



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología

Programa de doctorado: 3127 Fisiología

Papel de las Membranas Asociadas a Retículo
Endoplasmático y Mitocondria (MAMs) en la
fisiopatología celular de la Ataxia de Friedreich y su
relevancia como diana terapéutica

Tesis Doctoral presentada por:

Laura Robles Rodríguez

Dirigida por:

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Dra. M^a Pilar González Cabo

Valencia, octubre de 2022

D. Federico V. Pallardó Calatayud, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

Dña. M^a Pilar González Cabo, Investigadora postdoctoral del CIBERER y profesora asociada del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “Papel de las membranas asociadas a Retículo Endoplasmático y mitocondria (MAMs) en la fisiopatología celular de la Ataxia de Friedreich y su relevancia como diana terapéutica”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Laura Robles Rodríguez, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia.

Fdo.: Federico V. Pallardó Calatayud

Tutor y director

Fdo.: M^a Pilar González Cabo

Directora

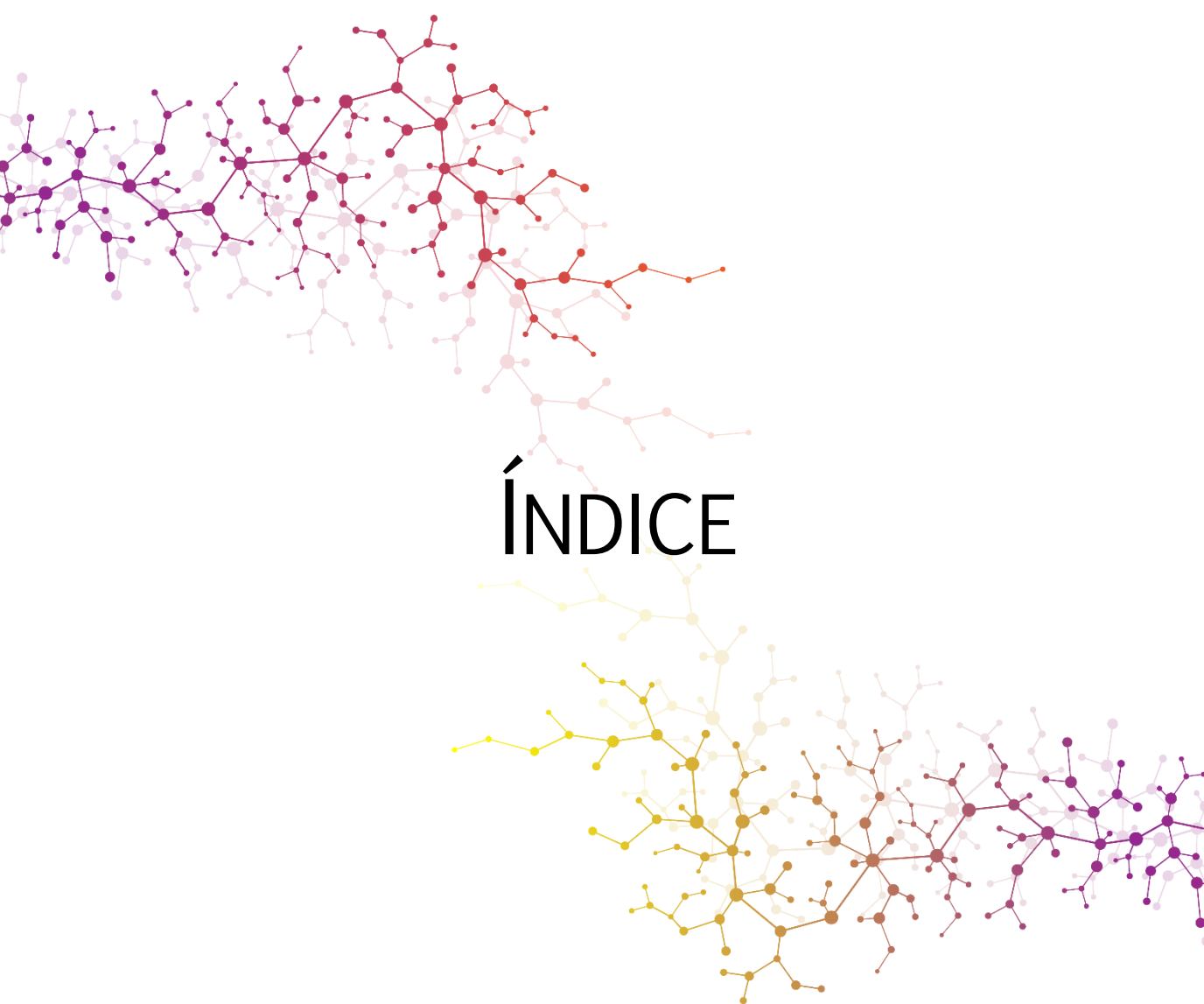
A los amores de mi vida (Mamá, Her, Agüi Mari y Alberto)

“Las preguntas que no podemos contestar son las que más nos enseñan.

Nos enseñan a pensar. Si le das a alguien una respuesta, lo único que obtiene es cierta información. Pero si le das una pregunta, él buscará sus propias respuestas...”

“-Así, cuanto más difícil es la pregunta, más difícil la búsqueda. Cuanto más difícil es la búsqueda, más aprendemos...”

-Patrick Rothfuss, El temor de un hombre sabio



ÍNDICE

ÍNDICE

ABSTRACT _____

RESUMEN _____

INTRODUCCIÓN _____ - 1 -

1. El calcio celular.....- 1 -
2. Las Membranas asociadas a Retículo Endoplasmático y Mitocondria (MAMs)- 2 -
 - 2.1. El Ca^{2+} regula funciones mitocondriales _____ - 6 -
 - 2.2. Ca^{2+} y estrés oxidativo _____ - 8 -
 - 2.3. La comunicación de las MAMs en enfermedades neurológicas _____ - 9 -
3. La Ataxia de Friedreich.....- 11 -
 - 3.1. Aspectos clínicos de la Ataxia de Friedreich _____ - 13 -
 - 3.1.1. Características neurológicas _____ - 13 -
 - 3.1.2. Características no neurológicas _____ - 16 -
 - 3.2. Genética molecular de la Ataxia de Friedreich _____ - 17 -
4. Estructura y maduración de Frataxina.....- 21 -
5. Isoformas de frataxina.....- 24 -
6. Fisiopatología molecular de la Ataxia de Friedreich- 28 -
 - 6.1. Bioenergética mitocondrial _____ - 32 -

ÍNDICE

6.2.	Estrés oxidativo _____	- 33 -
6.3.	Metabolismo del hierro _____	- 35 -
6.4.	Dinámica y biogénesis mitocondrial _____	- 36 -
6.5.	Metabolismo lipídico _____	- 38 -
6.6.	Movilización de Ca ²⁺ intracelular _____	- 40 -
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS _____		- 47 -
MATERIAL Y MÉTODOS _____		- 51 -
1.	Material Biológico	- 51 -
1.1.	Cultivos celulares _____	- 51 -
1.2.	Ratones _____	- 51 -
1.3.	Bacterias _____	- 52 -
1.4.	Anticuerpos _____	- 52 -
2.	Métodos.....	- 53 -
2.1.	Generación de líneas celulares estables _____	- 53 -
2.2.	Tratamientos _____	- 53 -
2.3.	Técnicas de imagen _____	- 54 -
2.4.	Análisis de peroxidación lipídica mediante citometría de flujo _____	- 58 -
2.5.	Fraccionamiento subcelular para la purificación de mitocondria, MAMs y RE _____	- 58 -
2.6.	Western Blot _____	- 61 -

2.7.	Ensayo de viabilidad celular por MTT _____	- 62 -
2.8.	Extracción de ARN, síntesis de ADNc y PCR cuantitativa _____	- 63 -
2.9.	Técnica Split-TurboID _____	- 64 -
2.10.	Análisis estadístico _____	- 71 -
RESULTADOS _____		- 75 -
1.	Estudio de la interacción retículo-mitocondria en la Ataxia de Friedreich.....	- 75 -
1.1.	Frataxina forma parte de la red proteica de las MAMs _____	- 75 -
1.2.	El déficit de FXN altera la arquitectura de las MAMs _____	- 77 -
1.3.	Los antioxidantes rescatan las interacciones retículo-mitocondria en células con déficit de FXN _____	- 80 -
1.4.	Los antioxidantes recuperan la movilización de Ca ²⁺ a la mitocondria _____	- 83 -
1.5.	Estudio de las MAMs como posible diana terapéutica de la Ataxia de Friedreich _____	- 90 -
2.	Estudio de la expresión de las isoformas canónica y citosólica de frataxina en células humanas y tejidos murinos	- 96 -
3.	Análisis del interactoma mitocondrial y extramitocondrial de las isoformas canónica y citosólica de frataxina.....	- 100 -

ÍNDICE

3.1. Frataxina I y II presentan localización extramitocondrial.....	- 100 -
3.2. Frataxina I y II muestran interactomas distintos en el dominio retículo/citosol.....	- 109 -
3.3. El interactoma mitocondrial de FXN I indica nuevas rutas de señalización.....	- 120 -
3.4. Frataxina I y II participan en procesos celulares regulados por las MAMs.....	- 129 -
DISCUSIÓN _____	- 141 -
1. El dominio MAMs como diana terapéutica de la Ataxia de Friedreich.....	- 141 -
1.1. El déficit de frataxina produce una alteración estructural y funcional en las MAMs _____	- 141 -
1.2. Restauración de la funcionalidad de las MAMs mediante distintas terapias farmacológicas en un modelo con déficit de frataxina _____	- 146 -
2. La expresión de las isoformas de FXN y su localización subcelular.....	- 156 -
3. El interactoma diferencial de Frataxina I y II.....	- 161 -
3.1. FXN I y II participan en rutas de señalización reguladas por las MAMs _____	- 162 -
4. Perspectivas de futuro.....	- 166 -
CONCLUSIONS _____	- 173 -
CONCLUSIONES _____	- 177 -

REFERENCIAS _____ - 181 -

ABREVIATURAS _____ - 215 -

ÍNDICE DE FIGURAS _____ - 217 -

ÍNDICE DE TABLAS _____ - 222 -

ANEXOS _____ - 225 -

Anexo I: Tablas de las rutas KEGG sobrerrepresentadas en el análisis
ORA de los proteomas de interacción de FXN I y II en el
RE/citosol..... - 225 -

Anexo II: Tablas de las rutas REACTOME sobrerrepresentadas en el
análisis ORA de los proteomas de interacción de FXN I y II en el
RE/citosol. - 226 -

Anexo III: Tablas de las rutas KEGG y REACTOME
sobrerrepresentadas en el análisis ORA del proteoma mitocondrial
de interacción de FXN I..... - 228 -

Anexo IV: Tabla de las proteínas del interactoma de FXN I y II
identificadas en estudios proteómicos de las MAMs..... - 229 -

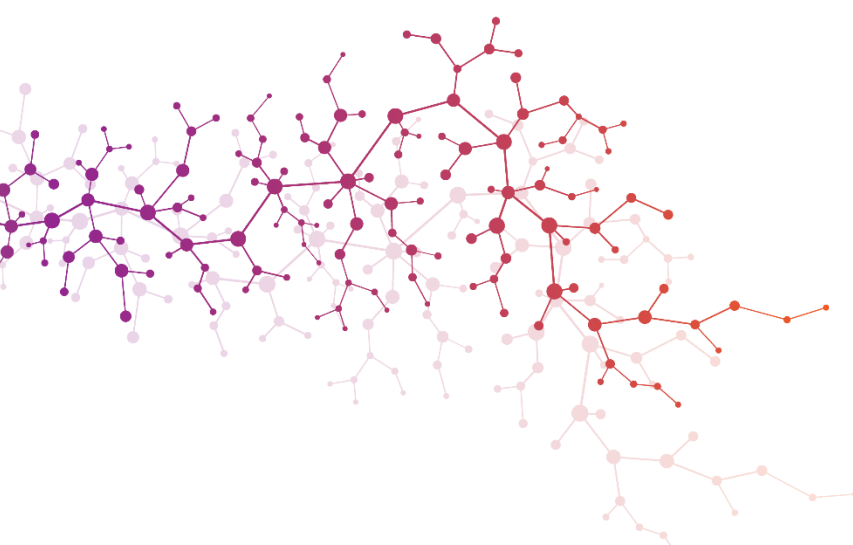
Anexo V: Producción científica..... - 234 -

1. Publicaciones _____ - 234 -

2. Contribuciones a congresos _____ - 234 -

3. Estancia Internacional _____ - 236 -

Anexo VI: Summary _____ -237-



ABSTRACT



ABSTRACT

Calcium (Ca^{2+}) is an ion involved in a great variety of different cellular functions and signaling pathways, mediating between extracellular and intracellular signals. Its versatility is given by changes in its concentration, which can occur either by Ca^{2+} influx from the extracellular space, Ca^{2+} release from intracellular storage compartments or, in the opposite, by Ca^{2+} pumping into the extracellular space or intracellular organelles. The main subcellular compartment that stores Ca^{2+} is the ER/SR (endoplasmic/sarcoplasmic reticulum) depending on the cell type. Together with the mitochondria, the ER is responsible for coordinating complex transduction mechanisms through continuous remodeling of its structures. Specifically, the ER and the mitochondria interact through dynamic close appositions between the two compartments which are very sensitive to physiological changes in the cell, termed MAMs (Endoplasmic reticulum-mitochondria associated membranes). Thus, different proteins belonging to both compartments and the cytosol interact to each other to coordinate processes such as Ca^{2+} exchange from the ER towards the mitochondria. Proteins such as Sig-1R (Sigma non-opioid intracellular receptor 1) and IP_3R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) regulate the outflow of Ca^{2+} from the ER, establishing a protein scaffold together with the cytosolic protein GRP75 (Glucose-regulated protein 75) and the mitochondrial proteins VDAC (voltage-dependent anion channel) and MCU (Mitochondrial calcium uniporter), located in the outer and inner mitochondrial membranes, respectively. In this context, ER-mitochondria communication is fundamental to maintain cell function and is involved in the pathophysiology of neurodegeneration, so it has been proposed as a common mechanism in neurodegenerative diseases.

Friedreich's Ataxia (FRDA) is an autosomal recessive neurodegenerative disorder, mainly caused by a homozygous GAA triplet repeat expansion in intron 1 of the *FXN* gene. Consequently, FRDA

ABSTRACT

patients show reduced levels of frataxin (FXN), a protein fundamentally associated with the mitochondrial matrix. This implies several alterations in signaling pathways related to mitochondrial metabolism and function. Among these, evidence for dysfunction of intracellular Ca^{2+} homeostasis has been observed, but the mechanisms involved are unknown. Given that MAMs domain is indispensable in the regulation of this process and other molecular pathways involved in the pathophysiology of the disease, the need to investigate the molecular processes related to intracellular Ca^{2+} and their role in the pathophysiology of FRDA is clear. On the other hand, the existence of extra-mitochondrial FXN isoforms highlights the importance of the functional characterization of FXN linked to its subcellular localization and tissue distribution in FRDA.

Our hypothesis is that FXN plays a role in the organization of MAMs, so its deficiency implies a dysregulation in ER-mitochondria communication, thus impairing the processes regulated in this domain and, specifically, in intracellular Ca^{2+} homeostasis. Therefore, the aim of the present work is to determine the involvement of MAMs in the pathophysiology of FRDA, as well as their relevance as potential therapeutic targets of the disease.

To address this main objective, we first focused on analyzing the architecture and functionality of MAMs. The study of FXN subcellular localization revealed that FXN is located in MAMs' domain, interacting directly with IP_3R and GRP75 , two of the main proteins responsible for ER-mitochondria Ca^{2+} exchange. In this context, we observed that FXN deficiency decreases ER-mitochondria communication in our cell model, diminishing the contacts between both compartments. In concordance, FXN deficiency also affects MAMs functionality, decreasing Ca^{2+} transfer from the ER to the mitochondria, all together with increased lipid peroxidation in our cell model. Treatment with the antioxidants Trolox and NAC succeeded in rescuing the deficiencies observed in the model,

ABSTRACT

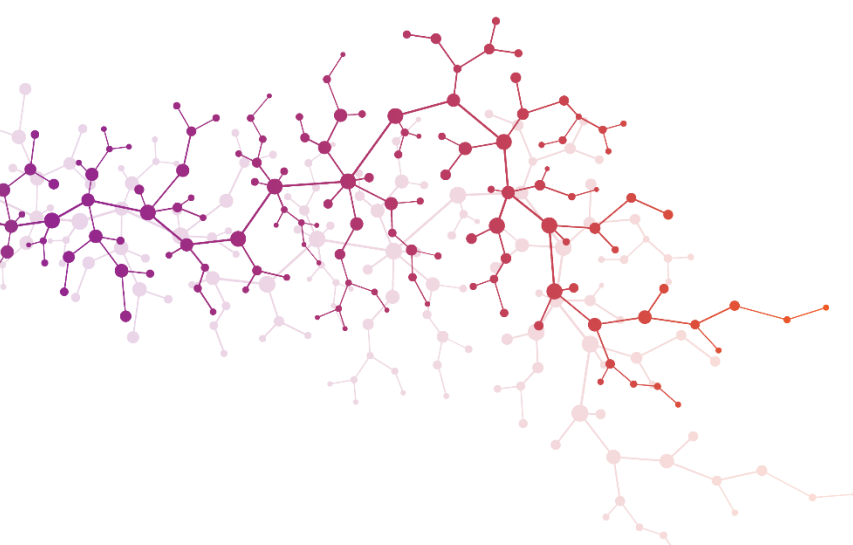
recovering ER-mitochondria connections and Ca^{2+} transfer to mitochondria, probably through the reduction of the redox environment in the microdomain of MAMs. In addition, cell treatment with compounds targeting MAMs domain, such as Omaveloxolone, Fluvoxamine and Kaempferol succeeded in recovering Ca^{2+} entry to mitochondria, highlighting the importance of MAMs as a therapeutic target for FRDA.

Thereafter, we decided to study the differential function of the cytosolic (FXN II) and canonical (FXN I) isoforms of FXN, with the aim of elucidating which variant might be involved in the regulation of MAMs. For this purpose, we optimized the Split-TurboID technique, developed for the analysis of the interactome of a protein of interest in a specific subcellular compartment. We designed the technique for the study of the interactome of FXN I and II in both the ER/cytosol (ERTS) and the mitochondrial matrix (MTS). To our surprise, we observed that both FXN I and FXN II localize extramitochondrially, interacting with the ER membrane from the cytosol. In contrast, only FXN I localizes to the mitochondria, exhibiting a dual subcellular localization. Furthermore, the interactome analysis of both isoforms in the ER revealed proteins belonging to MAMs, confirming that both isoforms are located in this domain. The analysis of the FXN I interactome in mitochondria confirmed numerous signaling pathways related to FRDA, revealing others that have been little explored, such as the mitochondrial translation process. Our study confirms that FXN I and II isoforms are involved in the regulation of several cellular processes through MAMs, including Ca^{2+} homeostasis, apoptosis, ATP synthesis, and lipid metabolism. These findings suggest that FRDA is not a purely mitochondrial disease, and that both FXN isoforms may play an important role in its pathophysiology. Finally, we analyzed in detail the proteins identified in the interactome of both FXN isoforms involved in processes enriched in our proteomes and regulated in the MAMs domain, such as intracellular Ca^{2+} homeostasis and lipid

ABSTRACT

metabolism. The results suggest that both, FXN I and II, would be related to intracellular Ca^{2+} homeostasis. In addition, both variants seem to be related to fatty acid biosynthesis, whereas FXN I would be specifically involved in cholesterol and steroid synthesis.

In short, our results point to a clear involvement of FXN in the regulation of the MAMs domain, which may contribute to the pathophysiology of FRDA. However, the contribution of each isoform in these processes needs to be clarified. Taken together, our findings open a field of possibilities focused on the communication of MAMs as a possible therapeutic strategy for FRDA.



RESUMEN



RESUMEN

El Calcio (Ca^{2+}) es un ion involucrado en una gran variedad de funciones celulares y vías de señalización, mediando entre las señales extracelulares e intracelulares. Su versatilidad viene dada por los cambios en su concentración, que pueden producirse tanto por la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, como por la liberación de Ca^{2+} desde los compartimentos de almacenamiento intracelular o, en el caso contrario, por el bombeo de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular o hacia orgánulos intracelulares. El principal compartimento subcelular que almacena Ca^{2+} es el RE/SR (Retículo sarcoplasmático/endoplasmático) dependiendo del tipo celular. Junto con la mitocondria, el RE se encarga de coordinar complejos mecanismos de transducción a través de una remodelación continua de sus estructuras. Concretamente, el RE y la mitocondria interaccionan a través de las MAMs (*Endoplasmic reticulum -mitochondria associated membranes*), zonas dinámicas de contacto entre ambos compartimentos muy sensibles a los cambios fisiológicos de la célula. De este modo, diferentes proteínas pertenecientes a ambos compartimentos y el citosol interaccionan para coordinar procesos como el intercambio de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. Proteínas como Sig-1R (*Sigma non-opioid intracellular receptor 1*) e IP_3R (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*) regulan la salida de Ca^{2+} desde el RE, estableciendo un puente proteico con la proteína citosólica GRP75 (*Glucose-regulated protein 75*) y las proteínas VDAC (*voltage-dependent anion channel*) y MCU (*Mitochondrial calcium uniporter*), localizadas en las membranas externa e interna de la mitocondria respectivamente. En este contexto, la comunicación RE-mitocondria es clave para mantener la función celular y está implicada en la fisiopatología de la neurodegeneración, por lo que se ha propuesto como mecanismo común en enfermedades neurodegenerativas.

RESUMEN

La Ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva, provocada principalmente por una expansión homocigótica de repetición del triplete GAA en el intrón 1 del gen *FXN*. En consecuencia, los pacientes de FRDA muestran niveles reducidos de frataxina (FXN), una proteína fundamentalmente asociada a la matriz mitocondrial, lo cual implica una serie de alteraciones en vías de señalización relacionadas con el metabolismo y la función mitocondrial. Entre ellas, se han observado evidencias sobre la disfunción de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , pero se desconocen los mecanismos implicados. Dado que el dominio de las MAMs es indispensable en la regulación de este proceso y otras rutas moleculares implicadas en la fisiopatología de la enfermedad, se hace evidente la necesidad de indagar en los procesos moleculares relacionados con el Ca^{2+} intracelular y su papel en la fisiopatología de la FRDA. Por otro lado, la existencia de isoformas de localización extramitocondrial de FXN pone de manifiesto la importancia de la caracterización funcional de FXN ligada a su localización subcelular y distribución tisular en la FRDA.

Nuestra hipótesis consiste en que FXN juega un papel en la organización de las MAMs, por lo que su deficiencia implica una desregulación en la comunicación RE-mitocondria, provocando en consecuencia una disfunción en los procesos regulados en este dominio y en concreto, en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es determinar la implicación de las MAMs en la fisiopatología de la FRDA, así como su relevancia como potenciales dianas terapéuticas de la enfermedad.

Para abordar este objetivo principal, en primer lugar, nos centramos en analizar la arquitectura y funcionalidad de las MAMs. El estudio de la localización subcelular de FXN nos reveló que esta se encuentra en el dominio de las MAMs, interaccionando de forma directa con IP_3R y GRP75 , dos de las principales proteínas responsables del

intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria. En este contexto, observamos que la deficiencia de FXN en nuestro modelo celular afecta a la comunicación RE-mitocondria, disminuyendo los puntos de contacto entre ambos compartimentos. En concordancia, la deficiencia de FXN también afecta a la funcionalidad de dominio MAMs, disminuyendo la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria, todo ello acompañado de una peroxidación lipídica incrementada en nuestro modelo celular. El tratamiento con los antioxidantes Trolox y NAC logró rescatar las deficiencias observadas en el modelo, recuperando las conexiones RE-mitocondria y la transferencia de Ca^{2+} a la mitocondria, probablemente a través de la reducción del ambiente redox en el microdominio MAMs. Asimismo, el tratamiento de modelo celular deficiente en FXN con fármacos dirigidos al dominio MAMs, como la Omaveloxolona, la Fluvoxamina y el Kaempferol logró recuperar la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, poniendo de manifiesto la importancia de las MAMs como diana terapéutica de la FRDA.

A continuación, decidimos estudiar la función diferencial de las isoformas citosólica (FXN II) y canónica (FXN I) de FXN, con la finalidad de esclarecer qué variante podría estar implicada en la regulación del dominio MAMs. Para ello, optimizamos la técnica Split-TurboID, desarrollada para el análisis del interactoma de una proteína de interés en un compartimento subcelular concreto. Diseñamos la técnica para el estudio del interactoma de FXN I y II tanto en el RE/citosol (ERTS) como en la matriz mitocondrial (MTS). Para nuestra sorpresa, observamos que tanto FXN I como FXN II se localizan extramitocondrialmente, interaccionando con la membrana del RE desde el citosol. Por el contrario, solamente FXN I se localiza en la mitocondria, presentando una localización subcelular dual. Además, el análisis del interactoma de ambas isoformas en el RE reveló proteínas pertenecientes a las MAMs, lo cual confirma que FXN I y II se localizan en este dominio. El análisis del interactoma de FXN I en la mitocondria confirmó numerosas vías de

RESUMEN

señalización relacionadas con la FRDA, desvelando otras poco exploradas, como el proceso de traducción mitocondrial. Nuestro estudio confirma que las isoformas de FXN I y II están involucradas en la regulación de varios procesos celulares a través de las MAMs, incluyendo la homeostasis del Ca^{2+} , la apoptosis, la síntesis de ATP y el metabolismo lipídico. Estos hallazgos sugieren que la FRDA no es una enfermedad puramente mitocondrial, y que ambas isoformas de FXN pueden desempeñar un papel importante en su fisiopatología. Por último, analizamos en detalle las proteínas identificadas en el interactoma de ambas isoformas de FXN implicadas en procesos enriquecidos en nuestros proteomas y regulados en el dominio MAMs, como la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y el metabolismo lipídico. Los resultados apuntan a que tanto FXN I como FXN II estarían relacionadas con la homeostasis intracelular de Ca^{2+} . Además, las dos variantes parecen estar implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que FXN I estaría involucrada de forma específica con la síntesis de colesterol y esteroides.

En definitiva, nuestros resultados apuntan hacia una clara implicación de FXN en la regulación del dominio MAMs, lo cual puede contribuir a la fisiopatología de la FRDA. No obstante, es necesario esclarecer la contribución de cada isoforma en estos procesos. En conjunto, nuestros hallazgos abren un campo de posibilidades centradas en la comunicación de las MAMs como posible estrategia terapéutica para la FRDA.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El calcio celular

El calcio (Ca^{2+}) es un ion bivalente simple implicado en una plétora de funciones celulares y vías de señalización diferentes. Es uno de los segundos mensajeros más ubicuos en la señalización intracelular de la mayoría de las células, actuando como una conexión clave entre las señales extracelulares y las respuestas intracelulares [1]. Tiene además funciones relacionadas con el mantenimiento del potencial eléctrico de la membrana celular y el desencadenamiento del potencial de acción en algunos tipos de células excitables, fundamentalmente en células neuronales y musculares. Su versatilidad se debe a una rica dinámica en los cambios de su concentración, que pueden producirse tanto por la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, como por la liberación de Ca^{2+} desde los compartimentos de almacenamiento intracelular o, en el caso contrario, por el bombeo de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular o hacia orgánulos intracelulares [2]. El principal almacenamiento de Ca^{2+} en células de mamífero es, dependiendo del tipo celular, el retículo sarcoplasmático/endoplasmático (RS/RE) [3]. La concentración intracelular de Ca^{2+} está en el rango de nM, mientras que el Ca^{2+} extracelular está en el rango de mM [1]. De este modo, los cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} son necesarios para el funcionamiento de diferentes estructuras y compartimentos celulares, receptores, canales, proteínas de unión al Ca^{2+} , bombas, transportadores, enzimas y factores de transcripción [4]. Por otro lado, cuando los niveles intracelulares se elevan por encima de la concentración fisiológica, pueden desencadenarse una serie de procesos celulares perjudiciales [5].

En las células no excitables, las vías reguladas por estas señales de Ca^{2+} abarcan una gran variedad de procesos, desde la expresión génica hasta la fecundación, la secreción, el plegamiento de proteínas, el metabolismo energético y la regulación del ciclo celular [6]–[8]. En las

INTRODUCCIÓN

células excitables, la señal depende de la entrada de Ca^{2+} a través de canales operados por voltaje o por ligandos, lo que regula la contracción muscular, los potenciales postsinápticos, la formación de memoria en las neuronas (potenciación a largo plazo) y la secreción de insulina de las células beta [9].

Debido a la gran variedad de eventos celulares dependientes de Ca^{2+} , la alteración de sus vías de señalización contribuye al desarrollo de múltiples enfermedades humanas. Por lo tanto, el estudio de la señalización del Ca^{2+} es esencial para entender la fisiopatología de enfermedades como la diabetes, la carcinogénesis, las enfermedades cardio y cerebrovasculares, incluyendo la disfunción endotelial, así como los trastornos neurodegenerativos [4], [10]–[16].

2. Las Membranas asociadas a Retículo Endoplasmático y Mitocondria (MAMs)

La mitocondria y el RE son estructuras que experimentan una remodelación continua para coordinar complejos mecanismos de transducción de señales y expresión génica, generando interacciones físicas que facilitan una regulación rápida y eficiente de estos procesos [17]. Designadas como membranas asociadas a retículo endoplásmico y mitocondria (*Endoplasmic reticulum-mitochondria associated membranes* o MAMs), las zonas de contacto entre ambos compartimentos son estructuras dinámicas muy sensibles a los cambios fisiológicos de la célula [18].

La asociación entre el RE y la mitocondria se describió en la década de 1950, cuando Copeland y Dalton observaron una orientación precisa del RE con respecto a las mitocondrias [19]. La distancia entre las membranas en esta región es de 10-30 nm, dependiendo del tipo de célula y de las condiciones celulares [20]. Además, se estima que en condiciones fisiológicas, el 5-20% de la superficie mitocondrial está conectada

transitoriamente con el RE, y estos contactos son dependientes de señalización [21].

Las MAMs engloban una amplia variedad de proteínas diferentes. Los dos primeros estudios proteómicos independientes identificaron 911 [22] y 1212 proteínas [23] localizadas en los puntos de unión de ambos compartimentos, pero sólo el 44% de ellas eran comunes. Durante la última década, diferentes autores han contribuido a incrementar la lista mediante diferentes aproximaciones moleculares como la microscopía o el fraccionamiento subcelular [24]–[26]. El desarrollo de nuevas técnicas ha facilitado el análisis proteómico de los dominios subcelulares en profundidad. El grupo de Alice Y Ting ha identificado recientemente más de 100 nuevas proteínas localizadas en las MAMs mediante la técnica TurboID. Esta aproximación ha sido diseñada para estudiar el interactoma de una proteína de interés en un compartimento celular específico [27]. Estos hallazgos ponen de manifiesto la complejidad de estas estructuras, especializadas en cada tipo de célula y organismo. De hecho, el conjunto de proteínas involucradas en las MAMs proporciona información importante sobre las funciones reguladas en este dominio. Existen proteínas implicadas en procesos celulares esenciales que pertenecen tanto al RE como a la membrana mitocondrial. De este modo, los contactos entre estos orgánulos permiten una regulación coordinada de eventos como la biosíntesis de lípidos [28], [29], la biogénesis mitocondrial [30]–[33], la dinámica mitocondrial [34], [35] y la homeostasis del Ca^{2+} [21], [36].

