó a cabo incubando la enzima acetilada (2 μ M) con 10 μ g de SIRT3 durante 30 minutos a temperatura ambiente, en presencia de 5 mM de NAD⁺ ($K_M = 600 \mu$ M[140]). En este ensayo, aprovechando que el grupo previamente había trabajado con ACO2 murina, consistiendo en la proteína sobre la cuál trató mi tesina de grado de la Licenciatura en Bioquímica[141], estudiamos si los efectos observados en la ACO2 humana también eran observables en la ACO2 murina. Como control negativo de la reacción, se realizó la incubación en ausencia de NAD⁺, sustrato de la SIRT3.

Por western blot la desacetilación de la ACO2 humana no fue evidenciable, lo que era esperable ya que la acetilación *in vitro* realizada no es específica, mientras que la SIRT3 solo logra desacetilar algunos sitios específicos (Figura 33A).

Por otra parte, el tratamiento con SIRT3 no llevó a una recuperación de la actividad de la ACO2, ni humana ni murina (Figura 33B). Esto se observó tanto tras la acetilación con acetil-CoA, como con anhídrido acético (Ac₂O).

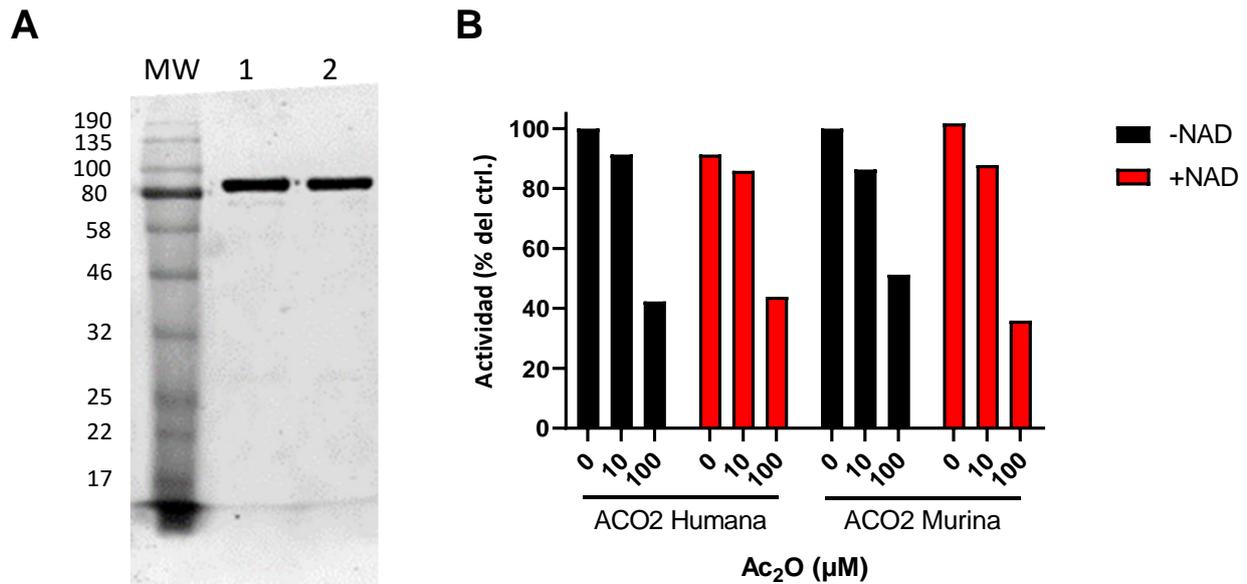


Figura 33. Incubación de la $[3Fe-4S]^+$ -ACO2 acetilada con la desacetilasa SIRT3. A) Western blot anti-acetil-lisina. Carril 1: ACO2 acetilada con 100 μ M Ac₂O; Carril 2: muestra del carril 1 incubada con 10 μ g de SIRT3, durante 30 min a temperatura ambiente, en presencia de 5 mM NAD⁺. B) Actividad como porcentaje del control, para la ACO2 humana o murina, acetilada con Ac₂O y posteriormente incubadas con SIRT3.

En conclusión, es altamente probable que las diferencias observadas en la actividad enzimática de la ACO2 humana recombinante acetilada *in vitro* en este trabajo en comparación con lo observado en la literatura, surjan de las diferencias en el patrón de acetilación entre todas estas condiciones experimentales. El efecto inhibitorio de la acetilación de la ACO2, si bien fue parcial, podría tener impacto sobre todo en tejidos sobre los que la ACO2 tiene un alto control de flujo metabólico (cerebro, músculo cardíaco), sin embargo, la modulación más importante de la actividad de la ACO2 parece igualmente ser la inactivación oxidativa y la reactivación.

Adicionalmente es posible vincular la pérdida de actividad ACO2 en modelos con niveles elevados de acetilación ya sea por acetilación de la MnSOD o de la FXN (ver sección 5.3), las cuales se encuentran involucradas con el mantenimiento del estado activo de la ACO2 o con la producción de la holo-ACO2 (Figura 34).

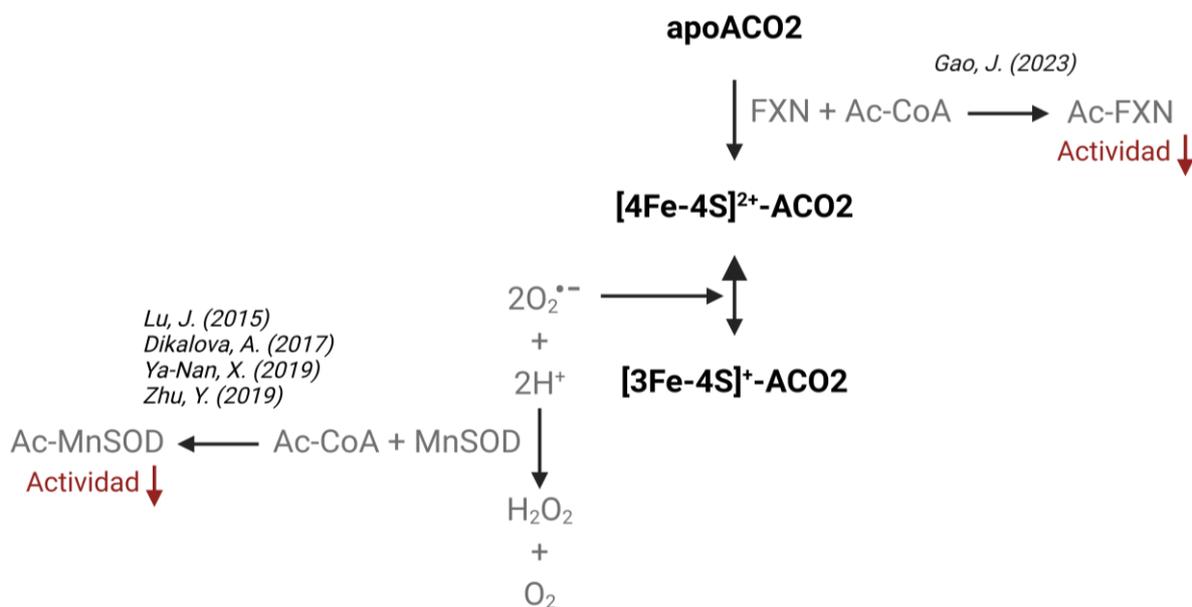


Figura 34. Pérdida de la actividad ACO2 mediada por acetilación. La disminución de la actividad ACO2 en modelos que involucran elevados niveles de acetilación podría ser producido por dos mecanismos: 1) La acetilación de la MnSOD, la cual le produce una pérdida de la actividad llevando a un aumento en los niveles de O₂^{•-} y por tanto fomentando la inactivación oxidativa de la ACO2. 2) La acetilación de la FXN, la cual ve reducida de su capacidad de activar la desulfurasa en el supercomplejo generador de centros Fe-S y por tanto disminuye los niveles de ACO2 que contienen centros Fe-S. Adicionalmente, aunque no hay evidencia al respecto, también podría impactar en la interacción directa con la ACO2 en su rol de chaperona de hierro disminuyendo la reactivación de la ACO2 en condiciones fisiológicas (ver sección 5.3 de *Resultados y Discusión*)

Como perspectiva, con el objetivo de estudiar si la acetilación de las lisinas logra tener un impacto sobre las propiedades dinámicas de la ACO2, se pretende realizar simulaciones de DM con la ACO2 modificada con acetil-lisina en las lisinas reportadas como moduladoras de la actividad en la literatura (Lys144 y Lys258), y adicionalmente alguna de las detectadas en nuestros experimentos de acetilación.

5.3. Interacción con la frataxina (FXN)

En condiciones fisiológicas, la ACO2 se encuentra en equilibrio entre el estado $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ activo y el $[3\text{Fe-4S}]^+$ inactivo, de modo tal que en bacterias o células de mamífero creciendo en normoxia, la fracción de ACO2 inactiva se encuentra en el entorno del 10-15%[19,142]. Mientras que la inactivación por oxidantes ha sido ampliamente estudiada, el mecanismo por el cual la ACO2 recupera su actividad no ha sido comprendido completamente. Para la reactivación, la ACO2 requiere un electrón (proveniente del ácido ascórbico, glutatión o cisteína, ampliamente disponibles en la mitocondria[143]) y ion ferroso (Fe^{2+}).

El pool de hierro lábil, utilizado para biosíntesis de centros Fe-S y grupo hemo, se encuentra en el orden de 0.5 a 10 μM en células de mamífero sugiriéndose además que el mismo se encuentra principalmente en el estado Fe^{2+} formando complejos de bajo peso molecular (citrato- Fe^{2+} , β -citril-L-glutamato), o unido a chaperonas de hierro[144–146]. Una de estas chaperonas de hierro para la cual hay reportes previos de que podría interactuar con la ACO2 es la FXN[6].

Entre los trabajos que han indagado en la interacción entre la ACO2, destacan el de Bulteau (2004)[6], donde tras la exposición de mitocondrias de *S. cerevisiae* o corazón de rata a H_2O_2 , se lograron coinmunoprecipitar la FXN y la ACO2. Sin embargo, en el trabajo de Schmuker (2011)[7], este resultado no logró ser reproducido, poniendo en duda la hipótesis de una interacción directa entre la FXN y la ACO2.

En colaboración con el laboratorio del Dr. Javier Santos (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, Argentina), quien posee una larga trayectoria trabajando con la FXN humana, nos propusimos determinar la existencia de una interacción física con la ACO2 humana. Para esto realizamos medidas de activación de la ACO2 por FXN y diversas técnicas bioquímicas y biofísicas para detectar la interacción.

Con respecto a la FXN humana utilizada, se utilizó una forma de la proteína truncada denominada “90-210”, por la numeración de los residuos que permanecen en la forma final. Aunque la forma madura de la FXN humana corresponde a la FXN 81-210, la variante truncada 90-210, presenta mayor estabilidad proteica y rendimiento de purificación. Los 9 aminoácidos que se eliminan corresponden a una región muy poco estructurada[147], sin embargo, la H86, localizada en esta región, podría llegar a coordinar iones metálicos, por lo que la capacidad de unión a metales de la FXN 90-210 podría encontrarse subestimada[148].

5.3.1. Estudio de las características bioquímicas de la ACO₂ en presencia de la FXN

La ACO₂ completamente activa usualmente es obtenida al incubar la enzima en presencia de Fe²⁺ y DTT durante 1 hora bajo atmósfera de argón, mientras que, si este proceso se realiza al aire, solo se obtiene un 20% de la actividad máxima en el mismo plazo temporal (Figura 35A). Para evaluar si la FXN cargada con Fe²⁺ era capaz de activar la ACO₂ bajo aire, primero incubamos la FXN (6 μM) o BSA (2 mg/mL = 30 μM) (como control) con 300 μM de Fe²⁺ en un buffer HEPES 20 mM, pH 7.4 con 100 mM de NaCl, durante 10 minutos. La concentración de BSA utilizada fue la que se estimó que igualaba equimolarmente los sitios de unión a hierro de la FXN (30 μM de sitios de unión, 5 en promedio por FXN y 1 en la BSA). Luego se agregaron ACO₂ y DTT para obtener una concentración final de 1 μM y 10 mM respectivamente. Las concentraciones finales de FXN y Fe²⁺ fueron de 4 μM y 200 μM. La activación de la ACO₂ se siguió tomando alícuotas y midiendo la actividad por ensayo directo con *cis*-aconitato, tal como se describió en la sección 6.1.3. Como se muestra en la Figura 35A, la presencia de FXN cargada con Fe²⁺ aceleró la reactivación de la ACO₂ *in vitro*, así como también permitió alcanzar mayores valores de actividad, similares a los máximos obtenidos cuando se trabaja en argón. La BSA incubada con Fe²⁺ o la incubación solo con Fe²⁺ libre, no tuvieron impacto sobre la activación de la ACO₂ como se ha mostrado previamente para la ACO₂ bovina[149].

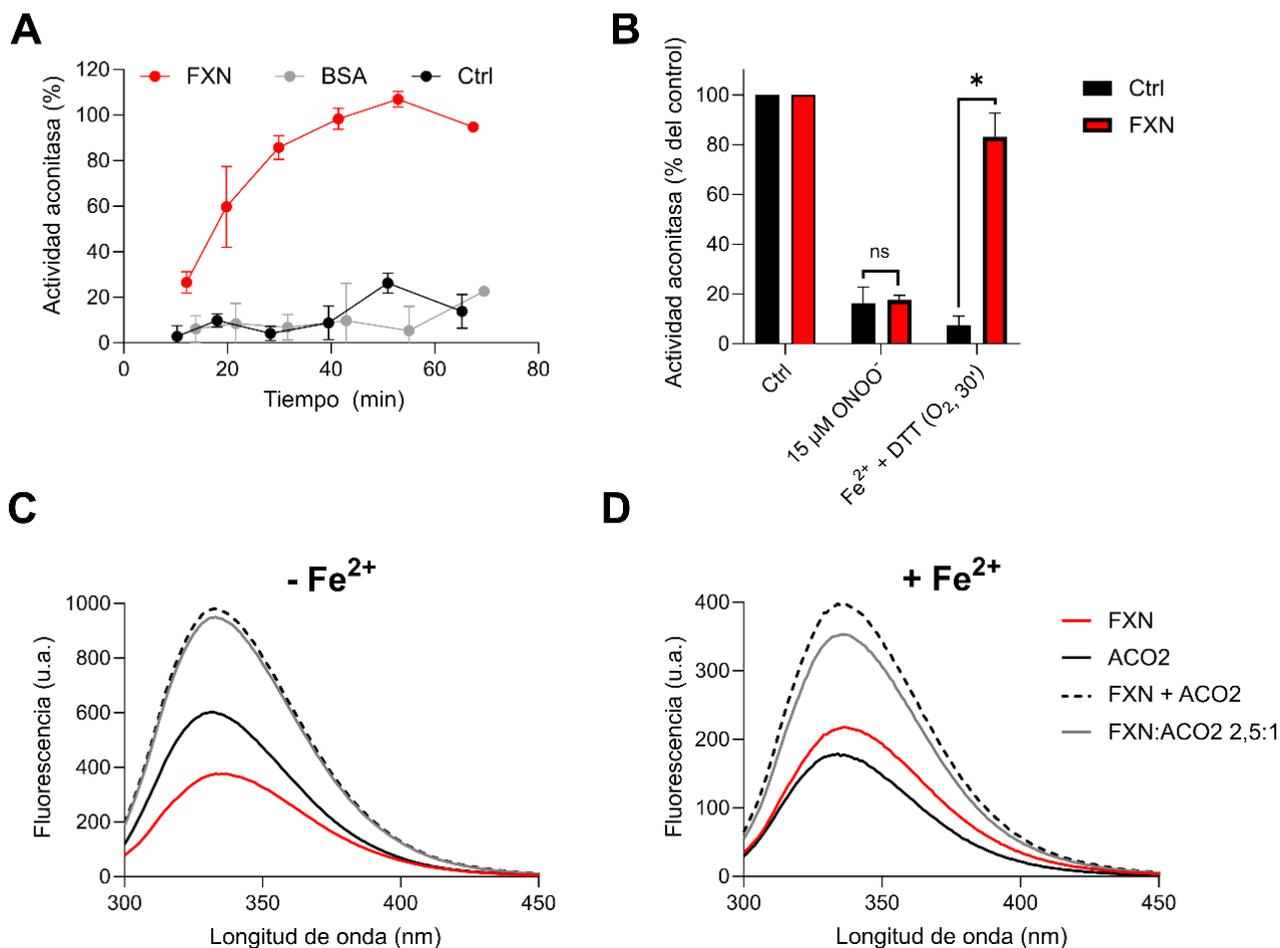


Figura 35. Activación de la ACO2 mediada por FXN. A) Activación de la ACO2 mediada por FXN. Se preincubaron 3.7 μM de FXN (1.2 mg/mL) o 1.2 mg/mL de BSA con 300 μM de Fe^{2+} y luego se añadieron ACO2 y DTT hasta alcanzar una concentración final de 1 μM y 10 mM, respectivamente. La concentración final de Fe^{2+} fue de 200 μM . El vial se dejó abierto y expuesto al aire, y la actividad de la ACO2 se siguió tomando alícuotas y midiendo el consumo de *cis*-aconitato 200 μM . B) La ACO2 activa fue tratada con ONOO^- en presencia o ausencia de FXN. La reactivación aeróbica de la ACO2 tratada con ONOO^- ocurrió solo en presencia de FXN. C-D) Espectros de emisión de fluorescencia de la ACO2 (2 μM) y FXN (5 μM) solas o en la misma solución en presencia o ausencia de 200 μM de Fe^{2+} ; $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$. * $p < 0.05$.

Para estudiar la relevancia biológica de esta reactivación, evaluamos si la reactivación de la ACO2 puede ocurrir tras su inactivación oxidativa. Se incubó la $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 (2 μM) con ONOO^- 15 μM , (una concentración que se ha demostrado que inactiva la ACO2) en presencia o ausencia de 4 μM de FXN (Figura 35B). En estas condiciones, la FXN no protegió a la ACO2 de la inactivación, sin embargo, la reactivación aeróbica se logró obtener en presencia de FXN cargada con Fe^{2+} . Dado que otros oxidantes biológicos como el $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ también inactivan a la ACO2 por oxidación del centro Fe-S (revisado en[5]), es esperable que el efecto de la FXN promueva la reactivación tras la inactivación por estos oxidantes.

Para determinar si la FXN está aumentando la biodisponibilidad de Fe^{2+} para la reactivación del ACO2 o si hay una interacción directa entre ambas proteínas, se realizaron una serie de experimentos considerando las condiciones donde detectamos la activación de la ACO2 por la FXN. La ACO2 contiene 9 residuos de triptófano (W166, W222, W241, W373, W455, W574, W603, W657, W765) mientras que el FXN tiene 3 (W155, W168, W173). Ambas proteínas tienen algunos de estos triptófanos expuestos al solvente, y por lo tanto son sensibles al *quenching* (apagamiento). El espectro de emisión de fluorescencia de la solución combinada de FXN:ACO2 en una relación molar de 2.5:1, mostró un *quenching* evidenciable al comparar el espectro obtenido respecto a la suma de los espectros de las proteínas individuales, lo que implica que ambas proteínas podrían estar cerca una de la otra (Figura 35C-D). Este efecto fue mayor en presencia de Fe^{2+} (12% vs 3%), lo que sugiere que el Fe^{2+} podría ser importante para la interacción. Estos resultados fueron reproducibles ($n = 3$) y se muestra un experimento representativo.