El intercambio de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria requiere de la formación de un puente proteico compuesto por proteínas de ambos compartimentos (**Figura 1**) [37]. En concreto, la formación de microdominios localizados en los contactos entre el RE y la mitocondria promueve un intercambio rápido y eficiente de Ca^{2+} , fundamental para la función y dinámica mitocondrial y la regulación de la apoptosis [38]. En

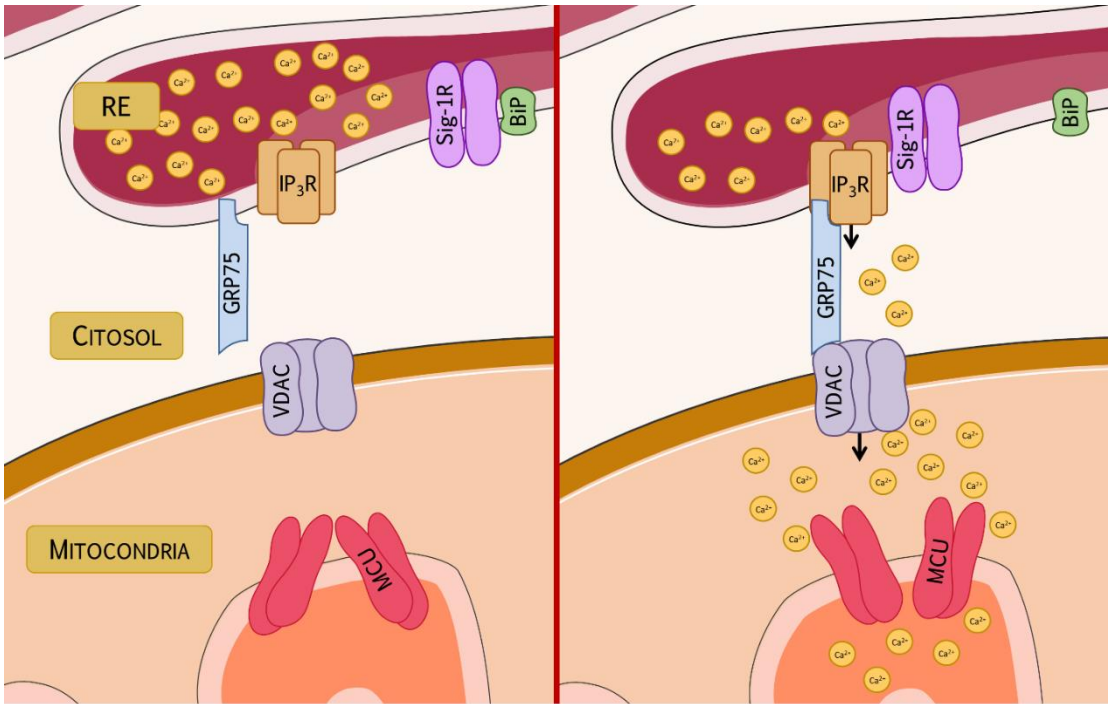


Figura 1: Esquema de la formación del puente proteico para el intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria. El RE es el compartimento principal de almacenamiento de Ca^{2+} en la célula. El intercambio de este catión entre el RE y la mitocondria requiere de la interacción de proteínas de ambos compartimentos, que forman puentes proteicos para optimizar este proceso. Sig-1R reside en la membrana de RE, en un estado inactivo, Ca^{2+} -dependiente (panel izquierdo). Tras su activación por diferentes señales y agonistas, Sig-1R se disocia de BiP/GRP78 y se reubica en la membrana del RE, interaccionando con IP_3R y actuando como chaperona del complejo proteico que permite la transferencia de Ca^{2+} hacia la mitocondria. En la mitocondria, la entrada de Ca^{2+} es controlada por VDAC, de la membrana mitocondrial externa, y MCU, situado en la membrana mitocondrial interna. GRP75 actúa como proteína de andamiaje entre IP_3R y VDAC. De este modo, el complejo formado por IP_3R -GRP75-VDAC asegura un flujo rápido y dinámico de Ca^{2+} hacia el espacio intermembrana mitocondrial, lo cual desencadena la apertura del MCU y el consecuente paso de Ca^{2+} a través de la membrana mitocondrial interna (panel derecho). BiP/GRP78: *Binding immunoglobulin protein/Glucose-regulated protein 78*; RE: Retículo Endoplasmático; GRP75: *Glucose-regulated protein 75*; IP_3R : *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*; MCU: *Mitochondrial calcium uniporter*; Sig-1R: *Sigma non-opioid intracellular receptor 1*; VDAC: *voltage-dependent anion channel*. Figura original creada a partir de recursos *Creative Commons* de Servier Medical Art [393].

1993, Rosario Rizzuto y colaboradores observaron el incremento de Ca^{2+} mitocondrial al movilizar el catión a través del canal IP_3R (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*) del RE [39]. Posteriormente, el mismo grupo describió la relación espacial entre el RE y la mitocondria, en la que observaron numerosas aposiciones estrechas entre ambos orgánulos, que cooperaban en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en células HeLa [21].

El lumen del RE es uno de los principales depósitos de Ca^{2+} libre en la célula (100-500 μM) comparado con el citosol (~100 nM). En este dominio, el Ca^{2+} entra al RE a través de las bombas SERCA (*Sarco/endoplasmatic reticulum calcium ATPase*), mientras que se libera al espacio citosólico en respuesta a señales a través de los IP_3R y de los RyR (*Ryanodine receptor*) [40]. Además, Sig-1R (*Sigma non-opioid intracellular receptor 1*), una chaperona sensible a Ca^{2+} localizada en el RE, también está implicada en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} . Sig-1R está enriquecida en las MAMs, ya que una de sus principales funciones es estabilizar el IP_3R activado, promoviendo la movilización de Ca^{2+} hacia la mitocondria [41], [42]. En condiciones fisiológicas, Sig-1R forma un complejo con la chaperona BiP/GRP78 (*Binding immunoglobulin protein/Glucose response protein 78*), en un estado latente, dependiente de Ca^{2+} . Una vez activado por agonistas o por agotamiento de Ca^{2+} en el RE, Sig-1R se disocia de BiP y se reubica dentro de la membrana del RE, interactuando con diferentes proteínas como IP_3R . Esto impide la degradación del IP_3R , promoviendo la captación de Ca^{2+} mitocondrial [42].

En la mitocondria, el Ca^{2+} debe atravesar ambas membranas mitocondriales. Por un lado, la membrana mitocondrial externa (MME) es permeable al Ca^{2+} debido a la presencia de VDAC (*voltage-dependent anion channel*), que permite el paso de diferentes metabolitos (succinato, malato, piruvato, NADH, ATP y fosfato) desde el citosol a la mitocondria [36]. En relación con la membrana mitocondrial interna (MMI), el Ca^{2+} entra a la matriz mitocondrial a través del MCU (*Mitochondrial calcium*

INTRODUCCIÓN

uniporter), ya que esta membrana es impermeable a los iones [43]. MCU es uno de los complejos de transporte de Ca^{2+} más importantes y altamente selectivos [44]. Es un elemento crucial en las MAMs, actuando como guardián del Ca^{2+} y controlando su flujo hacia la mitocondria. De hecho, se ha descrito que en condiciones fisiológicas, MCU e IP_3R deben tener una distancia óptima para asegurar la señalización de Ca^{2+} [45].

Además, otra proteína clave que estabiliza las conexiones de ambos compartimentos es GRP75 (*Glucose-regulated protein 75*). Esta chaperona actúa como proteína de andamiaje para IP_3R y VDAC, manteniendo su unión y asegurando una transferencia eficiente de Ca^{2+} a la mitocondria desde el RE [36,44]. En conjunto, todas estas propiedades hacen de las MAMs un dominio altamente coordinado, que requiere de una comunicación RE-mitocondria adecuada para regular la homeostasis del Ca^{2+} intracelular [36], [46].

2.1. El Ca^{2+} regula funciones mitocondriales

IP_3R -GRP75-VDAC-MCU es uno de los complejos esenciales en las MAMs, ya que la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} , controla, a su vez, la función mitocondrial, la bioenergética, la dinámica mitocondrial y la muerte celular [47], [48]. La mitocondria se considera el centro neurálgico de la célula, ya que proporciona al menos el 90% de la energía en la mayoría de los tipos celulares. En este contexto, las necesidades energéticas y, por tanto, la función mitocondrial, dependen de la función de cada tejido, así como de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. La mitocondria orchestra principalmente el perfil metabólico de los tejidos con alta demanda energética, como el corazón, el hígado, el músculo esquelético, el riñón y el cerebro [49]. En particular, las neuronas consumen el 70-80% de la energía total del cerebro, siendo el resto utilizada por las células de la glía [50]. Por tanto, la alteración de las vías bioenergéticas compromete la función mitocondrial, participando en el desarrollo de algunas de las características patológicas manifestadas en los trastornos neurológicos.

El mecanismo de producción de ATP depende de la fosforilación oxidativa, y está regulado de forma rápida y dinámica por los niveles de Ca^{2+} mitocondrial. De hecho, las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena de transporte de electrones requieren de un aumento del flujo de Ca^{2+} mitocondrial para promover la síntesis de ATP [51], [52]. Por ejemplo, las enzimas isocitrato deshidrogenasa y oxoglutarato deshidrogenasa se activan cuando aumenta el Ca^{2+} en la matriz mitocondrial [53], [54]. Además, la piruvato deshidrogenasa, un complejo clave para el metabolismo oxidativo, vincula la glucólisis con el ciclo de Krebs y se ve influenciada por la concentración de Ca^{2+} mitocondrial. De este modo, cuando aumenta la demanda de energía, diferentes receptores de neurotransmisores y hormonas promueven la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria a través de los IP_3R [17], [55].

Asimismo, la captación de Ca^{2+} mitocondrial está estrechamente relacionada con la dinámica mitocondrial. El flujo de Ca^{2+} que entra a la mitocondria está influenciado por diferentes propiedades mitocondriales, en términos de red, orientación y forma, lo cual a su vez, condiciona las funciones reguladas por estos eventos [56].

La primera propiedad es la distribución, ya que las mitocondrias agrupadas son capaces de captar el Ca^{2+} de forma más eficiente que las mitocondrias dispersas. Los eventos de fusión/fisión mitocondrial requieren de la transferencia de cantidades elevadas de Ca^{2+} citosólico hacia la mitocondria [33,55]. De este modo, el Ca^{2+} puede activar a la GTPasa citosólica Drp-1 (*Dynammin-Related Protein 1*), que es reclutada para formar un anillo alrededor de la mitocondria y así promover la fisión mitocondrial [31]. Por otro lado, la MFN2 (Mitofusina 2), una GTPasa responsable de la fusión de la MME, también participa como un regulador clave de las MAMs, contribuyendo a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular [33].

INTRODUCCIÓN

También influye la conectividad, ya que las mitocondrias alargadas son mejores conductoras de Ca^{2+} , distribuyendo el catión a lo largo de la red fusionada. Se ha descrito que mientras las mitocondrias fragmentadas incorporan el Ca^{2+} del RE de forma heterogénea, las mitocondrias tubulares lo hacen de forma equilibrada y conectada [56], [57].

En tercer lugar, la vecindad es una propiedad dinámica que también afecta a la transferencia del Ca^{2+} , ya que se requieren concentraciones elevadas de Ca^{2+} cerca de la mitocondria para promover su captación. En este contexto, Csordás *et al.* demostraron la importancia de la distancia RE-mitocondria, destacando que es esencial que el puente de anclaje entre ambos compartimentos esté correctamente ensamblado para asegurar la afluencia de Ca^{2+} a la mitocondria [46], [58].

Por último, pero no menos importante, el volumen de las mitocondrias también es crucial para asegurar la incorporación de Ca^{2+} mitocondrial, ya que la expansión forzada de las mitocondrias [58] y la fragmentación, reducen la capacidad de captación de Ca^{2+} [59].

Por otro lado, la acumulación anormal de Ca^{2+} en la mitocondria precede normalmente a la muerte celular por necrosis y apoptosis [60], [61]. En condiciones fisiológicas y patológicas, la desregulación del Ca^{2+} puede conducir a una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, activando a su vez la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Esto provoca la dilatación mitocondrial, que promueve la liberación de citocromo c y cofactores de caspasas al citosol [61], [62].

2.2. Ca^{2+} y estrés oxidativo

La mitocondria está considerada como la principal fuente de ROS (especies reactivas de oxígeno o *Reactive Oxygen Species*) en las células con alta tasa metabólica. En circunstancias de disfunción mitocondrial, una producción incontrolada de ROS llevaría a un desequilibrio en el

estado redox celular que, a su vez, podría participar en la patogénesis [63]. El estrés oxidativo se produce cuando la producción de ROS supera la defensa antioxidante, provocando daños celulares. Por tanto, el equilibrio entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes es crucial para mantener la homeostasis y la supervivencia celular [64], [65]. La cadena de transporte de electrones, localizada en las crestas mitocondriales, genera ROS como el anión superóxido (O_2^-), que se transforma en la molécula de señalización redox H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) a través de la SOD2 (superóxido dismutasa 2) presente en la mitocondria. Existe una evidencia creciente sobre el papel del H_2O_2 como mensajero localizado en los nanodominios redox de las MAMs [66]. El H_2O_2 , generado principalmente en la mitocondria, puede modular la actividad de los canales IP_3R y RyR , promoviendo la liberación de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. Este evento puede, a su vez, inducir la señalización redox a través de la activación del metabolismo mitocondrial, provocando además la acumulación de H_2O_2 adicional. Este mecanismo de retroalimentación positiva se atenúa cuando el Ca^{2+} regresa de la matriz mitocondrial al RE [67], [68]. Este proceso puede ser beneficioso o perjudicial, dependiendo del contexto celular y de los niveles de ROS generados. De hecho, cantidades excesivas de Ca^{2+} mitocondrial conducen a niveles elevados de ROS, que pueden desencadenar la muerte celular [66]. Además, se ha descrito que la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial puede inhibir la eliminación de H_2O_2 , promoviendo su acumulación en la mitocondria [69].

2.3. La comunicación de las MAMs en enfermedades neurológicas

Tal y como se ha comentado anteriormente, la regulación de las MAMs es crucial para mantener una correcta homeostasis del Ca^{2+} y regular mecanismos clave en la función celular. Estos procesos (metabolismo lipídico, homeostasis del Ca^{2+} , dinámica mitocondrial y mantenimiento axonal) suelen estar implicados en la fisiopatología de la neurodegeneración. La disfunción mitocondrial da lugar a un desequilibrio

INTRODUCCIÓN

del Ca^{2+} , lo cual provoca alteraciones en el transporte axonal, la bioenergética, el estado redox, la contractilidad y la viabilidad celular [70]–[72]. Es evidente que la comunicación entre el RE y la mitocondria es esencial para la supervivencia y la degeneración axonal. De hecho, las MAMs están funcionalmente implicadas en la fisiología de los axones, las dendritas y el soma neuronal, modulando y manteniendo la actividad sináptica [73]–[76]. Por esta razón, el ensamblaje RE-mitocondria se ha propuesto como un mecanismo común en las enfermedades neurodegenerativas [77]–[80].

La primera descripción proteómica de las MAMs identificó proteínas implicadas en la disfunción mitocondrial, así como proteínas responsables de enfermedades neuromusculares y degenerativas, incluyendo la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer [23]. En la actualidad, existe evidencia acumulada sobre la localización de las proteínas implicadas en estas enfermedades en las MAMs [81]–[84]. En concreto, estas enfermedades presentan un aumento en los contactos entre el RE y la mitocondria, lo que conduce a una captación tóxica de Ca^{2+} mitocondrial, la reducción de la viabilidad celular y la disfunción de los mecanismos posteriores regulados en este dominio [78]–[80].

Por el contrario, varias neuropatías, como la esclerosis lateral amiotrófica, presentan una reducción en las conexiones entre el RE y la mitocondria, acompañadas de una acumulación de Ca^{2+} en el citosol, lo que desequilibra la comunicación entre los dos compartimentos y desencadena alteraciones mitocondriales. Estos defectos conducen a la vulnerabilidad de las neuronas, asociada directamente con la fisiopatología de la enfermedad [85]. En consonancia, las ataxias cerebelosas son enfermedades multifactoriales y progresivas con mecanismos comunes de desregulación mitocondrial, defectos en la regulación del Ca^{2+} y estrés oxidativo, que contribuyen a la neurodegeneración [86]. En concreto, se ha

descubierto que las ataxias espinocerebelosas de tipo 2 y 3 presentan mutaciones en el canal IP_3R , lo que conduce a una liberación anormal de Ca^{2+} al citoplasma, induciendo potencialmente defectos en la captación de Ca^{2+} mitocondrial [87]. Asimismo, diferentes modelos de la enfermedad neuromuscular denominada Ataxia de Friedreich (FRDA, del inglés *Friedreich's Ataxia*), objeto de nuestro estudio, presentan acumulación citosólica de Ca^{2+} , así como una incorporación de Ca^{2+} mitocondrial disminuida [88], [89]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo subyacente a esta alteración.

3. La Ataxia de Friedreich

La FRDA (OMIM núm. 229300) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva. Es la ataxia hereditaria más común en Europa, con una prevalencia de alrededor de 1 de cada 30.000 habitantes, aunque muestra grandes diferencias regionales [90]. La enfermedad afecta principalmente a individuos de origen indoeuropeo y afroasiático, mientras que la incidencia en amerindios, subsaharianos, chinos, japoneses y poblaciones del sudeste asiático parece ser residual [91]. La mayoría de casos (~96%) de FRDA están asociados a una expansión homocigótica de repetición del triplete GAA en el intrón 1 del gen *FXN* [92]. Los casos restantes (1-3%) están conformados por heterocigotos compuestos, con una expansión en un alelo y una mutación puntual, inserción o deleción en el otro [93]. En consecuencia, los pacientes de FRDA muestran niveles reducidos de frataxina (FXN), la proteína codificada por el gen *FXN* [94]. La longitud de la expansión disminuye la expresión de FXN, lo cual se asocia a un inicio más temprano de la enfermedad y a fenotipos más graves [95]–[97].

En 1863, Nikolaus Friedreich describió una patología caracterizada por una “atrofia degenerativa de las columnas posteriores de la médula espinal”. Desde el punto de vista clínico, Friedreich reconoció las principales características de la enfermedad: ataxia, neuropatía sensitiva,

INTRODUCCIÓN

escoliosis, deformidad del pie y cardiomiopatía [98]. En 1996, con el descubrimiento de la causa genética subyacente de la enfermedad, se amplió el espectro clínico [99].

La edad característica de debut de la FRDA es entre los 10 y 15 años, con la aparición de inestabilidad en la marcha y torpeza como síntomas iniciales. Además, los pacientes también desarrollan ataxia del tronco y de las extremidades, lo que dificulta las actividades diarias. La progresión de la enfermedad es diferente entre los pacientes, que aproximadamente 11-15 años tras su inicio requieren del uso de silla de ruedas [96], [100]. La aparición temprana de los síntomas se asocia a una progresión más acelerada de la enfermedad. De hecho, la FRDA de inicio tardío (primeros síntomas después de los 25 años) y la FRDA de inicio muy tardío (primeros síntomas después de los 40 años) son fenotipos atípicos de la enfermedad, con una progresión más lenta. La edad media de fallecimiento de los pacientes es de 36,5 años (rango de edad 12-87), siendo la disfunción cardíaca la causa más frecuente de muerte (59%) [101].

Clínicamente, la gravedad de la FRDA se evalúa y clasifica mediante diferentes escalas de calificación. Inicialmente se utilizó la *International Cooperative Ataxia Rating Scale* (ICARS; [102]), pero a partir de 2005 [103] surgieron otras dos escalas: la *Friedreich Ataxia Rating Scale* (FARS; [104]) y la *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA; [105]). Recientemente se ha desarrollado una versión modificada, la mFARS, que se centra en las capacidades funcionales de los pacientes [106] y se ha avalado con un estudio de más de mil participantes [107].

Por el momento, no se conoce cura para la FRDA. El tratamiento actual de los pacientes se basa en la fisioterapia, logopedia, la terapia ocupacional y la cirugía. Por ello, es esencial la búsqueda de aproximaciones terapéuticas que mejoren su calidad de vida, bien postergando la aparición de los síntomas y/o disminuyendo la progresión

de la enfermedad. La Omaveloxolona (Omap, RTA-408) es el único tratamiento que ha logrado alcanzar la variable de evaluación primaria (*primary endpoint*) de un ensayo clínico de FRDA. Tras su monitorización en ensayos de fase I y II, el fármaco ha demostrado ser seguro, además de mejorar significativamente la evaluación neurológica de los pacientes (mFARS) de forma dosis-dependiente [108], [109]. La Omap ha sido designada como medicamento huérfano para el tratamiento de la FRDA en la Unión Europea [110]. Actualmente, la compañía a cargo del fármaco, Reata Pharmaceuticals, ha solicitado a la FDA (*Food and Drug Administration*) su aprobación como tratamiento oral experimental de la FRDA. Se espera lanzar su comercialización a principios de 2023 [111].

3.1. Aspectos clínicos de la Ataxia de Friedreich

3.1.1. Características neurológicas

El amplio espectro neurológico de la FRDA se debe a alteraciones tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. La ataxia, el síntoma más común de la enfermedad, se produce por la degeneración espinocerebelosa, la neuropatía periférica sensitiva y la patología cerebelosa y vestibular (**Figura 2**) [112]. Los ganglios de la raíz dorsal (*Dorsal Root Ganglion* o DRG) se encuentran particularmente afectados en la FRDA, mostrando un menor tamaño de sus neuronas y una mayor proliferación de células satélite. En las raíces dorsales se produce una pérdida de los axones grandes y una atrofia de las fibras mielinizadas [113]. En los nervios sensitivos periféricos se producen cambios severos, generando una neuropatía sensitiva y una pérdida de las columnas posteriores, con potenciales de acción sensitivos severamente reducidos o completamente ausentes [114], [115]. El diámetro de la médula espinal se reduce, y la atrofia es particularmente prominente a nivel torácico, con pérdida evidente de los tractos corticoespinales y espinocerebelosos [116].

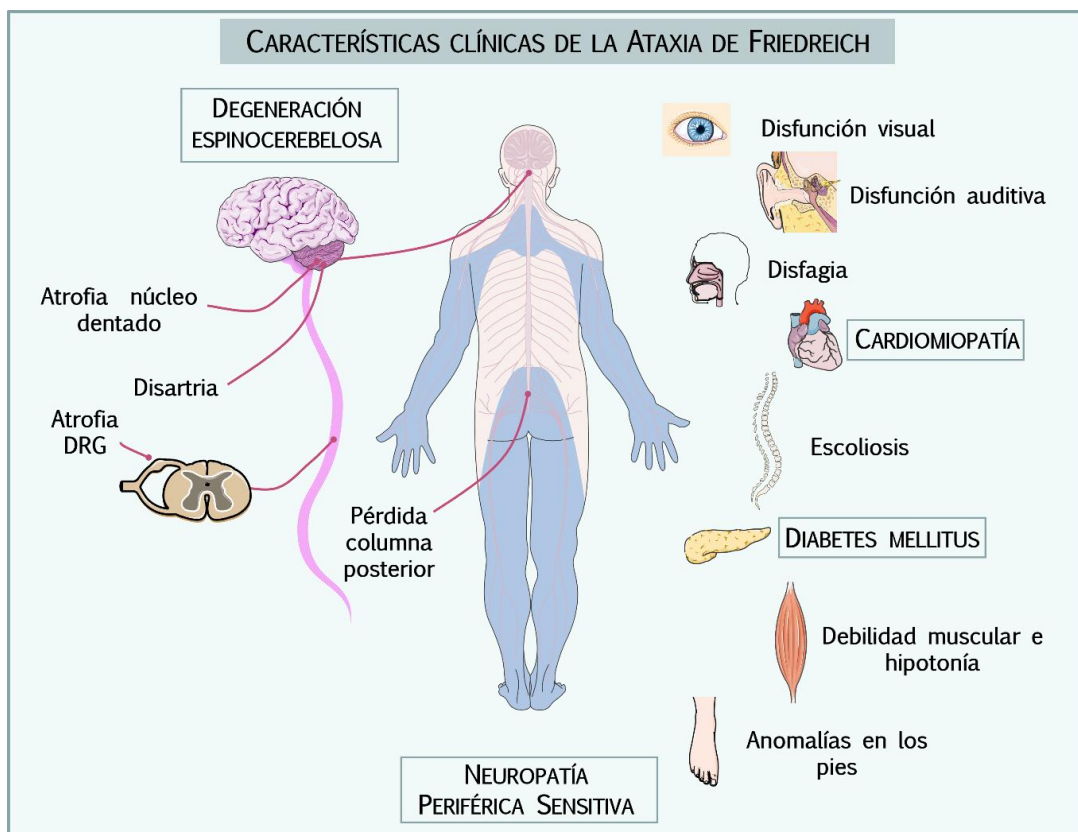


Figura 2: Características clínicas de la FRDA. Esta patología implica manifestaciones tanto neurológicas como no neurológicas. En ella, se ven afectados tanto el sistema nervioso central como el periférico, con degeneración espinocerebelosa, neuropatía periférica sensitiva y patología cerebelosa y vestibular. Los DRG se encuentran particularmente afectados, con un reducido tamaño de sus neuronas y pérdida de axones de la raíz dorsal. Además, los pacientes experimentan una pérdida progresiva de la propiocepción y los reflejos. La atrofia del núcleo dentado de cerebelo es evidente, lo cual desencadena la disartria. Otras características neurológicas incluyen la disfunción de los sistemas oculomotor y auditivo, además de la disfagia. Dentro de las características no neurológicas encontramos la cardiomiopatía, que es la principal causa de mortalidad en pacientes y puede ser dilatada o hipertrófica, con posible presencia de arritmias. Otras manifestaciones no neurológicas incluyen la escoliosis, diabetes mellitus, debilidad muscular e hipotonía y anomalías en los pies. DRG: *Dorsal Root Ganglion*. Figura original creada a partir de recursos *Creative Commons* de Servier Medical Art [393].

Se desconoce si esta neuropatía periférica es un efecto primario de la enfermedad o el resultado de la lesión en los DRG [117]. En consecuencia, los pacientes presentan alteraciones en la propiocepción, con reducción o pérdida de la percepción de la posición, la vibración, la temperatura, el dolor y el tacto ligero. Los reflejos están ausentes, especialmente en las extremidades inferiores, lo que refleja la neuropatía periférica subyacente. En consecuencia, los pacientes suelen mostrar una respuesta plantar extensora (signo de Babinski) y, en un porcentaje menor, también presentan espasticidad muscular, que a su vez puede causar dolor, contracturas y espasmos [113].

La principal lesión del sistema nervioso central es la atrofia selectiva del núcleo dentado del cerebelo, que se produce a medida que avanza la enfermedad. En ella, desaparecen las grandes células nerviosas y se pierden el control motor GABAérgico y glutamatérgico [118]. En estudios de resonancia magnética y morfometría se ha observado una reducción de la materia gris y blanca de los núcleos cerebelosos profundos y del tronco cerebral, mostrando una atrofia evidente [119], [120]. La disartria es otro síntoma primario en la FRDA, que está directamente relacionada con las lesiones cerebelosas. En estadios avanzados de la enfermedad, el habla se vuelve ininteligible [121] y los pacientes comienzan a presentar dificultades en la formación de conceptos y el razonamiento visoespacial [122].

Los pacientes pueden presentar disfunción auditiva debido a la alteración de la conducción nerviosa a nivel de las vías auditivas centrales [123]. El sistema visual también puede verse afectado en la FRDA, ya que hasta un 73% de los pacientes presentan anomalías neuro-oftalmológicas. Son frecuentes la degeneración progresiva del nervio óptico y la reducción del grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina. También puede verse afectado el sistema oculomotor, presentando inestabilidad en la fijación de la mirada, con frecuentes sacudidas de onda cuadrada (*Square Wave Jerks*

INTRODUCCIÓN

o SWJ), movimientos sacádicos y nistagmo [124], [125]. La disfagia (dificultad para tragar) es problemática en fases avanzadas de la enfermedad, lo cual puede conllevar a la inserción de una sonda de alimentación por gastrostomía. La disfagia persistente puede derivar en una neumonía causada por broncoaspiración de alimentos, una de las causas destacadas de mortalidad en los pacientes [126].

3.1.2. Características no neurológicas

A pesar de que la FRDA se describe como un trastorno neurológico, su fenotipo muestra disfunción multisistémica, afectando principalmente al miocardio, el páncreas endocrino y el sistema musculoesquelético.

Cabe destacar que la cardiomiopatía (dilatada, hipertrófica y/o presencia de arritmias) está estrechamente asociada con la FRDA, causando anomalías en la pared cardíaca en la mayoría de los pacientes (85%). Supone la principal causa de muerte de la enfermedad, en concreto, por insuficiencia cardíaca o arritmias. Un análisis de imagen cardíaca con 205 pacientes reveló que las escalas neurológicas no son capaces de predecir la gravedad de las condiciones cardíacas, y que la edad de debut de la enfermedad se relaciona estrechamente con el nivel de disfunción cardíaca [127]. Este aspecto se ha confirmado en otros estudios independientes. Por ejemplo, Tsou y colaboradores también observaron que cuando la causa principal de muerte era la disfunción cardíaca, estos pacientes mostraban arritmia y cardiomiopatía dilatada en las primeras fases del curso de la enfermedad [128]. Una característica principal de la cardiomiopatía en la FRDA es la miocarditis crónica. Los pacientes muestran células inflamatorias en el endomisio, adhesión de monocitos a los cardiomiocitos y necrosis de las fibras cardíacas [129]. En la mayoría de los pacientes también están presentes las anomalías de la pared cardíaca, como la hipertrofia del ventrículo izquierdo, aunque la fracción de eyección suele estar conservada [130]. El electrocardiograma es anormal en casi todos los

casos, con inversión de la onda T o aplanamiento en derivaciones laterales o inferiores, y alteraciones del segmento ST [131]. Las taquiarritmias supraventriculares pueden aparecer en fases avanzadas de la enfermedad. Entre ellas, la fibrilación auricular es la más común y su presencia tiene implicaciones pronósticas negativas [132].

Además, los pacientes con FRDA tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus e intolerancia a la glucosa. La diabetes suele aparecer en edades avanzadas tras los primeros síntomas de la FRDA. El mecanismo subyacente a la diabetes puede deberse a una combinación entre la resistencia a la insulina y la deficiencia de insulina, derivadas de la apoptosis de las células β pancreáticas [133], [134]. Asimismo, los pacientes muestran grasa abdominal que se correlaciona con la disfunción de las células β . Existen estudios que sugieren que la lipogénesis está aumentada en la FRDA, contribuyendo a la resistencia a la insulina [135], que junto con la reducida actividad física de los pacientes puede promover el síndrome metabólico [136]. De hecho, un estudio realizado en plaquetas aisladas de pacientes observó un incremento en el metabolismo lipídico, que apoya firmemente un cambio metabólico en los pacientes [137]. Las anomalías musculoesqueléticas en la FRDA incluyen la escoliosis e irregularidades en los pies, especialmente el pie cavo y pie equinovaro, que empeoran la estabilidad y la movilidad [138].

3.2. Genética molecular de la Ataxia de Friedreich

FXN es una pequeña proteína muy conservada a lo largo de la evolución. En humanos, está codificada en el núcleo por el gen *FXN*, situado en el *locus* 9q21.11 (versión GRCh38.p13 [GCF_000001405.39]). En la mayoría de los casos, la FRDA se produce cuando la transcripción del gen *FXN* se reduce debido a una expansión anómala del trinucleótido GAA localizada en una secuencia Alu del intrón 1 del mismo gen (**Figura 3A**).

INTRODUCCIÓN

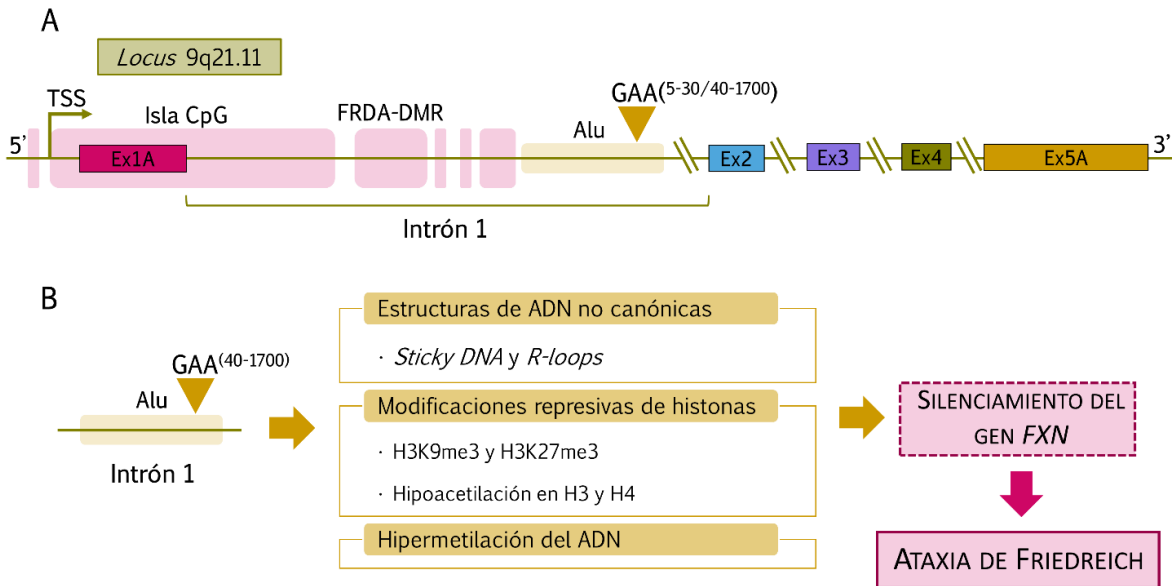


Figura 3: Estructura del gen *FXN* y mecanismos genéticos aberrantes de la FRDA. (A) El gen *FXN* se encuentra en el locus 9q21.11. La isoforma canónica y más abundante de *FXN* está codificada por 5 exones (Ex). En color rosa se muestran las principales regiones 5' susceptibles de metilación, como la isla CpG situada en el extremo 3' del sitio de iniciación de la transcripción (TSS) y la región diferencialmente metilada en pacientes (FRDA-DMR) descrita por Rodden *et al.* [150]. En amarillo se destaca la región Alu, donde se encuentra la expansión GAA, y se indican el rango de repeticiones fisiológica y patológica respectivamente. Imagen inspirada en Rodden *et al.* 2020. TSS: *Transcriptional Start Site*; FRDA-DMR: *Friedreich's Ataxia Differentially Methylated Region*. (B) Mecanismos de silenciamiento del gen *FXN*. Un número de repeticiones GAA patológico en el intrón 1 da lugar a diferentes procesos que provocan el silenciamiento del gen *FXN*, lo cual desencadena la FRDA. Figura original.

Los tramos de expansión del trinucleótido GAA contienen entre 5 y 30 repeticiones en individuos sanos, mientras que el umbral de repeticiones patológico parece estar por encima de 40. El rango de repeticiones más común en pacientes de FRDA suele estar entre 600 y 900, aunque se han llegado a secuenciar hasta 1700 [139]. La tasa de portadores del alelo con la expansión patológica en Europa es de ~1 de cada 85

individuos. Cabe destacar que éstos son sanos, siendo heterocigotos para los alelos de expansión fisiológica y patológica [95].