Por otra parte, se evaluó si la presencia de FXN influía en el mecanismo de desplegado o replegado de la ACO2 utilizando la fluorescencia intrínseca como indicador y generando su curva de desplegamiento por temperatura (Figura 36). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la T_m de la $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 en presencia o ausencia de FXN 12 μM (T_m [IC95%]: 45.6 [45.3 – 45.8] y 46.1 [45.7 – 46.4] y respectivamente). No obstante, se identificó un efecto notable de la presencia de FXN en el proceso de replegado. Mientras que la $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2 no mostraba recuperación de la fluorescencia intrínseca al disminuir la temperatura, la presencia de FXN indujo un aumento de la fluorescencia, lo que podría implicar una influencia de la FXN en la capacidad de la ACO2 para replegarse correctamente o para mantener su estructura estable en condiciones de estrés, como cambios de temperatura o cambios en el estado del centro Fe-S.

Adicionalmente, realizamos espectros UV-visible de la $[\text{3Fe-4S}]^+$ -ACO2 (tal como se purifica) y después de su incubación con Fe^{2+} y DTT en presencia o ausencia de FXN (Figura 37). Se sabe que las proteínas Fe-S poseen bandas anchas y sin rasgos distintivos en estos espectros, producidas por un gran número de transiciones electrónicas y número de átomos metálicos[122]. Como se muestra en la Figura 37, la ACO2 humana mostró este tipo de señal. Este resultado se asemeja al espectro de la ACO2 porcina reportado en la literatura[123]. Después de una incubación de 1 hora en presencia de Fe^{2+} y DTT, se observó un aumento en la señal de forma general, un efecto que fue potenciado por la adición de FXN, reflejando la aceleración en la formación de la $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2.

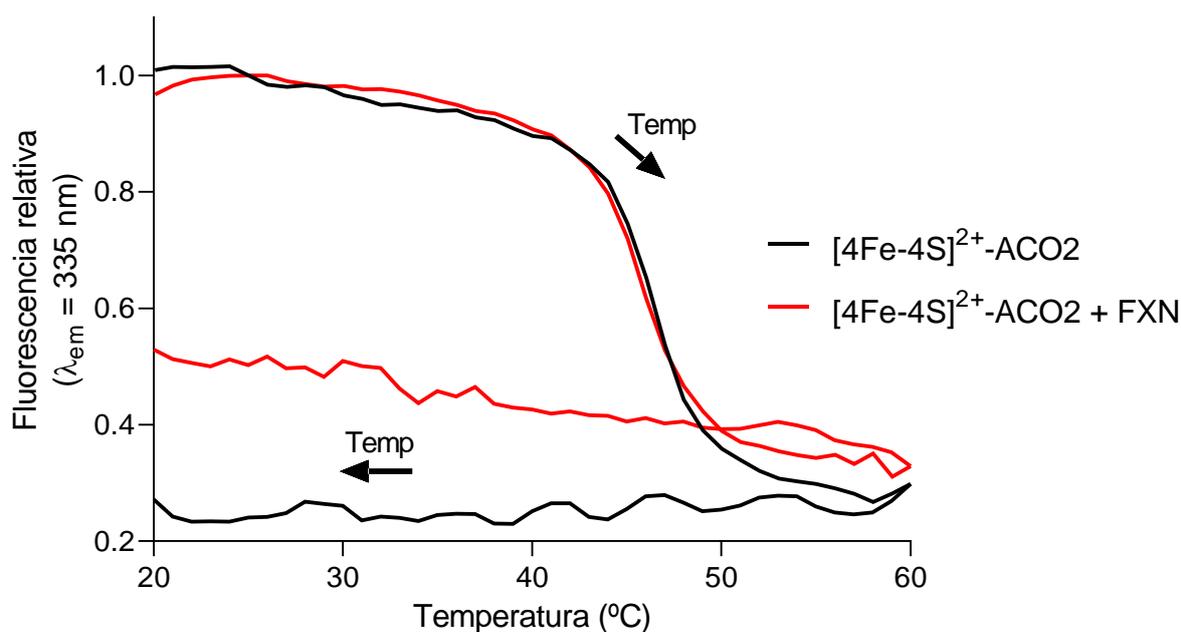


Figura 36. Desplegamiento de la ACO2 en presencia de FXN. Curvas de desplegamiento de la ACO2 graficadas siguiendo la fluorescencia intrínseca, por excitación a 295 nm, y siguiendo la fluorescencia a 335 nm a cada temperatura. Ensayo realizado buffer HEPES 20 mM, pH 7.8, conteniendo NaCl 100 mM, ACO2 2 μ M de y FXN 5 μ M.

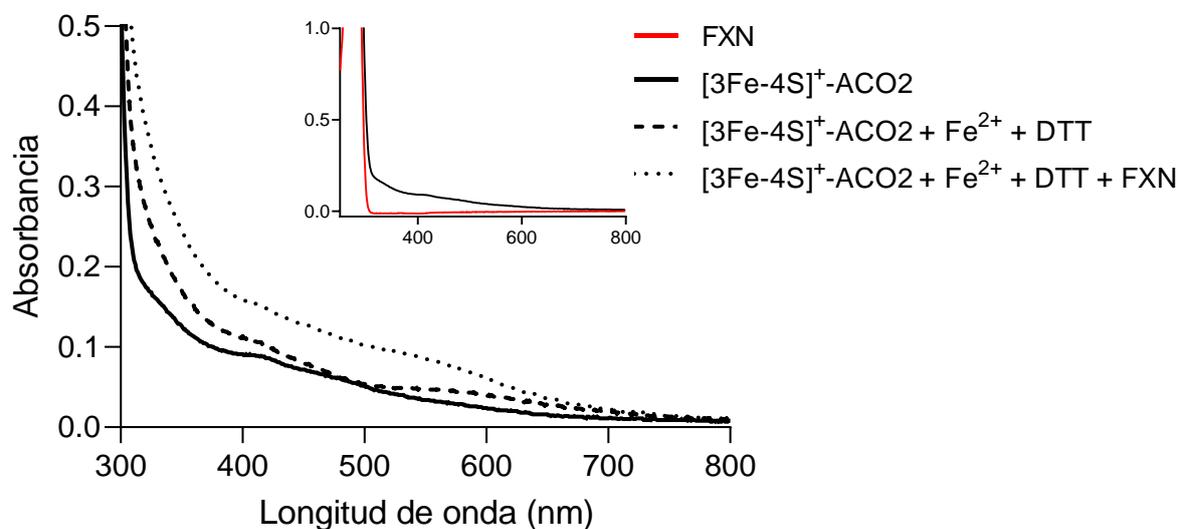


Figura 37. Espectros UV-visible de la ACO2 y la FXN. Se incubó a la [3Fe-4S]⁺-ACO2 (40 μ M) con 200 μ M de Fe²⁺ y 10 mM de DTT en presencia o ausencia de FXN (40 μ M) durante 30 minutos y se siguió el espectro UV por espectrofotometría entre 300 y 800 nm. La figura menor muestra el espectro UV-visible de la [3Fe-4S]⁺-ACO2 y la FXN aisladas.

Complementando estos resultados, se estudió también la reactivación de la ACO2 por CD. Lo que permitió observar una aceleración de la activación de la ACO2 al encontrarse en presencia de FXN cargada con Fe²⁺. En la Figura 38A se presentan los espectros UV-visible de la ACO2 y la FXN,

mientras que en la Figura 38B se presentan sus respectivos espectros de CD. Ya que la FXN no absorbe en esta región del UV y que la unión del Fe^{2+} a la misma no producen complejos que absorban, fue posible evaluar la activación mediada por FXN al seguir el espectro de CD de la ACO2 encontrándose todo en la misma solución (Figura 38C). En línea con los resultados presentados anteriormente, la FXN cargada con Fe^{2+} promovió la reactivación en comparación con solo el Fe^{2+} . Esto puede apreciarse tanto para las muestras hasta los 20 minutos como en la condición de activación bajo atmósfera de argón durante 2 h.

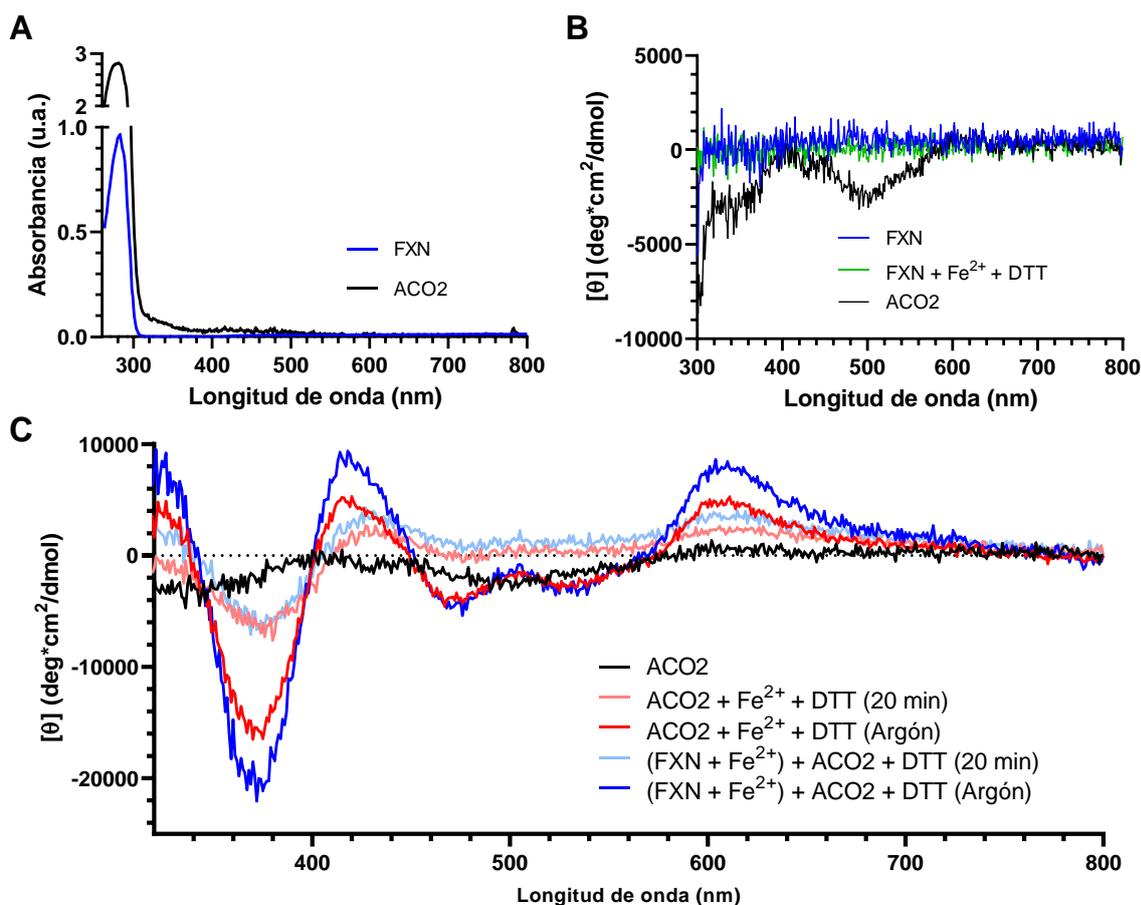


Figura 38. Activación de la ACO2 mediada por FXN evaluada por espectroscopía. A) Espectros UV-visible de la ACO2 y FXN, ambas 40 μM . B) Espectros de CD de la ACO2, FXN y FXN + Fe^{2+} + DTT. Las concentraciones utilizadas fueron de 40 μM de proteína, Fe^{2+} 200 μM y DTT 10 mM. C) Espectros de CD de la ACO2 activada con Fe^{2+} solo o con FXN cargada con Fe^{2+} .

Hasta aquí, los resultados revelan la capacidad de la FXN de promover la reactivación de la ACO2 inactivada oxidativamente, tanto en la aceleración de los tiempos de activación, como en la capacidad de activarse en condiciones donde no logra hacerlo en la ausencia de FXN. La influencia en el repliegamiento de la ACO2 y los espectros UV-Vis de las proteínas en solución sugieren una interacción física entre ambas proteínas.

5.3.2. Ensayos de interacción proteína-proteína para la caracterización de la interacción ACO2-FXN

Para tratar de evaluar la existencia de una interacción física entre la ACO2 y la FXN, se aplicó una batería de técnicas habitualmente utilizadas para el estudio de interacciones proteína-proteína. En primer lugar, utilizamos una técnica que depende de la unión de una de ellas a un sustrato mediante un ELISA de interacción proteína-proteína[116]. Los siguientes resultados refieren al ensayo realizado con la ACO2 adsorbida a la placa de ELISA y titulada con diferentes concentraciones de FXN (el esquema del ensayo se encuentra presentado en la sección *Materiales y métodos*).

Las concentraciones molares requeridas para el 50% de unión máxima de la FXN a la ACO2 inmovilizada, representativas de la afinidad de unión (K_a), fueron (1.1 ± 0.9) y (10 ± 2) μM en condiciones con y sin Fe^{2+} , lo que indica una mayor afinidad de la FXN por la ACO2 cuando está presente el Fe^{2+} (Figura 39A,B). La unión máxima, por otra parte, que representa la fuerza de acoplamiento o la tasa de disociación del complejo, no mostró diferencias con respecto a la adición de hierro (Figura 39C).

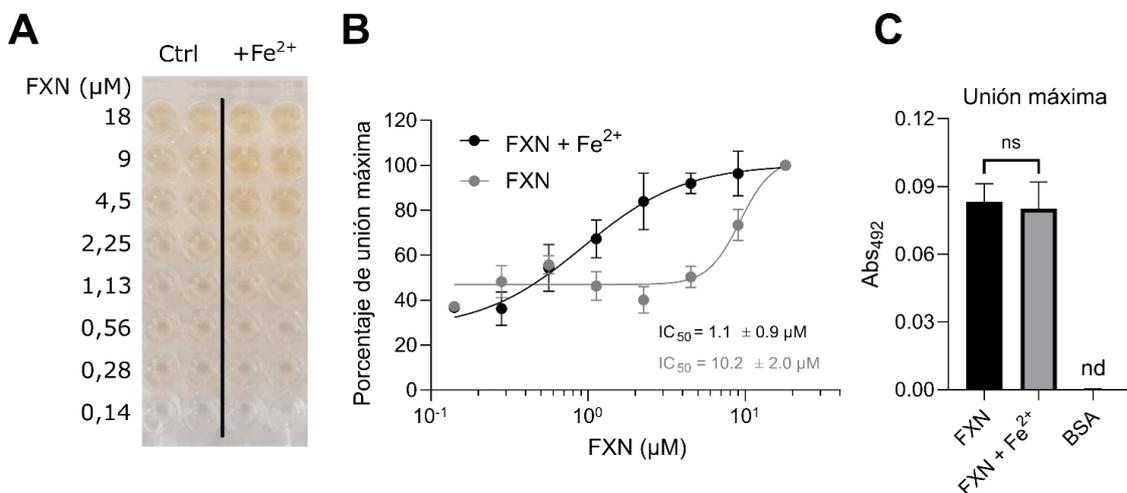


Figura 39. ELISA de interacción proteína-proteína para el complejo ACO2-FXN. A) Foto de la placa de ELISA revelada. B) Curvas de interacción normalizadas obtenidas a partir del ELISA de interacción proteína-proteína. La ACO2 fue inmovilizada en la placa y la interacción se llevó a cabo en condiciones donde se observó la activación de ACO2 por FXN (en presencia de Fe^{2+} y DTT o solo DTT). Los pocillos blanco no tenían ACO2 inmovilizada o se usó BSA en lugar de FXN. No se detectó unión al usar BSA (nd). C) Unión máxima del ELISA de interacción.

Este primer ensayo indica que la interacción de la ACO2 y la FXN es influenciada por la presencia de Fe^{2+} , modulando la afinidad de la interacción en el sentido que su presencia incrementaría la afinidad entre ambas proteínas sin afectar la estabilidad del complejo una vez formado.

Para evidenciar si este efecto era observable por otro enfoque, se utilizó la anisotropía de fluorescencia para la evaluación de la formación del complejo ACO₂-FXN. La técnica empleada se basa en el principio de que un fluoróforo excitado con luz polarizada produce una emisión parcialmente polarizada. La medida de anisotropía es una técnica sensible a factores que alteran la tasa de difusión rotacional de un fluoróforo y por tanto depende de la temperatura, la viscosidad de la solución y, particularmente para interés nuestro, del peso molecular del fluoróforo[97]. Cuando una proteína que tiene unido un fluoróforo se une a otra proteína, el aumento en el radio de giro del fluoróforo produce un aumento en la señal de anisotropía. El experimento realizado, en contraste con el ELISA de interacción proteína-proteína, consiste en evaluar interacción de las proteínas en solución.

Se tituló, con ACO₂, una cubeta que contenía 1 μ M de FXN marcada con la sonda fluorescente Texas Red, en condiciones donde previamente se comprobó que ocurría la activación de la ACO₂ por FXN (en presencia de Fe²⁺ y DTT).

Los resultados revelaron un aumento de la anisotropía con la adición de ACO₂, indicativo de la formación de un complejo FXN-Texas Red:ACO₂, mientras que el posterior agregado de FXN sin marcar, volvió a reducir la anisotropía, producto del desplazamiento del equilibrio hacia la formación del complejo ACO₂-FXN sin marcar y la liberación de la FXN-Texas Red (Figura 40A,B).

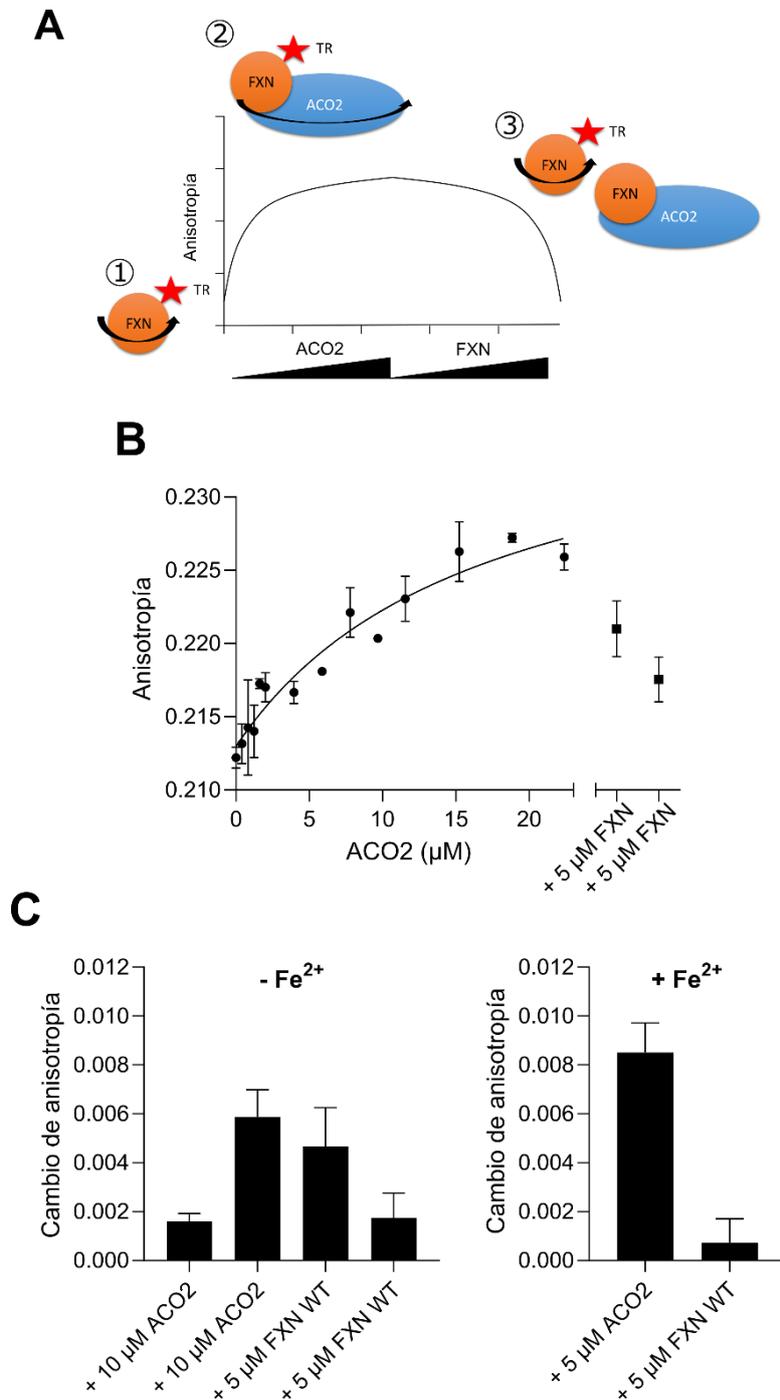


Figura 40. Interacción entre la ACO2 y la FXN evaluada por anisotropía de fluorescencia. A) Diagrama representativo del ensayo de anisotropía. 1) La FXN marcada con la sonda fluorescente Texas Red (TR) presenta un valor basal de anisotropía que es función de su radio de giro. 2) El agregado de ACO2 promueve la formación del complejo ACO2-FXN(TR), aumentando el radio de giro y la señal de anisotropía. 3) La titulación con FXN no marcada, desplaza la formación del complejo hacia el formado por la ACO2 y la FXN no marcada, liberando la FXN(TR) y llevando a una caída de la anisotropía. B) Curva de unión directa obtenida a partir de un experimento de anisotropía de fluorescencia midiendo la unión de FXN-Texas Red a ACO2 en presencia de DTT 10 mM. La reversibilidad de la unión se comprobó añadiendo FXN no marcada en una relación de 1:4.5 y 1:2.2 de FXN:ACO2. C) Cambio de anisotropía por adiciones puntuales de ACO2 o FXN no marcada en ausencia o presencia de 200 μM de Fe^{2+} . La FXN no marcada se añadió en una relación de 1:4 y 2:4 de FXN:ACO2 en ausencia de Fe^{2+} , y 1:1 en presencia de Fe^{2+} .

Además, como se muestra en la Figura 40C, en presencia de Fe^{2+} , se observó un aumento de casi 0.008 unidades de anisotropía al agregar ACO2 5 μM a FXN 1 μM marcada con TR, mientras que en ausencia de Fe^{2+} la adición de 20 μM de ACO2 aumentó la anisotropía en aproximadamente 0.006 unidades. Esto implica que se necesitó más ACO2 para permitir la formación del complejo en ausencia de Fe^{2+} .

Estos datos sugieren, que la FXN interactúa, en solución, directamente con la ACO2 de forma favorecida por la presencia de Fe^{2+} , y que la interacción ocurre en condiciones donde la ACO2 es capaz de recuperar su actividad catalítica tras la inactivación oxidativa.

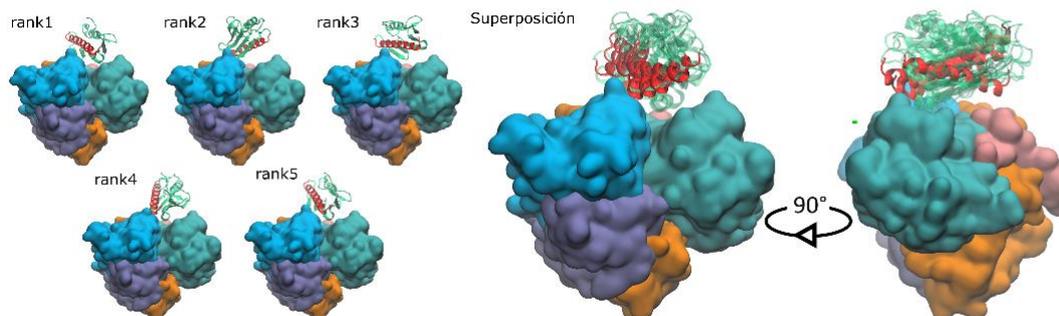
5.3.3. Estudios *in silico* de la interacción ACO2-FXN

Habiendo obtenido sólida evidencia experimental para la interacción entre la ACO2 y la FXN, decidimos complementar el estudio de la interacción desarrollando un modelo estructural para un complejo 1:1 de ACO2:FXN, con el objetivo de obtener información de tipo estructural sobre este complejo.

Como primer paso, utilizamos el AlphaFold2-Multimer[113] para generar modelos del complejo utilizando las secuencias de la ACO2 humana y la FXN (90-210) humana. Dado que esta herramienta utiliza información sobre la coevolución del par de proteínas a partir de un MSA (*multiple sequence alignment*), comparamos los complejos predichos de las proteínas WT con los complejos de las proteínas cambiando por alaninas los residuos de ácido glutámico y aspártico de la región ácida de la FXN (conocidas por conformar motivos de unión al hierro[150]). La secuencia 90-LDETTYERLAEETLDSL-117 fue modificada a 90-LAATTYARLAAATLASL-117 (Figura 41).

Los cinco modelos predichos para el complejo WT fueron similares, ya que todos posicionaron a la FXN junto a la cavidad de la ACO2 formada entre los dominios 3 y 4 (donde se encuentra dentro el centro Fe-S), y además tenían la región ácida orientada hacia la ACO2. Por otro lado, al utilizar la FXN con los residuos de la hélice ácida cambiados a alaninas, se observó que los modelos predichos difirieron en la ubicación relativa de la FXN con respecto a la ACO2, lo que implica que los residuos ácidos mutados parecen ser importantes para la interacción desde un punto de vista coevolutivo.

ACO2 WT:FXN WT



ACO2 WT:FXN (región ácida: GLU and ASP → ALA)

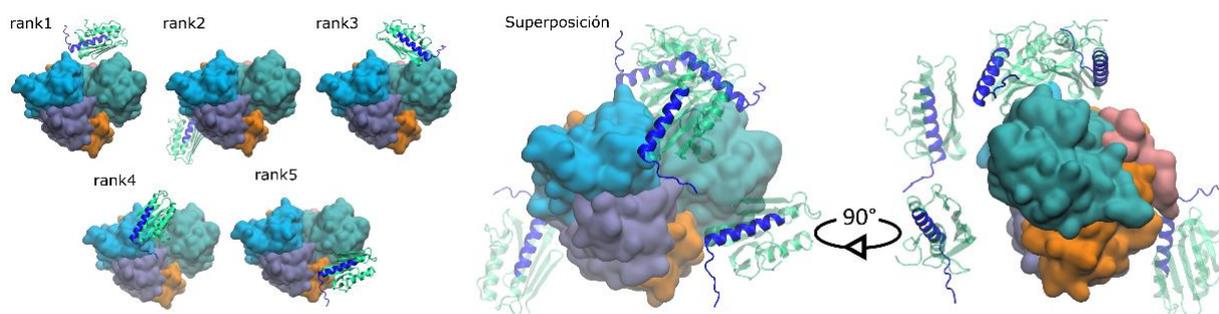


Figura 41. Complejos ACO2-FXN predichos por AlphaFold2-Multimer. Izquierda) Se representan los 5 mejores modelos según el ranking realizado por el algoritmo de AlphaFold2-Multimer. Derecha) Superposición de los modelos. La ACO2 se encuentra coloreada por dominios con el mismo esquema de colores de la Figura 9. La FXN se encuentra representada según su estructura secundaria en verde y la región ácida de la misma se muestra en rojo o azul, en base a si es la FXN WT o la FXN con la región ácida mutada.

Basándonos en esta información, desarrollamos un modelo de *docking*, con el objetivo de obtener un complejo más confiable y refinado, que además permitiera utilizar como estructuras de partida, estructuras de las simulaciones de DM realizadas para la $[3\text{Fe-4S}]^+-\text{ACO2}$ y la $[4\text{Fe-4S}]^{2+-\text{ACO2}}$, ya que ambas poseen características de apertura diferentes.

Para esto, se utilizó el webserver HADDOCK 2.4[115] y se definieron como residuos participantes en la interacción aquellos que se encuentran en la región ácida de la FXN y los residuos localizados en la hendidura de la ACO2 (Figura 42).

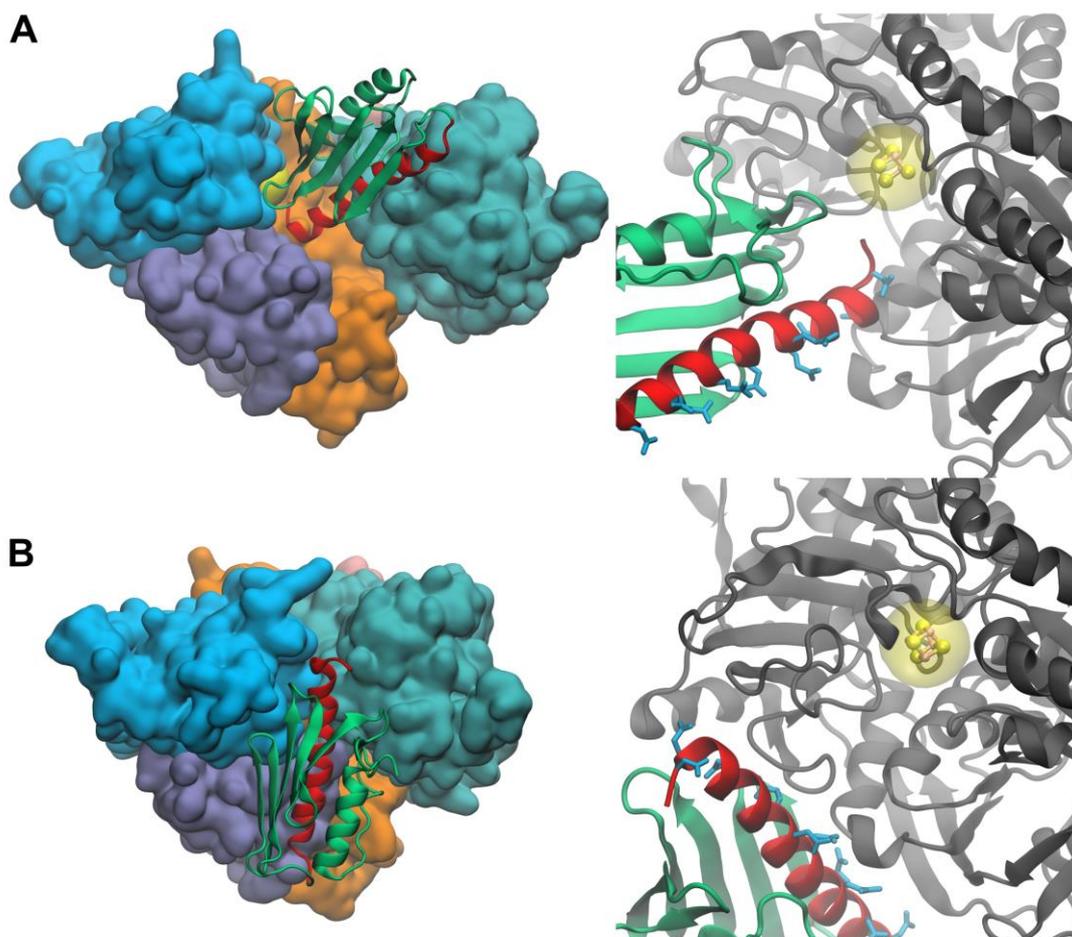


Figura 42. Modelo de docking para el complejo ACO2-FXN. Modelo de docking predicho con el Servidor Web HADDOCK 2.4 para el complejo formado entre la ACO2 humana WT y la FXN humana WT (ID PDB: 1EKG). Los modelos iniciales de ACO2 fueron obtenidos de la simulación de DM para ACO2 inactiva (A) o activa (B). La distancia desde el clúster Fe-S hasta la región de surco ácido de FXN es de ~ 8 Å en (A) y ~ 22 Å en (B). Los dominios de ACO2 están coloreados como en la Figura 9. FXN está coloreada en verde con la región de surco ácido en rojo. En representaciones de primer plano, los residuos de ácido glutámico y ácido aspártico están coloreados en cian. Los modelos representados corresponden a estructuras representativas de los mejores *clusters* de estructuras predichos por HADDOCK cuyo ranking se encuentra en la Figura 43.

El modelo del complejo para el estado inactivo y "abierto" de ACO2 muestra a la FXN posicionada dentro de la hendidura de la ACO2 con la región ácida orientada hacia el grupo Fe-S a una distancia de ~ 8 Å. En contraste, en el estado activo y "cerrado", la FXN no fue capaz de ingresar a la hendidura y acercarse al grupo Fe-S (~ 22 Å), principalmente porque este estado no expone el grupo Fe-S. El reemplazo de los residuos ácidos de la región ácida no afectó mucho la estructura del complejo, pero mostró un aumento del puntaje HADDOCK (mayor energía de unión predicha) en comparación con los complejos WT (Figura 43).

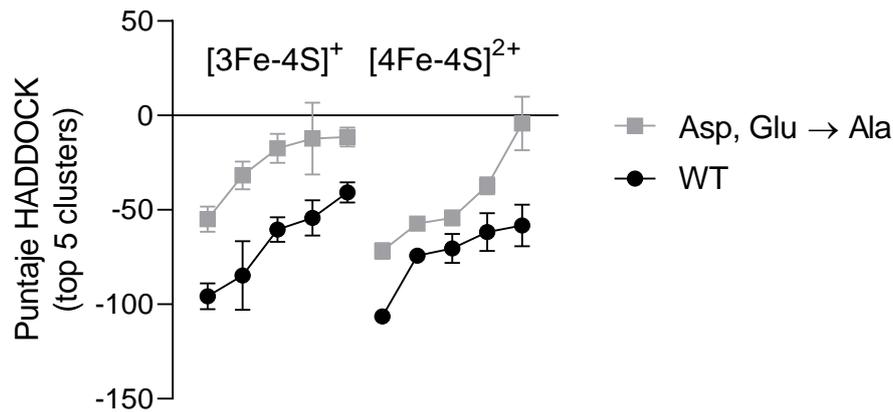


Figura 43. Puntaje HADDOCK para los 5 conjuntos de complejos predichos. El puntaje HADDOCK, que toma en cuenta la energía de Van der Waals, la energía electrostática intermolecular, la energía de desolvatación empírica y la energía *Ambiguous Interaction Restraints* (AIR), se graficó para el complejo *wild type* (WT) y para el complejo con la FXN mutada en la región ácida. Los puntajes se muestran también según el estado de la ACO2.

En conclusión, toda la evidencia aquí presentada sugiere la existencia de una interacción física entre la ACO2 y la FXN, que además depende de la presencia de Fe²⁺ favoreciendo la misma. La evidencia obtenida incluye los ensayos de activación de la ACO2 inactivada oxidativamente, variadas técnicas espectroscópicas, ELISA de interacción proteína-proteína y estudios *in silico* sustentados en la coevolución, geometría, complementariedad de superficies, afinidad de unión, potenciales energéticos coevolución y potencial energético. El rol de la FXN en el proceso de reactivación de la ACO2 se esquematiza en la Figura 44.

En la literatura, el rol de la FXN promoviendo la actividad de la ACO2 se ha apreciado en cardiomiocitos de ratones tratados con doxorubicina, que mostraron una reducción del 50% en la expresión de la FXN, acumulación de hierro libre, aumento de la formación de ROS mitocondriales y una reducción del 40% en la actividad de la ACO2[151]. Además, los hígados de ratones *knock-out* para HIF-2 α , que presentaron una reducción en la expresión de la FXN (<50% del WT), mostraron una reducción significativa en la actividad de la ACO2 (45%), a pesar de que la expresión de la ACO2 era mayor que en el WT[152]. En biopsias cardíacas obtenidas de pacientes con FRDA, la ACO2 fue la actividad más afectada entre otras proteínas Fe-S, lo que sugiere que tanto la biosíntesis como la reconstitución del clúster podrían estar comprometidas[78].

Por otra parte, se ha reportado, que la FXN podría interactuar con la superóxido dismutasa 2 (SOD2), pudiendo llegar a formar un complejo que deja la región de unión a metales de la FXN expuesta al solvente[153]. Debido a esto, y a la sensibilidad de la ACO2 al O₂^{•-}, existe la posibilidad de la formación un complejo trimérico que podría favorecer el estado activo de la ACO2, al protegerla de la inactivación oxidativa.

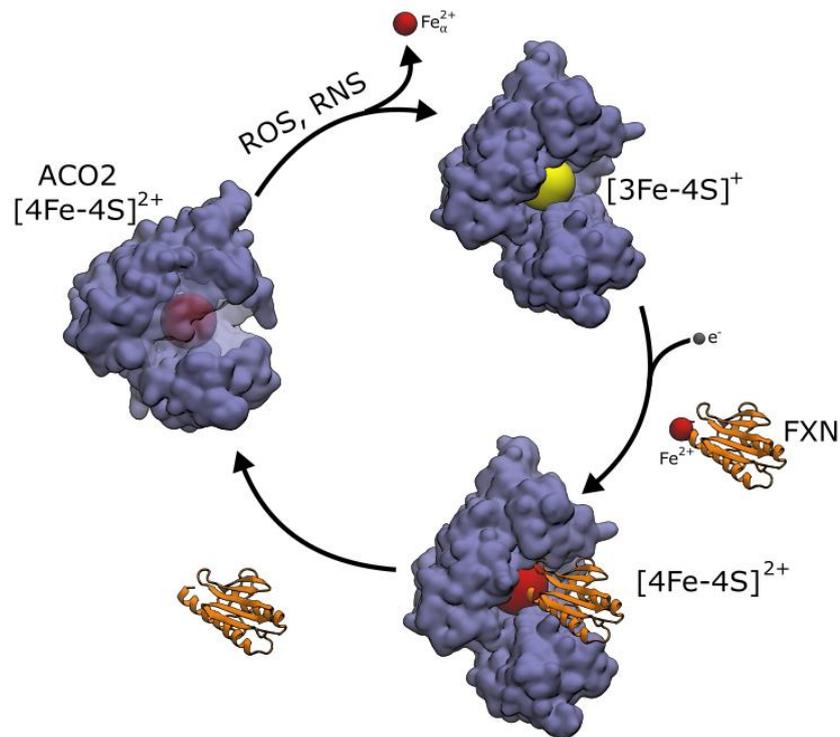


Figura 44. Diagrama de la inactivación y reactivación mediada por FXN de la ACO2. La [4Fe-4S]²⁺-ACO2 activa puede ser oxidada por ROS o RNS, llevándola a un estado [3Fe-4S]⁺-ACO2 inactivo con la liberación de un átomo de Fe²⁺. La chaperona de hierro FXN, que también participa en la biosíntesis *de novo* de grupos Fe-S en las mitocondrias, es capaz de promover la reactivación de la ACO2 en presencia de agentes reductores como ácido ascórbico, glutatión o cisteína. Este proceso contribuye al mantenimiento de un estado estacionario entre el ACO2 activa e inactiva y puede modificar el metabolismo celular.

Como perspectiva, se pretende realizar simulaciones de DM para el complejo ACO2:FXN, pero tomando como punto de partida distintos modelos de *docking* refinando los residuos participantes en la interacción en base a datos experimentales, por ej. obtenidos de NMR. Además de esto, se pretende considerar la presencia del Fe²⁺ unido a la FXN en la interacción con la [3Fe-4S]⁺-ACO2 inactiva. En caso de la obtención de resultados favorables, también se buscará estudiar el impacto de las modificaciones postraduccionales en las propiedades del complejo, ya que, por ejemplo, algunas de las acetilaciones reportadas en la ACO2, como la Lys258, se encuentran localizadas en la región donde la interacción con la FXN parece estarse llevando a cabo.