El silenciamiento del gen *FXN* ha sido objeto de especulación en los últimos años, cuyo mecanismo subyacente parece ser el resultado de un conjunto de procesos no excluyentes, de acuerdo con la variedad de observaciones descritas en diferentes modelos animales y celulares (**Figura 3B**). Existe una amplia evidencia de estudios que apuntan a un bloqueo físico de la transcripción provocada por la expansión intrónica GAA, aunque en los últimos años, los mecanismos de represión epigenética han tomado protagonismo. Por un lado, se ha observado que las repeticiones GAA · TTC dan lugar a la formación de estructuras de ADN no canónicas (*Sticky DNA*) y estructuras híbridas de ADN-ARN (*R-loops*). En consecuencia, provocarían el secuestro de la ARN polimerasa II a través de las repeticiones, lo cual impediría la iniciación y elongación de la transcripción [140]–[142].

Adicionalmente, se han descrito modificaciones represivas de histonas en la FRDA, conduciendo al desequilibrio entre la cromatina transcripcionalmente activa (eucromatina) e inactiva (heterocromatina). Particularmente, se ha observado un incremento en la trimetilación de histonas (H3K9me3 y H3K27me3) e hipoacetilación en los residuos de lisina de las H3 y H4 de las regiones flanqueantes a los tramos de expansión GAA [143]–[145]. De este modo, el silenciamiento del gen *FXN* podría ser el resultado de una heterocromatinización anormal en esta región, haciéndola transcripcionalmente inactiva. Sin embargo, en la actualidad se desconoce si las modificaciones observadas son las desencadenantes del silenciamiento del gen o una consecuencia de la regulación negativa de la transcripción. Es interesante destacar que el tratamiento con inhibidores de las histonas deacetilasas y otras moléculas dirigidas a la cromatina han logrado estimular la transcripción de *FXN* en modelos animales y celulares de FRDA [144]–[147]. En esta línea, un estudio reciente en células madre

INTRODUCCIÓN

pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem Cells* o iPSCs) ha destacado la importancia de eliminar el tramo de repeticiones GAA junto con sus regiones intrónicas flanqueantes mediante la tecnología CRISPR/Cas9. La escisión de estas regiones revertiría el estado de heterocromatinización de *FXN*, provocando su reactivación y consecuente rescate del fenotipo observado en el modelo. Estos resultados aportan evidencia sobre el impacto directo de la represión de la cromatina sobre la expresión de *FXN* [148].

Por otro lado, también se han relacionado otros mecanismos epigenéticos aberrantes con la FRDA, como la hipermetilación del ADN, un mediador crucial de la expresión génica [149]. El promotor *FXN* está asociado a islas CpG que se extienden desde la región 5' no traducida, el exón 1 y la región proximal (extremo 5') al intrón 1 (**Figura 3A**). La alta prevalencia y densidad de sitios CpG entre el promotor *FXN* y la expansión de repeticiones GAA hacen que esta región sea óptima como diana de metilación, especialmente debido a cromatina represiva presente en la FRDA [150]. Un análisis cuantitativo en células de sangre periférica de pacientes de FRDA confirmó una metilación anormalmente extensiva en la región 5' proximal a la región de expansión del *locus FXN* [151]. Estos niveles de metilación se correlacionan inversamente con la expresión de *FXN*, la edad de aparición de los síntomas y la puntuación en la escala FARS de los pacientes, lo cual sugiere un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad [152]. Asimismo, un estudio reciente con 73 pacientes de FRDA ha identificado una región diferencialmente metilada en el extremo proximal 5' al tramo de expansión GAA del intrón 1. Esta región, denominada FRDA-DMR, presenta una gran variedad en el patrón de metilación epialélica de cada individuo, lo cual se correlaciona significativamente con la deficiencia transcripcional de *FXN* y el inicio de la enfermedad. De este modo, la metilación en la región FRDA-DMR supone una novedosa firma epigenética para la FRDA [150].

4. Estructura y maduración de Frataxina

Inicialmente, la FXN humana en su forma canónica madura, se describió exclusivamente como una proteína de matriz mitocondrial asociada a la membrana mitocondrial interna [94]. Se traduce en el citoplasma como un precursor de 210 aminoácidos (23 kDa), que posteriormente es transportado a la mitocondria debido a una señal de localización mitocondrial (*Mitochondrial Targeting Sequence* o MTS) situada en su extremo N-terminal. La maduración de FXN implica un proceso de dos pasos por parte de la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP o *mitochondrial processing peptidase*), que elimina el MTS de FXN una vez importada a la mitocondria. El primer corte proteolítico se produce en Ala55/Ser56, mientras que el segundo se produce en Lys80/Ser81 (**Figura 4A**). De este modo, la FXN canónica puede

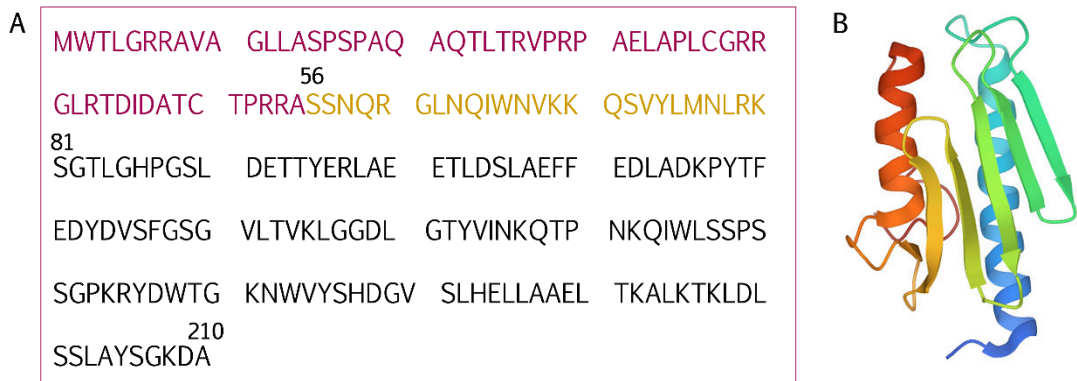


Figura 4: Secuencia proteica y estructura tridimensional de FXN. (A) El transcrito canónico de FXN se traduce como una proteína de 210 aminoácidos con un péptido señal dirigido a mitocondria (MTS) en el extremo N-terminal. Una vez importada a la mitocondria, FXN sufre dos cortes proteolíticos en los residuos Ala55/Ser56 y Lys80/Ser81, lo cual dará lugar a la forma madura de la proteína (FXN^{N81-210}), de 130 aminoácidos. Los colores representan los dos cortes llevados a cabo por la peptidasa de procesamiento mitocondrial. Secuencia obtenida de GenBank: NM_000144.5. Figura original (B) El plegamiento tridimensional de FXN da lugar a una estructura en forma de sándwich α - β con dos hélices α y una lámina β compuesta de cinco hebras. Imagen obtenida de la base de datos RCSB *Protein Data Bank*: 10.2210/pdb3S4M/pdb

INTRODUCCIÓN

encontrarse en forma de precursor (FXN¹⁻²¹⁰), forma intermedia (FXN⁵⁶⁻²¹⁰) y madura (FXN⁸¹⁻²¹⁰), siendo esta última de 130 aminoácidos (14.2 kDa), la más abundante en controles y pacientes [153], [154]. En general, FXN se expresa principalmente en tejidos con alta tasa metabólica, como el corazón, el músculo esquelético, el hígado y el páncreas [92], [155]. Adicionalmente, estudios modernos de RNA-seq han identificado su expresión enriquecida en tejidos endocrinos, ovario y médula ósea (**Figura 5**).

La forma madura de FXN se presenta plegada en un motivo estructural de sándwich α - β - α (**Figura 4B**). Mientras que el extremo N-terminal (81-90) se compone de residuos poco conservados dispuestos de forma desestructurada, el extremo C-terminal (90-210) está muy conservado evolutivamente. Este último se compone de una lámina β de siete hebras antiparalelas que forman una superficie plana en un lado y dos hélices α en el otro. La primera hélice α y la hebra β a continuación presentan 12 aminoácidos conservados, que definen una región ácida con una superficie cargada negativamente, responsable de su unión con iones metálicos. Además, las cinco hebras centrales de la lámina β se componen de residuos altamente conservados en eucariotas, incluyendo el Trp155, estrictamente conservado. Esto hace que la región se considere como la funcionalmente importante, siendo la que media de forma específica su interacción con otras proteínas [156], [157].

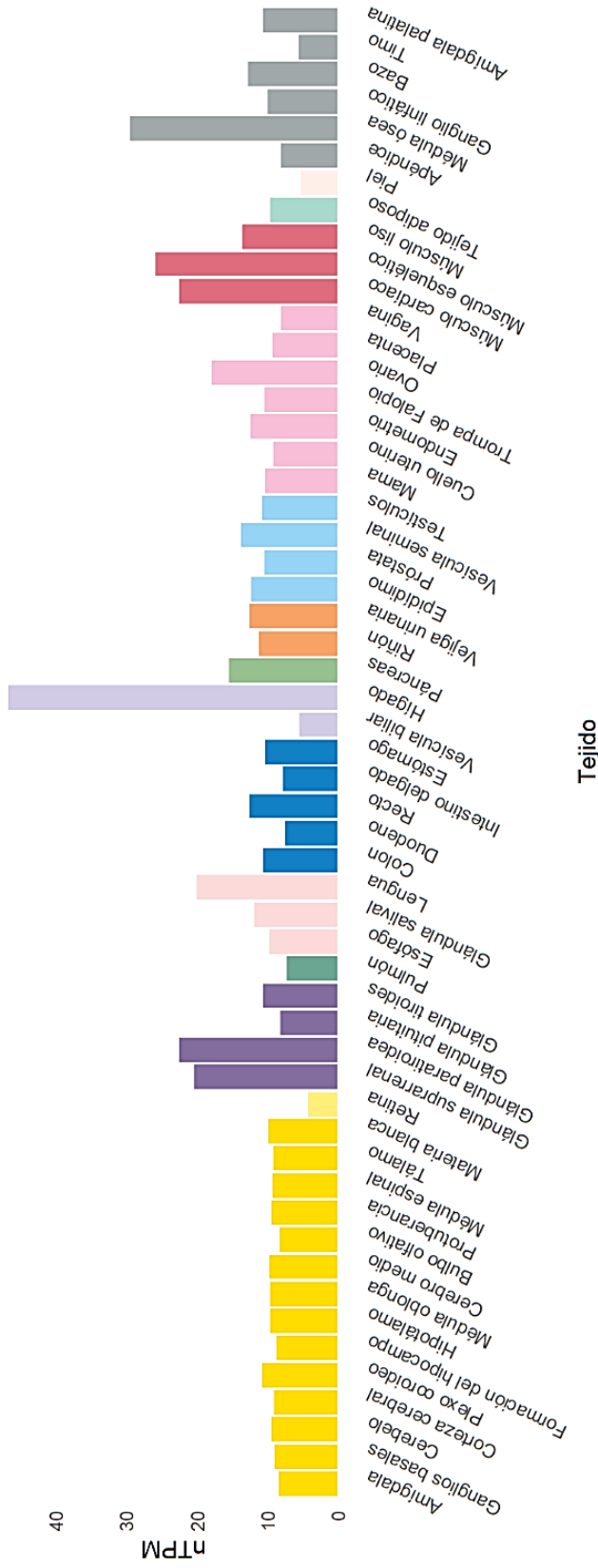


Figura 5: Datos consenso de expresión de mRNA de FFXN. Niveles de expresión del transcrito del gen FFXN en 55 tejidos humanos basados en datos transcriptómicos de las bases de datos *Human Protein Atlas* (HPA) y *Genotype-Tissue Expression* (GTEx). El valor de expresión consensuado normalizado (nTPM) se calcula como el valor máximo de nTPM en ambas bases de datos. Para los tejidos con múltiples regiones (regiones cerebrales, tejido linfóide e intestino), se ha utilizado el valor máximo de la región para todo el tejido. El código de color se basa en grupos de tejido, agrupándolos según características funcionales comunes. Los datos, obtenidos de HPA versión 21.0 y Ensembl versión 103.38, se han generado con R [394].

5. Isoformas de frataxina

Desde el comienzo de su conceptualización, la FRDA se ha considerado una enfermedad centrada en la mitocondria, debido al papel que FXN desempeña en este compartimento. Sin embargo, a lo largo de los últimos años se ha comenzado a mostrar interés en su estudio extramitocondrial. Así, diferentes autores han demostrado la existencia de FXN madura extramitocondrial y/o la expresión de diferentes isoformas de esta proteína (**Figura 6** y **Tabla 1**). En 2002 se identificó un transcrito del gen *FXN* generado a partir de *splicing* alternativo (isoforma A1), que difería en 14 aminoácidos con el extremo C-terminal de la secuencia canónica de FXN [158]. Más tarde, varios autores describieron la localización citosólica funcional de FXN en diferentes modelos celulares humanos [159]–[161]. En 2012, Xia *et al.* identificaron nuevos transcritos humanos que difieren en el extremo N-terminal con la FXN canónica, con diferente localización subcelular y distribución tisular [162]. Estas isoformas se denominan FXN II (FXN⁷⁶⁻²¹⁰) y FXN III (FXN^{1-5,53-210}), y se generan a partir de *splicing* alternativo. Por un lado, la FXN II (14,9 kDa) se transcribe a partir de exones iniciales alternativos (Exón 1B y 1BΔ18), lo cual provoca que la proteína se traduzca a partir de la segunda metionina (Met76) situada en el exón 2 y pierda el MTS. A su vez, FXN III (18,2 kDa) también carece del MTS, ya que se obtiene por *splicing* alternativo del exón 1A (Exón 1AΔ141), lo cual origina una delección de 141 nucleótidos en el extremo N-terminal. Se ha demostrado que son específicas de tejido, siendo FXN II prevalente en el cerebelo y FXN III, la isoforma más abundante en el corazón. Esto hace que ambas proteínas puedan ser relevantes en la fisiopatología de la FRDA, ya que estos tejidos son de los más afectados en la enfermedad. De hecho, los autores observaron que la deficiencia de FXN II en muestras de cerebelo de pacientes de FRDA era mayor que la deficiencia de ARNm de FXN total. Además, su distribución subcelular parece ser también distinta: FXN II se localiza en el citosol, mientras que FXN III es nuclear [162]. La

caracterización funcional de ambas isoformas indica que FXN II podría estar implicada en la protección de los ISC's del daño oxidativo [162] y en la dinámica y respiración mitocondrial [163]. Por otro lado, la isoforma III podría activar la biogénesis de los ISC's mitocondriales [162].

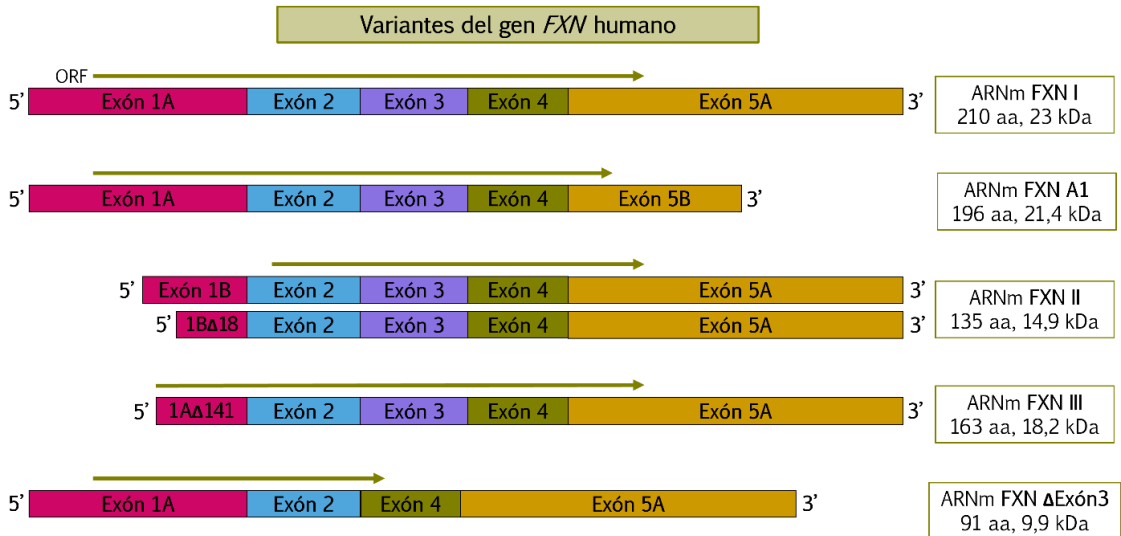


Figura 6: Representación de las variantes de *splicing* del gen *FXN* humano. Se han descrito cinco isoformas originadas a partir de *splicing* alternativo del gen *FXN*. De ellas, las cuatro primeras están codificadas por cinco exones. (i) En primer lugar, la isoforma canónica (*FXN* I) está formada por los exones 1-5. (ii) La isoforma A1 comparte con esta los exones 1-4, pero posee un exón 5B alternativo que hace que la proteína resultante difiera en 14 aminoácidos de *FXN* I en C-terminal. El MTS se encuentra en el exón 1A, por lo que ambas isoformas se localizarían en la mitocondria. (iii) El transcrito de *FXN* II comparte los exones 2-5 con *FXN* I y contiene un exón alternativo 1B o 1B que carece de 18 nucleótidos (1B/1BΔ18), lo cual provoca que *FXN* II se traduzca desde el exón 2, dando lugar a una isoforma truncada en extremo N-terminal que carece del MTS y se localiza en el citosol. (iv) *FXN* III difiere de *FXN* I en el exón 1AΔ141, lo cual genera una deleción de 141 aminoácidos en el N-terminal de la proteína y provoca la pérdida del MTS. Su localización subcelular principal se ha descrito en la mitocondria. (v) La isoforma ΔExón3 comparte los exones 1-2, 4-5 con *FXN* I y carece del exón 3, presente en el resto de las variantes, lo cual modifica la pauta de lectura y da lugar a una proteína de 91 aminoácidos. Las flechas verdes oscuro representan el marco de lectura abierto (*Open Reading Frame* u ORF). MTS: *Mitochondrial Targeting Sequence*. Figura original.

INTRODUCCIÓN

Recientemente, se ha identificado una isoforma (FXN⁷⁶⁻²¹⁰, isoforma E) acetilada en el extremo N-terminal y enriquecida en eritrocitos. Parece ser que también se traduce a partir del exón 1B/1B Δ 18 y su secuencia proteica coincide con la anteriormente identificada como FXN II. Al igual que esta, carece de MTS. Los autores observaron su distribución subcelular en el núcleo además de la citosólica ya descrita, lo cual sugiere un papel extramitocondrial en ambos compartimentos [164]. Un estudio reciente ha estudiado en profundidad algunos aspectos genómicos y epigenéticos en relación con la variante FXN II/isoforma E. Los autores señalaron la existencia de un segundo promotor específico para el exón 2B, que codifica para la FXN II en el extremo 3' proximal al exón 1A. Asimismo, y de acuerdo con datos de RNAseq de la base de datos EPDnew, esta isoforma se expresa principalmente en el sistema nervioso central y otros tipos celulares, aunque a niveles menores que la FXN canónica. También confirmaron la deficiencia de esta isoforma en muestras de sangre de pacientes de FRDA, siendo más severa que la deficiencia de FXN I. Esto se correlaciona inversamente con los niveles de metilación en la región FRDA-DMR, al igual que con el número de repeticiones GAA en el alelo más corto de los expandidos en pacientes [165].

Por último, Xia *et al.* también identificaron un transcrito idéntico al canónico que carece del exón 3 (Δ exón3) y que codificaría una proteína de 91 aminoácidos [162]. A pesar de que puede encontrarse anotada en varias bases de datos (**Tabla 1**), no hay más información disponible por el momento acerca de esta isoforma. En este contexto, también se ha descrito la existencia de una isoforma truncada con localización citosólica el ratón (Fxn⁷⁹⁻²⁰⁷) [166], [167], siendo esta más abundante que la isoforma canónica en el corazón, cerebro e hígado [167]. No obstante, la función y la expresión tisular de las isoformas, así como su papel en la fisiopatología de la FRDA, se encuentran actualmente en discusión. No existe un consenso sobre la anotación, nomenclatura y clasificación de las secuencias de variantes

alternativas de *splicing* del gen *FXN*, ya que la literatura se centra, principalmente, en la variante canónica. La **Figura 6** y la **Tabla 1** recogen información sobre las isoformas descritas hasta el momento.

Nombres	Exones	Tamaño proteína	Localización subcelular	Expresión en tejido	Anotaciones y referencias
FXN canónica, FXN I, variante 1, FXN-203	1A,2-5	210 aa (23 kDa)	Mitocondria	Ubicua	GenBank: NM_000144.5 Ensembl: ENST00000484259.3 Campuzano <i>et al.</i> 1997 [94]
FXN isoforma A1, variante 2 FXN-202	1-4, 5B	196 aa (21.4 kDa)	Mitocondria	-	GenBank: NM_181425.3 Ensembl: ENST00000396366.6 Pianese <i>et al.</i> 2002 [158]
FXN II, isoforma E FXN-204	1B/1BΔ18, 2-5	135 aa (14,9 kDa)	Citosol y núcleo	Cerebelo, músculo esquelético, eritrocitos (N-acetilada)	GenBank: DA102669.1 GenBank: AK308620.1 Ensembl: ENST00000498653.5 Xia <i>et al.</i> 2012 [162] Pérez-Luz <i>et al.</i> 2015 [166] Guo <i>et al.</i> 2018 [164]
FXN III	1AΔ141, 2-5	163 aa (18,2 kDa)	Núcleo	Corazón	Xia <i>et al.</i> 2012 [162] Pérez-Luz <i>et al.</i> 2015 [166]
ΔExon3, isoforma 3 FXN-205	1-2,4-5	91 aa (9.9 kDa)	-	<i>Pool</i> de corazón, hígado, cerebro, testículos y placenta	GenBank: KU178080.1 Ensembl: ENST00000644653.1 Xia <i>et al.</i> 2012 [162]

Tabla 1: Variantes de *splicing* del gen *FXN*. La tabla recoge información sobre los diferentes nombres de las variantes que se encuentran en la literatura y bases de datos (GenBank, Ensembl). También se muestran los exones que conforman el transcrito de cada isoforma, el tamaño de la proteína en aminoácidos (aa), su peso molecular en kilodaltons (kDa) y los tejidos y compartimentos subcelulares en los que se ha descrito su expresión. En la última columna se recogen las bases de datos en las que se encuentra anotada cada variante, así como las referencias relacionadas con cada una.

6. Fisiopatología molecular de la Ataxia de Friedreich

Se ha propuesto la participación de FXN en diversos procesos celulares. Sin embargo, su función biológica es, en gran medida, desconocida. Los primeros estudios llevados a cabo en diferentes tejidos y células derivadas de pacientes observaron una actividad deficiente en los *clusters* de hierro-azufre (*Iron Sulfur Clusters* o ISCs) presentes en enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial y del ciclo de Krebs [168], [169]. Los ISCs son cofactores prostéticos responsables de la actividad de diferentes enzimas que intervienen en el metabolismo energético, el metabolismo del hierro, la síntesis de purinas y la reparación del ADN. En este contexto, varios autores han señalado a FXN como estimuladora de la biogénesis de los ISCs, al facilitar la transferencia de grupos funcionales persulfuro (R-S-S-H) [170]–[172]. A pesar de que este papel de FXN es, en la actualidad, ampliamente aceptado entre la comunidad de la FRDA, diferentes observaciones experimentales han cuestionado el impacto real de su función en la biosíntesis de ISCs sobre la neurobiología de la enfermedad. De hecho, se han descrito defectos moleculares y fisiológicos en modelos de FRDA incluso cuando los déficits en los ISCs mitocondriales son indetectables o ausentes [173]–[175]. En consonancia, se ha observado la recuperación de la síntesis de ISCs en varios modelos deficientes de FXN sin llegar a restaurar sus niveles [176]. Por tanto, estas observaciones hacen evidente que FXN debe tener otras funciones adicionales que participen en la fisiopatología de la FRDA.

Por otro lado, se ha observado que FXN interviene en otros procesos celulares cruciales, como el control de la homeostasis del hierro celular [177], actuando como proteína de almacenamiento y transporte de hierro [178], [179], involucrada en la maduración de grupos hemo [180], [181] y en el reciente descrito mecanismo de muerte celular hierro-dependiente denominado ferroptosis [182], [183]. Se han señalado otros procesos, como su interacción con la cadena de transporte de electrones, regulando la fosforilación oxidativa [184], [185]. También se ha sugerido su papel protector frente al estrés oxidativo, a través de la reducción de ROS [186], [187], así como su interacción con enzimas antioxidantes como la SOD2 [188]. En la última década se ha propuesto un papel para la FXN en la homeostasis del Ca^{2+} como elemento clave para la fisiopatología de la enfermedad [88], [89], [189], [190]. A pesar de ello, es necesario indagar en la función de FXN en estos procesos moleculares, para así esclarecer su papel en la fisiopatología de la FRDA.

Tanto en los modelos animales y celulares de FRDA, como en modelos de células derivadas de pacientes, se ha observado disfunción mitocondrial (**Figura 7**). Esta se caracteriza principalmente por alteraciones metabólicas en la producción de energía y el metabolismo lipídico, en la que también se han visto afectadas, la homeostasis del Ca^{2+} y el hierro, y la dinámica y biogénesis mitocondrial. Todo ello acompañado de un estrés oxidativo exacerbado. Estas vías se presentan como potenciales dianas farmacológicas de la enfermedad, aunque aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares subyacentes.

INTRODUCCIÓN

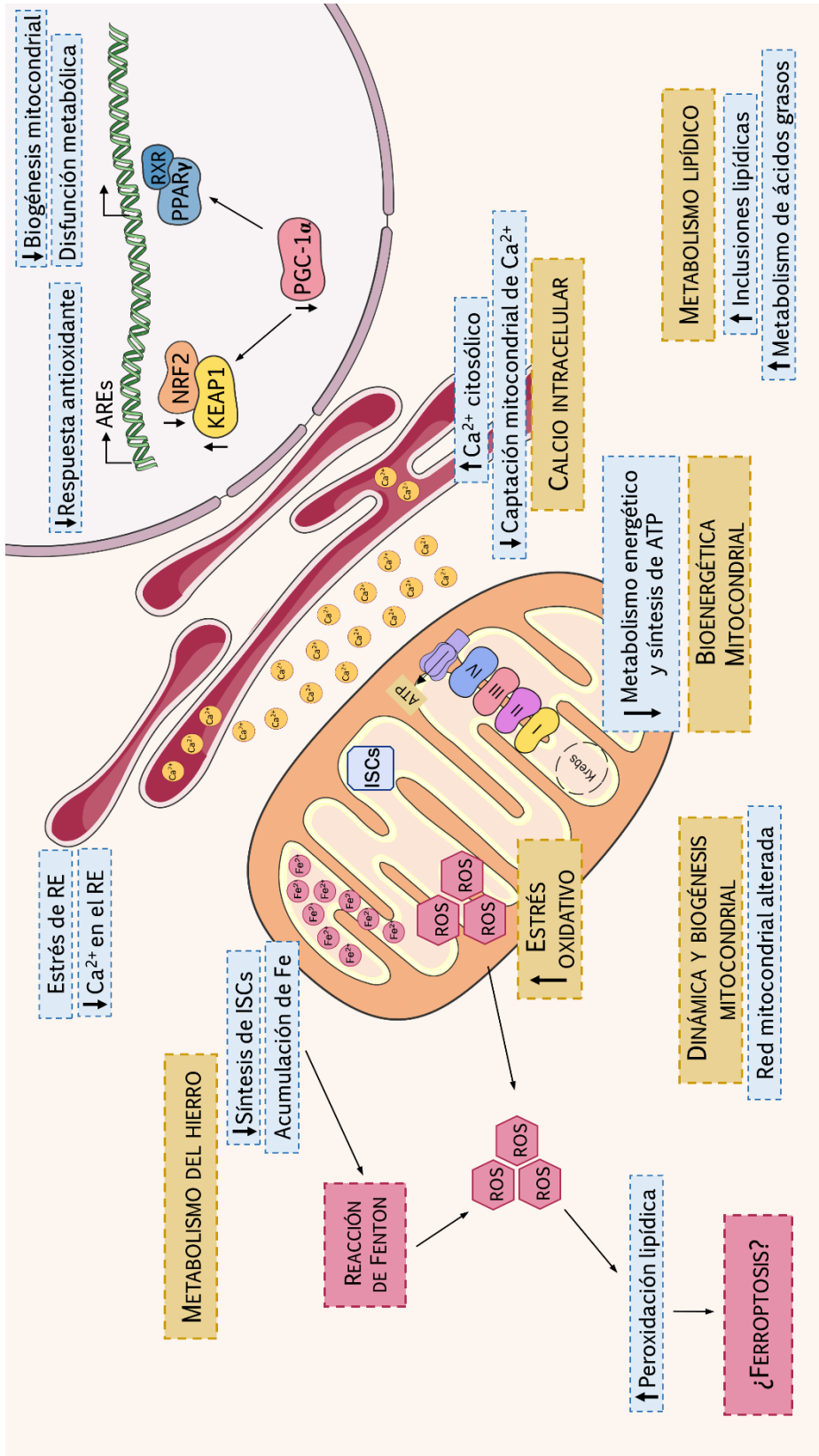


Figura 7: Resumen de las características moleculares de la Ataxia de Friedreich (FRDA). En la FRDA se han observado alteraciones en vías de señalización relacionadas fundamentalmente con el metabolismo y la función mitocondrial. Diferentes modelos deficientes en FXN y células derivadas de pacientes presentan un fallo en la bioenergética mitocondrial, causado por deficiencias en el ciclo de Krebs, donde destaca la disfunción de la enzima aconitasa. También existe un déficit de ATP provocado por una baja actividad de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Asimismo, se ha descrito una alteración metabólica de lípidos, en la que diferentes los modelos muestran inclusiones lipídicas y/o un aumento en el metabolismo de los ácidos grasos. La participación de FXN en el metabolismo del hierro conlleva a una acumulación intracelular de este ion en la FRDA, facilitando la generación de ROS a través de la reacción de Fenton. Esto conlleva a un aumento de la peroxidación de lípidos, que podría desencadenar la muerte celular por ferroptosis. En este contexto, el estrés oxidativo es uno de los factores más característicos en modelos y pacientes de la FRDA. Aunque la generación de ROS se da principalmente por el fallo energético mitocondrial, otras vías de señalización redox se encuentran también desreguladas, como la homeostasis del GSH y las rutas reguladas por NRF2. Todo ello provoca una menor disponibilidad y expresión de factores de respuesta antioxidante. La dinámica y biogénesis mitocondrial también se encuentran afectadas en la FRDA, provocando redes mitocondriales alteradas y un desequilibrio en las vías de señalización mediadas por PGC-1 α /PPAR γ . Por último, en los últimos años ha crecido evidencia sobre la alteración de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular, con acumulaciones de Ca²⁺ citosólico anormales, una capacidad de captación de Ca²⁺ reducida y menores depósitos de Ca²⁺ en el RE. Todas estas rutas contribuyen a la fisiopatología de la FRDA, aunque en la actualidad es necesario dilucidar muchos de los mecanismos subyacentes a estas alteraciones. AREs: *Antioxidant response elements*; ISCs: *Iron-sulfur clusters*; KEAP1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*; NRF2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*; PGC-1 α : *Peroxisome Proliferator-Activated Co-Activator 1- α* ; PPAR γ : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*; ROS: *Reactive oxygen species*; RxR: *Retinoid x receptor*. Figura original creada a partir de recursos *Creative Commons* de Servier Medical Art [393].

INTRODUCCIÓN

6.1. Bioenergética mitocondrial

La mitocondria es el compartimento involucrado en procesos esenciales como la regulación de la apoptosis y el metabolismo energético. La producción de energía es crucial para el crecimiento celular y el mantenimiento de las rutas metabólicas. Específicamente, la cadena de transporte de electrones participa en la respiración celular, situada en la membrana mitocondrial interna, que genera un gradiente de protones que permite la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa. De hecho, los tejidos y órganos con una alta demanda energética, como las neuronas del sistema nervioso central, incrementan la función respiratoria para cubrir estas necesidades [191]. Sin embargo, cuando la cadena de electrones y la actividad de las enzimas implicadas en la fosforilación oxidativa sufren una desregulación, se ven afectados tanto el potencial de membrana mitocondrial como la producción de ATP [192].

La deficiencia de FXN se ha asociado a una desregulación energética, debido a su estrecha relación con el mantenimiento de la bioenergética mitocondrial. Esto se debe a su interacción con la enzima Succinato deshidrogenasa y varios complejos de la cadena de transporte de electrones (I,II y III) [185], así como su actividad moduladora de la aconitasa mitocondrial [193]. En consecuencia, modelos celulares y murinos de la enfermedad han manifestado deficiencias en el ciclo de Krebs, la actividad de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, así como una consecuente disminución en la síntesis de ATP [88], [194], [195]. Por ejemplo, un análisis proteómico de un modelo KO (*Knock Out*) de FXN destacó una notable disminución en la expresión de enzimas del metabolismo del ATP y complejos de la cadena de transporte de electrones, así como una disminución en enzimas del ciclo de Krebs, el catabolismo de aminoácidos ramificados y cetonas y la descarboxilación del piruvato. Todo ello sugiere su relación con la patogénesis de la cardiomiopatía observada en el modelo [196].

Por otro lado, la utilización de oxígeno por parte de la mitocondria para la biosíntesis energética es uno de los principales contribuyentes del estrés oxidativo celular. Por tanto, un trastorno en la eficiencia de la cadena de transporte de electrones puede desencadenar un incremento en la generación de ROS, provocando un desequilibrio en el estado redox evidente en muchas enfermedades neurodegenerativas, como ocurre en la FRDA.