5.4. Roles y aplicación del análisis de la ACO2 en modelos celulares

La ACO2 desempeña un papel esencial en el metabolismo de los ácidos tricarbóxicos y la generación de energía celular, por lo que entender cómo se regula y cómo varía su actividad en diferentes contextos puede proporcionar información sobre su implicancia en procesos celulares claves, como el metabolismo energético, la respuesta al estrés oxidativo y la senescencia celular. A su vez, la ACO2 ha sido asociada con una variedad de enfermedades y condiciones, incluidas las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer y la infertilidad (ver *Introducción*). Además de esto, el estudio de la ACO2 en estos contextos celulares permite validar los resultados obtenidos *in vitro* y permite confirmar su relevancia fisiológica.

En particular utilizamos dos modelos celulares diferentes que tienen en común un aumento de las especies oxidantes para evaluar el impacto de la actividad aconitasa o de la inactivación de la misma en el metabolismo mitocondrial y en el flujo de citrato hacia el citosol.

5.4.1. La ACO2 en un modelo de senescencia celular inducida por el oncogén RAS

La senescencia celular es un estado celular permanente inducido por diversos estímulos estresantes que involucra la detención del ciclo celular (revisado en[154]). Este proceso fue descrito en primer lugar por Leonard Hayflick en su estudio sobre el crecimiento de fibroblastos humanos *in vitro*, donde se observó que, entre los 40 y 60 ciclos de replicación, las células presentan una disminución en el potencial proliferativo, llegando a la detención total (senescencia replicativa). Se ha postulado que esto es causado por el acortamiento de los telómeros en cada ciclo de división. Otros estímulos que pueden llevar a las células al estado de senescencia incluyen el daño al ADN, la activación de oncogenes, el estrés oxidativo, la quimioterapia y la disfunción mitocondrial, entre otros[154].

Además, estas células suelen presentar: activación de las vías de respuesta al daño en el ADN, alteraciones morfológicas (mayor tamaño y forma irregular), integridad nuclear comprometida, aumento de contenido lisosomal (el cual permite detectar estas células mediante el ensayo de la β -galactosidasa), mitocondrias grandes y disfuncionales que producen niveles elevados de ROS, entre otras características[155].

La proteasa mitocondrial Lon es crucial para mantener la funcionalidad mitocondrial y su deficiencia se asocia con un incremento de proteínas carboniladas en modelos de envejecimiento, una de las cuales es la ACO2[135]. Por otra parte, en una línea de fibroblastos pulmonares humanos en los que se alcanza la senescencia por replicación celular, se observa un aumento marcado de carbonilos

proteicos acompañándose de una disminución significativa en la expresión de la proteasa Lon en la mitocondria y la falta de inducción de esta proteasa frente a estímulos oxidativos a diferencia de lo que ocurre con cultivos celulares jóvenes[134]. Además, los cambios metabólicos que ocurren en células senescentes están relacionados con cambios en el metabolismo lipídico, y podrían llevar a una modificación de los patrones de acetilación proteico de los distintos compartimentos celulares[155]. El modelo celular de senescencia parece ser indicado para estudiar las modificaciones de la ACO2 y las consecuencias funcionales que de ellas se originan.

En esta parte del proyecto se colaboró con el grupo de la Dra. Celia Quijano y la Dra. Inés Marmisolle, quienes poseen amplia trayectoria en el estudio de la senescencia celular. Particularmente, la colaboración fue ideada a partir de que se encontraban trabajando en un modelo de senescencia celular inducido por el oncogén RAS, el cual presenta mayores niveles de oxidación de la sonda diclorofluoresceína (DCF) y menores niveles de glutatión, indicando como se muestra en la literatura[156], un aumento de los niveles intracelulares de ROS. Desde el punto de vista de la metabolómica de estas células, las mismas presentan niveles disminuidos de α -cetoglutarato y mayores niveles de succinato, malato y fumarato. La caída en α -cetoglutarato podría deberse a una disminución en la actividad de la ACO2.

El primer paso en la colaboración fue poner a punto un protocolo para lograr medir la actividad aconitasa en estas células tras la realización de un fraccionamiento subcelular. El protocolo final obtenido se encuentra presentado en la sección *Materiales y métodos*.

Posteriormente, se evaluó la actividad aconitasa en las fracciones citosólicas y mitocondrial en fibroblastos senescentes y en fibroblastos control (Figura 45) para medir las actividades correspondientes a las ACO1 y ACO2. Para esto se siguió la formación de *cis*-aconitato utilizando isocitrato como sustrato. Posterior a la medida de actividad, se adicionó fluorocitrato (inhibidor irreversible de la ACO2) para evaluar que la actividad medida efectivamente sea de la ACO1/ACO2 (Figura 45A). La diferencia entre las pendientes sin fluorocitrato y con fluorocitrato fue el valor definido como actividad aconitasa. Se determinó que la actividad de la ACO2 en la fracción mitocondrial estaba reducida en un 43% respecto al control, mientras que para la actividad aconitasa medida en el citosol no se encontraron diferencias. Estos resultados indican que la producción de $O_2^{\bullet-}$ es de origen mitocondrial.

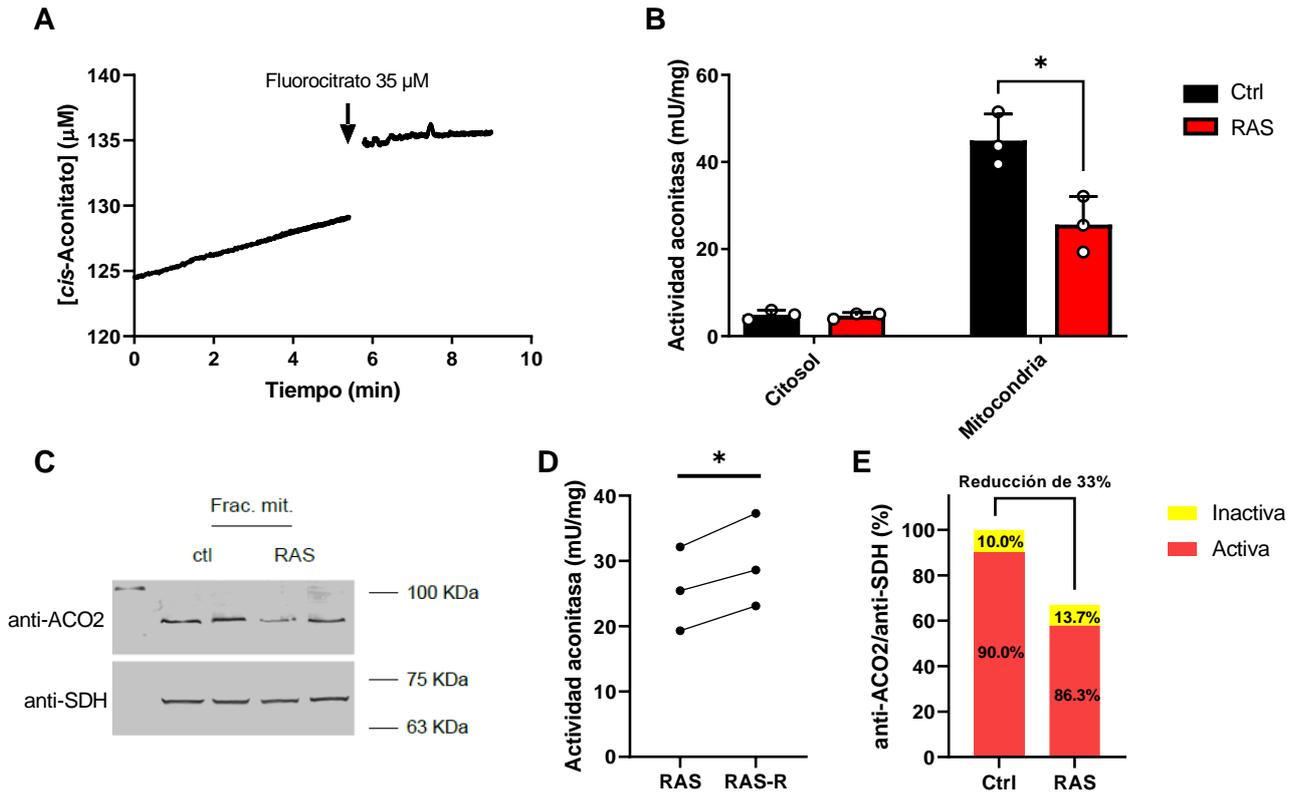


Figura 45. Evaluación de la actividad aconitasa en fibroblastos senescentes. A) La actividad aconitasa (tanto en mitocondria como en citosol) fue determinada siguiendo la formación de *cis*-aconitato a partir de isocitrato. La actividad considerada fue la diferencia entre la pendiente en ausencia y presencia de fluorocitrato 35 µM. Se muestra una medida representativa realizada en la fracción mitocondrial. B) Resultados de medida de actividad en las fracciones subcelulares de células control y RAS. Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos vías y la corrección por comparaciones múltiples se realizó por el método de Sidak. **p* = 0.0015. C) Western blot realizado para evaluar los niveles de ACO2 en mitocondrias. D) Las fracciones mitocondriales fueron incubadas en un vial anaeróbico bajo atmósfera de argón durante 30 minutos en presencia de DTT 10 mM y Fe²⁺ 100 µM. La consistencia de proporción reactivada fue evaluada mediante una prueba *t* para datos pareados (*ratio paired t test*). El promedio de recuperación de actividad fue de (16 ± 1)%. **p* = 0.0144. E) Proporciones de ACO2 activa e inactiva relativas al nivel de proteína.

Por otra parte, la determinación de los niveles proteicos de ACO2, mostró una reducción de 33% en las células RAS en comparación al control (Figura 45C). Esto podría explicarse porque la ACO2 modificada oxidativamente es sustrato de la proteasa mitocondrial Lon[135].

Debido a la reacción selectiva del O₂^{•-} con la [4Fe-4S]²⁺-ACO2, la razón entre las concentraciones de ACO2 inactiva y activa se puede utilizar como una forma indirecta de cuantificar el O₂^{•-} en estado estacionario en células y mitocondrias[20]. La razón de los niveles de O₂^{•-} entre las células RAS y controles, puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{[O_2^{\bullet-}]_{RAS}}{[O_2^{\bullet-}]_{Ctrl}} = \frac{\left(\frac{[3Fe-4S]^+-ACO2}{[4Fe-4S]^{2+}-ACO2}\right)_{RAS}}{\left(\frac{[3Fe-4S]^+-ACO2}{[4Fe-4S]^{2+}-ACO2}\right)_{Ctrl}}$$

Además, tanto los reportes de nuestro grupo como los reportes de la literatura, indican que la constantes de reacción de segundo orden entre la ACO₂ y el O₂^{•-} (k_2), se encuentra en el rango de 0.8×10^7 a $2.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [20]. Esto permite calcular la concentración absoluta de O₂^{•-} en estado estacionario utilizando la siguiente ecuación:

$$k_2[\text{O}_2^{\bullet-}][[4\text{Fe-4S}]^{2+}\text{-ACO}_2] = k[[3\text{Fe} - 4\text{S}]^+\text{-ACO}_2],$$

donde la k representa la constante de pseudoprimer orden para la reactivación. Al no contar con esta constante para este tipo celular en particular, se puede utilizar el valor reportado para células A549 de carcinoma de pulmón humano ($k = 0.0014 \text{ s}^{-1}$ [142]).

Considerando la reactivación de la ACO₂ en células senescentes (Figura 45D), y tomando que en las células control se puede utilizar el valor reportado en bibliografía para células de mamífero (10% de ACO₂ inactiva)[20], y al aplicar la ecuación antes mencionada, se puede estimar un incremento de $(40 \pm 20)\%$ en la producción de O₂^{•-} en estado estacionario. De acuerdo con estos resultados, los niveles intracelulares de oxidantes, determinados midiendo la oxidación de clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (CM-H₂DCF) a la sonda fluorescente clorometil-2',7' diclorofluoresceína (CM-DCF), se incrementó en promedio 2 veces (no mostrado, Marmisolle, I, trabajo en revisión).

5.4.2. Estudio de la ACO₂ en el proceso de capacitación espermática

La capacitación de la célula espermática en mamíferos es un proceso crítico que ocurre en el tracto reproductivo femenino, involucrando cambios bioquímicos, morfológicos y del patrón de motilidad (movimiento), que permite a estas células adquirir la capacidad de fertilizar un ovocito[157,158]. Aunque es un campo que ha sido estudiado ampliamente, todavía no hay conclusiones definitivas sobre los mecanismos bioquímicos de este proceso. Se ha prestado especial atención al papel de las mitocondrias en la capacitación, ya que el aumento de la función mitocondrial contribuye a la hiperactivación espermática (cambios en los patrones de motilidad) y la fertilización[119,159,160]. Las mitocondrias también son importantes en la producción de energía y el metabolismo del calcio, pero también pueden generar ROS que, en exceso, pueden dañar los espermatozoides y contribuir a la infertilidad masculina[161], sin embargo, su contribución en condiciones normales y patológicas aún es controversial ya que hay reportes contradictorios.

Este trabajo se desarrolló en colaboración con el grupo de las Dras. Rossana Sapiro y Adriana Cassina, y forma parte del proyecto de Doctorado de la Ing. Pilar Irigoyen. Mediante el análisis de muestras de donantes normozoospermicos (sin alteraciones que indiquen problemas de calidad espermática o infertilidad masculina), determinaron que los espermatozoides capacitados (CAP) presentan un mayor índice de control respiratorio (*respiratory control ratio*, RCR: respiración máxima/ fuga de protones (*proton leak*)[118,162]) respecto a los no capacitados (NC), siendo esto indicativo de una actividad mitocondrial incrementada. Adicionalmente, las células CAP exhiben mayor consumo de oxígeno en presencia de antimicina A (AA), compuesto que inhibe el flujo de electrones del complejo III a nivel del ciclo de la coenzima Q, favoreciendo la formación de $O_2^{\bullet-}$. Además, los espermatozoides CAP producen 3 veces más H_2O_2 extracelular en comparación a los NC, sin embargo, esto no conlleva un aumento en el daño oxidativo observable mediante un anticuerpo anti-4-hidroxinonenal (HNE) (marcador de peroxidación lipídica) ni por la caída de actividad de la SDH.

Nuestra participación en el trabajo fue con el objetivo de determinar si el H_2O_2 formado tenía como fuente el $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial. Para esto, utilizamos un método similar al utilizado en el modelo de senescencia celular presentado en la sección anterior.

En primera instancia, fue necesario poner a punto un protocolo para poder medir la actividad aconitasa en estas células. A diferencia de lo realizado en el modelo de senescencia celular, aquí se optó por no realizar el fraccionamiento subcelular ya que 1) del total de actividad aconitasa en el lisado celular total, la actividad específica correspondiente a la ACO1 es menor (Figura 45B, modelo de senescencia celular), y 2) en particular, los espermatozoides tienen muy poco citosol, por lo que resulta razonable asumir que el total de actividad aconitasa en estas células corresponda a la ACO2.

Para lograr la lisis y medida de actividad aconitasa en estas células se probaron distintos protocolos y técnicas (Figura 46).

Aconitasa en el espermatozoide

Puesta a punto del protocolo

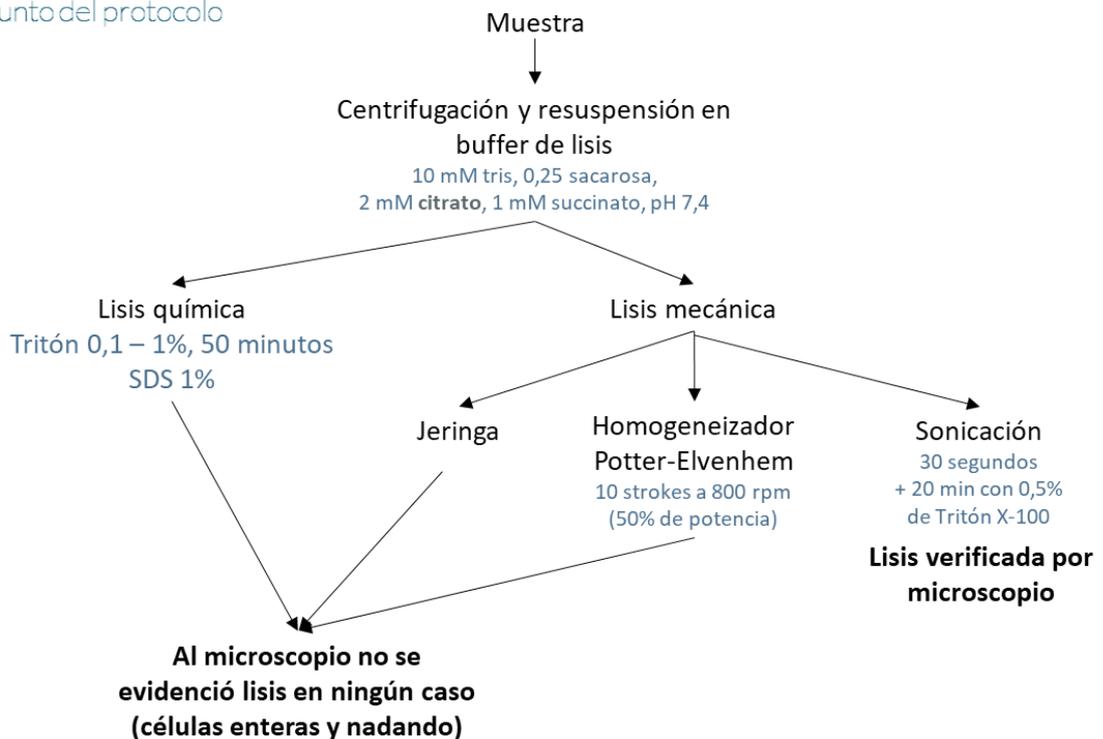


Figura 46. Técnicas utilizadas para lograr la lisis y medida de actividad aconitasa en células espermáticas.

Para nuestra sorpresa, ni la lisis química, la lisis con jeringa o la homogenización con un Potter-Elvenhem fueron capaces de lisar las células, y solamente fue posible detectar actividad aconitasa cuando las células fueron lisadas por sonicación y posteriormente incubadas con Tritón X-100 0.5% durante 20 min (Figura 47A). La lisis en todos estos casos fue verificada por microscopía.

Una vez lograda la lisis, se realizaron diversos controles para verificar las propiedades del protocolo. Primeramente, se comprobó que, entre distintos donantes, al utilizar un mismo número de células, se detectaba una actividad similar (Figura 47B). Posterior a esto, se estudió la relación entre la actividad ACO₂ y el número de células con el objetivo de identificar un rango donde esta relación sea lineal y poder tomar decisiones dependiendo del número de células obtenidas de cada donante (Figura 47C-D). En el rango explorado de 2 a 14.5 millones de células lisadas se identificó este rango lineal, por lo que todas las medidas siguientes continuaron siendo realizadas con un número de células dentro de este rango.