6.2. Estrés oxidativo

En los primeros estudios moleculares, el incremento del estrés oxidativo fue uno de los signos distintivos más destacados de la enfermedad. La identificación de depósitos de hierro en los cardiomiocitos de los pacientes [169], [197] y la conocida biología redox del hierro a través de la reacción de Fenton [198] fueron los primeros elementos que sugirieron esa estrecha relación. En la reacción de Fenton, el hierro reducido (Fe^{2+}) reacciona con el H_2O_2 para producir Fe^{3+} oxidado y el radical hidroxilo $\text{HO}\cdot$. Además, en condiciones fisiológicas, se producen otras ROS, como el anión superóxido O_2^- , debido a una fuga durante el transporte de electrones en el proceso de respiración.

En el contexto de la FRDA, los defectos en la respiración celular incrementan la fuga de electrones que, junto con el exceso concomitante de hierro libre en la mitocondria, contribuyen con el aumento de los niveles de ROS [199], incluso en aquellos tejidos que muestran una regulación alterada de iones metálicos sin acumulación de los mismos [177]. Asimismo, diferentes modelos de FRDA presentan niveles elevados de peroxidación lipídica y ROS, así como alteraciones en la homeostasis del glutatión (GSH)[182], [200]–[202]. En concordancia, se han encontrado niveles elevados de malondialdehído (MDA, producto de la peroxidación lipídica) [203], un aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG, indicador de ADN oxidado) [204] y una mayor actividad de la enzima glutatión S-transferasa en sangre de pacientes [205].

INTRODUCCIÓN

Junto con la acumulación de hierro, estos factores pueden desencadenar la activación de la ferroptosis como posible mecanismo de muerte neuronal, debido a que explica muchas de las características patológicas propias de la neurodegeneración en la FRDA. La ferroptosis es un tipo de muerte celular programada hierro-dependiente que ha sido descrita recientemente y es independiente de la apoptosis y otros procesos celulares desde el punto de vista morfológico y bioquímico. Morfológicamente, se caracteriza por una reducción en el tamaño de las crestas mitocondriales y un incremento en la densidad de la membrana mitocondrial. Bioquímicamente, se produce una acumulación de peróxidos lipídicos y ROS, como consecuencia de la acumulación del hierro [206], [207]. Algunos autores han señalado a la ferroptosis como posible mecanismo relacionado con la fisiopatología de la enfermedad y se ha propuesto como posible diana de la enfermedad [182], [183].

Por otro lado, se ha observado que las células deficientes en FXN son incapaces de reclutar defensas antioxidantes para contrarrestar los efectos de las ROS generadas, lo que a su vez aumenta la sensibilidad al estrés oxidativo [208], [209]. NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) es un factor de transcripción considerado como el regulador por excelencia de la respuesta antioxidante. Está involucrado en la expresión de enzimas antioxidantes que comparten una secuencia promotora común, denominada elemento de respuesta antioxidante (*Antioxidant Response Element* o ARE). En condiciones fisiológicas, NRF2 se localiza en el citoplasma, donde está regulado por su inhibidor, KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Bajo condiciones de estrés oxidativo, NRF2 se estabiliza y se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de los genes que contienen AREs, manteniendo un estado redox adecuado en la célula [210], [211]. Se han observado niveles elevados de KEAP1 en modelos de FRDA, lo que a su vez aumenta la ubiquitinación de NRF2 y su posterior degradación [212]. Además de niveles reducidos de NRF2

funcional, otros autores han observado una translocación deficiente de este factor de transcripción al núcleo en respuesta al estrés oxidativo [209], [213] con algunas excepciones [214]. En consecuencia, la expresión de diferentes genes citoprotectores disminuye, y la respuesta antioxidante se ve comprometida, potenciando la hipersensibilidad celular a las agresiones oxidativas. Además, se ha descrito que NRF2 regula la biogénesis mitocondrial [215]. En concordancia, la reducción de los niveles de NRF2 también puede dar lugar a un desequilibrio en el potencial mitocondrial de membrana, la producción de ATP y la respiración celular en condiciones de deficiencia de FXN [192]. La omaveloxona, el único tratamiento que ha conseguido avances clínicos en pacientes hasta la fecha, tiene como diana NRF2 [108], [216].

Los efectos del estrés oxidativo también se han asociado a otros fenotipos observados en los modelos de FRDA, como un desequilibrio en la dinámica del citoesqueleto [217], la desregulación del Ca^{2+} intracelular [89], [218], la peroxidación lipídica [89], [218], [219] y la apoptosis [190]. En definitiva, el estrés oxidativo es el principal nexo entre las vías moleculares afectadas en el contexto de la FRDA. Es por ello que muchas de las estrategias terapéuticas probadas en la clínica hasta hoy se han centrado en paliar los efectos del estrés oxidativo en la FRDA [220].

6.3. Metabolismo del hierro

La deficiencia de FXN está estrechamente asociada a un desequilibrio en el metabolismo del hierro. Se han identificado depósitos de este catión y una desregulación en el metabolismo del hierro en cardiomiocitos de pacientes, lo cual sugiere su implicación en el desarrollo de la cardiomiopatía [118], [197], [221].

También en modelos murinos, como en el modelo KO condicional de FXN de músculo esquelético y cardíaco, se han encontrado acumulación de hierro mitocondrial y alteraciones en el metabolismo del hierro, que

INTRODUCCIÓN

guardan similitud con la cardiomiopatía presente en pacientes de FRDA. En consecuencia, existe una acumulación de hierro, tanto en la célula como en la mitocondria, y un déficit generalizado en la exportación de hierro celular, lo cual conduce a una desregulación de vías metabólicas hierro-dependientes, como la biogénesis de ISCs y la síntesis de grupos hemo [222]–[224]. En relación con estas rutas, se ha observado en diferentes modelos que la deficiencia de FXN se asocia a una disminución en la expresión y función de ISCs, lo cual también contribuye a una alteración en la cadena de transporte de electrones y una acumulación de hierro prooxidante en la mitocondria [224]–[226]. Asimismo, se ha descrito un aumento en la biosíntesis hemo, al igual que un descenso en metabolitos hemo mitocondriales, como consecuencia del silenciamiento de FXN en células de mamífero [173], [181]. Sin embargo, a pesar de haberse encontrado alto contenido en hierro en los DRG de pacientes, no se han observado depósitos de hierro en neuronas en degeneración de pacientes o modelos murinos neuronales, por lo que no parece que las alteraciones en el metabolismo del hierro estén implicadas en la neurodegeneración [227], [228].

6.4. Dinámica y biogénesis mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo dinámico que mantiene su homeostasis a través de cambios continuos en su morfología mediante procesos de fusión/fisión, biogénesis y autofagia. Los procesos de fusión y fisión mitocondrial regulan el balance entre la biogénesis mitocondrial y su eliminación, lo cual supone un sistema de control de calidad mitocondrial [229], [230]. Mientras que la fusión da lugar a morfologías elongadas o tubulares, la fisión mitocondrial produce mitocondrias esféricas pequeñas. Por un lado, la fusión mitocondrial es un proceso estimulado por la demanda energética y el estrés mitocondrial (ambiental, genético, oxidativo...). La tasa de fusión y fisión mitocondrial depende, en gran medida, de los cambios metabólicos celulares. Asimismo, la fusión de mitocondrias dañadas con mitocondrias funcionales permite el intercambio

de componentes entre orgánulos, lo cual supone una reparación que puede prevenir, a su vez, la acumulación de mutaciones del ADN mitocondrial. Por otro lado, en la fisión mitocondrial se recupera la morfología mitocondrial a través de la eliminación de componentes mitocondriales dañados [231]. Los procesos de fisión asisten a la formación de nuevas mitocondrias y su distribución a la célula hija en el proceso de división celular, particularmente en regiones de alta demanda energética de la célula, como los axones neuronales [230], [232]. Además, la dinámica mitocondrial desempeña un papel fundamental en la eliminación de mitocondrias dañadas o envejecidas a través de la mitofagia [233].

Numerosos estudios han observado una dinámica mitocondrial alterada en el contexto de la neurodegeneración, destacando su implicación en la patogénesis [229]–[232]. En concreto, FXN parece estar relacionada con la dinámica mitocondrial [163]. Varios modelos deficientes en FXN han mostrado redes mitocondriales alteradas, bien por un aumento de la fragmentación mitocondrial [234], [235] o por una mayor red de mitocondrias fusionadas [88], [236]. De este modo, algunos autores apuntan a una maquinaria de fisión mitocondrial mermada, tras observar niveles significativamente disminuidos de DRP-1 en cardiomiocitos derivados de pacientes [236]. Sin embargo, otros señalan a la Mitofusina, una de las proteínas clave en la fusión mitocondrial, como proteína fundamental en el desarrollo del fenotipo degenerativo de neuronas de *D. melanogaster* deficientes en FXN [235]. Por otro lado, en un modelo murino se observó la sobreexpresión del marcador selectivo de mitofagia Fundc1, sugiriendo un aumento de la mitofagia en la FRDA [237]. Las discrepancias en estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de comprender el papel de FXN en la dinámica mitocondrial.

Otra ruta relacionada con la disfunción mitocondrial de la FRDA es la vía de biogénesis mitocondrial señalizada por PGC-1 α /PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Co-Activator 1- α / Peroxisome*

INTRODUCCIÓN

Proliferator-Activated Receptor Gamma). PPAR γ es considerado como un regulador maestro de la biogénesis mitocondrial, controlando la expresión de PGC-1 α [238]. La deficiencia de FXN provoca una regulación negativa de los genes controlados por PPAR γ , generando una disminución en PGC1- α y un consecuente un déficit en la biogénesis mitocondrial, que conduce a una disfunción metabólica [135], [239], [240]. Un estudio llevado a cabo en fibroblastos y linfoblastos de pacientes describió una regulación negativa de PGC-1 α [241], que se correspondió con lo observado en células neuronales y musculoesqueléticas de ratones deficientes en FXN. De hecho, el silenciamiento de PGC-1 α en fibroblastos de individuos sanos condujo a un descenso en los niveles de FXN [135]. En este ámbito, se observaron niveles reducidos de PGC-1 α en diferentes tejidos de modelos murinos de FRDA [135], [239]. En consonancia, se han observado niveles disminuidos de masa mitocondrial y en el número de copias de ADN mitocondrial [208], [234]. Sin embargo, otros autores han descrito resultados opuestos, encontrando una sobreexpresión de PGC1- α en fibroblastos de pacientes [241]. Por tanto, es evidente que la biogénesis mitocondrial se encuentra afectada en la FRDA, pero es necesario indagar en su relación con la patogénesis de la enfermedad.

6.5. Metabolismo lipídico

El metabolismo de ácidos grasos que se da en la mitocondria es un proceso fisiológico clave. Una prueba de ello es la existencia de enfermedades genéticas relacionadas con una disrupción en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos. En el contexto de la FRDA, uno de los marcadores moleculares común en modelos deficientes de FXN es la acumulación intracelular de gotas lipídicas, acompañada de alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos [219], [235], [240], [242], [243]. Por ejemplo, se ha observado la acumulación de gotas lipídicas en músculo estriado y neurona de varios modelos de ratón deficientes en FXN. Esta anomalía se ha relacionado directamente con el desarrollo de características

fisiopatológicas de la FRDA, como la cardiomiopatía hipertrófica y la disfunción de las neuronas sensitivas grandes [225]. De forma similar, la deficiencia condicional de FXN en el hígado condujo a la acumulación lipídica, esteatosis y disfunción mitocondrial en un modelo murino [243]. En *D. melanogaster*, el silenciamiento ubicuo de FXN condujo a un aumento en el metabolismo de ácidos grasos y de peróxidos lipídicos. De hecho, el silenciamiento selectivo de FXN en células de la glía de *D. melanogaster* desencadenó un fenotipo similar, con acumulación de gotas lipídicas en estas células. Este fenotipo se asoció a una mortalidad temprana, un aumento de la sensibilidad al estrés oxidativo, defectos neurodegenerativos y una actividad locomotora severamente afectada [219]. En cardiomiocitos deficientes en FXN se ha observado, además de una acumulación lipídica intracelular, la inducción de la actividad Acil-coA deshidrogenasa y Carnitina Palmitoil-Transferasa I (CPT1), lo cual refuerza la premisa de un metabolismo lipídico alterado bajo condiciones de deficiencia de FXN [240].

Los pacientes de FRDA también presentan otros signos de metabolismo lipídico desregulado, ya que se han observado deficiencias para metabolizar los ácidos grasos [244]. Un análisis en proteínas plasmáticas reveló una regulación negativa de proteínas Apo CII y CIII, que regulan la escisión de triglicéridos en ácidos grasos en las lipoproteínas VLDL a través de la proteína lipasa (LPL). Además, las lipoproteínas HDL que transportan el colesterol al hígado estaban aumentadas [245]. Otro estudio centrado en el corazón describió una alteración en niveles de triglicéridos y colesterol HDL, LDL y total. Los autores destacaron la inclusión de terapias de reducción de lípidos para atenuar la progresión de la enfermedad de miocardio en la FRDA [136].

Se desconoce el mecanismo subyacente al metabolismo lipídico alterado observado tanto en modelos como en pacientes. Algunos autores señalan que tanto la actividad defectiva de la cadena de transporte de

INTRODUCCIÓN

electrones, como la deficiencia de aconitasa presentes en la FRDA podrían conducir a una inhibición de la β -oxidación mitocondrial. Por otro lado, se ha propuesto que la deficiencia de FXN podría estimular la lipogénesis en el músculo esquelético vía SREBP1 (*Sterol-Responsive Element-Binding Protein 1*) [135]. De hecho, en corazones murinos deficientes en FXN se ha observado un aumento en la Acil-CoA tioesterasa, una enzima lipogénica [196]. Por tanto, se desconoce si la desregulación del metabolismo lipídico en la FRDA se debe a una disfunción en la degradación de lípidos o a una sobre activación de los mecanismos de síntesis.

6.6. Movilización de Ca^{2+} intracelular

La homeostasis del Ca^{2+} intracelular es fundamental en procesos como la supervivencia neuronal y la contracción cardíaca, por lo que su desregulación es un factor común en la neurodegeneración [246] y la cardiomiopatía [247]. A nivel molecular, existe una doble regulación del Ca^{2+} que se moviliza en la célula. Por un lado, existe el mecanismo de intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria regulado por las MAMs, en el que la mitocondria interviene en la captación y liberación de Ca^{2+} citosólico, implicadas en la señalización de procesos celulares esenciales [80]. Adicionalmente, el SOCE (*Store-operated Calcium Entry*) es un mecanismo de incorporación de Ca^{2+} procedente del espacio extracelular activado por la depleción específica de este catión en el RE. Este proceso es mediado por STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*), que tras detectar el agotamiento de Ca^{2+} en el RE oligomeriza y se transloca a la membrana plasmática, donde activa la entrada de Ca^{2+} celular a través de la apertura de los canales Orai1 (*Calcium release-activated calcium channel protein 1*). Una vez reaprovisionado el RE, la interacción STIM1-Orai1 se disocia e inactiva el SOCE [248].

En la última década se ha acumulado evidencia que relaciona la deficiencia de FXN con un desequilibrio en la regulación del Ca^{2+} intracelular. En el ámbito clínico, un estudio llevado a cabo en el corazón

de 23 pacientes de FRDA observó una acumulación de Fe y Ca^{2+} . Mientras que la acumulación de Fe no era estadísticamente significativa, los niveles de Ca^{2+} eran significativamente más elevados en la pared ventricular derecha, y los cardiomiocitos de pacientes con cardiomiopatía severa mostraron depósitos de Ca^{2+} [249]. Wong *et al.* describieron los primeros indicios moleculares sobre la contribución del Ca^{2+} a la fisiopatología de la FRDA. En este estudio, los autores consiguieron rescatar la muerte celular inducida por estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes con quelantes de Ca^{2+} , Fe e inhibidores de la apoptosis. Estos resultados apuntan a que la desregulación del Ca^{2+} podría ser un evento temprano en la patología de la enfermedad, desencadenando la muerte celular por apoptosis [250].

En cuanto a los estudios *in vitro*, en 2014 se publicaron dos trabajos que describieron una acumulación anormal de Ca^{2+} intracelular en modelos diferentes deficientes en FXN. Por un lado, Mincheva-Tasheva *et al.* revelaron un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular en neuronas del DRG de rata con déficit de FXN. Esta acumulación condujo a una alteración en las rutas de señalización mediadas por Ca^{2+} e implicadas en la degeneración neuronal y la muerte celular [190]. Asimismo, Bolinches-Amorós y colaboradores observaron una acumulación de Ca^{2+} citosólico en células SH-SY5Y deficientes en FXN, con una incorporación de Ca^{2+} mitocondrial disminuida y mayor susceptibilidad al estrés de RE. Esta reducción en la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} se asoció también a un aumento de la señalización por autofagia, lo cual puede participar en la degeneración neuronal [88]. También se ha observado una desregulación del Ca^{2+} intracelular en neuronas del modelo murino de la enfermedad denominado YG8R. Mollá y colaboradores observaron una acumulación de Ca^{2+} intracelular directamente relacionada con la disfunción mitocondrial y el daño axonal en cultivo de DRG YG8R. El tratamiento con quelantes de Ca^{2+} consiguió revertir la axonopatía presente en el modelo [189]. En línea con estos resultados, Abeti *et al.* describieron que la deficiencia de

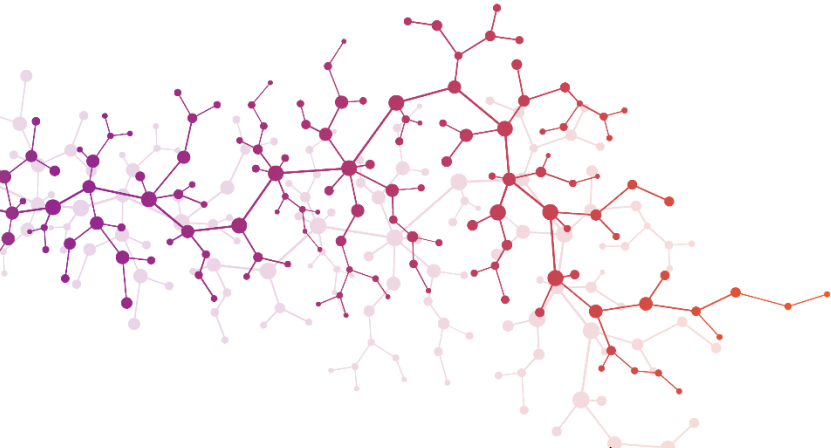
INTRODUCCIÓN

FXN en cultivo primario de células de la granulosa cerebelar condujo a una desregulación en la homeostasis del Ca^{2+} . Las neuronas YG8R mostraron deficiencias en la liberación de Ca^{2+} por parte del RE y una acumulación de Ca^{2+} citosólico anormal, lo cual sugiere una captación de Ca^{2+} mitocondrial afectada [89]. En consonancia, el mecanismo del SOCE también parece estar afectado en modelos neuronales con deficiencia de FXN, donde se han observado una captación de Ca^{2+} intracelular deficiente y una activación del SOCE defectiva, tanto en células humanas SH-SY5Y [88] como en cultivo de DRG del modelo YG8R [189].

Asimismo, diferentes modelos cardíacos y musculoesqueléticos de FRDA han mostrado un desequilibrio en el Ca^{2+} intracelular. En células HL-1, H9c2 y cardiomiocitos primarios derivados del modelo YG8R, la deficiencia de FXN provocó una depleción de Ca^{2+} en el RS y una baja respuesta mitocondrial a las señales de liberación de Ca^{2+} , llevando a una consecuente acumulación en el citosol [89]. En iPSCs de pacientes derivadas a cardiomiocito se observó una menor recaptación de Ca^{2+} por parte del RS y una menor producción de ATP, probablemente provocada por una disminución en la entrada de Ca^{2+} mitocondrial [251]. Otros autores han mostrado un fenotipo de hipertrofia cardíaca ventricular en su modelo de cardiomiocitos de FRDA, acompañado de una señalización intracelular de Ca^{2+} alterada [252].

En conjunto, estos hallazgos señalan que la deficiencia de FXN provoca una desregulación en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, pero se desconocen los mecanismos subyacentes a esta alteración. Como se ha comentado anteriormente, tanto el RE como la mitocondria son fundamentales en este proceso a través de su interacción física mediada por las MAMs. Por consiguiente, tanto la disfunción mitocondrial como las alteraciones en el RE observadas en modelos deficientes de FXN [88], [89], [235] apuntan a que la comunicación entre ambos compartimentos

podría estar afectada en la FRDA, contribuyendo a la desregulación de los procesos regulados por este dominio.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La deficiencia de FXN implica una serie de alteraciones en vías de señalización relacionadas fundamentalmente con el metabolismo y la función mitocondrial. Entre ellas, se han observado evidencias sobre la disfunción de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , pero se desconocen los mecanismos implicados. En concreto, el dominio subcelular formado por la interacción física entre el RE y la mitocondria (MAMs) es indispensable en la regulación de este proceso y otras rutas moleculares implicadas en la fisiopatología de la enfermedad. Todo ello hace evidente la necesidad de indagar en los procesos moleculares relacionados con el Ca^{2+} intracelular y su papel en la fisiopatología de la FRDA. Por otro lado, se desconoce el papel bioquímico de las isoformas extramitocondriales de FXN, lo cual pone de manifiesto la importancia de la caracterización funcional de FXN ligada a su localización subcelular y distribución tisular en la FRDA.

Nuestra hipótesis consiste en que FXN juega un papel en la organización de las MAMs, por lo que su deficiencia implica una desregulación en la comunicación RE-mitocondria, provocando en consecuencia una disfunción en los procesos regulados en este dominio y en concreto, en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es determinar la implicación de las MAMs en la fisiopatología de la FRDA, así como su relevancia como potenciales dianas terapéuticas de la enfermedad. Para abordar este objetivo general se presentan los siguientes objetivos específicos:

1. **Determinar la implicación de frataxina en la arquitectura y funcionalidad de las MAMs**
2. **Restablecer la comunicación retículo-mitocondria en condiciones de deficiencia de FXN mediante el uso de fármacos**
3. **Estudiar la función diferencial de las isoformas citosólica y canónica de FXN**

A decorative graphic consisting of a complex network of interconnected nodes and lines, resembling a molecular structure or a data network. The nodes are colored in shades of purple, red, orange, yellow, and green, and are arranged in a horizontal, slightly curved pattern across the middle of the page. The lines connecting the nodes are thin and light-colored.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Biológico

1.1. Cultivos celulares

Las líneas celulares SH-SY5Y, HEK293 y HeLa se adquirieron en la ATCC (American Type Culture Collection). Específicamente, la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se cultivó en DMEM-12 (Gibco) suplementado con 1% de L-glutamina. Las líneas HEK293T y HeLa se cultivaron en DMEM con 4,5g/L de glucosa y L-glutamina (Gibco). Todos los medios se suplementaron con un 10% de SBF (Suero Bovino Fetal) y un 1% de penicilina/estreptomicina.

Las líneas de linfoblastos se obtuvieron del Biobanco CIBERER (www.ciberer-biobank.es). Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado del procedimiento. En concreto, los linfocitos B de células mononucleares de sangre periférica se immortalizaron añadiendo el sobrenadante del Virus Epstein-Barr al medio de transformación (RPMI 1640 suplementado con un 20% de SBF, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y ciclosporina a 1 µg/mL). Las células se cultivaron en suspensión con los frascos colocados verticalmente. El comité ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en investigación Experimental de la Universitat de València certificó favorablemente el uso de estas muestras para el presente trabajo.

En general, todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Todas las células se testaron de micoplasma regularmente.

1.2. Ratones

Los experimentos llevados a cabo con tejido de ratón se hicieron a partir de la cepa C57BL/6J. Los animales se alojaron en grupos bajo condiciones estándar de albergue con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas,

MATERIAL Y MÉTODOS

con alimentos y agua *ad libitum*. Los procedimientos animales fueron previamente aprobados por el comité ético de Experimentación Animal de la Universitat de València. Se utilizaron ratones de 3 meses de edad que se sacrificaron por dislocación cervical para su posterior extracción de tejidos.

1.3. Bacterias

La cepa bacteriana utilizada ha sido DH5 α , *Escherichia coli*, empleada para la replicación y posterior purificación de los plásmidos utilizados en este estudio. Las células se sembraron en medio líquido 2xYT (Condalab, 1507.00) o en medio sólido LB-Agar Miller (Formedium, LMM0202) a 37°C. El medio se suplementó con Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ una vez transformados las células competentes, con el fin de seleccionar las portadoras del plásmido.

1.4. Anticuerpos

NOMBRE Y REFERENCIA DEL ANTICUERPO	TÉCNICAS/CONCENTRACIÓN
ATP5A (Abcam, ab110273)	WB: 1:1000
CANX (Proteintech, 10427-2-AP)	IFI: 1:1000
FXN (Abcam, ab110328)	WB: 1:500
FXN (Thermo Fisher Scientific, MA3-085)	IFI, PLA: 1:250
GRP75 (Santa Cruz Biotechnology, sc13967)	IFI, PLA: 1:500 WB: 1:2000
HA (Invitrogen, 26183)	IFI: 1:500; WB: 1:1000
IP ₃ R (Abcam, ab125076)	IFI, PLA: 1:500
Sigma-1R (Sigma-Aldrich, HPA018002)	WB: 1:1000
Streptavidin-HRP (Merck, 18-152)	WB: 1:1000
Tom20 (Santa-Cruz, sc-17764)	IFI: 1:100
V5 (Proteintech, 14440-1-AP)	IFI: 1:1000; WB: 1:2000
VDAC1 (Abcam, ab14734)	IFI, PLA: 1:500 WB: 1:1000

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados. IFI: Inmunofluorescencia; PLA: *Proximity Ligation Assay*; WB: *Western Blot*.

En la **Tabla 2** se muestran los anticuerpos utilizados en este trabajo, especificando las técnicas en las que se ha empleado cada uno de ellos.

2. Métodos

2.1. Generación de líneas celulares estables

Para la generación de líneas celulares estables con el silenciamiento del gen *FXN* (FXN-138.1 y FXN-138.2), las células SH-SY5Y WT (*Wild Type*) se transfectaron con el vector pLKO.1 (Plásmido de ADN MISSION® shRNA, Sigma-Aldrich) que contenía una secuencia de horquilla de FXN (TRCN000006138) [88]. La transfección se realizó utilizando el reactivo SuperFect Transfection (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron con puromicina 2 µg/mL (Panreac Applichem).

Para la generación de lentivirus, las células HEK293T se sembraron en placas p100 y se transfectaron con 10 µg del vector lentiviral que contenía el gen de interés y los plásmidos lentivirales de empaquetamiento psPAX2 (5 µg) y pMD2.G (2,5 µg) utilizando polyethylenimine (PEI) (1mg/mL, Polysciences) en Opti-Mem (Gibco). Tras 48 h, el medio de cultivo que contenía los lentivirus se filtró con un filtro de 0,45 µm. Para la generación de las líneas estables ERTS/MTS-SplitC-HA, tanto las células HeLa como las HEK293T se sembraron en frascos T25, donde se infectaron con el sobrenadante de lentivirus junto con Polibreno (8 µg/mL, Merck) a una dilución 1:1000. Las células transfectadas se seleccionaron con puromicina 2 µg/mL (Panreac Applichem) 72 h tras la infección.

2.2. Tratamientos

En la **Tabla 3** se especifican los reactivos usados como tratamientos en líneas celulares humanas y su análisis en diferentes

MATERIAL Y MÉTODOS

experimentos, así como las concentraciones y las técnicas en las que se ha empleado cada uno de ellos.

REACTIVO	CONCENTRACIONES	TÉCNICAS
Trolox, 238813, Sigma Aldrich	1 mM	PLA, Ca ²⁺ mitocondrial, citometría de flujo
N-acetilcisteína (NAC), A9165, Sigma Aldrich	5mM	PLA, Ca ²⁺ mitocondrial, citometría de flujo
Omaveloxolona (OmaV), B3576, ApexBio	50 nM, 75 nM, 100 nM	Ca ²⁺ mitocondrial, MTT
Fluvoxamina (Flv), F2802, Sigma Aldrich	1 µM, 5 µM, 10 µM	Ca ²⁺ mitocondrial, MTT
Kaempferol (KAM), 60010, Sigma Aldrich	5 µM, 10 µM	Ca ²⁺ mitocondrial, MTT
H ₂ O ₂ , H1009, Sigma Aldrich	500 µM, 5mM	Citometría de flujo, MTT

Tabla 3: Reactivos utilizados como tratamiento en las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2. PLA: *Proximity Ligation Assay*; MTT: Ensayo de viabilidad celular.

2.3. Técnicas de imagen

2.3.1. Inmunofluorescencia

Las líneas celulares SH-SY5Y, FXN-138.2 y HeLa se sembraron en cristales de 13 mm Ø en placas de 24 pocillos. Tras la fijación con paraformaldehído en PBS al 4% durante 10 minutos, las células se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con PBS-Triton-X al 0,5% durante 10 minutos. A continuación, las células se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS-Tritón al 0,05% y se bloquearon con SBF al 10% en PBS-tritón al 0,1% durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (**Tabla 2**) se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS y se incubaron con una combinación de los siguientes anticuerpos secundarios durante 1h a temperatura ambiente: Alexa Fluor-555-conjugated goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific, A32727), Alexa Fluor-Texas Red-conjugated

goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific, T2767), y Alexa Fluor-647-conjugated goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific, A21235). Los núcleos se detectaron con DAPI Fluoromount-G® (Southern Biotech). Las imágenes de microscopía de fluorescencia se obtuvieron utilizando un microscopio Leica DMI8 con cámara DC9000GT y un objetivo de inmersión en aceite de 63x.

Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP8 *X-White Light Laser* equipado con un microscopio invertido (DMI8; Leica) y un objetivo HC PL APO 63x/1,40 CS2 de aceite de inmersión.

2.3.2. *Proximity ligation Assay* (PLA)

Las líneas celulares SH-SY5Y, FXN-138.1 y FXN-138.2 se sembraron en una placa μ -Dish de 35 mm, de fondo de cristal alto (Ibidi, 81156) a una densidad de 100000 células/placa. Tras la fijación con paraformaldehído en PBS al 4% durante 10 minutos, se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con PBS-Triton-X al 0,5% durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min y en agitación con PBS-Tween 20 al 0,05% y se bloqueó con la solución de bloqueo Duolink® (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, se eliminó la solución de bloqueo y se incubaron una combinación de dos anticuerpos primarios específicos durante la noche a 4°C (**Tabla 2**). Al día siguiente, tras realizar 3 lavados de 5 min en agitación con PBS-tween al 0,01%, las células se incubaron a 37°C durante 1 hora con las sondas Duolink® in situ PLA® Anti-rabbit PLUS (Sigma-Aldrich, DUO92002) y Anti-mouse MINUS (Sigma-Aldrich, DUO92004). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min y en agitación con PBS-tween al 0,01%. Los pasos de ligación y amplificación se realizaron con los reactivos de detección in situ Duolink® Red (Sigma-Aldrich, DUO92008-100RXN). La ligasa se incubó durante 30 minutos a 37°C y se lavó dos veces durante 5

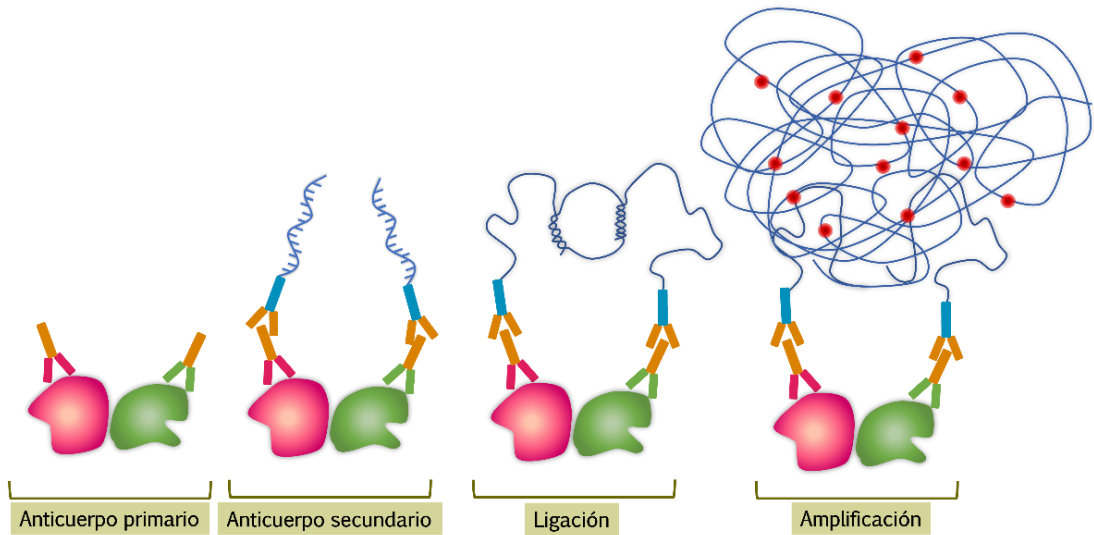


Figura 8: Esquema de la técnica Proximity ligation Assay (PLA). Esta técnica, basada en inmunocitoquímica, se utiliza para analizar de forma cuantitativa e *in vitro* la interacción entre dos proteínas de interés. En primer lugar, las dos proteínas de interés deben marcarse con anticuerpos primarios de diferentes especies tras la fijación y permeabilización de la muestra (en nuestro caso, células humanas comerciales). A continuación, los anticuerpos primarios se marcan con anticuerpos secundarios unidos a oligonucleótidos complementarios (sondas PLUS y MINUS). Si las proteínas se encuentran cercanas entre sí (distancia menor a 40 nm), los oligonucleótidos se circularizarán mediante la reacción con una ligasa y la señal será posteriormente amplificada con una polimerasa. El resultado positivo puede analizarse tras la toma de imágenes de microscopía y mediante la cuantificación del punteado fluorescente que la técnica da como resultado. Figura original.

minutos con PBS-tween al 0,01%. La polimerasa se incubó durante 100 minutos y se lavó con tampón SSC 1x y 0,01x respectivamente durante 5 minutos y en agitación cada uno. Los núcleos se detectaron con DAPI Fluoromount-G® (Southern Biotech). Todas las incubaciones a 37°C se realizaron en una cámara húmeda. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 con cámara DC9000GT y un objetivo de inmersión en aceite de 63x. El punteado se contó de forma manual y los resultados se expresaron como número de interacciones por número de núcleos en cada campo. Las interacciones por célula de cada

condición se expresan como porcentaje sobre la condición de control. núcleos en cada campo. Las interacciones por célula de cada condición se expresan como porcentaje sobre la condición de control.

2.3.3. Microscopía de calcio mitocondrial en célula viva

Las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2 se sembraron a una densidad de 25000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos. 16-20 h después, las células se transfectaron con el plásmido pcDNA-4mtD3cpv utilizando el kit de transfección Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (proporción 2 μ l lipofectamina:1 μ g plásmido). El plásmido pcDNA-4mtD3cpv (AddGene, #36324) utilizado en esta técnica fue una cesión de la Dra. Jorgina Satrústegi, del centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid). Este plásmido codifica para una proteína *cameleon* (D3cpv) sensible a calcio dirigida a mitocondria. 24 h tras la transfección, las células se tripsinizaron y sembraron en una cámara μ -Slide 8 Well (Ibidi, 80826), apta para la obtención de imágenes en vivo. Las mediciones se realizaron 48 horas después de la transfección. Para todos los experimentos, las células se lavaron dos veces, retirando el medio de cultivo antes de comenzar la toma de imágenes y sustituyéndolo por HBSS sin Ca^{2+} (Thermo Fisher Scientific, 14175095). El D3cpv se excitó a 435 nm y la fluorescencia se midió a 450-480 nm (CFP) y 520-540 nm (YFP). Se tomaron imágenes cada 5 segundos utilizando una cámara DC9000GT (Leica ®) y una W-view Gemini (Hamamatsu) para la obtención de imágenes de división óptica. Se utilizó Carbachol (Cch) (Merck, 212385) para inducir la salida de calcio del retículo endoplasmático y analizar la capacidad de incorporación mitocondrial de calcio. El Cch se adicionó a las células a los 6 segundos de la toma de imágenes. Para determinar la concentración óptima de Cch, se realizó una curva con 25 μ M, 250 μ M, 500 μ M o 900 μ M. El resto de los experimentos se realizaron utilizando Cch 250 μ M. El ratio FRET (YFP/CFP) se calculó midiendo la intensidad de fluorescencia de las dos

MATERIAL Y MÉTODOS

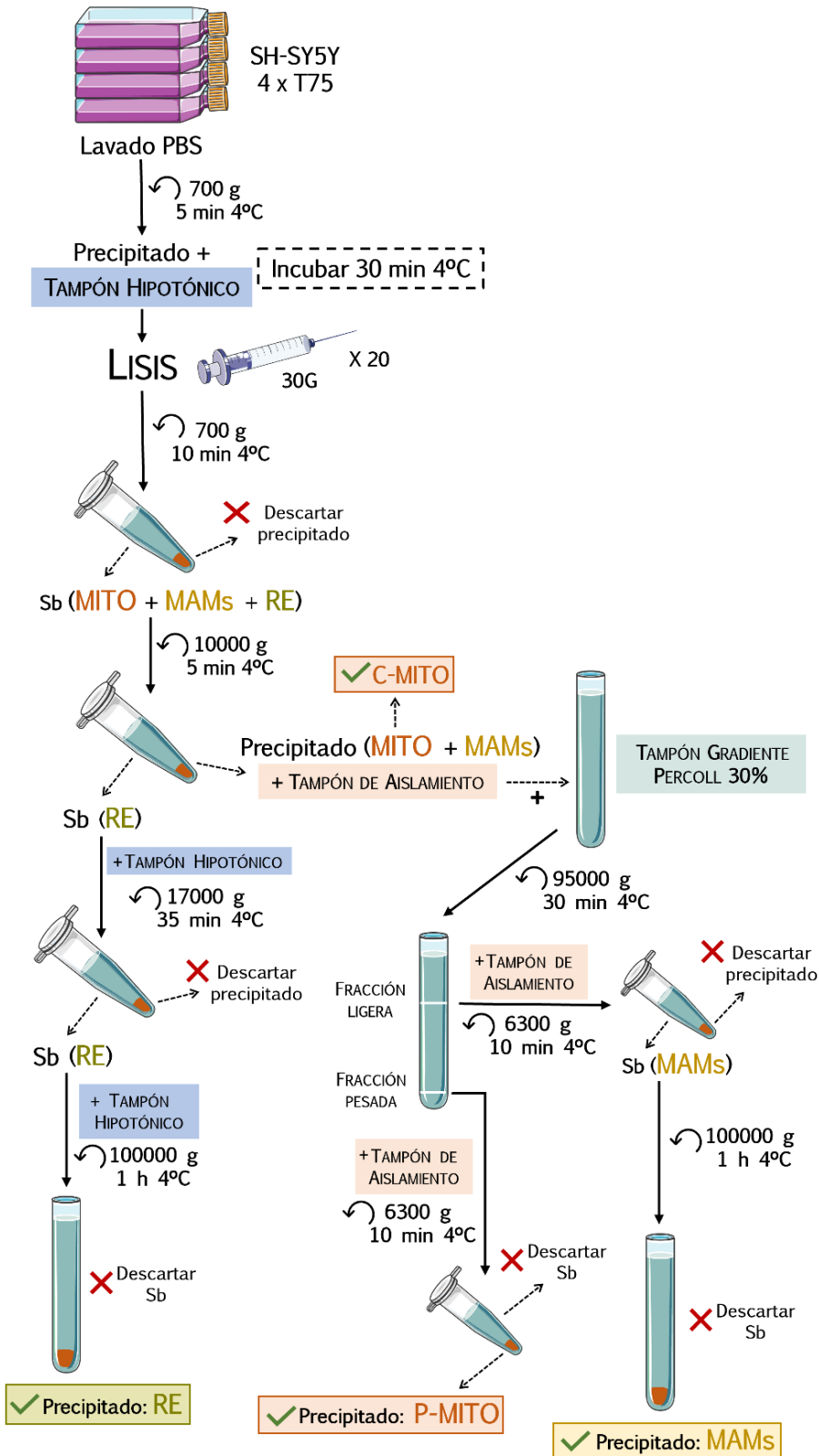
longitudes de onda de emisión, donde el canal CFP representa el fluoróforo no unido al Ca^{2+} y el YFP, unido al Ca^{2+} . Se analizó un rango de 15-40 células en cada condición por réplica.

2.4. Análisis de peroxidación lipídica mediante citometría de flujo

Para medir la peroxidación lipídica, las líneas SH-SY5Y y FXN-138.2 se incubaron con 5 μM de C11 BODIPY (581/591) (Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DAPI durante 5 minutos antes del inicio de los experimentos respectivamente. La intensidad de fluorescencia se detectó por citometría de flujo con un citómetro BD FACSAria™ III equipado con 5 láseres, 355, 405, 488, 561, 640nm (BD, software DIVA 6.0). Los parámetros FS-A, FS-H, SS-A se utilizaron para la morfología celular. La peroxidación lipídica se midió con el fluorocromo C11 BODIPY, seleccionando el parámetro RATIO (586/530 nm). La discriminación de células muertas se realizó con DAPI (excitación 405, emisión 450/50). Se adquirieron 5000 eventos individuales (FS-A vs FS-H) a velocidad media. Se determinó la fluorescencia media del parámetro RATIO de las células vivas.

2.5. Fraccionamiento subcelular para la purificación de mitocondria, MAMs y RE

El protocolo se basa en el descrito por Annunziata *et al.* [253] con algunas modificaciones (**Figura 9**). En primer lugar, las células SH-SY5Y al 80-90 % de confluencia se recogieron con tripsina y el pellet se lavó con PBS y se centrifugó a 700 g durante 3 min. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 500 μl de tampón hipotónico (sacarosa 250 mM, HEPES pH 7,45 20 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 1,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM e inhibidores de proteasas) y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. A continuación, las células se lisaron haciéndolas pasar por una aguja de 30G unas 20 veces. La solución se centrifugó a 700 g durante 10 minutos a 4°C.



MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 9: Esquema del protocolo de fraccionamiento subcelular para la purificación de mitocondria, MAMs y RE. Protocolo adaptado de Annuziata *et al.* [253]. El protocolo parte de 4 frascos T75 de células SH-SY5Y a una confluencia del 80-90%. A partir de ahí, las muestras se irán sometiendo a una serie de centrifugaciones secuenciales de las que se obtendrán las fracciones de mitocondria cruda o C-MITO (P-MITO + MAMs), retículo endoplasmático (RE), mitocondria pura (P-MITO) y membranas asociadas a RE-mitocondria MAMs. Sb: Sobrenadante. Figura original creada a partir de recursos *Creative Commons* de Servier Medical Art [393].

Se descartó el pellet y se centrifugó nuevamente el sobrenadante en un tubo de 2 mL, a 10000 g durante 20 min y a 4°C. En esta centrifugación, el sobrenadante contiene el RE, mientras que el pellet contiene la fracción C-MITO (mitocondria cruda = mitocondria pura + MAMs). A partir de este punto, se bifurcaron las centrifugaciones para purificar cada una de las fracciones.

Por un lado, el sobrenadante (RE) se transfirió a un tubo de 2 ml, que se completó hasta el borde con tampón hipotónico y se centrifugó a 17000 g durante 35 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrífuga y se completó hasta el borde con tampón hipotónico, para después centrifugarlo a 100000 g durante 1h a 4°C. Finalmente, el pellet se resuspendió en 150 µl de tampón hipotónico para obtener la fracción del RE.

Asimismo, el pellet de la fracción C-MITO se resuspendió en 2 ml de tampón de aislamiento (manitol 250 mM, HEPES pH 7,45 5 mM, de EGTA 0,5 mM, BSA al 0,1%). Se conservaron 150 µl de esta suspensión como fracción de mitocondria cruda (C-MITO). El resto de la solución se transfirió a un tubo de ultracentrífuga lleno tampón de gradiente con Percoll (Percoll al 30 %, manitol 225 mM, HEPES pH 7,45 25 mM, EGTA 1 mM, BSA al 0,1 %) y se centrifugó a 95000 g durante 30 min a 4°C. En este punto se observan dos bandas o fracciones: una banda superior o fracción ligera, que contiene la fracción de las MAMs, y una banda inferior

o fracción pesada, que contiene la fracción de mitocondria pura (P-MITO). La banda inferior se recogió con una pipeta Pasteur de vidrio, se diluyó en un tubo limpio con tampón de aislamiento y se centrifugó a 6300 g durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 150 µl de tampón de aislamiento para obtener la fracción de mitocondria pura (P-MITO). Por otro lado, la banda superior que contenía la fracción de MAMs se recogió con una pipeta Pasteur de vidrio, se diluyó en tampón de aislamiento y se centrifugó a 6300 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrífuga lleno de tampón de aislamiento y se centrifugó a 100000 g durante 1 h a 4°C. A su vez, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 150 µl de tampón de aislamiento para obtener, finalmente, la fracción de las MAMs.

2.6. Western Blot

Para el análisis del fraccionamiento subcelular de las MAMs, las fracciones aisladas de ER, c-mito, p-mito y MAMs se resuspendieron en tampón de lisis RIPA [Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM ácido desoxicólico 0,5%, Tritón X-100 1%, SDS al 1% y *cocktail* inhibidor de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich)]. Las proteínas no se cuantificaron debido a que el tampón de extracción de las diferentes fracciones subcelulares contiene SBF, impidiendo su correcta cuantificación. Por este motivo, las fracciones se cargaron directamente al gel de SDS-poliacrilamida junto con el tampón de carga correspondiente. Para verificar la pureza de las fracciones y la presencia de frataxina, se utilizaron anticuerpos específicos de proteínas de cada compartimento subcelular.

Para el análisis de proteínas biotiniladas, las células HEK293 se sembraron en placas p60 (Thermo Fisher Scientific). Los pellets se resuspendieron en tampón de lisis RIPA con la misma composición descrita anteriormente. Las proteínas se cuantificaron con el kit Pierce™ BCA

MATERIAL Y MÉTODOS

protein assay (Thermo Fisher Scientific) y se prepararon añadiendo la cantidad de tampón de carga correspondiente.

En general, las proteínas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida y se transfirieron en membranas de PVDF. Los anticuerpos se bloquearon en leche desnatada (Merck) al 5% y posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados de 5 min y el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa HRP (IgG anti-mouse, Cell Signaling, 7074S o anti-rabbit, Cell Signaling, 7076S) se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Como agente de revelado se utilizó el kit Amersham ECL Prime (GE Healthcare) La obtención de imágenes se realizó con una cámara CCD refrigerada para imágenes de Western Blot ImageQuant™ LAS500 (GE Healthcare).

2.7. Ensayo de viabilidad celular por MTT

Este protocolo tiene la finalidad de analizar la viabilidad celular a través de la actividad metabólica de las deshidrogenasas. De este modo, el reactivo MTT es metabolizado por las células viables en cristales de formazán, que pueden solubilizarse para finalmente, ser medidos y analizados por colorimetría. La señal colorimétrica corresponde de forma indirecta con la medida de la viabilidad celular.

El protocolo se adaptó a partir del publicado por Nga *et al.* [254] con algunas modificaciones. Las líneas SH-SY5Y y FXN-138.2 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 30000 células/pocillo junto con los tratamientos correspondientes. Se utilizó H₂O₂ 5 mM como control positivo y todas las condiciones se sembraron por cuadruplicado. Tras 24 h, se añadió el reactivo MTT (Thiazolul Blue tetrazolium Bromide, Merck, M2128) a cada pocillo, en oscuridad y a una dilución 1:11 (10 µl de reactivo *stock* 5 mg/mL por pocillo). Se incubó durante 3h a 37°C en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, los cristales de formazán precipitados se solubilizaron en 150 µl de SDS al 30% en DMSO

(dimetilsulfóxido) y se incubaron en oscuridad durante 15 min en agitación. Por último, se midió la absorbancia a 570 nm y el porcentaje de viabilidad celular se calculó acorde con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = 100 \cdot \frac{(OD_{570\ tratamiento} - Blanco)}{(OD_{570\ sin\ tratar} - Blanco)}$$

2.8. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y PCR cuantitativa

TRANSCRITO	PRIMER DIRECTO (5'-3')	PRIMER REVERSO (5'-3')
FXN I (Humano)	ACCGACATCGATGCGACC	GGCCCAAAGTTCCAGATTTCC
FXN II (Humano)	CGACTGCGGGTCAAGAGT	GGCCCAAAGTTCCAGATTTCC
FXN total (Humano)	GACAAGCCATACGTTTGAGG	TCACATAGGTTCTAGATCTCC
GAPDH (Humano)	TGGCAAATTCATGGCACCG	GACTTGATTTTGGAGGGATCTCGC
Fxn I (Ratón)	GGGAACCGATCGTAACCTGC	TCCGCCAGTCTTTCATACGC
Fxn II (Ratón)	TGCTGGATCAGAGTAGACGAAG	TCCGCCAGTCTTTCATACGC
Fxn total (Ratón)	GCAGACAAGCCCTATACCC	GGTCTGCTTGTTGATCACG
GAPDH (Ratón)	CCTATAAATACGGACTGCAGCC	ATTTTGTCTACGGGACGAGG

Para en análisis de expresión de las isoformas canónica y citosólica

Tabla 4: *Primers* utilizados para el análisis de la expresión de las isoformas canónica (FXN I) y citosólica (FXN II) de frataxina.

de frataxina, las células adherentes (SH-SY5Y y HeLa) se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de 250000 células/pocillo. Las células en suspensión (linfoblastos inmortalizados) se sembraron en 5 mL, en frascos T25 y a una densidad de 500000 células/mL. La extracción de ARN de células y tejidos se llevó a cabo 24 horas después utilizando el kit RNeasy® (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Se diseñaron *primers* específicos para cada isoforma (**Tabla 4**) y se utilizó GAPDH como control *housekeeping*. El tamaño de bandas específico de cada amplicón se

MATERIAL Y MÉTODOS

comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa, así como la presencia de una única banda. La PCR cuantitativa se llevó a cabo con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific, K0222) y se utilizó el *software design & Analysis* (v1.5.1) para exportar los datos.

2.9. Técnica Split-TurboID

Esta técnica se basa en las herramientas de marcaje de proximidad o *proximity labeling*, diseñadas para el estudio de la localización subcelular de una proteína de interés y el mapeo de su interactoma en condiciones de célula viva. Para ello, se requiere de la coexpresión de dos fragmentos proteicos inactivos de la enzima biotina-ligasa TurboID (Split-TurboID). Uno de los fragmentos puede dirigirse a un compartimento subcelular concreto, mientras que el otro se fusiona con la proteína de interés (**Figura 10A**). De este modo, si la proteína se localiza en el compartimento escogido, los fragmentos proteicos de la TurboID reconstituyen la actividad biotina-ligasa, que marcará con biotina las proteínas proximales (distancia <10-20 nm) a nuestra proteína de interés. El proteoma de influencia o interactoma puede identificarse posteriormente mediante espectrometría de masas.

2.9.1. Generación de plásmidos

Todos los plásmidos se generaron utilizando técnicas estándar de clonaje. Los productos de ligación se transformaron en bacterias competentes descritas en el apartado **1.3. Bacterias**. Todos los plásmidos se comprobaron por secuenciación.

Los plásmidos clonados para el estudio del interactoma de las isoformas de FXN se especifican en la **Tabla 5 y Figura 10B**. Las proteínas de fusión se clonaron en el plásmido pLenti-CMV Puro (Addgene, #17452), un vector de expresión lentiviral en mamífero que permite la

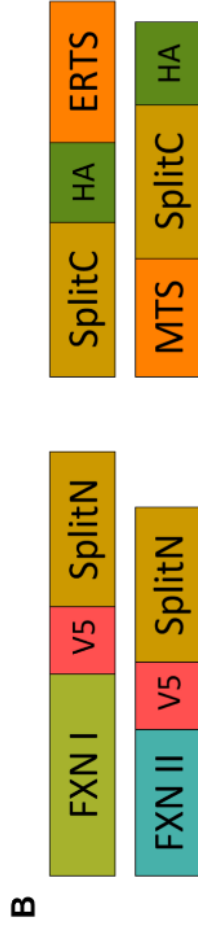
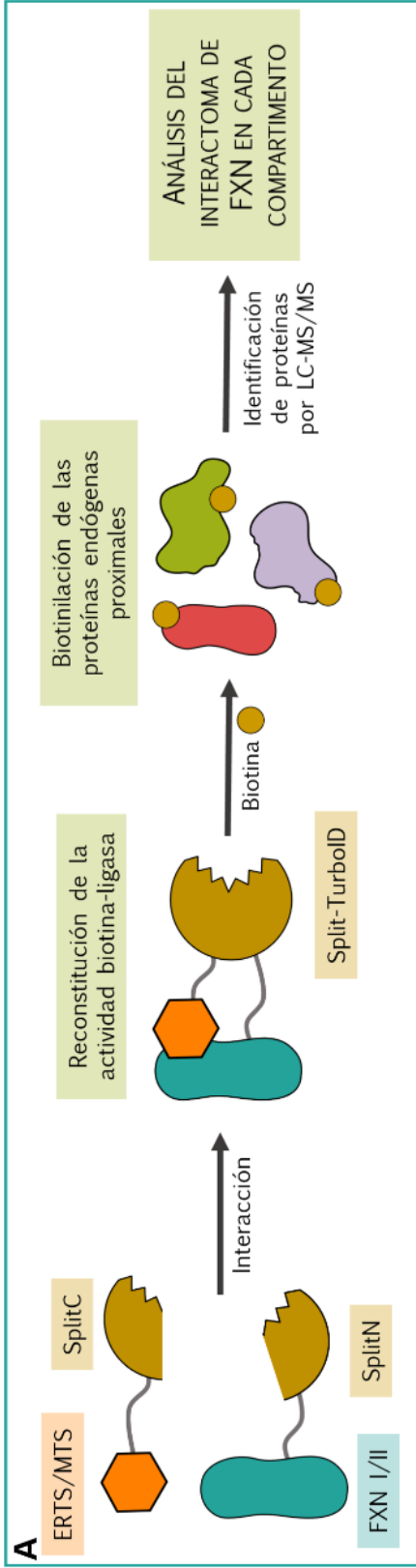


Figura 10: (A) Representación esquemática de la técnica Split-TurboID. En primer lugar, se co-expresan los plásmidos que contienen las proteínas fusionadas a los fragmentos C-terminal (SplitC) y N-terminal (SplitN) de la proteína TurboID. Si estas proteínas se localizan en el mismo compartimento subcelular, la actividad biotina-ligasa de TurboID se reconstituye, biotinilando las proteínas endógenas proximales. Estas proteínas pueden identificarse por espectrometría de masas. (B) Esquema de los plásmidos diseñados para el estudio del interactoma de las isoformas canónica (FXN I-SplitN-V5) y citosólica (FXN II-SplitN-V5) de FXN en la membrana del RE (SplitC-HA-ERTS) y matriz mitocondrial (MTS-SplitC-HA). ERTS: *Endoplasmic Reticulum Targeting Sequence*; FXN: Frataxina; LC-MS/MS: *Liquid chromatography with tandem Mass Spectrometry*; MTS: *Mitochondrial Targeting Sequence*. Figura original.

MATERIAL Y MÉTODOS

selección con puromicina. Por un lado, el fragmento TurboID N-terminal (SplitN) se fusionó con FXN I o FXN II. El fragmento TurboID C-terminal (SplitC) se dirigió a la matriz mitocondrial o el retículo endoplásmico orientado hacia el citosol, bien incluyendo las secuencias de localización mitocondrial (*Mitochondrial Targeting Sequence*, MTS), o de membrana de retículo (*Endoplasmic-reticulum Targeting Sequence*, ERTS) respectivamente. Para facilitar el reconocimiento de las proteínas de fusión por anticuerpos, se incluyeron los epítomos proteicos V5 y HA en nuestros constructos. Se fusionó V5 en los fragmentos SplitC y HA en los fragmentos SplitN. Se generaron líneas celulares HeLa o HEK293 estables expresando cada uno de los plásmidos.

NOMBRE	VECTOR	INSERTO	DETALLES
FXN I-V5-SplitN	pLenti-CMV puro	EcoRV-FXN I-Linker a-V5-SplitN-Stop- EcoRV	Linker a: GSKGSGSTSGLE; V5: GKPIPPLLGLDST SplitN: TurboID aa 1-L73
FXN II-V5-SplitN	pLenti-CMV puro	EcoRV-FXN II-Linker a-V5-SplitN-Stop- EcoRV	Linker a: GSKGSGSTSGLE; V5: GKPIPPLLGLDST SplitN: TurboID aa 1-L73
SplitC-HA-ERTS	pLenti-CMV puro	EcoRV-SplitC-Linker b-HA-Linker c-ERTS- Stop-EcoRV	SplitC: aa G74-fin de TurboID; Linker b: GLAGGLINREPCWNRTELSNPGWAEKSVCG PKRARAGVP HA: YPYDVPDYG; Linker c: GSKGSGSTSGELNSSAGG ERTS (anclaje citocromo p450): ITTVESNSSWWTNWVIPAISALVVALMYRLYM AED
MTS-SplitC-HA	pLenti-CMV puro	EcoRV-MTS-SplitC- Linker b-HA-Stop- EcoRV	MTS (COX8A): MSVLTPLLRLSLTGSARRLMVPRAQV; SplitC: aa G74-fin de TurboID; Linker b: GLAGGLINREPCWNRTELSNPGWAEKSVCG PKRARAGVP; HA: YPYDVPDYG

Tabla 5: Plásmidos clonados para la técnica Split-TurboID.

2.9.2. Transfección y marcaje con biotina

En los experimentos de caracterización de la actividad biotina ligasa, se transfectaron los plásmidos FXN I/II-SplitN-V5 con PEI (proporción 5 µL PEI: 2 µg Plásmido) sobre la línea estable de expresión ERTS/MTS-SplitC-HA. Para el marcaje de proteínas con biotina, las células se incubaron con Biotina 500 µM (Sigma, B4501) disuelta en medio de cultivo. Tanto para los experimentos de inmunofluorescencia como de

WB, el marcaje se detuvo después del tiempo indicado mediante la retirada del medio con biotina y 5 lavados con PBS muy frío.

2.9.3. Preparación de muestras para espectrometría de masas

En la preparación de muestras para proteómica se utilizaron células HEK293T que expresan de forma estable los constructos especificados en la **Tabla 5**. Las células se incubaron con biotina tal y como se explica en el apartado anterior. Para el enriquecimiento de proteínas biotiniladas, se utilizaron esferas de agarosa recubiertas de streptavidina (Sigma Aldrich, S1638) que se lavaron tres veces con tampón RIPA [Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM ácido desoxicólico 0,5%, Tritón X-100 1%, SDS al 1% y *cocktail* inhibidor de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich)]. A continuación, el extracto de proteínas biotiniladas se incubó con las esferas equilibradas durante 24h en rotación y a 4°C. Posteriormente, las esferas se lavaron tres veces con tampón RIPA y dos veces con tampón bicarbonato de amonio (tampón ABC) 50 mM pH8. Las muestras se congelaron hasta su procesamiento posterior y preparación para en análisis de espectrometría de masas LC-MS/MS. Antes de enviar las muestras a proteómica, el lisado se analizó por WB para verificar la expresión de los constructos y confirmar las bandas de biotinilación.

2.9.4. Análisis Cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS-MS)

Las muestras de proteómica enriquecidas por afinidad se analizaron en modo positivo utilizando la adquisición dependiente de datos (*Data Dependent Acquisition* o DDA) mediante un sistema Easy-nLC 1000 - *Q Exactive Plus* o un sistema *Easy-nLC 1200 - Orbitrap Eclipse tribrid* (todos ellos de Thermo Fisher). La cromatografía en línea se acopló directamente a los sistemas de espectrometría de masas utilizando una fuente de ionización de *nanoelectrospray*. Los péptidos se separaron mediante cromatografía en fase inversa con un sistema tampón binario de tampón A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y tampón B (ácido fórmico al

MATERIAL Y MÉTODOS

0,1% en acetonitrilo al 80%) utilizando un gradiente cromatográfico de 60 min para las muestras IP y de 120 min para las muestras SILAC pulsadas. La separación se llevó a cabo en una columna analítica empaquetada *in-house* de 50 cm de longitud y rellena con esferas *C18-AQ Reprosil Pur* de 1,9 μM (Dr. Maisch). Utilizando el gradiente cromatográfico de 60 min se realizó la separación de péptidos en función de su hidrofobicidad aumentando linealmente la cantidad de tampón B desde el 13% inicial hasta el 48% durante 35 min, seguido de un aumento de B hasta el 95% durante 10 min. La columna se lavó durante 5 min y las condiciones iniciales de la columna se alcanzaron equilibrando la columna durante 10 min al 7% de B. Se adquirieron espectros de MS completos (300 a 1750 m/z) con una resolución de 70.000, un tiempo de inyección máximo de 20 ms y un objetivo de AGC de $3e6$. Se aislaron los 10 iones peptídicos más abundantes (ventanas de aislamiento de 1,8 m/z) para la posterior fragmentación HCD (NCE = 28) y el registro MS/MS con una resolución de 35.000, un tiempo máximo de inyección de 120 ms y un objetivo AGC de $5e5$. Los iones peptídicos seleccionados para la fragmentación se excluyeron dinámicamente durante 20 segundos.

Utilizando el gradiente cromatográfico de 120 min, los péptidos se separaron mediante un aumento lineal de B desde el 4% inicial hasta el 25% durante 96 min, seguido de un aumento de B hasta el 55% durante 14 min. Después de un aumento brusco de B hasta el 95% durante 2 min, la columna analítica se lavó durante 8 min al 95% de B. Se adquirieron espectros MS completos (375 a 1500 m/z) con una resolución de 60.000, un tiempo de inyección dinámico y un objetivo AGC automatizado. Se aislaron los 20 iones peptídicos más abundantes (estado de carga 2 - 7) (ventanas de aislamiento de 1,2 m/z) para la posterior fragmentación HCD (NCE = 30) y el registro MS/MS con una resolución de 15.000, un tiempo de inyección máximo de 22 ms y un objetivo AGC automatizado. Los iones

peptídicos seleccionados para la fragmentación se excluyeron dinámicamente durante 60 segundos.

2.9.5. Procesamiento y análisis de datos de proteómica

Los archivos crudos obtenidos se procesaron con el *software* MaxQuant. Para la identificación y puntuación de péptidos, los espectros MS/MS se compararon con la base de datos Uniprot humana (descargada el 15/08/2019) utilizando el algoritmo de búsqueda Andrómeda. Para las muestras enriquecidas por afinidad, la multiplicidad se estableció en uno y se seleccionó tripsina/P como enzima digestiva. Se estableció la carbamidometilación como modificación fija y se seleccionó la oxidación de metionina o la acetilación N-terminal como modificación variable. Los péptidos se identificaron con una longitud mínima de aminoácidos de siete y una tasa FDR (del inglés, *False Discovery Rate*) del 1% a nivel de péptido. Las proteínas se identificaron con un FDR < 1% utilizando péptidos únicos y de corte para la cuantificación. La cuantificación sin marcaje se realizó utilizando la configuración estándar del algoritmo maxLFQ. Se activó la coincidencia entre ejecuciones.

El análisis estadístico y visualización de los datos se realizó con Perseus (v1.6.5) y R (v4.1.2). La intensidad LFQ de las muestras se transformó mediante \log_2 y se filtró para obtener las proteínas presentes en al menos dos réplicas por condición. Los valores ausentes se imputaron con el *plugin* Perseus ImputeLCMD utilizando un enfoque de valor mínimo determinista (MinDet, valor $P_{adj} = 0,001$) para simular los límites de detección más bajos del espectrómetro de masas. Además, se realizó un test *two-sided* t-Student con corrección por FDR. Las proteínas significativamente enriquecidas se determinaron mediante una combinación de valores P_{adj} corregidos por FDR < 0,05 y $\log_2 FC > 0$. Para el estudio del proteoma mitocondrial, las proteínas significativas se filtraron de acuerdo con la base de datos Mitocarta 3.0 [255], seleccionando las anotadas como localizadas en la mitocondria. Mitocarta es un

MATERIAL Y MÉTODOS

inventario de genes que codifican proteínas con un fuerte respaldo sobre su localización mitocondrial obtenido a partir de datos experimentales y curado manual de la literatura.

El análisis de sobrerrepresentación (ORA u *Over-representation Analysis*) de los términos Gene Ontology (GO) se realizó según Fernandes, M y Husi, H. [256], utilizando la aplicación ClueGo (v2.5.8) para Cytoscape. Los *treemaps* se trazaron utilizando el paquete de R *rrvgo* (v1.6.0) para reducir la abundancia de los términos GO. Se establecieron los siguientes parámetros: *Homo sapiens* [9606], identificador [AccessionID], utilizando para las anotaciones GO_BiologicalProcess-EBI GO (Versión publicada el 13 de mayo de 2021). Configuración de la prueba estadística: el análisis ORA se realizó mediante un test hipergeométrico de dos caras, valor p ajustado <0,05, corrección de Bonferroni, nivel GO mínimo =5, nivel GO máximo =15, umbral de puntuación Kappa fijado en 0,4 (por defecto).

Las redes de Markov se realizaron utilizando las puntuaciones de interacción proteína-proteína de la base de datos STRING y se trazaron con la aplicación STRING (v1.7.0) para Cytoscape.

El ORA de los términos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) se llevó a cabo empleando las proteínas determinadas como significativamente enriquecidas. Para este test se empleó el paquete de R *clusterProfiler* (v4.2.2) [257] mediante la función *enrichKEGG* para análisis ORA, empleando como método de corrección FDR y seleccionando como significativas aquellas con valor p ajustado <0.05. La base de datos KEGG recopila de forma manual diferentes mapas de rutas de señalización que representan la interacción molecular, reacción y relación entre proteínas.