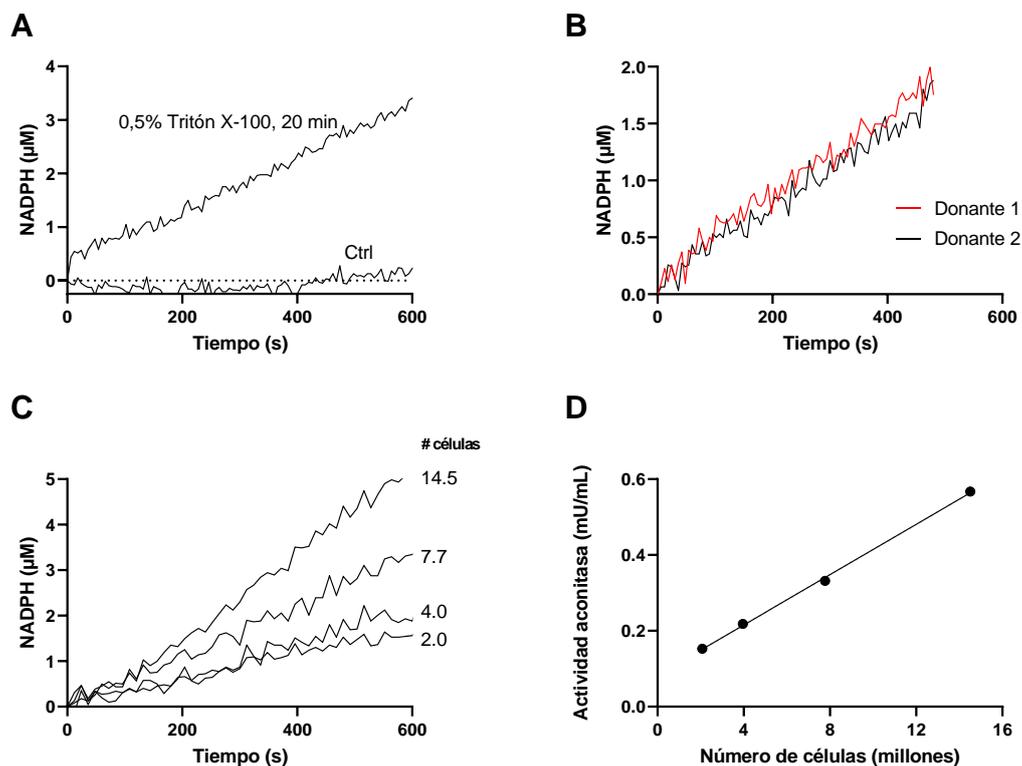


Figura 47. Puesta a punto del protocolo para medida de actividad aconitasa en células espermáticas. A) Medidas de actividad aconitasa en lisados de células espermáticas NC realizadas con el ensayo acoplado a la IDH. Se destaca la importancia de la incubación con tritón 0.5% en el protocolo de lisis de espermatozoides (7 millones de células). B) Comparación de lisados de dos donantes diferentes con igual número de espermatozoides (4.4 millones de células). C) Dependencia de la actividad aconitasa respecto al número de espermatozoides. D) Pendientes del panel C graficadas en función del número de espermatozoides. La actividad aconitasa fue medida mediante un ensayo acoplado a la IDH.

A continuación, ya que el cambio en la actividad aconitasa puede deberse a una disminución de la fracción de ACO₂ activa, o a una disminución en los niveles de la proteína (Figura 48A), realizamos la cuantificación de la ACO₂ en los donantes mediante western blot. Aquí se observó por western blot que los espermatozoides CAP presentan en promedio un 65% menos de ACO₂ respecto a los NC (Figura 48B,C), mientras que la actividad ACO₂ solo se reduce en un 24% (Figura 48D). Por otra parte, la normalización de la actividad aconitasa respecto a la relación anti-ACO₂/anti-TUB no presentó cambios significativos entre espermatozoides CAP y NC (Figura 48E), lo que implicaría que la ACO₂ que se logra medir posee el mismo nivel de actividad en ambas condiciones (no parecen haber modificaciones postraduccionales que modifiquen su actividad).

Ya que al medir actividad aconitasa en las células logramos medir solamente la fracción de ACO₂ activa y no la actividad de la ACO₂ total, realizamos la incubación de los lisados de células NC y CAP con Fe²⁺ y DTT en anaerobiosis tal como se realizó para la ACO₂ aislada. Tras esto, se observaron incrementos de la actividad de la ACO₂ de en promedio un 71% y 140% respectivamente (Figura

48F,G). A diferencia del modelo de senescencia celular, donde se estimó un 10% de ACO2 inactiva en células control, aquí usamos el valor obtenido experimentalmente debido a que la cantidad de muestras obtenidas fue suficiente.

A partir de estos datos, fue posible calcular para cada donante la fracción de ACO2 activa e inactiva. Los promedios observados se encuentran representados en la Figura 48H.

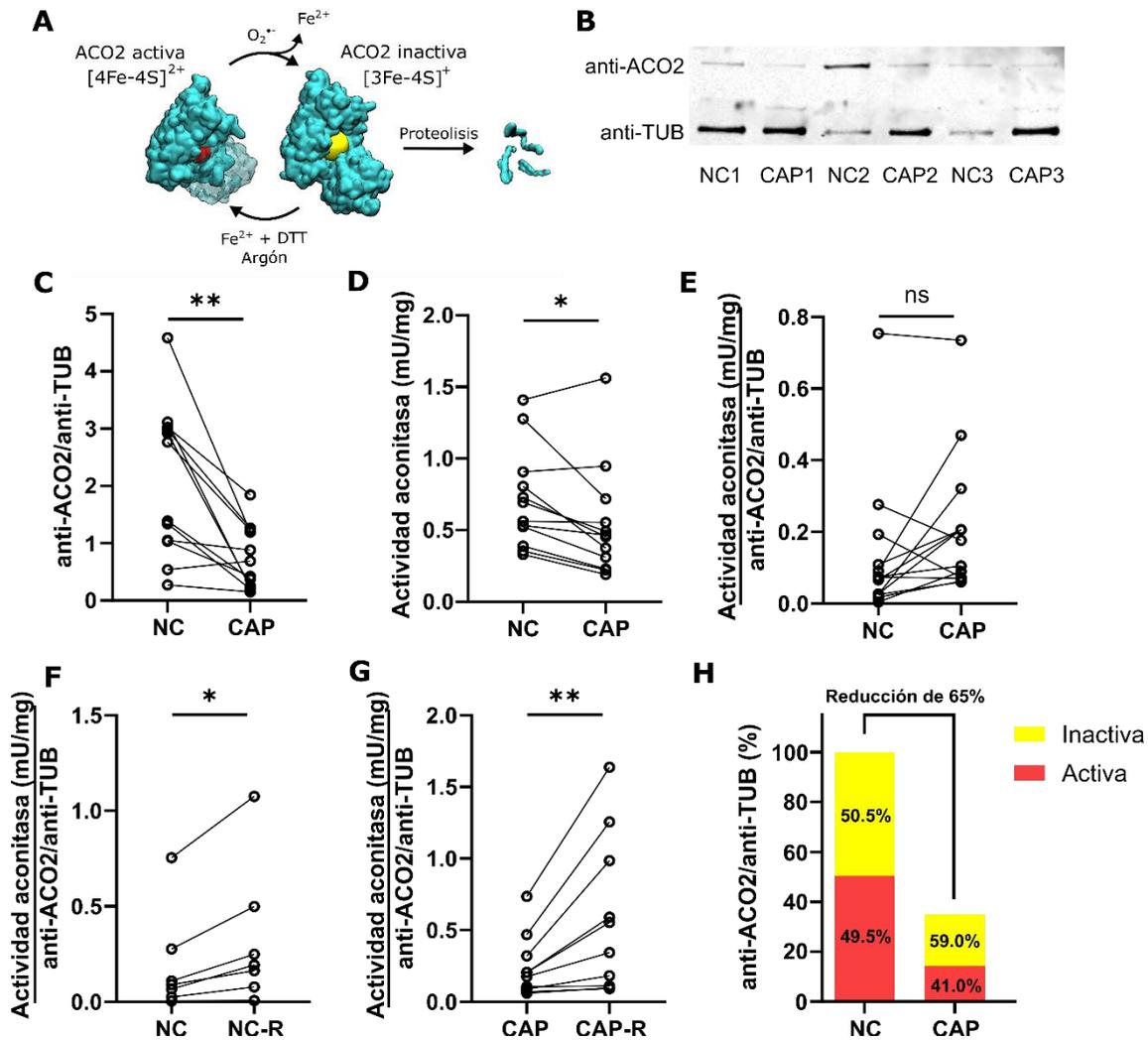


Figura 48. Inactivación de la ACO2 en el proceso de capacitación espermática. A) La [4Fe-4S]²⁺-ACO2 reacciona rápidamente con superóxido, lo que la lleva al estado ACO2-[3Fe-4S]⁺ inactivo. En presencia de Fe²⁺ y DTT bajo flujo de argón, se puede recuperar la actividad completa. La ACO2 oxidada (entre otras modificaciones) es un blanco de la proteasa mitocondrial Lon. B, C) Cuantificación de la ACO2 en células espermáticas determinadas mediante western blot. Se utilizó la tubulina como control de carga. D) La actividad aconitasa en lisados de muestras de espermatozoides se midió mediante el ensayo acoplado utilizando IDH. E) Actividad de aconitasa normalizada respecto a la cuantificación de la ACO2. F, G) Actividad aconitasa normalizada de células espermáticas NC y CAP antes y después de la incubación con 100 μM de Fe²⁺ y 10 mM de DTT bajo flujo de argón durante 30 min. R: Reactivado. H) Proporciones de ACO2 activa e inactiva en relación con los niveles de proteína de ACO2. ns = p > 0.050, *p < 0.05, **p < 0.01.

Ya que en estas células se observó un aumento en el RCR y una disminución en la actividad ACO2, nos propusimos estudiar el rol de la ACO2 en el flujo metabólico del ciclo de Krebs y la cadena

respiratoria, como nuestro grupo ya ha estudiado anteriormente para distintos tejidos de rata[60]. El fluorocitrato fue utilizado para realizar una titulación y así evaluar el control ejercido por la ACO2 en la respiración celular. La respiración controlada por la ACO2 fue evaluada utilizando citrato y ADP como sustratos (Figura 49A), y posteriormente titulando con fluorocitrato hasta observar inhibición. La especificidad de la inhibición se confirmó recuperando la respiración por agregado de isocitrato. Debido a limitaciones con el número de donantes y cantidad de muestra necesaria para realizar los ensayos no pudimos llevar a cabo una titulación completa de fluorocitrato para obtener un umbral exacto de inhibición y los coeficientes de control ejercidos por ACO2 en células espermáticas, como se hizo anteriormente para mitocondrias de rata[60]. Sin embargo, la Figura 49C muestra que el IC₅₀ para la inhibición de la ACO2 por fluorocitrato podría determinarse en lisados de células no capacitadas y es de 5.3 μM, similar a lo reportado para diferentes tejidos de rata. Como se muestra en la Figura 49B, el consumo de oxígeno de las células no capacitadas disminuye solo en promedio un 42 ± 2% cuando ACO2 está inactivada en un 90% a la misma concentración de fluorocitrato (22.5 μM).

En conjunto, estos experimentos descartan el papel de la ACO2 ejerciendo control del flujo sobre la respiración en células espermáticas humanas, similar a lo observado en tejidos como hígado o riñón de rata y contrastando con otros tejidos como cerebro y corazón, donde bajos niveles de inhibición de la ACO2 impacta significativamente en el flujo de electrones del ciclo de Krebs y la respiración mitocondrial[60].

Como se mencionó en la Introducción, se ha reportado que la sialilación de la asparagina 612 de la ACO2, por lo menos en ratones, es el posible mecanismo detrás del *switch* que realizan los espermatozoides de un metabolismo dependiente de la fosforilación oxidativa a uno glucolítico durante la capacitación. Hasta ahora, esto no ha sido reportado en humanos ni en ningún otro tipo celular. En dicho reporte, la actividad de la ACO2 se ve disminuida aproximadamente en un 20%. Extrapolando estos resultados, si la inhibición de la ACO2 fuera de esa magnitud en humanos, no se apreciaría una modificación, por lo menos en lo que refiere a la función mitocondrial. La profundización de la caracterización de las modificaciones postraduccionales en la ACO2 humana será un aspecto a indagar en futuros proyectos del grupo.

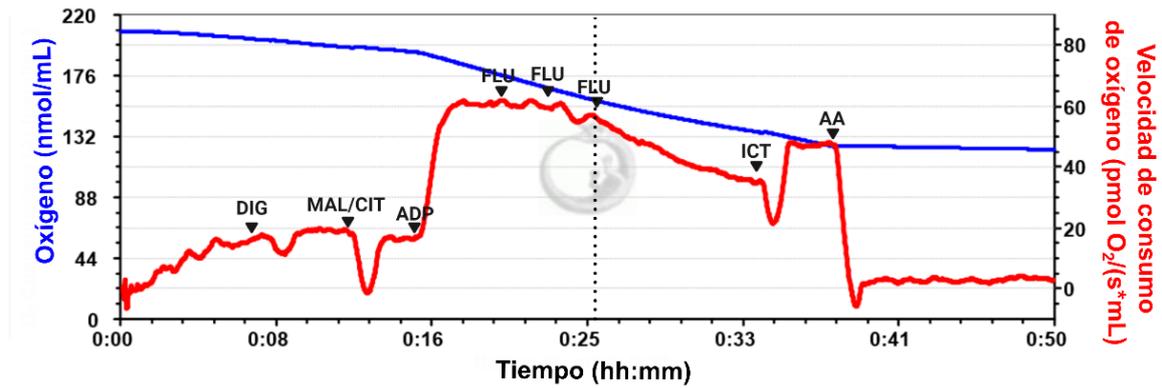
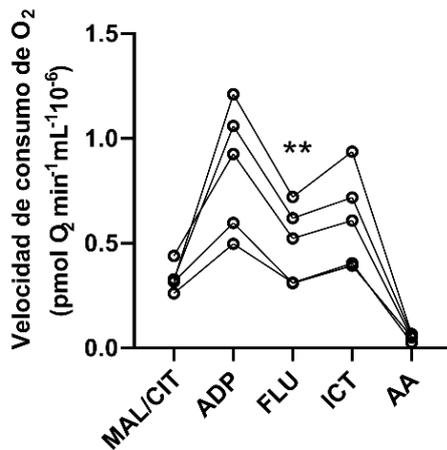
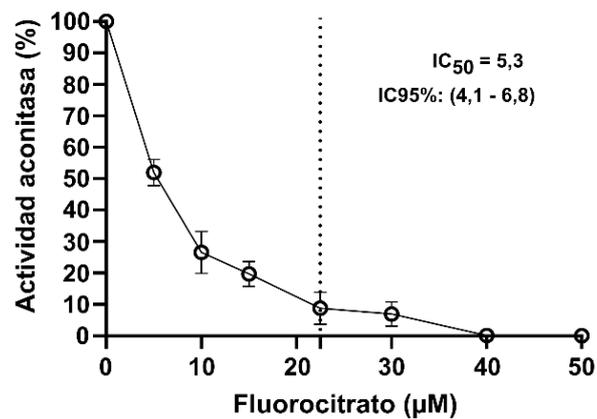
A**B****C**

Figura 49. Consumo de oxígeno mitocondrial inducido por la aconitasa en espermatozoides humanos no capacitados. A) Experimento representativo de respirometría de alta resolución en espermatozoides permeabilizados con digitonina en presencia de concentraciones crecientes de fluorocitrato. DIG = Digitonina (22.5 μM), MAL/CIT = Malato/Citrato (2 mM/10 mM), ADP = Adenosín difosfato (1.25 mM), FLU = Fluorocitrato (7.5, 15 y 22.5 μM), ICT = Isocitrato (5 mM) y AA = Antimicina A (2.5 μM). B) Disminución en el consumo de oxígeno en presencia de 22.5 μM de fluorocitrato (N = 5). C) Actividad aconitasa en células espermáticas como porcentaje del control en diferentes concentraciones de fluorocitrato. IC₅₀ = concentración de fluorocitrato necesaria para reducir la actividad de la aconitasa en un 50% (N = 3). Los resultados se expresan como media ± SEM. Se utilizó una prueba de Mann-Whitney pareada para evaluar la significación estadística entre ADP vs. FLU y FLU vs. ICT. **p < 0.01.

6. Conclusiones

Este trabajo describió por primera vez la expresión, purificación y caracterización de la ACO2 humana, incluyendo sus parámetros cinéticos, las constantes de reacción de segundo orden con oxidantes de relevancia biológica y su dinámica estructural mediante estudios *in silico*, validando resultados previos inferidos para la ACO2 humana a partir de homólogos de otras especies. En la Figura 50 se resumen estos y algunos más de los principales hallazgos presentados en este trabajo.

Caracterización y regulación redox de la ACO2 humana

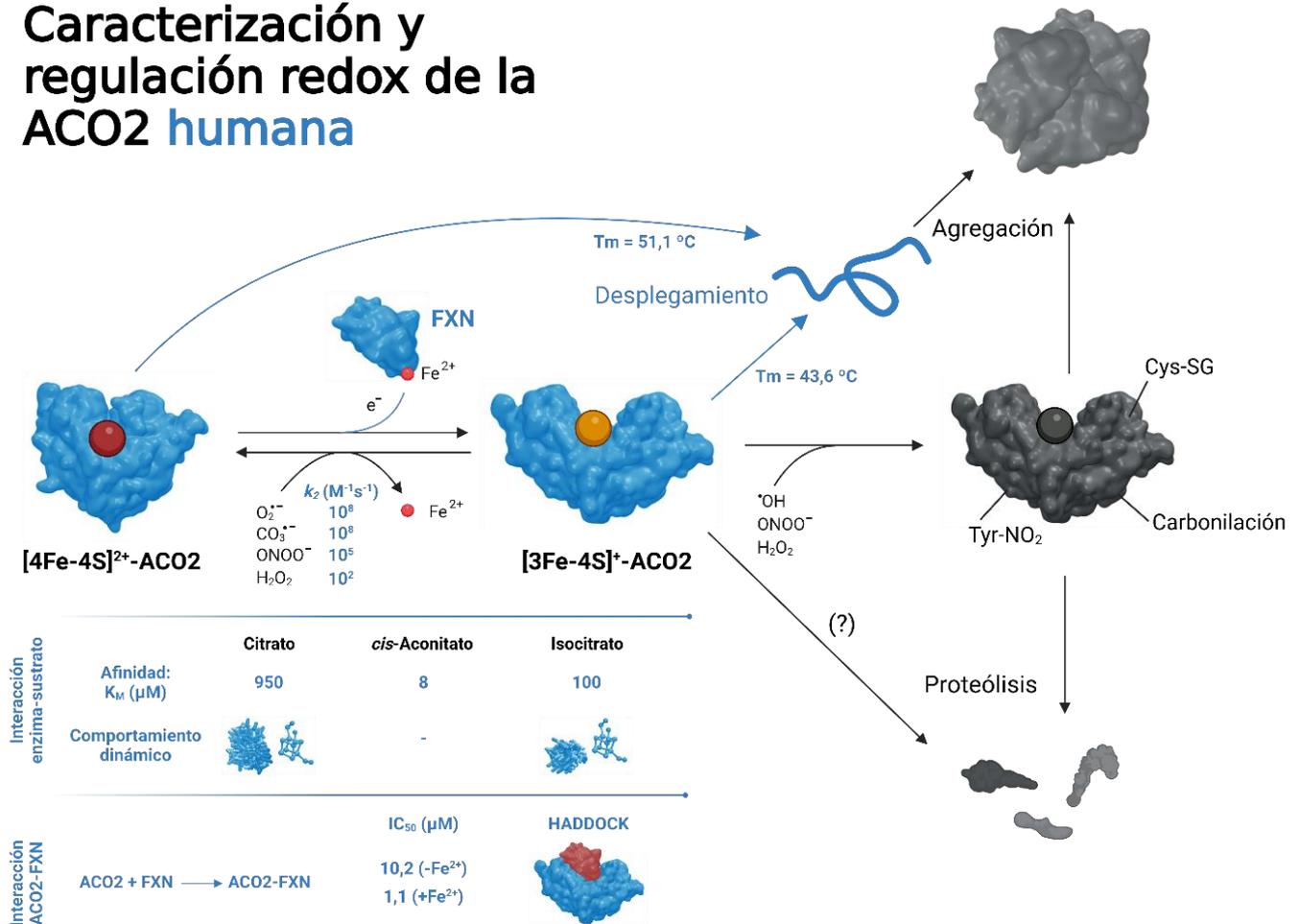


Figura 50. Caracterización y regulación redox de la ACO2 humana. En negro, hallazgos previos sobre la ACO2 realizados por nuestro grupo de investigación u otros. En azul, hallazgos realizados durante el desarrollo de esta tesis. La ACO2 puede ser inactivada por ROS y RNS. En este trabajo se determinaron las constantes de reacción entre la ACO2 humana y algunos de estos oxidantes de relevancia biológica. Se caracterizaron además las diferencias estructurales y dinámicas entre la [4Fe-4S]²⁺-ACO2 y la [3Fe-4S]⁺-ACO2, incluyendo el cambio en el nivel de apertura de la ACO2, la exposición del centro Fe-S y el cambio en las T_m de desplegamiento. Se determinaron los parámetros cinéticos de la ACO2 y se asociaron con la afinidad por sus sustratos. Finalmente, se presentó evidencia que respalda la existencia de una interacción entre la ACO2 y la FXN, promoviendo esta última la reactivación de la ACO2 inactivada oxidativamente. Esta interacción fue Fe²⁺-dependiente y además se sustentó la viabilidad del complejo ACO2-FXN mediante modelos de predicción de complejos (AF2) y *docking* (HADDOCK).