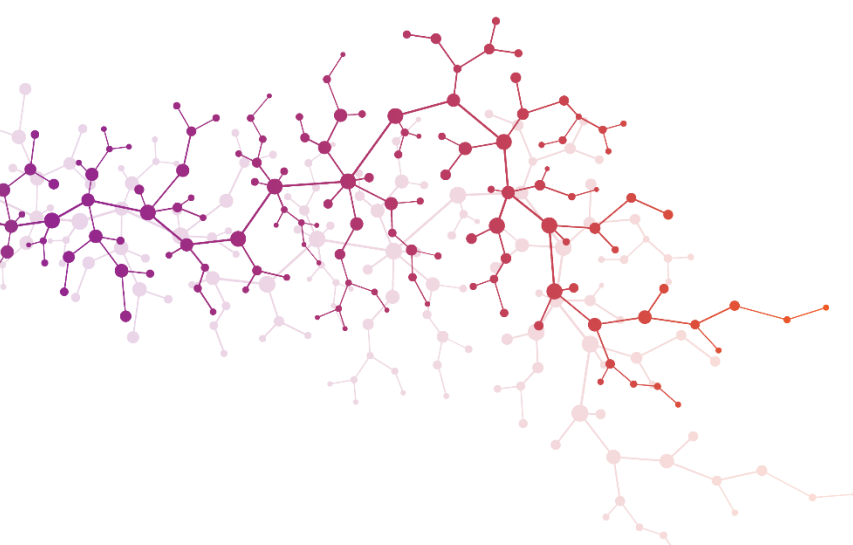
El ORA de los términos REACTOME se llevó a cabo empleando las proteínas determinadas como significativamente enriquecidas. Para este

test se empleó el paquete de R ReactomePA (v1.38.0) [258] mediante la función *enrichPathway* para análisis ORA, empleando como método de corrección FDR y seleccionando como significativas aquellas con valor p ajustado <0.05 . REACTOME es una base de datos de código abierto, acceso libre, curada manualmente y revisada por pares que recopila información para la visualización, interpretación y análisis de diferentes rutas de señalización celular.

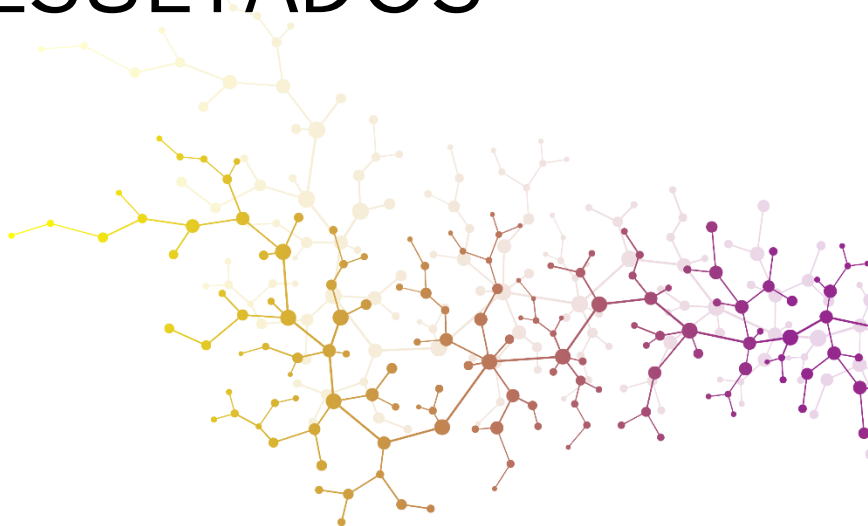
La búsqueda de la localización subcelular de las proteínas se llevó a cabo en la base de datos COMPARTMENTS. Este recurso web, semanalmente actualizado, integra evidencia sobre la localización subcelular de proteínas procedente de la literatura curada manualmente, cribado de alto rendimiento (*high-throughput screens*), minería de texto automática y métodos de predicción basados en secuencia de proteínas [259].

2.10. Análisis estadístico

En general, el análisis estadístico se ha llevado a cabo con el *software* GraphPad Prism (versión 8.0.1) para Windows (GraphPad *Software*, www.graphpad.com). Salvo que se indique lo contrario en los pies de figura, los datos han sido representados como la media (SEM) de al menos 3 experimentos biológicos/réplicas independientes. En general, se realizó un análisis *two-tailed* t-Student para la comparación de dos grupos. Para la comparación de grupos múltiples, se llevó a cabo un análisis *one-way* ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple de Tukey *post hoc*. Se consideró como significativo un p valor $<0,05$. Para indicar la significancia estadística, en este trabajo hemos utilizado el método basado en asteriscos “*”, donde $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $*** = p<0.001$ y $****=p<0.0001$. En el caso de no haber diferencias significativas, se indica abreviado como “n.s.”.



RESULTADOS



RESULTADOS

1. Estudio de la interacción retículo-mitocondria en la Ataxia de Friedreich

1.1. Frataxina forma parte de la red proteica de las MAMs

Muchas de las proteínas involucradas en enfermedades neurológicas que presentan un desequilibrio en la movilización de Ca^{2+} intracelular se localizan en el dominio MAMs [246]. Es por ello que, dadas las alteraciones descritas en la homeostasis del Ca^{2+} en modelos de FRDA [88], [89], [189], quisimos comprobar si FXN estaba presente en estas estructuras. Para abordar esta cuestión, realizamos un aislamiento de las fracciones subcelulares implicadas en la arquitectura de las MAMs (mitocondria, MAMs y RE) en la línea celular SH-SY5Y y un posterior análisis mediante WB. En primer lugar, llevamos a cabo una centrifugación diferencial, en la que obtuvimos las fracciones de mitocondria pura (P-MITO), mitocondria cruda (C-MITO), (MAMs + P-MITO), RE y MAMs. Posteriormente, se seleccionaron marcadores específicos de cada fracción subcelular y se evaluó la localización subcelular de FXN en cada compartimento mediante WB. Efectivamente, además de su presencia característica mitocondrial, encontramos que FXN se localiza en las MAMs (**Figura 11A**).

A continuación, con la finalidad de averiguar la implicación directa de FXN en la estructura de las MAMs, llevamos a cabo un análisis de la interacción de FXN con GRP75 e IP_3R , dos de las principales proteínas encargadas del intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria. Para ello empleamos la técnica PLA, que valora la interacción de proteínas con una proximidad menor a 40 nm. En primer lugar, comprobamos y optimizamos la concentración de anticuerpos de cada proteína por inmunofluorescencia (**Figura 11B**), para así asegurar la especificidad de la técnica PLA. Tanto en la imagen conjunta (*merge*) de FXN- IP_3R como en la de FXN-GRP75 pueden observarse, en amarillo, las áreas de colocalización de las proteínas

RESULTADOS

con ambas combinaciones de anticuerpos. Esto se confirmó al realizar el análisis de interacción por PLA, que demostró una relación robusta y directa de FXN con IP₃R y GRP75 (Figura 11C), lo cual sugiere un papel de FXN en la regulación y mantenimiento de las MAMs.

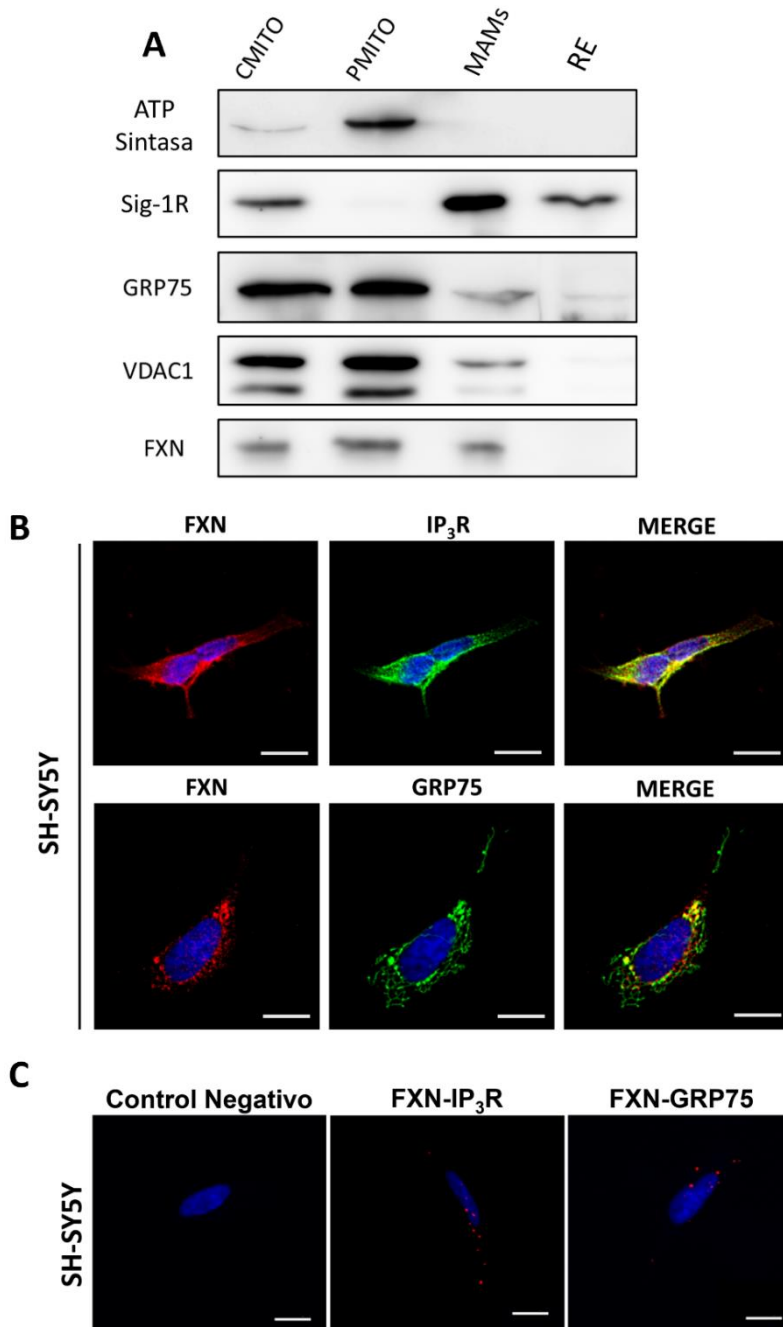


Figura 11: FXN se localiza en las MAMs. (A) Análisis mediante *Western Blot* de la localización subcelular de FXN tras el aislamiento de las fracciones subcelulares implicadas en las MAMs en la línea SH-SY5Y. Las proteínas Sig-1R, GRP75 y VDAC1 se utilizaron como marcadores de cada fracción. CMITO: fracción de mitocondria cruda (PMITO + MAMs), PMITO: fracción mitocondrial enriquecida, MAMs: fracción de membranas asociadas a retículo endoplasmático y mitocondria, RE: fracción de retículo endoplasmático. (B) Imágenes representativas de inmunotinciones de FXN con IP₃R o GRP75 como controles de especificidad de la técnica PLA. El núcleo, marcado con DAPI, se muestra en azul. (C) Imágenes de microscopía representativas del análisis de interacción FXN-IP₃R y FXN-GRP75 en las células SH-SY5Y. Los puntos rojos representan la interacción física entre las dos proteínas. El núcleo celular se marca en azul con DAPI. Barra de escala: 12 μ m. El anticuerpo anti-FXN se utilizó como control negativo.

1.2. El déficit de FXN altera la arquitectura de las MAMs

Las MAMs se componen de una gran variedad de proteínas con funciones muy diversas, desde canales hasta enzimas del metabolismo [260]. La transferencia de Ca²⁺ ER-mitocondria es mediada principalmente por IP₃R (situada en la membrana del RE), VDAC (MME) y la chaperona GRP75 (citosol). Para comprender si los niveles de FXN juegan un papel importante en la estabilidad de las MAMs a través de esta interacción proteica, evaluamos las conexiones ER-mitocondria en células con déficit de FXN (**Figuras 12A-C y 13A-C**). Para ello utilizamos como modelo de estudio dos líneas celulares estables deficientes en FXN, basadas en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y. El neuroblastoma es un tumor del desarrollo originado a partir de la cresta neural, al igual que las neuronas del DRG. De este modo, las líneas FXN-138.1 y FXN-138.2 se generaron mediante el silenciamiento del gen *FXN* utilizando ARNsh o ARN en horquilla, obteniendo un 82% y 78% de reducción de FXN respectivamente [88]. En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas para realizar la inmunofluorescencia utilizando anticuerpos frente a GRP75, IP₃R y VDAC1 y se comprobó que mostraban un patrón propio de la localización subcelular de estas proteínas (**Figuras 12A y 13A**). Las imágenes de microscopía muestran que, tanto en las células control como en las

RESULTADOS

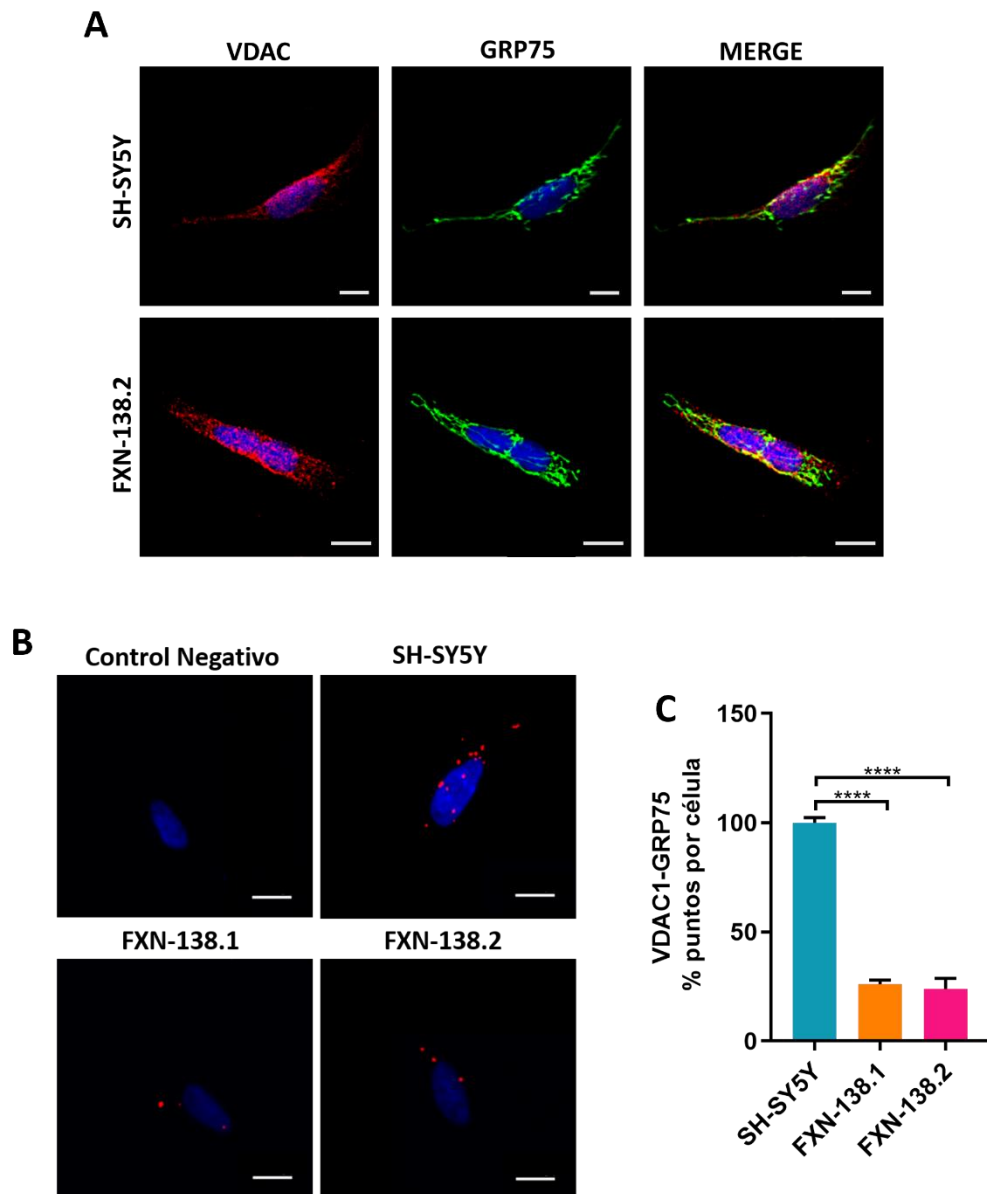


Figura 12: Las interacciones VDAC1-GRP75 disminuyen en condiciones de déficit de FXN. (A) Imágenes representativas de inmunotinciones de VDAC1 y GRP75 en células SH-SY5Y y FXN-138.2 como controles de especificidad de la técnica PLA. (B) Imágenes de microscopía representativas de PLA evaluando las interacciones VDAC-GRP75 de la línea control y las líneas deficientes en FXN en condiciones basales. Los puntos rojos representan la interacción física entre ambas proteínas y el núcleo (azul) se marcó con DAPI. Barra de escala: 12 μ m. (C) Niveles normalizados de interacción (puntos) por célula en cada línea con silenciamiento de FXN comparada con la línea SH-SY5Y control (SH-SY5Y: 100 \pm 2%; FXN-138.1: 26 \pm 1,91%; FXN-138.2: 23,78 \pm 4,9%). Los resultados (n \geq 4) se representan como la media \pm SEM. Se analizó un mínimo de 500 células por condición en cada experimento independiente. Significancia ANOVA: ****p \leq 0,0001 sobre SH-SY5Y.

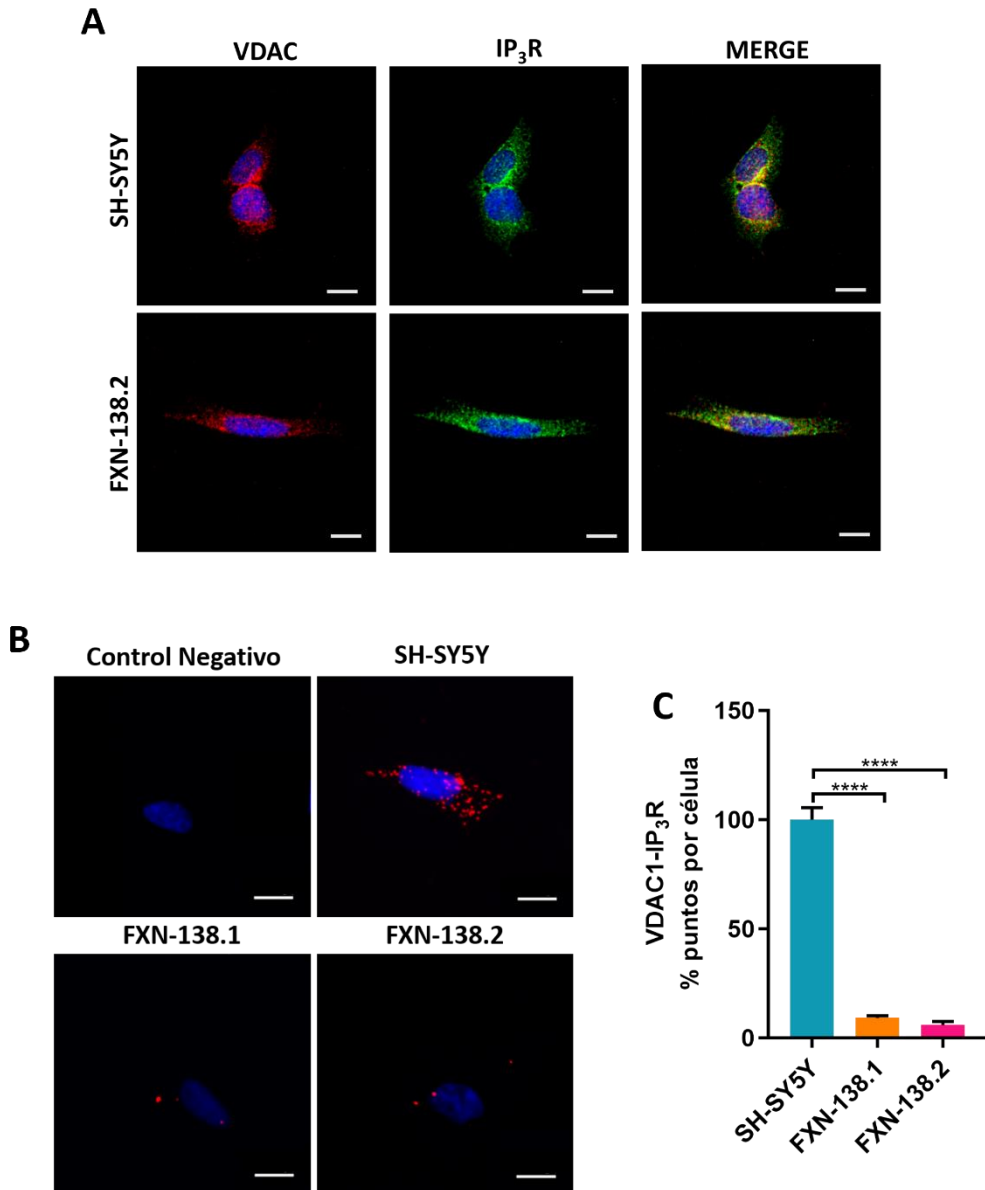


Figura 13: Las interacciones VDAC1-IP₃R disminuyen en condiciones de déficit de FXN. (A) Imágenes representativas de inmunotinciones de VDAC1 e IP₃R en células SH-SY5Y y FXN-138.2 como controles de especificidad de la técnica PLA. (B) Imágenes de microscopía representativas de PLA evaluando las interacciones VDAC-IP₃R de la línea control y las líneas deficientes en FXN en condiciones basales. Los puntos rojos representan la interacción física entre ambas proteínas y el núcleo (azul) se marcó con DAPI. Barra de escala: 12 μ m. (C) Niveles normalizados de interacción (puntos) por célula en cada línea con silenciamiento de FXN comparada con la línea SH-SY5Y control (SH-SY5Y, 100 \pm 5,48%; FXN-138.1, 9,14 \pm 1,07%; FXN-138.2, 5,99 \pm 1,5%). Los resultados (n \geq 4) se representan como la media \pm SEM. Se analizó un mínimo de 500 células por condición en cada experimento independiente. Significancia ANOVA: ****p \leq 0,0001 sobre SH-SY5Y.

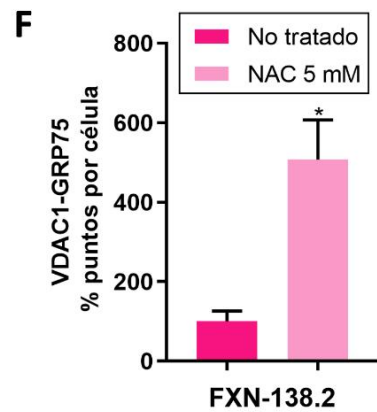
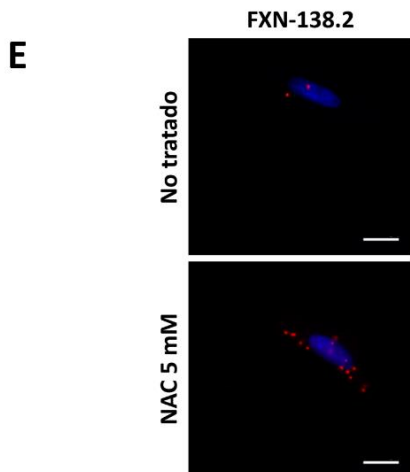
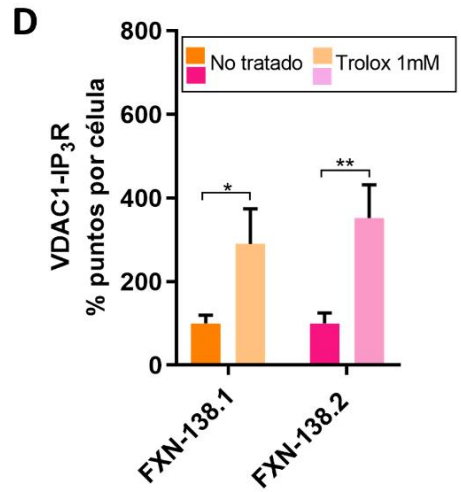
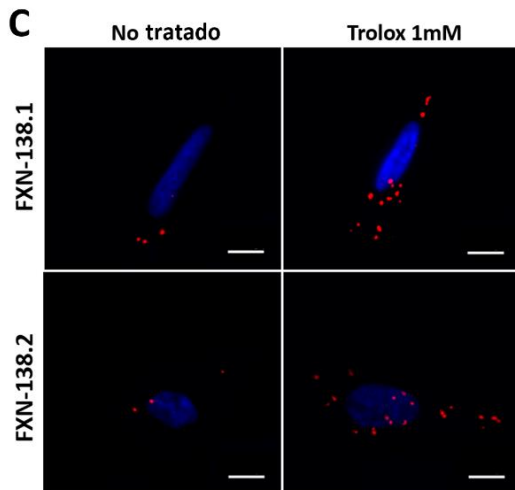
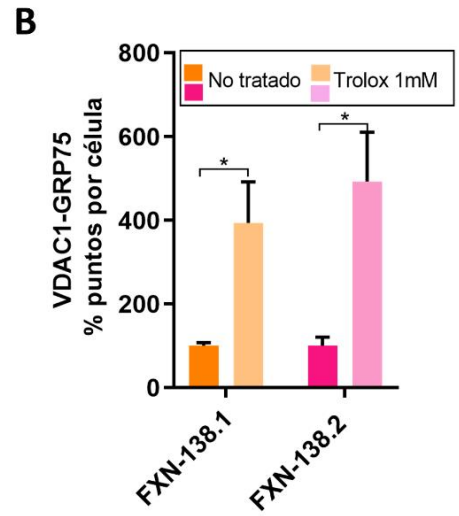
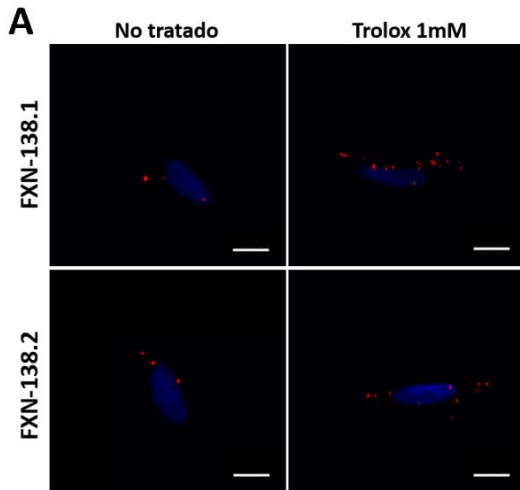
RESULTADOS

deficientes en FXN, existen áreas de colocalización VDAC1-GRP75 y VDAC1-IP₃R, que se corresponden con la formación de las MAMs. Posteriormente, realizamos un análisis y cuantificación por PLA de las interacciones de estas dos combinaciones de proteínas (**Figuras 12B, C y 13B, C**).

En la **Figura 12B** puede observarse que, tras la reducción de los niveles de FXN, se produce una drástica disminución en el número de interacciones entre VDAC y GRP75 en comparación con las células control (**Figura 12C**). En consonancia, las interacciones entre VDAC1 e IP₃R también disminuyen en condiciones de deficiencia de FXN (**Figuras 13B y C**). Estos resultados indican que, en condiciones de déficit de FXN, la interacción ER-mitocondria se encuentra afectada, lo cual podría provocar la desregulación en la transferencia de Ca²⁺ mitocondrial, explicando la dishomeostasis del Ca²⁺ descrita en este y otros modelos de FRDA [88], [89], [189] y la importancia de FXN en la estructura de las MAMs.

1.3. Los antioxidantes rescatan las interacciones retículo-mitocondria en células con déficit de FXN

Los antioxidantes han sido objeto de evaluación clínica en la FRDA durante más de 20 años, dado que el estrés oxidativo es un marcador presente tanto en modelos como en pacientes de la enfermedad [220]. A continuación, con el objetivo de dilucidar la posible relación entre la desregulación del Ca²⁺ y las MAMs en la FRDA, decidimos utilizar antioxidantes como tratamiento de nuestras células deficientes en FXN (**Figura 14**). En primer lugar escogimos el Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E, que actúa como secuestrador de peróxidos lipídicos y por tanto, contribuye a la estabilización de las membranas celulares [261]. Abeti y colaboradores describieron que la vitamina E recupera la captación de Ca²⁺ mitocondrial en neuronas cerebelosas y cardiomiocitos deficientes en FXN [89]. De este modo, analizamos el impacto del Trolox en la integridad de las MAMs, incubando las líneas FXN-138.1 y FXN-138.2 con



RESULTADOS

Figura 14: El tratamiento con antioxidantes rescata los contactos de las MAMs en células deficientes en FXN. Las líneas FXN-138.1 y 2 se trataron con Trolox 1mM durante 24h (**A-D**). La línea FXN-138.2 se trató con N-acetilcisteína (NAC) 5mM durante 24h (**E, F**). (**A, C, E**) Imágenes de microscopía representativas de PLA evaluando la interacción VDAC1-GRP75 (**A, E**) y VDAC1-IP₃R (**C**) tras los tratamientos con antioxidantes. Barra de escala: 12 μ m. (**B, D, F**) Niveles normalizados de interacción (puntos) por célula en cada línea deficiente en FXN comparada consigo misma tras los tratamientos. (**B**) FXN-138.1: No tratado $100 \pm 7,4\%$; Trolox 1 mM $394,2 \pm 97,5\%$; FXN-138.2: No tratado $100 \pm 20,6\%$; Trolox 1 mM $492,6 \pm 117,87\%$ (**D**) FXN-138.1: No tratado $100 \pm 19,8\%$; Trolox 1 mM $290,1 \pm 83,79\%$; FXN-138.2: No tratado $100 \pm 25\%$; Trolox 1 mM $352,2 \pm 79,4\%$. (**F**) FXN-138.2: No tratado $100 \pm 26\%$; NAC 5 mM $506,95 \pm 100,46\%$. Los resultados ($n \geq 4$) se representan como la media \pm SEM. Se analizó un mínimo de 500 células por condición en cada experimento independiente. Significancia t-Student: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ sobre cada línea en condiciones basales.

Trolox 1 mM durante 24h. El análisis mediante PLA de las interacciones ER-mitocondria mostró un marcado aumento en el número de interacciones tras el tratamiento, tanto de VDAC1-GRP75 (**Figuras 14A y B**), como de VDAC1-IP₃R (**Figuras 14C y D**).

Adicionalmente, tratamos las células FXN-138.2 con N-Acetilcisteína (NAC) 5mM durante 24h. La NAC es una molécula tiol versátil relacionada con los principales mecanismos antioxidantes de la célula. Actúa en la regulación del estado redox de forma directa reaccionando con diferentes ROS y de forma indirecta, participando en la restauración de grupos tiol y como donante de cisteínas en la síntesis del GSH [262]. En concordancia con los resultados obtenidos con el Trolox, el análisis de PLA tras el tratamiento con NAC reveló una recuperación en el número de interacciones VDAC1-GRP75 en la línea FXN-138.2 (**Figuras 14E y F**). Estos resultados indican que tanto el Trolox como la NAC restablecen los contactos entre ambos compartimentos, probablemente debido a que provocan un estado reductor en el entorno de las membranas mitocondriales y del RE.

1.4. Los antioxidantes recuperan la movilización de Ca^{2+} a la mitocondria

Los resultados obtenidos sobre la restauración de la interacción RE-mitocondria tras los tratamientos con antioxidantes en nuestro modelo nos llevaron a analizar si esta recuperación estructural era también funcional a través de la incorporación mitocondrial de Ca^{2+} . Tras observar un comportamiento similar en las líneas FXN-138.1 y FXN-138.2, decidimos continuar los experimentos únicamente con la línea celular FXN-138.2. Las células FXN-138.2 y las células control se transfectaron con una “proteína camaleón” (*cameleon protein* 4mtD3cpv), diseñada para visualizar los cambios de Ca^{2+} mitocondrial en célula viva. En concreto, 4mtD3cpv cambia de conformación al unirse a Ca^{2+} , emitiendo fluorescencia en dos longitudes de onda y permitiendo su análisis ratiométrico. Se utilizó Carbacol (Cch) para desencadenar la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de IP_3R y así analizar la incorporación de este catión a la mitocondria. En primer lugar, se realizó una curva de concentraciones de Cch (25 μM , 250 μM , 500 μM y 900 μM) en las células SH-SY5Y y en las FXN-138.2. La **Figura 15A** muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia de la proteína 4mtD3cpv (Ratio FRET) tras la adición del Cch, lo cual indica que el Ca^{2+} procedente del RE está entrando a la mitocondria. En la **Figura 15B** se observa el análisis del área bajo la curva en cada condición. Los resultados indicaron que a igual concentración de Cch, la respuesta de las células deficientes en FXN era mucho menor comparada con las células control. Dado que las células deficientes en FXN no respondieron al Cch 25 μM , se determinó que la concentración óptima era 250 μM , ya que es la mínima que genera la máxima respuesta en ambas líneas celulares.