Numerosas técnicas espectroscópicas como la espectrofotometría, el dicroísmo circular y la fluorescencia, fueron utilizadas para revelar diferencias estructurales entre la $[3\text{Fe-4S}]^+-\text{ACO2}$ y la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}-\text{ACO2}$, incluyendo, para la primera, una mayor susceptibilidad al desplegamiento térmico y una mayor exposición de regiones hidrofóbicas. Esto junto a los estudios de DM comparativa entre los dos estados de la ACO2, indicaron que la $[3\text{Fe-4S}]^+-\text{ACO2}$ alcanza una conformación principalmente más abierta, con mayor exposición del centro Fe-S inactivo, lo que permitiría el acercamiento de un *partner* proteico que colabore con su reactivación.

Además, se presentó numerosa evidencia que sustenta el rol de la FXN como ese *partner* proteico. El modelado del complejo ACO2:FXN y el *docking* proteína-proteína proponen un complejo donde la región de unión a iones metálicos de la FXN se acerca al clúster $[3\text{Fe-4S}]^+$ a distancias que hacen viable la transferencia del Fe^{2+} para permitir la reactivación de la ACO2. Estas predicciones fueron sustentadas experimentalmente mediante técnicas de espectrofotometría, anisotropía de fluorescencia, ELISA de interacción proteína-proteína y ensayos de reactivación de la $[3\text{Fe-4S}]^+-\text{ACO2}$, mostrando la viabilidad de este complejo en condiciones apropiadas y de forma favorecida por la presencia de Fe^{2+} . Este trabajo confirmó que la FXN es capaz de promover la actividad ACO2 no solo durante la maduración de los centros Fe-S, sino también mediante la reactivación de la ACO2 oxidada.

Por otra parte, se logró estimar el aumento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ al utilizar la medida de actividad de la ACO2 en dos contextos celulares: 1) el modelo de senescencia celular inducida por el oncogén RAS (Figura 51) y 2) células espermáticas transcurriendo el proceso de capacitación espermática (Figura 52). En ambos modelos, había sido reportado previamente un incremento de la producción de ROS, y la aplicación del método de medida de la actividad de la ACO2 permitió una estimación directa del nivel de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mitocondrial.

En condiciones normales, en la mayoría de los tejidos de mamífero, la ACO2 se encuentra en equilibrio entre su forma $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ activa y su forma $[3\text{Fe-4S}]^+$ inactiva, en una relación de 9:1. La oxidación de la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}-\text{ACO2}$ lleva a la pérdida del Fe_α esencial para la catálisis, pero este proceso puede ser revertido ante el agregado de Fe^{2+} y la presencia de un agente reductor. Sólida evidencia obtenida en este trabajo indica que el Fe^{2+} es capaz de ser donado por la FXN, proteína capaz de funcionar como chaperona de hierro. En condiciones de estrés oxidativo, otros aminoácidos de la ACO2 pueden ser oxidados llevando a la ACO2 a un estado sobreoxidado donde la misma se vuelve un potencial blanco de la Lon proteasa, lo que la lleva a la degradación. Alternativamente, la inestabilidad de la ACO2 inactiva y oxidada puede llevarla a un estado agregado.

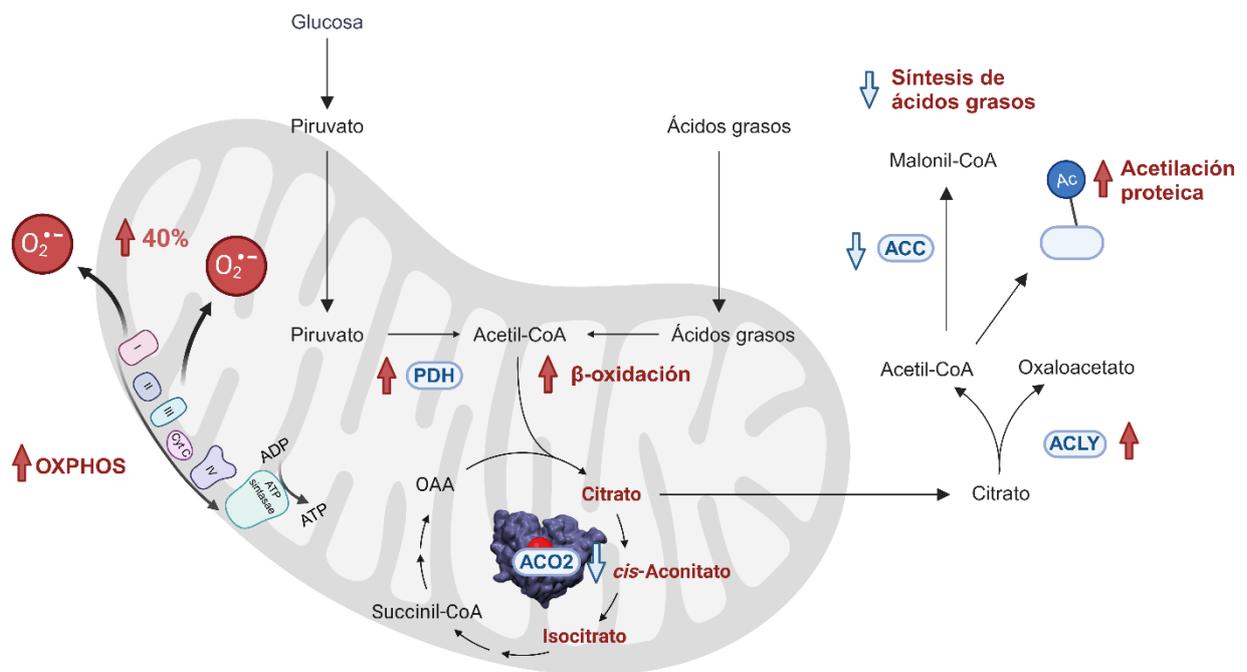


Figura 51. Rol de la ACO2 en el metabolismo energético de la célula con senescencia inducida por el oncogén RAS. La oxidación de glucosa y ácidos grasos se encuentra aumentada en este modelo, resultando en la formación de acetil-CoA. El acetil-CoA, se condensa con oxalacetato formando citrato (sustrato de la ACO2), que puede ser oxidado en el ciclo de Krebs o exportado al citosol y regenerando el acetil-CoA. Dado que la síntesis de lípidos está inhibida en estas células, el acetil-CoA puede redirigirse y participar en otras reacciones, como la acetilación de lisinas en proteínas. Las enzimas y las vías donde se encontró evidencia de un aumento de la actividad se muestran con una flecha roja, y aquellas donde se detectó una menor actividad se indican con una flecha azul. Adicionalmente estas células presentaron una mayor producción de superóxido mitocondrial ($40 \pm 20\%$), lo cual fue revelado por el método de la ACO2. ACC: acetil-CoA carboxilasa; ACLY: ATP-citrato liasa; PDH: complejo piruvato deshidrogenasa.

No capacitado

Capacitado

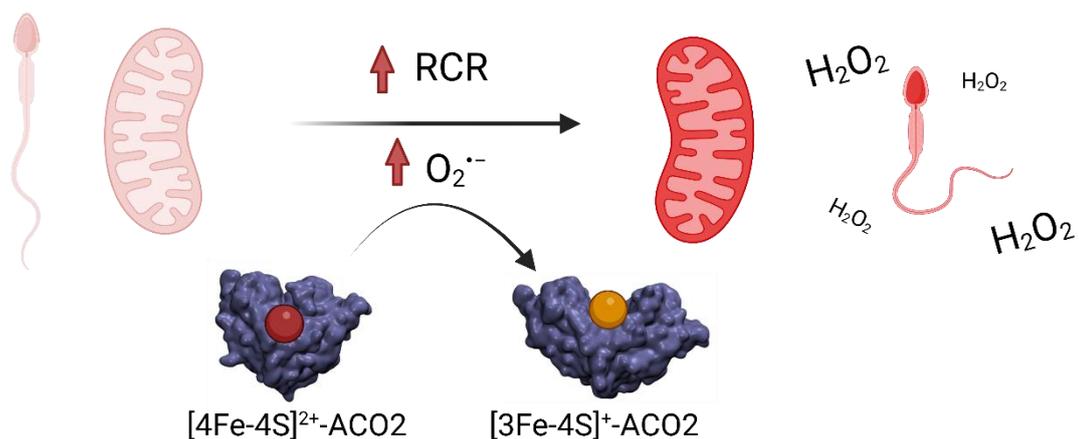


Figura 52. Metabolismo oxidativo mitocondrial en la capacitación espermática. Durante la capacitación espermática en humanos, la función mitocondrial aumenta, acompañada de una producción de H_2O_2 extracelular tres veces mayor. La hiperactivación y la reacción acrosómica ocurren sin que haya signos de daño por estrés oxidativo en los espermatozoides. La mitocondria aporta al H_2O_2 detectado en el medio extracelular, ya que la misma produce $O_2^{\bullet-}$, el cuál fue cuantificado mediante el método de la ACO2. Los datos indican que el aumento en la función mitocondrial juega un papel en la generación de este radical, contribuyendo en la modulación de la capacitación espermática

7. Agradecimientos y financiación

A la Lucía Turell, Mariana Bonilla y Matías Machado, por su tiempo en la evaluación de este trabajo y por comentarios constructivos que contribuyeron a la versión final de esta tesis.

A María Laura Chiribao y Carlos Robello, por la colaboración que permitió la puesta a punto del sistema de expresión para la ACO₂ humana recombinante.

A Mauricio Mastrogiovanni, por la colaboración con los experimentos realizados utilizando espectrometría de masas.

A Javier Santos, Ignacio Castro y Florencia Pignataro, por la colaboración con todo lo referido a los experimentos que involucraron a la FXN.

A Rosario Durán, por la colaboración en las primeras aproximaciones en la determinación de los sitios de acetilación de la ACO₂.

A Ari Zeida y Santiago Sastre, por la asistencia en la realización y análisis de todo lo que implicó técnicas de modelado molecular.

A Verónica Demicheli, por brindar el control positivo para la actividad de la SIRT3 humana recombinante.

A mi hermana, Noelia Mansilla, por la realización de la corrección de texto de este documento.

Al CEINBIO, su director, el Prof. Radi, y todos los integrantes del mismo, por la generación de la infraestructura y el ambiente colaborativo donde se desarrollaron la mayoría de las actividades de esta tesis. Por las discusiones con mis compañeros y colegas en las reuniones de laboratorios y simposios.

Al Área Biología de PEDECIBA, por el apoyo en la investigación, tanto desde el punto de vista económico (becas, alícuotas) como administrativo.

A la Comisión Académica de Posgrado, por el apoyo otorgado mediante las becas otorgadas, que hicieron posible la realización de este trabajo.

A CSIC por el apoyo económico brindado para la realización de los proyectos y actividades en los que esta tesis estuvo involucrada (CSIC I + D 2020, ID23; CSIC grupos 767).

Parte de los resultados presentados en este trabajo fueron realizados utilizando ClusterUY (sitio: <https://cluster.uy>).

8. Referencias bibliográficas

- [1] H.A. Krebs, The equilibrium constants of the fumarase and aconitase systems., *Biochem. J.* 54 (1953) 78–82. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1268849&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [2] J.P. Glusker, Aconitase, in: Paul D. Boyer (Ed.), *Enzym., The Enzymes*, Academic Press, 1971: pp. 413–439. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60097-9](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60097-9).
- [3] A.H. Robbins, C.D. Stout, The structure of aconitase, *Proteins.* 5 (1989) 289–312. <https://doi.org/10.1002/prot.340050406>.
- [4] H. Beinert, M.C. Kennedy, C.D. Stout, Aconitase as Iron–Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2335–2374. <https://doi.org/10.1021/cr950040z>.
- [5] L. Castro, V. Tórtora, S. Mansilla, R. Radi, Aconitases: Non-redox Iron-Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species, *Acc. Chem. Res.* 52 (2019) 2609–2619. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00150>.
- [6] A. Bulteau, H.A. O’Neill, M.C. Kennedy, M. Ikeda-Saito, G. Isaya, L.I. Szwedra, Frataxin Acts as an Iron Chaperone Protein to Modulate Mitochondrial Aconitase Activity, *Science (80-.)*. 305 (2004) 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.1098991>.
- [7] S. Schmucker, A. Martelli, F. Colin, A. Page, M. Wattenhofer-Donzé, L. Reutenauer, H. Puccio, Mammalian frataxin: An essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/ NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex, *PLoS One.* 6 (2011) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016199>.
- [8] H. Beinert, M.C. Kennedy, Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor 1 2, *FASEB J.* 7 (1993) 1442–1449. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.15.8262329>.
- [9] K.B. Pechter, F.M. Meyer, A.W. Serio, J. Stülke, A.L. Sonenshein, Two roles for aconitase in the regulation of tricarboxylic acid branch gene expression in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 195 (2013) 1525–1537. <https://doi.org/10.1128/JB.01690-12>.
- [10] W.H. Tong, T.A. Rouault, Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: Role of iron-sulfur cluster biogenesis, *BioMetals.* 20 (2007) 549–564. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9047-6>.
- [11] M.C. Kennedy, L. Mende-Mueller, G.A. Blondin, H. Beinert, Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1993).
- [12] M.P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species., *Biochem. J.* 417 (2009) 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- [13] M.D. Brand, Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling., *Free Radic. Biol. Med.* 100 (2016) 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>.
- [14] R.L.S. Goncalves, V.I. Bunik, M.D. Brand, Production of superoxide/hydrogen peroxide by the mitochondrial 2-oxoadipate dehydrogenase complex., *Free Radic. Biol. Med.* 91 (2016) 247–55. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.020>.
- [15] C.L. Quinlan, R.L.S. Goncalves, M. Hey-Mogensen, N. Yadava, V.I. Bunik, M.D. Brand, The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen

peroxide at much higher rates than complex I., *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 8312–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545301>.

- [16] C.L. Quinlan, I. V Perevoshchikova, M. Hey-Mogensen, A.L. Orr, M.D. Brand, Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates., *Redox Biol.* 1 (2013) 304–12. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.005>.
- [17] D.H. Flint, J.F. Tuminello, M.H. Emptage, The inactivation of Fe-S cluster containing hydrolyases by superoxide., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 22369–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226748>.
- [18] P.R. Gardner, I. Fridovich, I. Fridovichs, Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19328–19333. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)55001-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)55001-8).
- [19] P.R. Gardner, I. Fridovich, Inactivation-reeactivation of aconitase in Escherichia coli. A sensitive measure of superoxide radical, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 8757–8763. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50343-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50343-x).
- [20] P.P.R.P. Gardner, Aconitase: Sensitive target and measure of superoxide, *Methods Enzymol.* 349 (2002) 9–23. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)49317-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)49317-2).
- [21] C. Quijano, L. Castro, G. Peluffo, V. Valez, R. Radi, Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (2007) H3404-14. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00761.2007>.
- [22] L. Castro, M. Rodriguez, R. Radi, Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 29409–29415.
- [23] L. a Castro, R.L. Robalinho, a Cayota, R. Meneghini, R. Radi, Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts., *Arch. Biochem. Biophys.* 359 (1998) 215–24. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0898>.
- [24] K.S. Aulak, M. Miyagi, L. Yan, K.A. West, D. Massillon, J.W. Crabb, D.J. Stuehr, Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 12056–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.221269198>.
- [25] K.S. Aulak, T. Koeck, J.W. Crabb, D.J. Stuehr, Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286 (2004) H30-8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00743.2003>.
- [26] F. Casoni, M. Basso, T. Massignan, E. Gianazza, C. Cheroni, M. Salmona, C. Bendotti, V. Bonetto, Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16295–304. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413111200>.
- [27] V. Tórtora, C. Quijano, B. Freeman, R. Radi, L. Castro, Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation., *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 1075–88. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.007>.
- [28] M.-P. Golinelli-Cohen, C. Bouton, Fe-S Proteins Acting as Redox Switch: New Key Actors of Cellular Adaptive Responses, *Curr. Chem. Biol.* 11 (2017). <https://doi.org/10.2174/2212796811666170406163809>.
- [29] L.A.J. O'Neill, M.N. Artyomov, Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in

- macrophage function, *Nat. Rev. Immunol.* 19 (2019) 273–281. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0128-5>.
- [30] E.M. Palmieri, M. Gonzalez-Cotto, W.A. Baseler, L.C. Davies, B. Ghesquière, N. Maio, C.M. Rice, T.A. Rouault, T. Cassel, R.M. Higashi, A.N. Lane, T.W.-M. Fan, D.A. Wink, D.W. McVicar, Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase, *Nat. Commun.* 11 (2020) 698. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14433-7>.
- [31] J.C. Xin, X. Wang, B.A. Kaufman, R.A. Butow, Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance, *Science* (80-.). 307 (2005) 714–717. <https://doi.org/10.1126/science.1106391>.
- [32] X.J. Chen, X. Wang, R. a Butow, Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 13738–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703078104>.
- [33] K.L. Schalinske, O.S. Chen, R.S. Eisenstein, Iron Differentially Stimulates Translation of Mitochondrial Aconitase and Ferritin mRNAs in Mammalian Cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3740–3746. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3740>.
- [34] J.B. Goforth, S.A. Anderson, C.P. Nizzi, R.S. Eisenstein, Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy, *RNA.* 16 (2010) 154–169. <https://doi.org/10.1261/rna.1857210>.
- [35] M. Shen, J.B. Goforth, R.S. Eisenstein, Iron-dependent post transcriptional control of mitochondrial aconitase expression, *Metallomics.* 15 (2023). <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac099>.
- [36] L.-Y. Sun, Y.-Y. Lyu, H.-Y. Zhang, Z. Shen, G.-Q. Lin, N. Geng, Y.-L. Wang, L. Huang, Z.-H. Feng, X. Guo, N. Lin, S. Ding, A.-C. Yuan, L. Zhang, K. Qian, J. Pu, Nuclear Receptor NR1D1 Regulates Abdominal Aortic Aneurysm Development by Targeting the Mitochondrial Tricarboxylic Acid Cycle Enzyme Aconitase-2, *Circulation.* 146 (2022) 1591–1609. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057623>.
- [37] D.B. Mirel, K. Marder, J. Graziano, G. Freyer, Q. Zhao, R. Mayeux, K.C. Wilhelmsen, Characterization of the human mitochondrial aconitase gene (ACO2), *Gene.* 213 (1998) 205–218.
- [38] R. Lill, R. Lill, S.A. Freibert, Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis, *Annu. Rev. Biochem.* 89 (2020) 471–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111540>.
- [39] A.H. Robbins, C.D. Stout, Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 3639–3643. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3639>.
- [40] S.J. Lloyd, H. Lauble, G.S. Prasad, C.D. Stout, The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a:citrate complex., *Protein Sci.* 8 (1999) 2655–62. <https://doi.org/10.1110/ps.8.12.2655>.
- [41] I.A. Rose, E.L. O’Connell, Mechanism of Aconitase Action, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 1870–1879. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96082-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96082-5).
- [42] T. Bilbrough, E. Piemontese, O. Seitz, Dissecting the role of protein phosphorylation: a chemical biology toolbox, *Chem. Soc. Rev.* 51 (2022) 5691–5730.