A continuación, se procedió al análisis de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} en ambas líneas celulares tras los tratamientos con Trolox y NAC durante 24h. Al igual que en el experimento anterior, los resultados

RESULTADOS

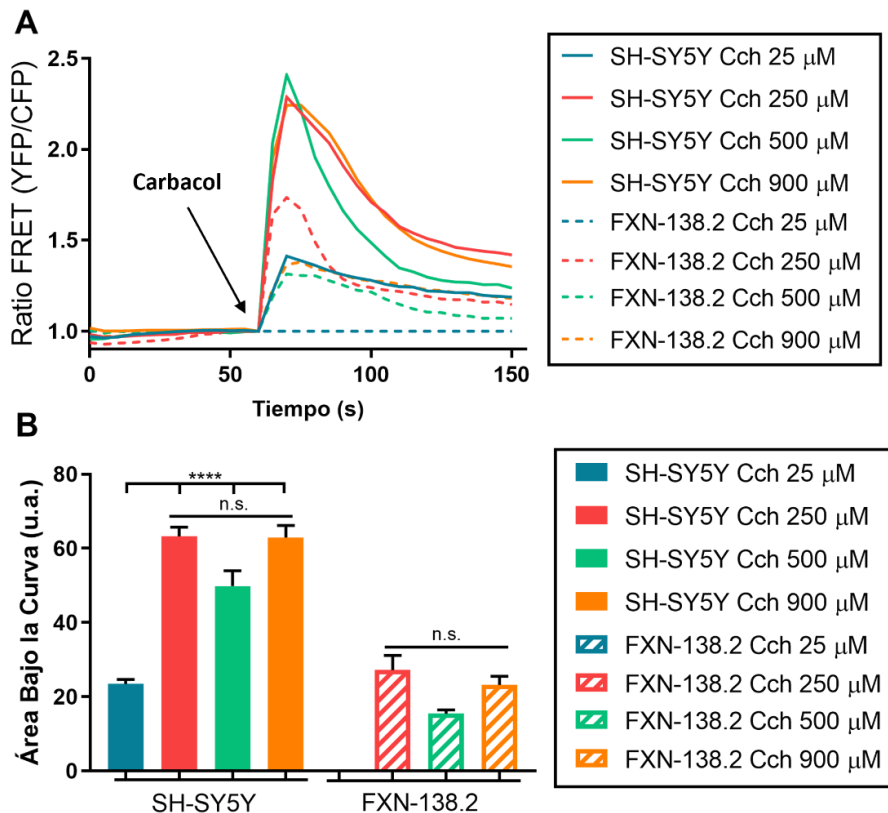


Figura 15: Curva de dosis-respuesta de Carbacol (Cch) en las células SH-SY5Y y FXN-138.2. (A) Análisis FRET de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} . Se utilizaron concentraciones de Cch 25 μ M, 250 μ M, 500 μ M y 900 μ M para estimular la salida de Ca^{2+} del RE a través de IP_3R . Los resultados ($n \geq 3$) se representan como niveles de fluorescencia normalizados sobre el valor de carga del Cch. Se analizó un rango de 11-31 células en cada condición y experimento independiente. (B) Análisis del área bajo la curva de la respuesta mitocondrial a las diferentes concentraciones de Cch de las líneas SH-SY5Y (25 μ M $24,13 \pm 1,27$; 250 μ M $64,18 \pm 2,48$; 500 μ M $50,71 \pm 4,18$; 900 μ M $63,25 \pm 3,27$). y FXN-138.2 (25 μ M 0; 250 μ M $29,41 \pm 4,04$; 500 μ M $15,61 \pm 1,07$; 900 μ M $24,02 \pm 2,36$) u. a.: unidades arbitrarias. Significancia ANOVA: **** $p < 0,0001$

demonstraron una respuesta significativamente menor al Cch en condiciones basales de las células deficientes en FXN comparadas con las células control (Figura 16A). El análisis del área bajo la curva no indicó diferencias significativas en las células control tras los tratamientos (Figura 16B), mientras que el análisis en células con déficit de FXN reveló

una clara potenciación de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} por parte de ambos antioxidantes (**Figura 16B**), siendo mayor el efecto potenciado por el tratamiento con NAC. Del mismo modo, la velocidad de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en las células FXN-138.2 es mayor tras el tratamiento con NAC, ya que el pico de la intensidad de fluorescencia (valor más alto del eje Y) es más alto comparado con el del Trolox en el mismo periodo de tiempo. Este valor supera incluso al de la línea control en condiciones basales (**Figura 16A**). Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que tanto el Trolox como el NAC recuperan la red de conexión ER-mitocondria, lo cual mejora el intercambio de Ca^{2+} entre ambos compartimentos en condiciones de deficiencia de FXN.

Tras comprobar que los antioxidantes mejoran la comunicación ER-mitocondria, tanto estructural como funcionalmente, quisimos averiguar si sus efectos sobre la peroxidación lipídica podrían ser la base molecular del rescate observado. Tras 24 h de tratamiento con antioxidantes en la línea deficiente en FXN, las líneas control y FXN-138.2 se incubaron con la sonda Bodipy C11 (481/491), un sensor ratiométrico de la peroxidación de lípidos en células y membranas. Se utilizó como control positivo el H_2O_2 , incubado en las células SH-SY5Y una hora antes del análisis mediante citometría de flujo (**Figura 16C**). Los resultados confirmaron un aumento significativo de peroxidación lipídica en las células deficientes en FXN. Además, tanto el tratamiento con Trolox como con NAC alivió la peroxidación lipídica en las células FXN-138.2, sugiriendo que el daño oxidativo afecta a la integridad de las MAMs en nuestro modelo de FRDA. Estos resultados fortalecen la premisa de que la recuperación estructural y funcional de las MAMs es dependiente del estado redox y, por tanto, de que el estrés oxidativo ejerce un papel clave en la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de nuestro modelo.

RESULTADOS

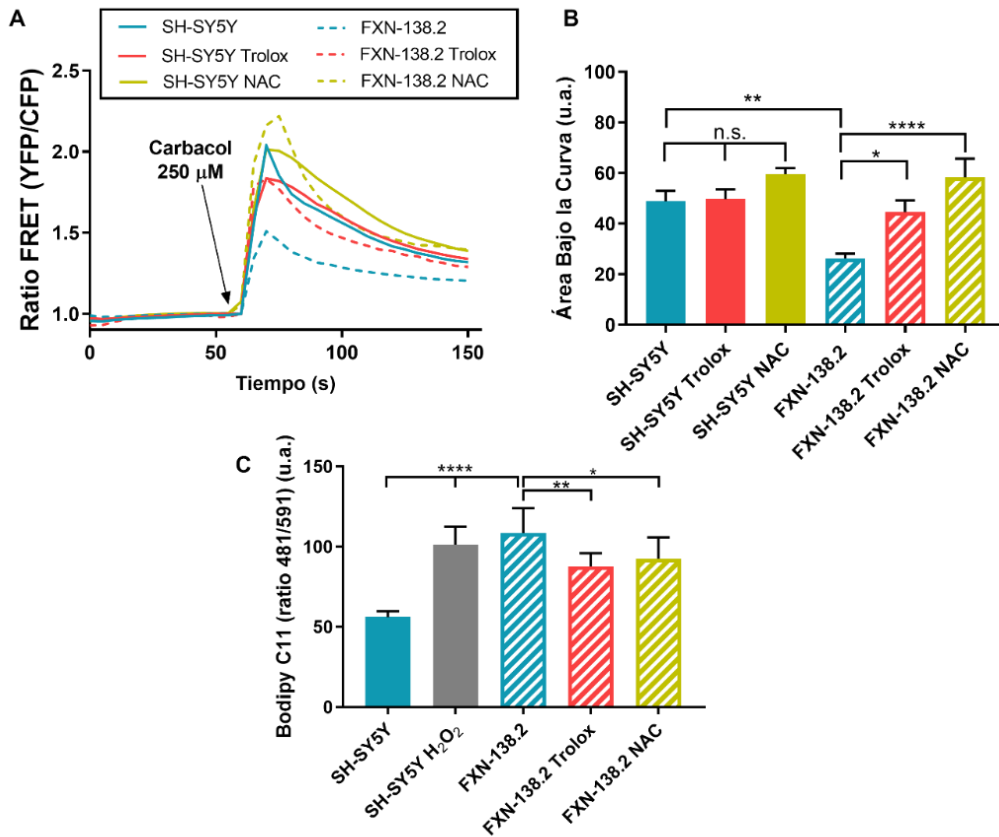


Figura 16: Los antioxidantes recuperan la entrada de Ca^{2+} mitocondrial y alivian la peroxidación lipídica en células deficientes en FXN. **(A)** Análisis FRET de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} tras el tratamiento con Trolox 1mM o N-acetilcisteína (NAC) 5mM durante 24h. Se utilizó Cch 250 μM para estimular la salida de Ca^{2+} desde el RE a través de los canales IP_3R . Valores de los picos: SH-SY5Y: No tratado 2,03; Trolox 1,83; NAC 2,01; FXN-138.2: No tratado 1,5; Trolox 1,83; NAC 2,21. Los resultados ($n=3$) se representan como los niveles normalizados de intensidad de fluorescencia sobre el valor de carga del Cch. Se analizó un rango de 15-40 células en cada condición y experimento independiente. **(B)** Análisis del área bajo la curva de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} tras el tratamiento con Trolox y NAC de las líneas SH-SY5Y (No tratado $48,79 \pm 4,14$; Trolox 1mM $49,71 \pm 3,87$; NAC 5mM $59,6 \pm 2,37$) y FXN-138.2 (No tratado $26,17 \pm 1,97$; Trolox 1mM $44,54 \pm 4,64$; NAC 5mM $58,32 \pm 7,38$) u. a.: unidades arbitrarias. **(C)** Detección de peroxidación lipídica mediante citometría de flujo. Las células se marcaron con Bodipy C11 (581/591) 5 μM durante 30 min. Se utilizó H_2O_2 500 μM (1h) en la línea SH-SY5Y como control positivo. Las células FXN-138.2 se trataron con los antioxidantes durante 24h. Los resultados ($n \geq 4$) de intensidad de fluorescencia se representan en unidades arbitrarias como la media del ratio 481/591 \pm SEM. Significancia ANOVA: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

En el ámbito clínico de la FRDA, la terapia con antioxidantes ha sido de las más evaluadas en ensayos clínicos de la enfermedad. Sin embargo, los antioxidantes clásicos no han tenido éxito a pesar de haberse testado durante más de 20 años [220]. La Omaveloxolona (Omap) es un potente activador de NRF2, un factor de transcripción que regula la expresión de enzimas relacionadas con la respuesta antioxidante y el metabolismo energético [263]. Es el único fármaco que ha demostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de FRDA [108], [109]. Por tanto, decidimos estudiar el efecto de la Omap en la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular presente en nuestro modelo con déficit de FXN. En primer lugar, verificamos que el fármaco es seguro en ambas líneas celulares, mediante el ensayo de viabilidad celular MTT, que evalúa la actividad metabólica celular. No encontramos diferencias significativas, en la viabilidad celular de las células control (**Figura 17A**), ni en la de las deficientes en FXN (**Figura 17B**). A continuación, realizamos una curva de dosis-respuesta de Omap (50 nM, 75 nM y 100 nM) en ambas líneas celulares y analizamos la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} 24h tras el tratamiento (**Figuras 18A-C**). Los resultados del análisis del área bajo la curva mostraron que la Omap no ejerce efectos significativos en las células control (**Figura 18A y C**), mientras que todas las concentraciones testadas en las células deficientes en FXN recuperan la captación de Ca^{2+} mitocondrial de forma significativa (**Figura 18B y C**). Asimismo, la concentración más alta (100 nM) promueve una transferencia de Ca^{2+} más rápida a la mitocondria en las células con déficit de FXN, ya que el valor máximo de intensidad de fluorescencia es mayor comparado con las otras las concentraciones, y superando la capacidad de las células control (**Figura 18B**). Por tanto, dado que no se ha descrito que la Omap incremente los niveles de FXN, esta se presenta como un novedoso potenciador de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} . Dado que este fármaco ha restaurado algunas características fisiopatológicas de modelos de la

RESULTADOS

enfermedad, estos resultados sugieren que las MAMs podrían ser una potencial diana terapéutica para la FRDA.

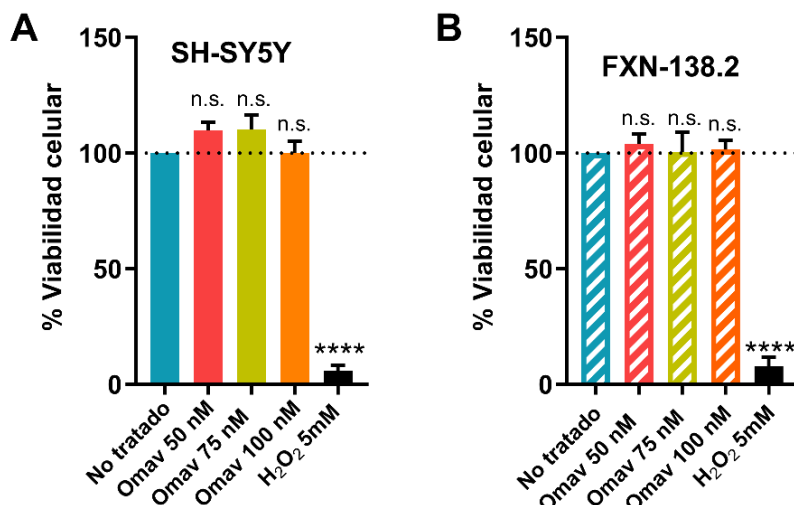


Figura 17: Análisis de viabilidad celular ras el tratamiento con Omaveloxolona (Oma) en las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2. (A, B) Análisis de viabilidad celular por MTT tras los tratamientos con diferentes concentraciones de Oma (50 nM, 75 nM y 100 nM) durante 24h en las líneas SH-SY5Y (No tratado 100±11,58%; Oma 50 nM 109,7±3,64%; Oma 75 nM 110,2±6,26%; Oma 100 nM 99,92±5,13%; H₂O₂ 5mM 5,98±2,3%) (A) y FXN-138.2 (100±8,21%; Oma 50 nM 103,9±4,25%; Oma 75 nM 100,5±8,41%; Oma 100 nM 101,4±4,05%; H₂O₂ 5mM 7,85±3,79%) (B). Las células se incubaron con el reactivo MTT durante 3 horas y se midió la absorbancia a 570 nm. Los resultados se muestran como la media (n=3) del porcentaje de viabilidad normalizada sobre el valor de la condición basal ±SEM. Se utilizó H₂O₂ 5mM como control positivo de la técnica.

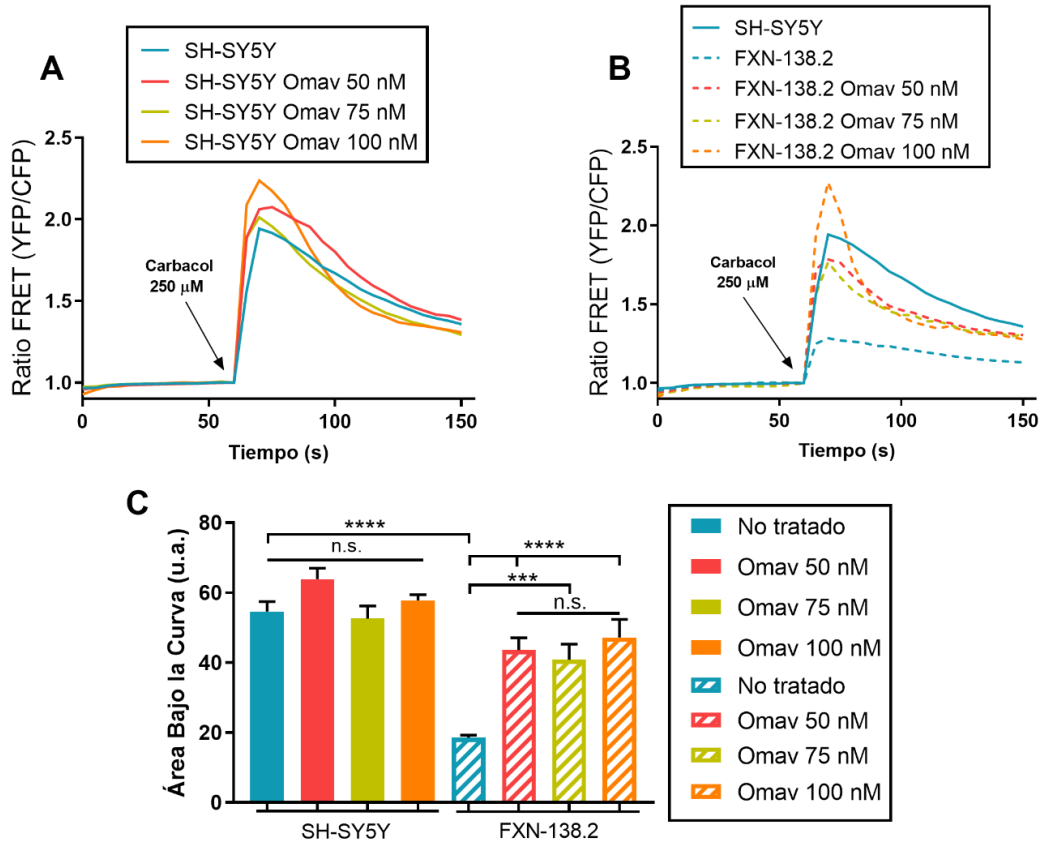


Figura 18: La Omaveloxolona (OmaV) restablece la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en condiciones de deficiencia de FXN. (A, B) Análisis FRET de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} . Se utilizó Carbacol (Cch) 250 μM para estimular la salida de Ca^{2+} desde el RE a través de los canales IP_3R . Las células se trataron previamente con OmaV durante 24h. Valores de los picos: SH-SY5Y: 1,94; FXN-138.2: No tratado 1,28; Omav 50 nM 1,78; Omav 75 nM 1,77; Omav 100 nM 2,27. Los resultados ($n \geq 4$) se representan como los niveles normalizados de intensidad de fluorescencia sobre el valor de carga del Cch. Se analizó un rango de 10-35 células en cada condición y experimento independiente. (C) Análisis del área bajo la curva de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} tras el tratamiento con OmaV de las líneas SH-SY5Y (No tratado $54,57 \pm 2,9$; Omav 50 nM $63,83 \pm 3,14$; Omav 75 nM $52,58 \pm 3,58$; Omav 100 nM $57,78 \pm 1,7$) y FXN-138.2 (No tratado $18,57 \pm 0,7$; Omav 50 nM $43,61 \pm 3,5$; Omav 75 nM $40,87 \pm 4,39$; Omav 100 nM $47,18 \pm 5,16$) u.a.: unidades arbitrarias. Significancia ANOVA: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.**

1.5. Estudio de las MAMs como posible diana terapéutica de la Ataxia de Friedreich

Llegados a este punto, quisimos comprobar si los fármacos dirigidos a proteínas residentes en las MAMs son capaces de recuperar la desregulación del flujo intracelular de Ca^{2+} observada en nuestro modelo. Para ello escogimos la Fluvoxamina (Flv), un fármaco dirigido a la membrana del RE, y el Kaempferol (KAM), dirigido a la membrana mitocondrial.

La Flv es un inhibidor de la recaptación de serotonina con alta afinidad por Sig-1R, la chaperona que estabiliza IP₃R para asegurar una adecuada transferencia de Ca^{2+} a la mitocondria. La Flv ha demostrado inducir la expresión de Sig-1R, ejerciendo un papel neuroprotector y protegiendo las células del estrés de RE [264]. Al igual que con la Omav, testamos la citotoxicidad de diferentes concentraciones de Flv durante 24h (1 μM , 5 μM y 10 μM) por MTT, tanto en las células control, como en las deficientes de FXN (**Figuras 19A y B**). Ninguna de las concentraciones provocó diferencias significativas en la viabilidad celular de ambas condiciones.

Posteriormente, procedimos al análisis de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} tras los tratamientos con las mismas concentraciones de Flv (1 μM , 5 μM y 10 μM). En las **Figuras 20A y C** se observa que la menor concentración de Flv (1 μM) consiguió incrementar de forma significativa la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria en las células control, tal y como se muestra en el análisis del área bajo la curva (**Figura 20C**). Sin embargo, en las células con déficit de FXN, el fármaco incrementó la captación de Ca^{2+} mitocondrial de forma satisfactoria en todas las concentraciones testadas. Sin embargo, a pesar de que los picos máximos de incorporación de Ca^{2+} son mayores cuando tratamos las células FXN-

138.2 con Flv 1 y 5 μM (Figura 20B), encontramos diferencias significativas en todos los tratamientos comparados con la condición basal en el análisis de área bajo la curva (Figuras 20B y C). Al compararlas entre sí, no mostraron diferencias significativas entre ellas. Estos resultados demuestran que la Flv es capaz de restaurar la comunicación RE-mitocondria en condiciones de deficiencia de FXN, a través de la activación de Sig-1R, lo cual sugiere que la Flv podría ser un novedoso candidato terapéutico para la FRDA.

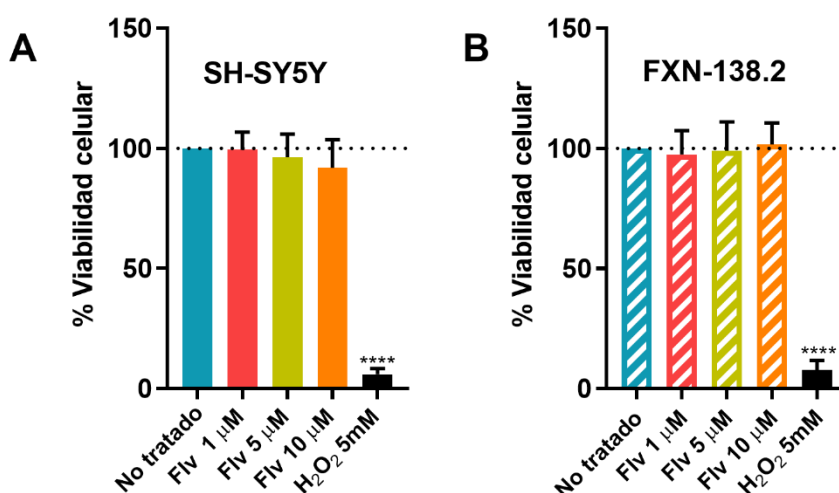


Figura 19: Análisis de viabilidad celular tras el tratamiento con Fluvoxamina (Flv) en las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2. (A, B) Análisis de viabilidad celular por MTT tras los tratamientos con diferentes concentraciones de Flv (1 μM , 5 μM y 10 μM) durante 24h en las líneas SH-SY5Y (No tratado 100±11,58; Flv 1 μM 99,34±7,4; Flv 5 μM 96,39±9,4; Flv 10 μM 91,84±11,79; H₂O₂ 5mM 5,98±2,3) (A) y FXN-138.2 (No tratado 100±8,21; Flv 1 μM 97,36±10,04; Flv 5 μM 99,04±11,87; Flv 10 μM 101,06±9,05; H₂O₂ 5mM 7,85±3,79) (B). Las células se incubaron con el reactivo MTT durante 3 horas y se midió la absorbancia a 570 nm. Los resultados se muestran como la media (n=3) del porcentaje de viabilidad normalizada sobre el valor de la condición basal ±SEM. Se utilizó H₂O₂ 5mM como control positivo de la técnica.

RESULTADOS

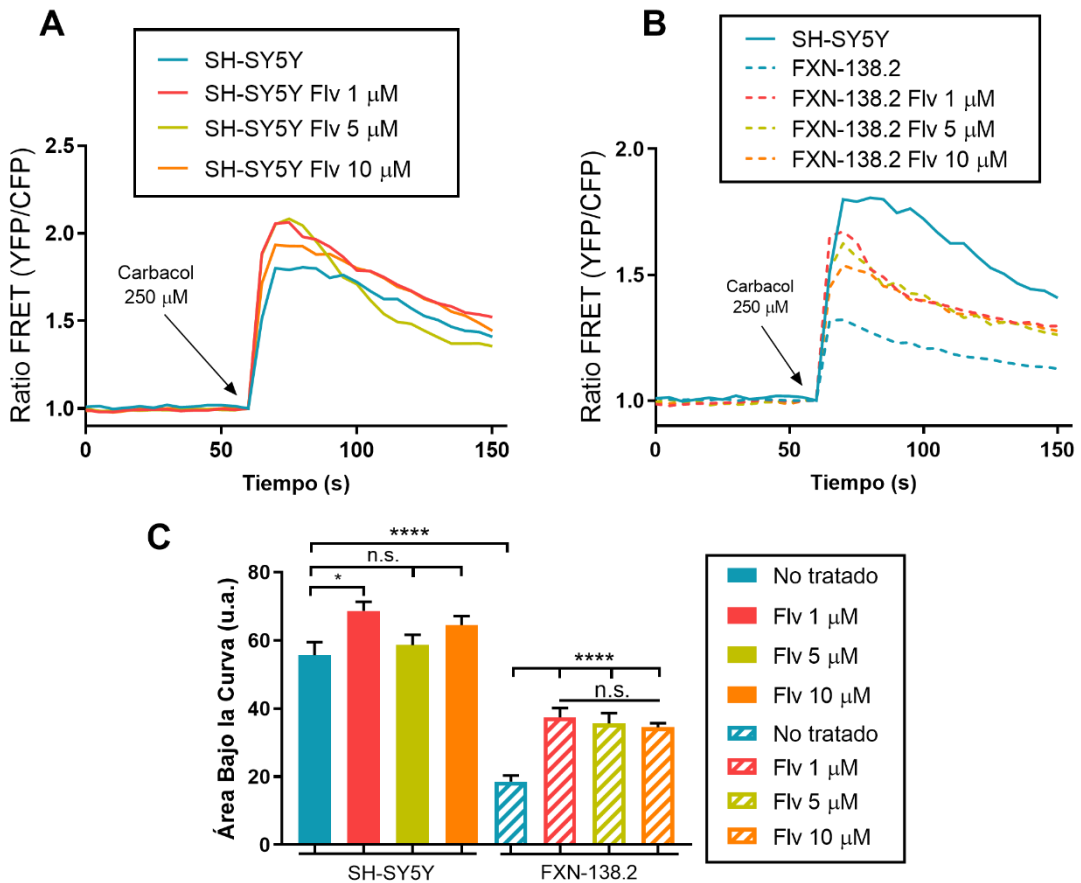


Figura 20: La Fluvoxamina (Flv) restablece la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en condiciones de déficit de FXN. (A, B) Análisis FRET de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} . Se utilizó Carbacol (Cch) 250 μM para estimular la salida de Ca^{2+} desde el RE a través de los canales IP_3R . Las células se trataron previamente con Flv durante 24h. Valores de los picos: SH-SY5Y: 1,81; FXN-138.2: No tratado 1,32; Flv 1 μM 1,67; Flv 5 μM 1,63; Flv 10 μM 1,54. Los resultados ($n \geq 4$) se representan como los niveles normalizados de intensidad de fluorescencia sobre el valor de carga del Cch. Se analizó un rango de 7-32 células en cada condición y experimento independiente. (C) Análisis del área bajo la curva de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} tras el tratamiento con Flv en las líneas SH-SY5Y (No tratado $55,67 \pm 3,8$; Flv 1 μM $68,64 \pm 2,65$; Flv 5 μM $58,56 \pm 3,06$; Flv 10 μM $64,51 \pm 2,6$) y FXN-138.2 (FXN-138.2: No tratado $18,49 \pm 1,89$; Flv 1 μM $37,42 \pm 2,75$; Flv 5 μM $35,62 \pm 3,00$; Flv 10 μM $34,46 \pm 1,22$) u.a.: unidades arbitrarias. Significancia ANOVA: * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Por otro lado, escogimos el KAM, un fármaco dirigido a MCU (*mitochondrial calcium uniporter*), el transportador mitocondrial de Ca^{2+} situado en la MMI. El KAM es el potenciador de MCU más relevante descrito hasta la fecha. Este flavonoide ha demostrado incrementar la importación de Ca^{2+} a la mitocondria, exhibiendo propiedades cardio y neuroprotectoras [265]–[269]. Así pues, procedimos a analizar su citotoxicidad en nuestros modelos celulares tras el tratamiento con KAM durante 24h (DMSO 0,02% (Vehículo), KAM 5 μM y KAM 10 μM). Al igual que en los casos anteriores, no se observaron cambios significativos en ninguna de las condiciones testadas en ambas líneas celulares, ni siquiera en las células tratadas con DMSO (Figuras 21A y B).

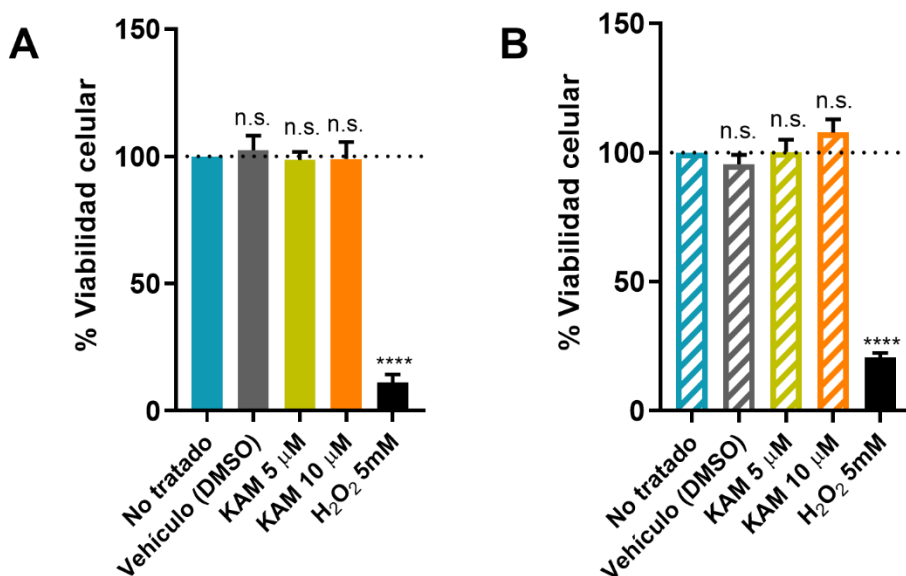


Figura 21: Análisis de viabilidad celular tras el tratamiento con Kaempferol (KAM) en las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2. (A, B) Análisis de viabilidad celular por MTT tras los tratamientos con diferentes concentraciones de KAM (5 μM y 10 μM) durante 24h en las líneas SH-SY5Y (No tratado 100±5,38%; DMSO 0,02% 102,3±5,79%; KAM 5 μM 98,56±3,2%; KAM 10 μM 99,03±6,5%; H₂O₂ 5mM 11,19±3,16%) (A) y FXN-138.2 (No tratado 100±2,21%; DMSO 0,02% 95,47±3,6%; KAM 5 μM 100,2±4,69%; KAM 10 μM 107,8±5,01%; H₂O₂ 5mM 20,54±1,86%) (B). Las células se incubaron con el reactivo MTT durante 3 horas y se midió la absorbancia a 570 nm. Los resultados se muestran como la media (n=3) del porcentaje de viabilidad normalizada sobre el valor de la condición basal ±SEM. Se utilizó H₂O₂ 5mM como control positivo de la técnica. DMSO: dimetilsulfóxido.

RESULTADOS

Al evaluar la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} tras los tratamientos (**Figuras 22A-C**), descubrimos que el DMSO ejercía un efecto negativo sobre el flujo de Ca^{2+} mitocondrial en ambas líneas celulares. Sin embargo, al incubar las células con el KAM, no se observó este efecto. En las células SH-SY5Y, la afluencia de Ca^{2+} mitocondrial se vio significativamente incrementada con KAM 5 μM , mientras que ésta se mantuvo tras el tratamiento con KAM 10 μM (**Figura 22A y C**). En cuanto a las células deficientes en FXN, el DMSO también disminuyó la movilización de Ca^{2+} a la mitocondria, pero este efecto no se observó al tratar las células con el fármaco. En este caso, únicamente la concentración más alta (KAM 10 μM) fue capaz de incrementar la transferencia de Ca^{2+} a la mitocondria en condiciones de deficiencia de FXN (**Figura 22B y C**). Esto puede deberse a los efectos negativos del DMSO en el flujo de Ca^{2+} mitocondrial, ya que el tratamiento con KAM 5 μM en las células control consiguió incrementar significativamente la transferencia mitocondrial de Ca^{2+} , mientras que no produjo cambios significativos en las células deficientes en FXN. Este hecho pone de manifiesto la capacidad potenciadora del KAM sobre MCU, contrarrestando los efectos perjudiciales del solvente de este fármaco sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial. En cuanto a los picos de intensidad de fluorescencia, el KAM consiguió acelerar la incorporación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial de las células con déficit de FXN, siendo esta mucho más evidente en la mayor concentración testada (**Figura 22B**). Por tanto, estos resultados muestran que favorecer la actividad de MCU a través del KAM podría ser un mecanismo potencial para aliviar las alteraciones observadas en la homeostasis del Ca^{2+} en condiciones de déficit de FXN.