<https://doi.org/10.1039/D1CS00991E>.

- [43] V. Kotrasová, B. Keresztesová, G. Ondrovičová, J.A. Bauer, H. Havalová, V. Pevala, E. Kutejová, N. Kunová, Mitochondrial Kinases and the Role of Mitochondrial Protein Phosphorylation in Health and Disease, *Life*. 11 (2021) 82. <https://doi.org/10.3390/life11020082>.
- [44] M. Salvi, N.A. Morrice, A.M. Brunati, A. Toninello, Identification of the flavoprotein of succinate dehydrogenase and aconitase as in vitro mitochondrial substrates of Fgr tyrosine kinase, *FEBS Lett*. 581 (2007) 5579–5585. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.005>.
- [45] S. Zhang, M.E. Sandstro, J.T. Lanner, A. Thorell, A. Katz, Activation of aconitase in mouse fast-twitch skeletal muscle during contraction-mediated oxidative stress, (2007). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00110.2007>.
- [46] G. Lin, R.W. Brownsey, K.M. MacLeod, Regulation of mitochondrial aconitase by phosphorylation in diabetic rat heart, *Cell. Mol. Life Sci*. 66 (2009) 919–932. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8696-3>.
- [47] N.L. Alderson, Y. Wang, M. Blatnik, N. Frizzell, M.D. Walla, T.J. Lyons, N. Alt, J.A. Carson, R. Nagai, S.R. Thorpe, J.W. Baynes, S-(2-Succinyl)cysteine: A novel chemical modification of tissue proteins by a Krebs cycle intermediate, *Arch. Biochem. Biophys*. 450 (2006) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.03.005>.
- [48] N. Ternette, M. Yang, M. Laroyia, M. Kitagawa, L. O’Flaherty, K. Wolhulter, K. Igarashi, K. Saito, K. Kato, R. Fischer, A. Berquand, B.M. Kessler, T. Lappin, N. Frizzell, T. Soga, J. Adam, P.J. Pollard, Inhibition of Mitochondrial Aconitase by Succination in Fumarate Hydratase Deficiency, *Cell Rep*. 3 (2013) 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.013>.
- [49] G.R. Wagner, R.M. Payne, Widespread and enzyme-independent N^ε-acetylation and N^ε-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix, *J. Biol. Chem*. 288 (2013) 29036–29045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486753>.
- [50] A. Lundby, K. Lage, B.T. Weinert, D.B. Bekker-Jensen, A. Secher, T. Skovgaard, C.D. Kelstrup, A. Dmytriiev, C. Choudhary, C. Lundby, J. V. Olsen, Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns, *Cell Rep*. 2 (2012) 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.006>.
- [51] J.L. Horton, O.J. Martin, L. Lai, N.M. Riley, A.L. Richards, R.B. Vega, T.C. Leone, D.J. Pagliarini, D.M. Muoio, K.C. Bedi, K.B. Margulies, J.J. Coon, D.P. Kelly, Mitochondrial protein hyperacetylation in the failing heart, *JCI Insight*. 1 (2016). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.84897>.
- [52] L. Yang, B. Vaitheesvaran, K. Hartil, A.J. Robinson, M.R. Hoopmann, J.K. Eng, I.J. Kurland, J.E. Bruce, The Fasted/Fed Mouse Metabolic Acetylome: N⁶-Acetylation Differences Suggest Acetylation Coordinates Organ-Specific Fuel Switching, *J. Proteome Res*. 10 (2011) 4134–4149. <https://doi.org/10.1021/pr200313x>.
- [53] J. Fernandes, A. Weddle, C.S. Kinter, K.M. Humphries, T. Mather, L.I. Szveda, M. Kinter, Lysine Acetylation Activates Mitochondrial Aconitase in the Heart., *Biochemistry*. (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00375>.
- [54] S.S. Romanick, C. Ulrich, K. Schlauch, A. Hostler, J. Payne, R. Woolsey, D. Quilici, Y. Feng, B.S. Ferguson, Obesity-mediated regulation of cardiac protein acetylation: Parallel analysis of total and acetylated protein via TMT-tagged mass spectrometry, *Biosci. Rep*. (2018) BSR20180721. <https://doi.org/10.1042/BSR20180721>.

- [55] A. Sawant Dessai, M. Palestino Dominguez, U.-I. Chen, J. Hasper, C. Prechtel, C. Yu, E. Katsuta, T. Dai, B. Zhu, S.Y. Jung, N. Putluri, K. Takabe, X.H.-F. Zhang, B.W. O'Malley, S. Dasgupta, Transcriptional repression of SIRT3 potentiates mitochondrial aconitase activation to drive aggressive prostate cancer to the bone, *Cancer Res.* (2020) canres.1708.2020. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1708>.
- [56] J. Ma, T. Liu, A.C. Wei, P. Banerjee, B. O'Rourke, G.W. Hart, O-GlcNAcomic profiling identifies widespread O-linked β -N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAcylation) in oxidative phosphorylation system regulating cardiac mitochondrial function, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 29141–29153. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691741>.
- [57] J.L. Sacoman, R.K.R.Y.R.K.R.Y. Dagda, A.R. Burnham-Marusich, R.K.R.Y.R.K.R.Y. Dagda, P.M. Berninsone, Mitochondrial O-GlcNAc Transferase (mOGT) regulates mitochondrial structure, function, and survival in HeLa cells, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 4499–4518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726752>.
- [58] C. Reily, T.J. Stewart, M.B. Renfrow, J. Novak, Glycosylation in health and disease, *Nat. Rev. Nephrol.* 15 (2019) 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>.
- [59] A.I. Silva Balbin Villaverde, R.A. Ogle, P. Lewis, V. Carbone, T. Velkov, J.K. Netherton, M.A. Baker, Sialylation of Asparagine 612 Inhibits Aconitase Activity during Mouse Sperm Capacitation; a Possible Mechanism for the Switch from Oxidative Phosphorylation to Glycolysis, *Mol. Cell. Proteomics.* 19 (2020) 1860–1875. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002109>.
- [60] F. Scandroglio, V. Tórtora, R. Radi, L. Castro, Metabolic control analysis of mitochondrial aconitase: influence over respiration and mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production., *Free Radic. Res.* 48 (2014) 684–93. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.900175>.
- [61] N. Raimundo, B.E. Baysal, G.S. Shadel, Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation, *Trends Mol. Med.* 17 (2011) 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.06.001>.
- [62] M.D. Metodiev, S. Gerber, L. Hubert, A. Delahodde, D. Chretien, X. Gérard, P. Amati-Bonneau, M.C. Giacomotto, N. Boddaert, A. Kaminska, I. Desguerre, J. Amiel, M. Rio, J. Kaplan, A. Munnich, A. Rötig, J.M. Rozet, C. Besmond, Mutations in the tricarboxylic acid cycle enzyme, aconitase 2, cause either isolated or syndromic optic neuropathy with encephalopathy and cerebellar atrophy, *J. Med. Genet.* 51 (2014) 834–838. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102532>.
- [63] P.R. Blackburn, M.J. Schultz, C.A. Lahner, D. Li, E. Bhoj, L.J. Fisher, D.L. Renaud, A. Kenney, N. Ibrahim, M. Hashem, M. Zain Seidahmed, L. Hasadsri, S.A. Schrier Vergano, F.S. Alkuraya, B.C. Lanpher, Expanding the clinical and phenotypic heterogeneity associated with biallelic variants in ACO2, *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 7 (2020) 1013–1028. <https://doi.org/10.1002/acn3.51074>.
- [64] R. Sadat, E. Barca, R. Masand, T.R. Donti, A. Naini, D.C. De Vivo, S. DiMauro, N.A. Hanchard, B.H. Graham, Functional cellular analyses reveal energy metabolism defect and mitochondrial DNA depletion in a case of mitochondrial aconitase deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 118 (2016) 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.03.004>.
- [65] C.G. Bouwkamp, Z. Afawi, A. Fattal-Valevski, I.E. Krabbendam, S. Rivetti, R. Masalha, M. Quadri, G.J. Breedveld, H. Mandel, M.A. Tailakh, H.B. Beverloo, G. Stevanin, A. Brice, W.F.J. van IJcken, M.W. Vernooij, A.M. Dolga, F.M.S. de Vrij, V. Bonifati, S.A. Kushner, ACO2 homozygous missense mutation associated with complicated hereditary spastic paraplegia,

Neurol. Genet. 4 (2018). <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000223>.

- [66] C. Marelli, C. Hamel, M. Quiles, B. Carlander, L. Larrieu, C. Delettre, E. Sarzi, D. Chretien, P. Rustin, M. Koenig, C. Guissart, ACO2 mutations: A novel phenotype associating severe optic atrophy and spastic paraplegia, *Neurol. Genet.* 4 (2018). <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000225>.
- [67] M.A.C. Neumann, D. Grossmann, S. Schimpf-Linzenbold, D. Dayan, K. Stingl, R. Ben-Menachem, O. Pines, F. Massart, S. Delcambre, J. Ghelfi, J. Bohler, T. Strom, A. Kessel, A. Azem, L. Schöls, A. Grünwald, B. Wissinger, R. Krüger, Haploinsufficiency due to a novel ACO2 deletion causes mitochondrial dysfunction in fibroblasts from a patient with dominant optic nerve atrophy, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73557-4>.
- [68] M. Charif, N. Gueguen, M. Ferré, Z. Elkarhat, S. Khiati, M. LeMao, A. Chevrollier, V. Desquiret-Dumas, D. Goudenège, C. Bris, S. Kane, J. Alban, S. Chupin, C. Wetterwald, L. Caporali, F. Tagliavini, C. LaMorgia, M. Carbonelli, N. Jurkute, A. Barakat, P. Gohier, C. Verny, M. Barth, V. Procaccio, D. Bonneau, X. Zanlonghi, I. Meunier, N. Weisschuh, S. Schimpf-Linzenbold, F. Tonagel, U. Kellner, P. Yu-Wai-Man, V. Carelli, B. Wissinger, P. Amati-Bonneau, P. Reynier, G. Lenaers, Dominant ACO2 mutations are a frequent cause of isolated optic atrophy, *Brain Commun.* 3 (2021). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab063>.
- [69] C. González-Mingot, F.J. Miana-Mena, P.J. Iñarrea, C. Iñiguez, J.L. Capablo, R. Osta, A. Gil-Sánchez, L. Brieva, P. Larrodé, Mitochondrial Aconitase Enzymatic Activity: A Potential Long-Term Survival Biomarker in the Blood of ALS Patients, *J. Clin. Med.* 12 (2023) 3560. <https://doi.org/10.3390/jcm12103560>.
- [70] A. Cook, P. Giunti, Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management, *Br. Med. Bull.* 124 (2017) 19–30. <https://doi.org/10.1093/bmb/idx034>.
- [71] N. Maio, T.A. Rouault, Iron –sulfur cluster biogenesis in mammalian cells: New insights into the molecular mechanisms of cluster delivery, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 1493–1512. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.009>.
- [72] N.G. Fox, X. Yu, X. Feng, H.J. Bailey, A. Martelli, J.F. Nabhan, C. Strain-Damerell, C. Bulawa, W.W. Yue, S. Han, Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism, *Nat. Commun.* 10 (2019) 2210. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09989-y>.
- [73] C.-L. Tsai, D.P. Barondeau, Human Frataxin Is an Allosteric Switch That Activates the Fe–S Cluster Biosynthetic Complex, *Biochemistry.* 49 (2010) 9132–9139. <https://doi.org/10.1021/bi1013062>.
- [74] J. Bridwell-Rabb, N.G. Fox, C.-L. Tsai, A.M. Winn, D.P. Barondeau, Human Frataxin Activates Fe–S Cluster Biosynthesis by Facilitating Sulfur Transfer Chemistry, *Biochemistry.* 53 (2014) 4904–4913. <https://doi.org/10.1021/bi500532e>.
- [75] M. Nair, S. Adinolfi, C. Pastore, G. Kelly, P. Temussi, A. Pastore, Solution Structure of the Bacterial Frataxin Ortholog, CyaY, *Structure.* 12 (2004) 2037–2048. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.08.012>.
- [76] K. Cai, R.O. Frederick, M. Tonelli, J.L. Markley, Interactions of iron-bound frataxin with ISCU and ferredoxin on the cysteine desulfurase complex leading to Fe-S cluster assembly., *J. Inorg. Biochem.* 183 (2018) 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.007>.
- [77] M. Bellanda, L. Maso, D. Doni, M. Bortolus, E. De Rosa, F. Lunardi, A. Alfonsi, M.E. Noguera, M.G. Herrera, J. Santos, D. Carbonera, P. Costantini, Exploring iron-binding to human frataxin

and to selected Friedreich ataxia mutants by means of NMR and EPR spectroscopies, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1867 (2019) 140254. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.07.007>.

- [78] A. Rötig, P. de Lonlay, D. Chretien, F. Foury, M. Koenig, D. Sidi, A. Munnich, P. Rustin, Aconitase and mitochondrial iron–sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia, *Nat. Genet.* 17 (1997) 215–217. <https://doi.org/10.1038/ng1097-215>.
- [79] R.A. Vaubel, G. Isaya, Iron-sulfur cluster synthesis, iron homeostasis and oxidative stress in Friedreich ataxia, *Mol. Cell. Neurosci.* 55 (2013) 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.08.003>.
- [80] S. Pérez-Luz, F. Loria, Y. Katsu-Jiménez, D. Oberdoerfer, O.-L. Yang, F. Lim, J.L. Muñoz-Blanco, J. Díaz-Nido, Altered Secretome and ROS Production in Olfactory Mucosa Stem Cells Derived from Friedreich’s Ataxia Patients, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 6662. <https://doi.org/10.3390/ijms21186662>.
- [81] F. Ciccarone, R. Vegliante, L. Di Leo, M.R. Ciriolo, The TCA cycle as a bridge between oncometabolism and DNA transactions in cancer, *Semin. Cancer Biol.* 47 (2017) 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.06.008>.
- [82] D. Jaworski, A. Kowalewski, J. Durslewicz, P. Antosik, M. Smolinska, D. Grzanka, Ł. Szyłberg, The Prognostic Role of ACO2 in Renal Cell Carcinoma, *Anticancer Res.* 43 (2023) 1503–1511. <https://doi.org/10.21873/anticancer.16299>.
- [83] P. Wang, C. Mai, Y. Wei, J. Zhao, Y. Hu, Z. Zeng, J. Yang, W. Lu, R. Xu, P. Huang, Decreased expression of the mitochondrial metabolic enzyme aconitase (ACO2) is associated with poor prognosis in gastric cancer, *Med. Oncol.* 30 (2013) 552. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0552-5>.
- [84] F. Ciccarone, L. Di Leo, G. Lazzarino, G. Maulucci, F. Di Giacinto, B. Tavazzi, M.R. Ciriolo, Aconitase 2 inhibits the proliferation of MCF-7 cells promoting mitochondrial oxidative metabolism and ROS/FoxO1-mediated autophagic response, *Br. J. Cancer.* 122 (2020) 182–193. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0641-0>.
- [85] X. You, J. Tian, H. Zhang, Y. Guo, J. Yang, C. Zhu, M. Song, P. Wang, Z. Liu, J. Cancilla, W. Lu, C. Glorieux, S. Wen, H. Du, P. Huang, Y. Hu, Loss of mitochondrial aconitase promotes colorectal cancer progression via SCD1-mediated lipid remodeling, *Mol. Metab.* 48 (2021) 101203. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101203>.
- [86] Z. Wang, W. Zheng, Z. Chen, S. Wu, H. Chang, M. Cai, H. Cai, Pan-Cancer analysis shows that ACO2 is a potential prognostic and immunotherapeutic biomarker for multiple cancer types including hepatocellular carcinoma, *Front. Oncol.* 12 (2022). <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1055376>.
- [87] M. Čuperlović-Culf, The importance of inhibitor of the simulation of metabolic processes: in silico Zn²⁺ inhibition of m-aconitase from analysis of glycolysis and Krebs Cycle kinetic models, *J. Bioinform. Comput. Biol.* 08 (2010) 703–715. <https://doi.org/10.1142/S0219720010004872>.
- [88] R.B. Franklin, L.C. Costello, The important role of the apoptotic effects of Zinc in the development of cancers, *J. Cell. Biochem.* 106 (2009) 750–757. <https://doi.org/10.1002/jcb.22049>.
- [89] K.K. Singh, M.M. Desouki, R.B. Franklin, L.C. Costello, Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues, *Mol. Cancer.* 5 (2006)

14. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-14>.

- [90] D.R. Crooks, N. Maio, A.N. Lane, M. Jarnik, R.M. Higashi, R.G. Haller, Y. Yang, T.W.M. Fan, M. Linehan, T.A. Rouault, Acute loss of iron–sulfur clusters results in metabolic reprogramming and generation of lipid droplets in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* (2018) jbc.RA118.001885. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001885>.
- [91] R. Radi, M. Rodriguez, L. Castro, R. Telleri, Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Peroxynitrite, *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1994) 89–95. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1013>.
- [92] A. Varela, C., Pikielny, R., Balbi, N., Faraj, S., Santos, J., & Ferrari, Desarrollo de un sistema de cuantificación de frataxina humana para el diagnóstico complementario y seguimiento de individuos con Ataxia de Friedreich, *Rev. Bioquímica Y Patol. Clínica.* 82 (2021) 11–21. <http://www.revistabypc.org.ar/index.php/bypc/article/view/83>.
- [93] H. Shintani, Oxygen Uptake and Spectrophotometric Measurement of Superoxide, Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radicals, *Pharm. Anal. Acta.* 01 (2013). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.S7-005>.
- [94] I. Fridovich, Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23 (1983) 239–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.23.040183.001323>.
- [95] E.A. Roman, S.E. Faraj, M. Gallo, A.G. Salvay, D.U. Ferreira, J. Santos, Protein Stability and Dynamics Modulation: The Case of Human Frataxin, *PLoS One.* 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045743>.
- [96] J.R. Lakowicz, ed., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [97] A. Gijbbers, T. Nishigaki, N. Sánchez-Puig, Fluorescence anisotropy as a tool to study protein-protein interactions, *J. Vis. Exp.* 2016 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.3791/54640>.
- [98] J. Schymkowitz, J. Borg, F. Stricher, R. Nys, F. Rousseau, L. Serrano, The FoldX web server: an online force field, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) W382–W388. <https://doi.org/10.1093/nar/gki387>.
- [99] E. Krieger, G. Vriend, YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations, *Bioinformatics.* 30 (2014) 2981–2982. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>.
- [100] D.J. Price, C.L. Brooks, A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation, *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 10096–10103. <https://doi.org/10.1063/1.1808117>.
- [101] M.R. Machado, S. Pantano, Split the Charge Difference in Two! A Rule of Thumb for Adding Proper Amounts of Ions in MD Simulations, *J. Chem. Theory Comput.* 16 (2020) 1367–1372. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00953>.
- [102] A.T.P. Carvalho, M. Swart, Electronic Structure Investigation and Parametrization of Biologically Relevant Iron–Sulfur Clusters, *J. Chem. Inf. Model.* 54 (2014) 613–620. <https://doi.org/10.1021/ci400718m>.
- [103] C.I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, P.A. Kollman, A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 10269–10280. <https://doi.org/10.1021/j100142a004>.
- [104] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, P.A. Kollman, Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation, *J. Am.*

Chem. Soc. 115 (1993) 9620–9631. <https://doi.org/10.1021/ja00074a030>.

- [105] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M. a. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. a. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, a. V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J. V. Ortiz, a. F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, Williams, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. a. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T. a. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, a. P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, G16_C01, (2016) Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallin.
- [106] L.F. Song, T.-S. Lee, C. Zhu, D.M. York, K.M. Merz, Using AMBER18 for Relative Free Energy Calculations, *J. Chem. Inf. Model.* 59 (2019) 3128–3135. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00105>.
- [107] J. Mongan, D.A. Case, Biomolecular simulations at constant pH, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (2005) 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.02.002>.
- [108] J. Mongan, D.A. Case, J.A. McCammon, Constant pH molecular dynamics in generalized Born implicit solvent, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 2038–2048. <https://doi.org/10.1002/jcc.20139>.
- [109] G. Rastelli, A. Del Rio, G. Degliesposti, M. Sgobba, Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA, *J. Comput. Chem.* 32 (2009) NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21372>.
- [110] D.R. Roe, T.E. Cheatham, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data, *J. Chem. Theory Comput.* 9 (2013) 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>.
- [111] B.J. Grant, A.P.C. Rodrigues, K.M. ElSawy, J.A. McCammon, L.S.D. Caves, Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures, *Bioinformatics.* 22 (2006) 2695–2696. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl461>.
- [112] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [113] M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov, M. Steinegger, ColabFold: making protein folding accessible to all, *Nat. Methods.* 19 (2022) 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.
- [114] C. Dominguez, R. Boelens, A.M.J.J. Bonvin, HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1731–1737. <https://doi.org/10.1021/ja026939x>.
- [115] G.C.P. van Zundert, J.P.G.L.M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P.L. Kastiris, E. Karaca, A.S.J. Melquiond, M. van Dijk, S.J. de Vries, A.M.J.J. Bonvin, The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes, *J. Mol. Biol.* 428 (2016) 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>.
- [116] B.J. Biesiadecki, J.-P. Jin, A High-Throughput Solid-Phase Microplate Protein-Binding Assay to Investigate Interactions between Myofibrillar Proteins, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/421701>.

- [117] I. Dimauro, T. Pearson, D. Caporossi, M.J. Jackson, A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue, *BMC Res. Notes.* 5 (2012) 513. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-513>.
- [118] P. Irigoyen, S. Mansilla, L. Castro, A. Cassina, R. Sapiro, Mitochondrial function and reactive oxygen species production during human sperm capacitation: Unraveling key players, *FASEB J.* 38 (2024). <https://doi.org/10.1096/fj.202301957RR>.
- [119] J.J. Ferreira, A. Cassina, P. Irigoyen, M. Ford, S. Pietroroia, N. Peramsetty, R. Radi, C.M. Santi, R. Sapiro, Increased mitochondrial activity upon CatSper channel activation is required for mouse sperm capacitation, *Redox Biol.* 48 (2021) 102176. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102176>.
- [120] A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, J.A.M. Leunissen, Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.
- [121] J.C. Crack, J. Green, A.J. Thomson, N.E. Le Brun, Techniques for the Production, Isolation, and Analysis of Iron–Sulfur Proteins, in: *Methods Mol. Biol.*, 2014: pp. 33–48. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-794-5_4.
- [122] I.O. Betinol, S. Nader, S.S. Mansy, Spectral decomposition of iron-sulfur clusters, *Anal. Biochem.* 629 (2021) 114269. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114269>.
- [123] D. Piszkiwicz, O. Gawron, J.C. Sutherland, Analysis of the iron-sulfur cluster of aconitase by natural and magnetic circular dichroism, *Biochemistry.* 20 (1981) 363–366. <https://doi.org/10.1021/bi00505a021>.
- [124] A. Wilkening, C. Rüb, M. Sylvester, W. Voos, Analysis of heat-induced protein aggregation in human mitochondria, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 11537–11552. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002122>.
- [125] J.F. Morrison, The influence of buffers on the pH optimum of aconitase., *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 32 (1954) 877–883. <https://doi.org/10.1038/icb.1954.91>.
- [126] I. Fridovich, Superoxide radical and superoxide dismutases., *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995) 97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>.
- [127] C.M.C. Andrés, J.M. Pérez de la Lastra, C. Andrés Juan, F.J. Plou, E. Pérez-Lebeña, Superoxide Anion Chemistry—Its Role at the Core of the Innate Immunity, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 1841. <https://doi.org/10.3390/ijms24031841>.
- [128] J. a Imlay, Pathways of oxidative damage., *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (2003) 395–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>.
- [129] R. Radi, Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant., *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 26464–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472936>.
- [130] K. Jia, C.C.M. Manning, A. Jollymore, R.D. Beckie, Technical note: Effects of iron(II) on fluorescence properties of dissolved organic matter at circumneutral pH, *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 25 (2021) 4983–4993. <https://doi.org/10.5194/hess-25-4983-2021>.
- [131] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>.
- [132] D.P. Klose, B.A. Wallace, R.W. Janes, 2Struc: the secondary structure server, *Bioinformatics.* 26 (2010) 2624–2625. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq480>.

- [133] D. Essassi, R. Zini, J.-P. Tillement, Use of 1-Anilino-8-naphthalene Sulfonate as a Fluorescent Probe in the Investigation of Drug Interactions with Human Alpha-1-acid Glycoprotein and Serum Albumin, *J. Pharm. Sci.* 79 (1990) 9–13. <https://doi.org/10.1002/jps.2600790104>.
- [134] J.K. Ngo, L.C.D. Pomatto, D.A. Bota, A.L. Koop, K.J.A. Davies, Impairment of Ion-induced protection against the accumulation of oxidized proteins in senescent wi-38 fibroblasts., *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 66 (2011) 1178–85. <https://doi.org/10.1093/gerona/qlr145>.
- [135] D.A. Bota, K.J.A. Davies, Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 674–680. <https://doi.org/10.1038/ncb836>.
- [136] D.R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, 103rd ed., Boca Raton, 2022. <https://hbcpc.chemnetbase.com/faces/contents/ContentsSearch.xhtml;jsessionId=AD04F6DEBD1B8104F112DCD276A3E91F>.
- [137] A.M. Porcelli, A. Ghelli, C. Zanna, P. Pinton, R. Rizzuto, M. Rugolo, pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326 (2005) 799–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.105>.
- [138] J.M. Muroski, J.Y. Fu, H.H. Nguyen, R.R. Ogorzalek Loo, J.A. Loo, Leveraging Immonium Ions for Targeting Acyl-Lysine Modifications in Proteomic Datasets, *Proteomics*. 21 (2021). <https://doi.org/10.1002/pmic.202000111>.
- [139] X. Zou, C.A. Santa-Maria, J. O'Brien, D. Gius, Y. Zhu, Manganese Superoxide Dismutase Acetylation and Dysregulation, Due to Loss of SIRT3 Activity, Promote a Luminal B-Like Breast Carcinogenic-Permissive Phenotype, *Antioxid. Redox Signal.* 25 (2016) 326–336. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6641>.
- [140] L. Jin, W. Wei, Y. Jiang, H. Peng, J. Cai, C. Mao, H. Dai, W. Choy, J.E. Bemis, M.R. Jirousek, J.C. Milne, C.H. Westphal, R.B. Perni, Crystal Structures of Human SIRT3 Displaying Substrate-induced Conformational Changes, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 24394–24405. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014928>.
- [141] S. Mansilla, *Caracterización bioquímica de una aconitasa mitocondrial de mamífero*, Universidad de la República, 2017. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/10127>.
- [142] P.R. Gardner, I. Raineri, L.B. Epstein, C.W. White, Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 13399–13405. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13399>.
- [143] S.R. Dickman, A.A. Cloutier, Factors affecting the activity of aconitase., *J. Biol. Chem.* 188 (1951) 379–388.
- [144] N.D. Jhurry, M. Chakrabarti, S.P. McCormick, G.P. Holmes-Hampton, P.A. Lindahl, Biophysical Investigation of the Ironome of Human Jurkat Cells and Mitochondria, *Biochemistry*. 51 (2012) 5276–5284. <https://doi.org/10.1021/bi300382d>.
- [145] M. Hamada-Kanazawa, M. Narahara, M. Takano, K.S. Min, K. Tanaka, M. Miyake, .BETA.-Citryl-L-glutamate Acts as an Iron Carrier to Activate Aconitase Activity, *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1455–1464. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1455>.
- [146] D.R. Richardson, D.J.R. Lane, E.M. Becker, M.L.H. Huang, M. Whitnall, Y.S. Rahmanto, A.D. Sheftel, P. Ponka, Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 10775–

10782. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912925107>.

- [147] I.H. Castro, M.F. Pignataro, K.E. Sewell, L.D. Espeche, M.G. Herrera, M.E. Noguera, L. Dain, A.D. Nadra, M. Aran, C. Smal, M. Gallo, J. Santos, Frataxin Structure and Function, in: 2019: pp. 393–438. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28151-9_13.
- [148] L.E. Gentry, M.A. Thacker, R. Doughty, R. Timkovich, L.S. Busenlehner, His86 from the N - Terminus of Frataxin Coordinates Iron and Is Required for Fe - S Cluster Synthesis, (2013). <https://doi.org/10.1021/bi400443n>.
- [149] A. Bulteau, H.A.O. Neill, M.C. Kennedy, M. Ikeda-saito, G. Isaya, L.I. Szwedda, Frataxin Acts as an Iron Mitochondrial Aconitase Activity, (n.d.).
- [150] M.F. Pignataro, M.G. Herrera, N. Fernández, M. Aran, F. Bataglini, J. Santos, Selection of Synthetic Proteins to Modulate the Human Frataxin Function, *BioRxiv*. (2022) 2022.02.11.480108. <http://biorxiv.org/content/early/2022/02/12/2022.02.11.480108.abstract>.
- [151] X. Fu, M. Eggert, S. Yoo, N. Patel, J. Zhong, I. Steinke, M. Govindarajulu, E.A. Turumtay, S. Mouli, P. Panizzi, R. Beyers, T. Denney, R. Arnold, R.H. Amin, The Cardioprotective Mechanism of Phenylaminoethyl Selenides (PAESe) Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Involves Frataxin, *Front. Pharmacol.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.574656>.
- [152] Y. Oktay, E. Dioum, S. Matsuzaki, K. Ding, L.-J. Yan, R.G. Haller, L.I. Szwedda, J.A. Garcia, Hypoxia-inducible Factor 2 α Regulates Expression of the Mitochondrial Aconitase Chaperone Protein Frataxin, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 11750–11756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611133200>.
- [153] D. Doni, M. Meggiolaro, J. Santos, G. Audran, S.R.A. Marque, P. Costantini, M. Bortolus, D. Carbonera, A Combined Spectroscopic and In Silico Approach to Evaluate the Interaction of Human Frataxin with Mitochondrial Superoxide Dismutase, *Biomedicines*. 9 (2021) 1763. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121763>.
- [154] A. Hernandez-Segura, J. Nehme, M. Demaria, Hallmarks of Cellular Senescence, *Trends Cell Biol.* 28 (2018) 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>.
- [155] C. Quijano, L. Cao, M.M. Fergusson, H. Romero, J. Liu, S. Gutkind, I.I. Rovira, R.P. Mohney, E.D. Karoly, T. Finkel, Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations, *Cell Cycle*. 11 (2012) 1383–1392. <https://doi.org/10.4161/cc.19800>.
- [156] A.C. Lee, B.E. Fenster, H. Ito, K. Takeda, N.S. Bae, T. Hirai, Z.-X. Yu, V.J. Ferrans, B.H. Howard, T. Finkel, Ras Proteins Induce Senescence by Altering the Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7936–7940. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7936>.
- [157] L.C. Puga Molina, G.M. Luque, P.A. Balestrini, C.I. Marín-Briggiler, A. Romarowski, M.G. Buffone, Molecular Basis of Human Sperm Capacitation, *Front. Cell Dev. Biol.* 6 (2018). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072>.
- [158] C. Stival, L. del C. Puga Molina, B. Paudel, M.G. Buffone, P.E. Visconti, D. Krapf, Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm, in: 2016: pp. 93–106. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_5.
- [159] F. Barbagallo, S. La Vignera, R. Cannarella, A. Aversa, A.E. Calogero, R.A. Condorelli, Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 363. <https://doi.org/10.3390/jcm9020363>.

- [160] M.M. Giaccagli, M.D. Gómez-Elías, J.D. Herzfeld, C.I. Marín-Briggiler, P.S. Cuasnicú, D.J. Cohen, V.G. Da Ros, Capacitation-Induced Mitochondrial Activity Is Required for Sperm Fertilizing Ability in Mice by Modulating Hyperactivation, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.767161>.
- [161] R.J. Aitken, J.R. Drevet, A. Moazamian, P. Gharagozloo, Male Infertility and Oxidative Stress: A Focus on the Underlying Mechanisms, *Antioxidants.* 11 (2022) 306. <https://doi.org/10.3390/antiox11020306>.
- [162] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochem. J.* 437 (2011) 575.1-575. <https://doi.org/10.1042/BJ4370575u>.

9. Comunicaciones y trabajos publicados asociados al trabajo de tesis

• Comunicaciones

- **Estudios estructurales sobre la aconitasa mitocondrial y su interacción con la FXN** (presentación de póster, 2023). XIII Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Montevideo, Uruguay.
- **Structural studies on the redox-sensitive ACO2 and its interaction with FXN** (presentación de póster, 2023). Society for Redox Biology and Medicine's 30th Annual Conference. Maldonado, Uruguay.
- **Role of mitochondria in human sperm capacitation beyond ATP production** (colaborador en póster, 2023). Fertilization and Activation of Development (Gordon Research Conference). USA.
- **Estudios *in vitro* e *in silico* de la aconitasa mitocondrial y su interacción con la frataxina** (exposición oral, 2022). Simposio: Rol de la Mitocondria en la Patología (CEINBIO). Montevideo, Uruguay.
- **Estudios *in vitro* e *in silico* de la aconitasa mitocondrial y su interacción con la frataxina** (exposición oral, 2022). VII Simposio CEINBIO. Salto, Uruguay.
- **Estudios *in vitro* e *in silico* de la aconitasa mitocondrial y su interacción con la frataxina** (exposición oral, 2022). III Congreso Nacional de Biociencias. Montevideo, Uruguay.
- **Human mitochondrial aconitase: characterization and its interaction with frataxin** (presentación de póster, 2022). SfrBMB 27th Annual Conference. Florida, USA.
- **Caracterización de las modificaciones postraduccionales de la aconitasa mitocondrial humana** (presentación de póster, 2019). II Congreso Nacional de Biociencias. Montevideo, Uruguay.
- **Biochemical and structural characterization of human aconitase, a key mitochondrial oxidant target** (presentación de póster, 2018). SfrBMB 25th Annual Conference. Illinois, USA.
- **Caracterización bioquímica y estructural de la aconitasa mitocondrial humana expuesta a oxidantes** (presentación de póster, 2015). 9as Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Montevideo, Uruguay.

• Publicaciones asociadas con esta tesis

- **Redox sensitive human mitochondrial aconitase and its interaction with frataxin: *In vitro* and *in silico* studies confirm that it takes two to tango** (artículo original, 2023). Mansilla, S., Tórtora, V., Pignataro, F., Sastre, S., Chiribao, M.L., Robello, C., Zeida, A., Santos, J., Castro, L.A. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2023.01.028](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.01.028)
- **Oncogene-induced senescence mitochondrial metabolism: further characterization and comparison with H₂O₂ and doxorubicin induced senescence** (artículo original, 2024, EN

REVISIÓN EN REDOX BIOLOGY). Marmisolle, I., Chacón, E., Mansilla, S., Bresque M., Martínez, J., Zamudio, R., Herbig, U., Liu, J., Finkel, T., Escande, C., Castro L.A., Quijano, C.

- **Mitochondrial function and reactive oxygen species production during human sperm capacitation: Unraveling key players** (artículo original, 2024). Irigoyen, P., Mansilla, S., Castro, L.A., Cassina, A, Sapiro, R., The FASEB Journal, DOI: [10.1096/fj.202301957RR](https://doi.org/10.1096/fj.202301957RR)
- **Aconitases: Non-redox Iron-Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species** (revisión, 2019). Castro, L.A., Tórtora, V., Mansilla, S., Radi, R., Accounts of Chemical Research, DOI: [10.1021/acs.accounts.9b00150](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00150)

- **Otras publicaciones realizadas vinculadas a la mitocondria**

- **Linking triphenylphosphonium cation to a bicyclic hydroquinone improves their antiplatelet effect via the regulation of mitochondrial function** (Trabajo original, aceptado en marzo de 2024). Méndez, D., Tellería, F., Monroy-Cárdenas, M., Montecino-Garrido, H., Mansilla, S., Castro, L., Trostchansky, A., Muñoz-Córdova, F., Zickermann, V., Schiller, J., Alfaro, S., Caballero, J., Araya-Maturana, R., Fuentes, D., Redox Biology, DOI: [10.1016/j.redox.2024.103142](https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103142)
- **The use of triphenyl phosphonium cation enhances the mitochondrial antiplatelet effect of the compound magnolol** (Trabajo original, 2023). Tellería, F., Mansilla, S., Méndez, D., Sepúlveda, M., Araya-Maturana, R., Castro, L.A., Trostchansky, A., Fuentes, E., Pharmaceuticals, DOI: [10.3390/ph16020210](https://doi.org/10.3390/ph16020210)
- **Computational and mitochondrial functional studies of novel compound heterozygous variants in SPATA5 gene support a causal link with epileptogenic encephalopathy** (Trabajo original, 2023). Raggio, V., Graña, M., Winiarski, E., Mansilla, S., Simoes, C., Rodríguez, S., Brandes, M., Tapie, A., Rodríguez, L., Cibils, L., Alonso, M., Martínez, J., Fernandez-Calero, T., Domínguez, F., Rosas, M., Castro, L., Cerisola, A., Naya, H., Cassina, A., Quijano, C., Spangenberg, L., Human Genomics, DOI: [10.1186/s40246-023-00463-x](https://doi.org/10.1186/s40246-023-00463-x)
- **Blood cell respiration rates and mtDNA copy number: A promising tool for the diagnosis of mitochondrial disease** (Trabajo original, 2021). Alonso, M., Zabala, C., Mansilla, S., De Brun, L., Martínez, J., Garau, M., Rivas, G., Acosta, C., Lens, D., Cerisola, A., Graña, M., Naya, H., Puentes, R., Spangenberg, L., Raggio, V., Lemes, A., Castro, L., Quijano, C., Mitochondrion, DOI: [10.1016/j.mito.2021.09.004](https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.09.004)
- **The protein disulphide isomerase inhibitor CxxCpep modulates oxidative burst and mitochondrial function in platelets** (Completo, 2021). Gaspar, R.S., Mansilla, S., Vieira, V.A., da Silva, L.B., Gibbins, J.M., Castro, L.A., Trostchansky, A., Paes, A.M.A., Free Radical Biology and Medicine, DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.011](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.011)
- **Deep sequencing discovery of causal mtDNA mutations in a patient with unspecific neurological disease** (Trabajo original, 2018). Spangenberg, L., Graña, M., Mansilla, S., Martínez, J., Tapié, A., GREIF, G., Montano, N., Vaglio, A., Gueicamburu, R., Robello, C., Castro, L.A., Quijano, C., Raggio, V., Naya, H., DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.09.004>