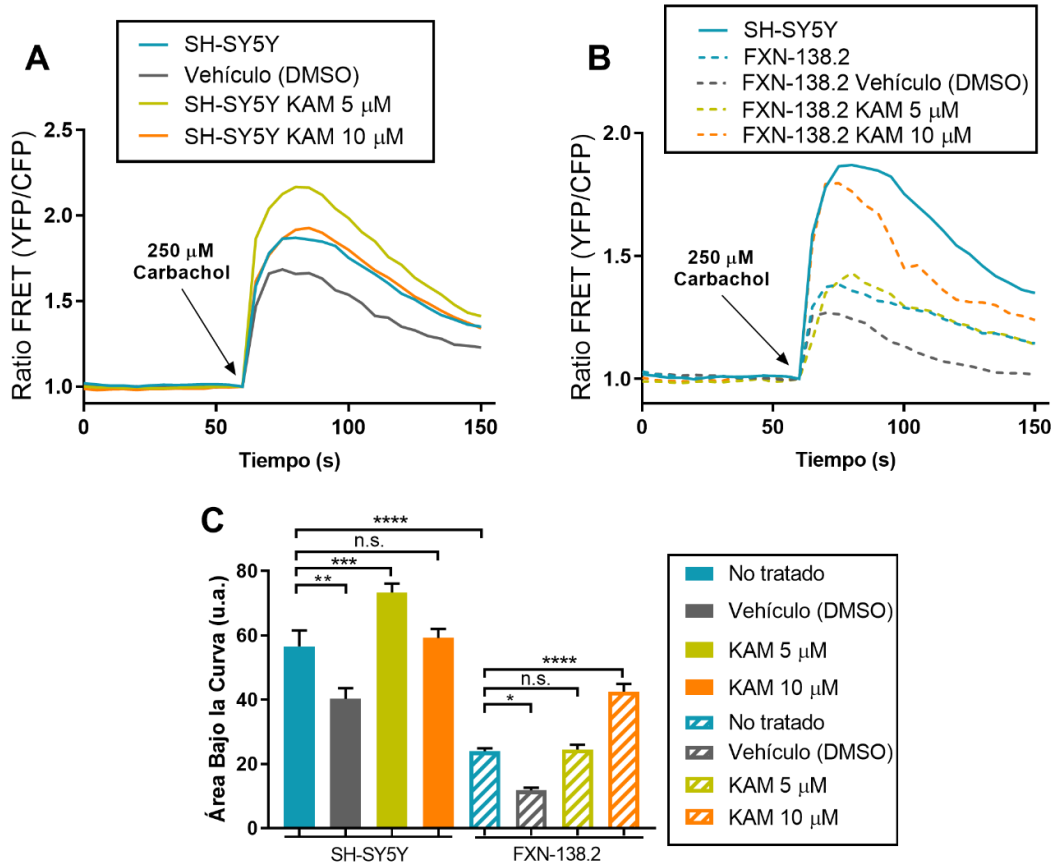


Figura 22: El Kaempferol (KAM) restablece la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en condiciones de déficit de FXN. (A, B) Análisis FRET de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} . Se utilizó Carbachol (Cch) 250 μM para estimular la salida de Ca^{2+} desde el RE a través de los canales IP_3R . Las células se trataron previamente con KAM durante 24h. Valores de los picos: SH-SY5Y: 1,87; FXN-138.2: No tratado 1,38; DMSO 0,02% 1,02; KAM 5 μM 1,43; Flv 10 μM 1,79). Los resultados (n=4) se representan como los niveles normalizados de intensidad de fluorescencia sobre el valor de carga del Cch. Se analizó un rango de 7-32 células en cada condición y experimento independiente. DMSO: dimetilsulfóxido. (C) Análisis del área bajo la curva de la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} tras el tratamiento con KAM de las líneas SH-SY5Y (No tratado $56,54 \pm 4,98$; DMSO 0,02% $40,26 \pm 3,32$; KAM 5 μM $73,33 \pm 2,77$; KAM 10 μM $59,20 \pm 2,77$) y FXN-138.2 (No tratado $23,94 \pm 0,9$; DMSO 0,02% $11,81 \pm 0,83$; KAM 5 μM $24,48 \pm 1,51$; KAM 10 μM $42,46 \pm 2,5$) u.a.: unidades arbitrarias. Significancia ANOVA: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

RESULTADOS

2. Estudio de la expresión de las isoformas canónica y citosólica de frataxina en células humanas y tejidos murinos

Como ya se ha comentado anteriormente, FXN es una proteína de localización predominantemente mitocondrial. Sin embargo, diferentes autores han descrito la presencia de FXN extramitocondrial funcional anteriormente [153], [159], [164], al igual que una isoforma con localización subcelular citosólica (FXN II) traducida a partir de *splicing* alternativo del gen *FXN* (**Figura 23A**). Su transcrito se traduce a partir de dos variantes exónicas denominadas 1B y 1B Δ 18, que dan lugar a la misma proteína (FXN II). Este transcrito difiere de la isoforma canónica (FXN I) en el exón 1, lo que determina que FXN II carezca del péptido señal de localización mitocondrial presente en la secuencia proteica de FXN I. Por tanto, el hecho de que FXN se localice en las MAMs nos llevó a preguntarnos qué isoforma es la presente en este subdominio. En este contexto, se llevó a cabo un análisis de expresión de las variantes FXN I y II en diferentes modelos celulares mediante RT-qPCR. Para ello, se realizó una extracción de ARN de las células SH-SY5Y, HeLa y linfoblastos inmortalizados, tanto de individuos control como de pacientes de FRDA, y su posterior retrotranscripción por RT-PCR. A continuación, se evaluó la expresión de las isoformas FXN I y II por qPCR, para las cuales se diseñaron *primers* específicos, de acuerdo con las secuencias anotadas en las bases de datos GenBank (FXN I: NM_000144.5; FXN II: DA102669.1, AK308620.1) y Ensembl (FXN I: ENST00000484259.3; FXN II: ENST00000498653.5) (**Figura 23A**). La expresión se midió en las líneas celulares SH-SY5Y (**Figura 23B**), HeLa (**Figura 23C**) y linfoblastos inmortalizados, tanto de individuos control, como de pacientes de FRDA (**Figura 23D**). Por un lado, la expresión de FXN I en condiciones basales es mayor en las células SH-SY5Y, seguida de las HeLa y los linfoblastos control. Además, los resultados muestran que, si bien la expresión de FXN I canónica es mayor, FXN II se expresa en todos los modelos testados. Como era de esperar, la expresión de FXN I en linfoblastos de pacientes

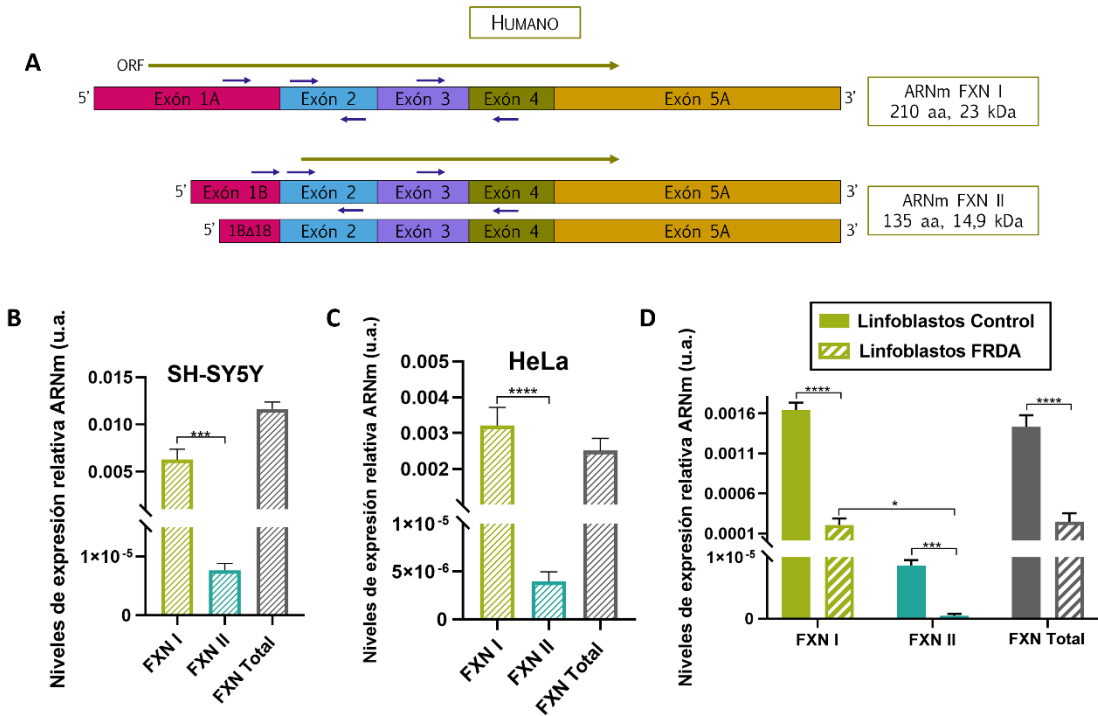


Figura 23: Expresión de las variantes canónica y citosólica de *FXN* en células humanas. (A) Representación esquemática del ARNm de las variantes de *splicing* canónica (FXN I) y citosólica (FXN II) del gen *FXN*. Ambos ARNm están codificados por 5 exones y comparten los exones 2-5. FXN I se traduce a partir del exón 1A, que contiene la secuencia de localización mitocondrial (MTS). Los exones alternativos 1B y 1B que carece de 18 nucleótidos (1BΔ18) están presentes en el ARNm del FXN II. Esto hace que el FXN II se traduzca a partir del exón 2, dando lugar a una isoforma más corta que carece del MTS y se localiza en el citosol. Las flechas verdes oscuro representan el marco de lectura abierto (*Open Reading Frame* u ORF), mientras que las flechas cortas representan los *primers* diseñados para analizar la expresión relativa de cada isoforma, así como el control (FXN total), que incluye regiones comunes a ambas isoformas. MTS: *Mitochondrial Targeting Sequence*. (B-D) Niveles de expresión relativa del ARNm de FXN I y II en las líneas celulares SH-SY5Y (FXN I: $0,0063 \pm 0,0006$; FXN II: $7,667e-006 \pm 6,667e-007$) (B), HeLa (FXN I: $0,0032 \pm 0,0002$; FXN II: $4,000e-006$) (C) y linfoblastos inmortalizados de individuos control (FXN I: $0,001 \pm 9,130e-005$; FXN II: $8,667e-006 \pm 8,819e-007$) (n=3) y pacientes de FRDA (FXN I: $0,0002 \pm 8,035e-005$; FXN II: $5,065e-007 \pm 2,849e-007$) (n=4) (D). La expresión del transcrito denominado FXN total se utilizó como control. Los resultados (n=3) se expresan como el valor de expresión normalizado sobre los niveles de expresión del gen constitutivo GAPDH ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Significancia ANOVA: ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001.

RESULTADOS

se encuentra drásticamente reducida, en concreto un orden de magnitud comparado con los linfoblastos control. Además, la reducción de FXN II en pacientes de FRDA es mucho mayor, no llegando a detectarse expresión en algunas de las líneas celulares analizadas (**Figura 23D**).

Por otro lado, también se ha descrito la presencia de *fxn* extramitocondrial madura en el ratón [167], siendo esta la localización prevalente en hígado murino. Sin embargo, la expresión de variantes de *splicing* del gen *Fxn* no se ha analizado por el momento. La base de datos AceView [270] recoge las secuencias de ARNm alternativas a la canónica anotadas para *Mus musculus*. Entre ellas, encontramos una variante que codifica para una isoforma de FXN citosólica murina (Fxn II), que podría ser homóloga a la isoforma citosólica humana (FXN II) (**Figura 24A**). Su secuencia de ARNm se compone de 4 exones, careciendo del exón 1, donde se localiza el codón de inicio de la isoforma canónica. Además, presenta un exón 2B alternativo, lo cual condiciona que la proteína se traduzca desde el final de este exón, donde está presente el siguiente codón de inicio. De manera similar a lo que ocurre en humano, al estar desprovista del exón 1, la proteína carecería del MTS, localizándose en el citosol. La expresión de los transcritos de ARNm de las Fxn I y II murinas se analizó también por RT-qPCR en ratones de la cepa c57BL/6 de tres meses de edad. Tras la disección de los tejidos (corazón, DRG y cerebelo) se extrajo el ARN y se llevó a cabo una RT-PCR para la obtención del ADNc. Posteriormente, se llevó a cabo una qPCR con *primers* diseñados a partir de las secuencias anotadas en AceView [271] y GenBank (BC038010.1, BC016644.1). En primer lugar, la expresión de Fxn I en la cepa C57BL/6 es muy elevada en corazón (**Figura 24B**). Asimismo, la expresión en DRG (**Figura 24C**) y cerebelo (**Figura 24D**) es considerablemente menor. Por otro lado, y en relación con los resultados obtenidos en células humanas, la expresión de Fxn II es notablemente reducida en comparación con su equivalente canónica en los tres tejidos analizados. Estos resultados apoyan la

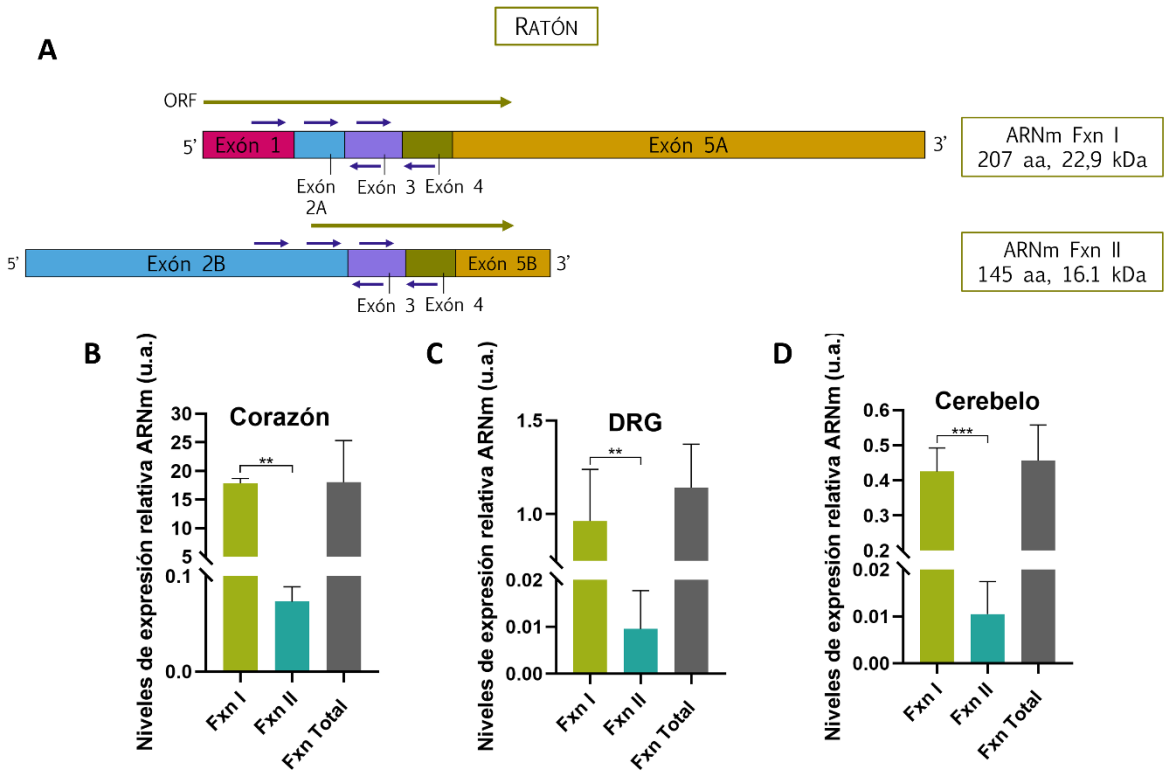


Figura 24: Expresión de las variantes canónica y citosólica de *Fxn* en tejidos de ratón. (A) Representación esquemática del ARNm de las variantes de *splicing* canónica (Fxn I) y citosólica (Fxn II) del gen *Fxn*. Fxn I está codificada por 5 exones y el exón 1 contiene el MTS, que dirige la proteína a la mitocondria. En el caso de la isoforma citosólica, el ARNm está codificado por 4 exones, careciendo del exón 1 y compartiendo por completo los exones 3 y 4 con Fxn I. Además, el exón 2B contiene el exón 2A en su extremo 3', mientras que el exón 5B es un fragmento del exón 5A situado en su extremo 5'. Esto provoca que Fxn II se traduzca a partir del exón 2B, dando lugar a una isoforma más corta que carece del MTS y que se localiza en el citosol. Las flechas verdes oscuro representan el marco de lectura abierto (*Open Reading Frame* u ORF), mientras que las flechas cortas representan los *primers* diseñados para analizar la expresión relativa de cada isoforma, así como el control (Fxn total), que incluye regiones comunes a ambas isoformas. MTS: *Mitochondrial Targeting Sequence*. (B-D) Niveles de expresión relativa del ARNm de Fxn I y II en los tejidos del modelo murino C57BL/6 (n=3) corazón (Fxn I: 17,83±0.48; Fxn II: 0.073±0.008) (B), DRG (Fxn I: 0.96± 0.16; Fxn II: 0.0095± 0.004) (C) y Cerebelo (Fxn I: 0.4250± 0.03; Fxn II: 0.01±0.004) (D). La expresión del transcrito denominado Fxn total se utilizó como control. Los resultados (n=3) se expresan como el valor de expresión normalizado sobre los niveles de expresión del gen constitutivo GAPDH ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). DRG: *Dorsal Root Ganglion*. Significancia ANOVA: **p<0,01; ***p<0,001.

RESULTADOS

existencia de una variante citosólica de frataxina, tanto en humano como en ratón.

3. Análisis del interactoma mitocondrial y extramitocondrial de las isoformas canónica y citosólica de frataxina

3.1. Frataxina I y II presentan localización extramitocondrial

La isoforma FXN II se expresa en células humanas, pero su función biológica no se ha esclarecido por el momento. Por tanto, y con el objetivo de arrojar luz en este asunto, optimizamos la técnica Split-TurboID, diseñada para confirmar la localización subcelular de una proteína de interés y mapear su interactoma en un compartimento subcelular concreto. La técnica Split-TurboID requiere de la coexpresión de dos plásmidos que contienen un fragmento inactivo de la proteína biotina-ligasa TurboID. Uno de esos fragmentos se dirige a un compartimento subcelular de interés. En nuestro caso, el fragmento N-terminal (SplitN) se dirigió a la membrana de RE (cara citosólica), mediante un péptido señal de localización (ERTS), y a la matriz mitocondrial, a través de una señal de localización mitocondrial (MTS). A su vez, el fragmento C-terminal de TurboID (SplitC) se fusionó con FXN I o FXN II. Estos plásmidos incluyen también epítomos proteicos (HA o V5) para facilitar el reconocimiento de las proteínas de fusión mediante el uso de anticuerpos (Tabla 2, Material y Métodos). En primer lugar, se diseñaron, clonaron y secuenciaron los cuatro constructos mencionados (ERTS/MTS-SplitC-HA y FXN I/II-SplitN-V5).

Para detectar la expresión específica de las proteínas de fusión SplitC en los compartimentos de interés, generamos líneas celulares estables de expresión de los constructos ERTS-SplitC-HA y MTS-SplitC-HA en células HeLa. A continuación, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-HA junto con marcadores endógenos de cada compartimento (anti-Calnexina o CANX para RE y anti-Tom20 para mitocondria). Tal y como se muestra en la **Figura 25**, los

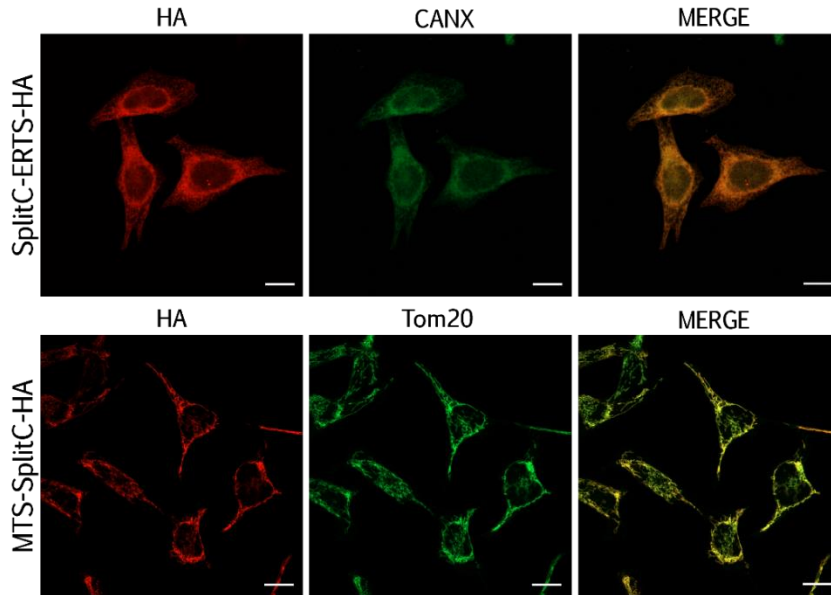


Figura 25: Análisis de la localización subcelular de las proteínas de fusión ERTS/MTS-SplitC-HA mediante imagen. Imágenes representativas de microscopía confocal de los constructos SplitC-HA en células HeLa. Las líneas celulares de expresión estable generadas se fijaron y marcaron con los anticuerpos anti-HA para detectar el fragmento C-terminal de TurboID dirigido a la membrana de RE o a la mitocondria. Se utilizaron CANX (Calnexina) y Tom20 como marcadores de RE y mitocondria respectivamente. Barra de escala: 30 μ M.

constructos ERTS/MTS-SplitC-HA se expresan en sus respectivos orgánulos, dado que los patrones de HA colocalizan con CANX para el plásmido dirigido a RE y con Tom20 para el dirigido a mitocondria. Asimismo, parece que la expresión de los constructos no altera la morfología de sus respectivos compartimentos. Del mismo modo, se generaron líneas celulares Hela con expresión estable de las proteínas de fusión SplitN, denominadas FXN I-SplitN-V5 y FXN II-SplitN-V5. En primer lugar, se realizaron inmunotinciones del epítipo V5 para la línea de expresión de FXN I. Para confirmar su localización subcelular se marcaron también CANX y Tom20 como marcadores de RE y mitocondria. La **Figura 26A** muestra que FXN I colocaliza con Tom20, coincidiendo con su localización subcelular habitual en la mitocondria.

RESULTADOS

Además, parece que la expresión de esta proteína de fusión no influye en la morfología de los compartimentos marcados.

Una vez caracterizadas por imagen, coexpresamos FXN I-SplitN-V5 con los plásmidos ERTS/MTS-SplitC-HA. De este modo, sólo si los dos fragmentos de la proteína TurboID se localizan en el mismo dominio subcelular, su actividad biotina-ligasa se reconstituye para biotinar las proteínas endógenas proximales, y, en este caso, proximales a FXN I. Las células que coexpresaban ambos fragmentos de la proteína TurboID se incubaron con biotina 500 μ M durante 1 h antes de proceder con la inmunotinción. Los fragmentos SplitN y SplitC se marcaron con anticuerpos anti-V5 y HA respectivamente y las proteínas biotiniladas se marcaron con Neutravidina-488. En la **Figura 26B** pueden observarse células que expresan uno o ambos fragmentos de la proteína TurboID (marcados con HA y/o V5). Sorprendentemente, observamos actividad biotina-ligasa fuera de la mitocondria al sobreexpresar FXN I con el ERTS (**Figura 26B**, paneles superiores). Las imágenes muestran una señal cualitativamente más intensa de neutravidina en las células que coexpresan ambos plásmidos. En cambio, las células que solo expresan uno de ellos presentan niveles de biotinilación cualitativamente inferiores, que pueden corresponderse con la biotinilación basal de cada célula. Esto nos permite comprobar que la actividad biotina-ligasa se reconstituye en presencia de ambos plásmidos. El patrón de biotinilación de las células que coexpresan FXN I y ERTS puede observarse por toda la célula, incluyendo el núcleo. Estos resultados confirman la reconstitución de TurboID en el RE y el citosol cuando se sobreexpresa FXN I. Adicionalmente y como estaba previsto, al sobreexpresar FXN I-SplitN-V5 junto con el MTS-SplitC-HA, dirigido a matriz mitocondrial, también observamos actividad biotina-ligasa (**Figura 26B**, paneles inferiores). A diferencia del caso anterior, en el que el patrón de biotinilación se observa tanto dentro como fuera de la mitocondria, en este caso parece mostrar

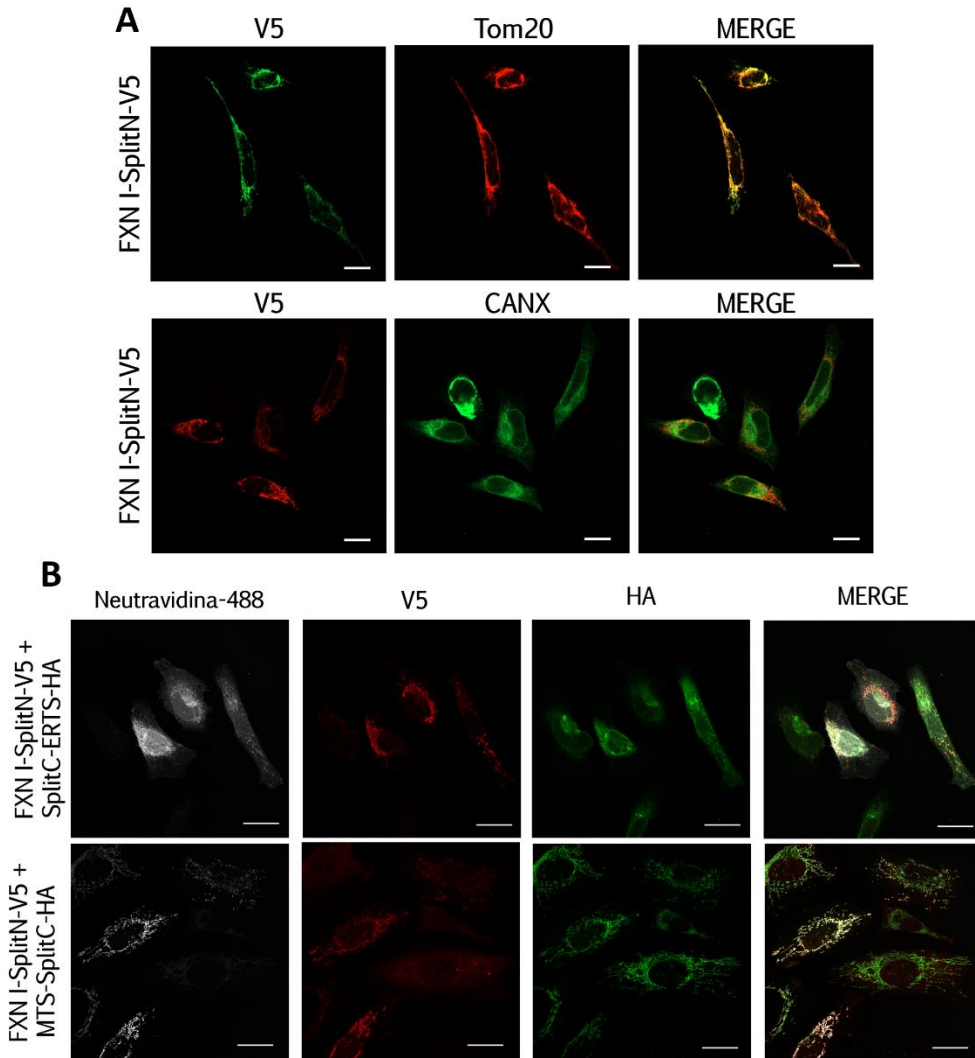


Figura 26: Valoración por imagen de la localización mitocondrial y extramitocondrial de FXN I-SplitN-V5. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de la línea celular HeLa, que expresa de forma estable la proteína de fusión FXN I-SplitN-V5. Las células se fijaron y marcaron con los anticuerpos anti-V5 para detectar el fragmento N-terminal de TurboID fusionado con FXN I. Se utilizaron CANX (Calnexina) y Tom20 como marcadores de RE y mitocondria respectivamente. (B) Caracterización de la actividad biotina-ligasa de TurboID dentro y fuera de la mitocondria. Imágenes representativas de células HeLa, en las que se coexpresan los constructos ERTS/MTS-SplitC-HA con FXN I-SplitN-V5. Las células se incubaron con biotina 500 μ M durante 1h antes de ser fijadas y marcadas con anticuerpos anti-V5 y anti-HA. Las proteínas biotiniladas se marcaron con neutravidina-488. Barra de escala: 30 μ M.

RESULTADOS

únicamente un patrón mitocondrial. Estos resultados confirman la localización subcelular de FXN I tanto dentro como fuera de la mitocondria.

Del mismo modo, se verificó la expresión de la proteína de fusión FXN II-SplitN-V5 en la línea HeLa estable mediante el marcaje de V5 por inmunofluorescencia (**Figura 27A**). FXN II muestra un patrón citosólico que no corresponde con el del RE o mitocondria. Una vez confirmada su expresión, comprobamos la actividad biotina-ligasa al igual que en el apartado anterior. Se coexpresó el plásmido FXN II-SplitN-V5 con los ERTS/MTS-SplitC-HA en células HeLa y estas se incubaron con biotina 500 μ M durante 1h previa a la inmunofluorescencia. En la **Figura 27B** también podemos observar que no todas las células coexpresan ambos plásmidos. En el caso de la membrana de RE/citosol también encontramos actividad biotina-ligasa para FXN II, ya que solo se observa un patrón de biotilación en células que coexpresan ambos plásmidos y no uno de ellos (**Figura 27B**, paneles superiores). Este patrón muestra proteínas biotiniladas en toda la célula, incluyendo el núcleo. En cambio, las células que coexpresan FXN II y el plásmido dirigido a matriz mitocondrial no presentan una actividad biotina-ligasa activada, dado que los niveles de neutravidina son cualitativamente menores al resto de condiciones, tanto en células que expresan un fragmento TurboID como en las que expresan ambos (**Figura 27B**, paneles inferiores). Esta señal de neutravidina correspondería con los niveles endógenos de biotilación, que no presentan un patrón morfológico concreto. Por tanto, los resultados confirman una localización citosólica para FXN II. En conjunto, estos hallazgos indican que tanto FXN I como FXN II presentan una localización extramitocondrial, interaccionando con la membrana del RE desde el citosol. Esto sugiere la posibilidad de que ambas isoformas se localicen en el dominio MAMs y ambas podrían tener un papel relevante en la regulación de la entrada mitocondrial de Ca^{2+} .

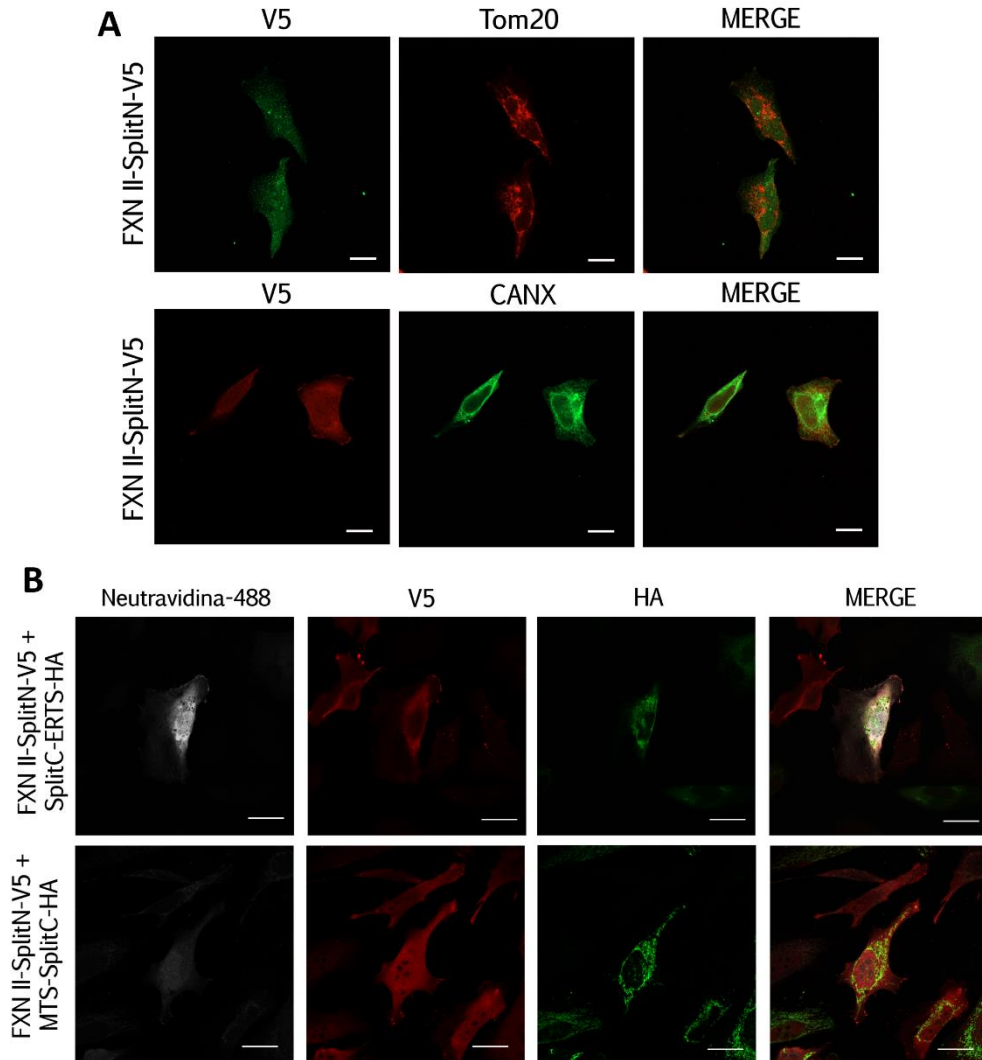


Figura 27: Valoración por imagen de la localización mitocondrial y extramitocondrial de FXN II-SplitN-V5. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de la línea celular HeLa, que expresa de forma estable la proteína de fusión FXN II-SplitN-V5. Las células se fijaron y marcaron con los anticuerpos anti-V5 para detectar el fragmento N-terminal de TurboID fusionado con FXN II. Se utilizaron CANX (Calnexina) y Tom20 como marcadores de RE y mitocondria respectivamente. (B) Caracterización de la actividad biotina-ligasa de TurboID dentro y fuera de la mitocondria. Imágenes representativas de células HeLa, en las que se coexpresan los constructos ERTS/MTS-SplitC-HA con FXN II-SplitN-V5. Las células se incubaron con biotina 500 μ M durante 1h antes de ser fijadas y marcadas con anticuerpos anti-V5 y anti-HA. Las proteínas biotiniladas se marcaron con neutravidina-488. Barra de escala: 30 μ M.

RESULTADOS

Por otro lado, procedimos a caracterizar en profundidad la actividad de marcaje de Split-TurboID en cada condición. Se ha descrito que, a pesar de que TurboID se divide en dos fragmentos proteicos inactivos para la técnica Split-TurboID, estos podrían tener cierta actividad biotina-ligasa por sí mismos, sin necesidad de llegar a reconstituirse por completo [27], [272]. Dado que el análisis por imagen no permite diferenciar con facilidad entre la auto-biotinilación espontánea de la ligasa y la biotinilación por reconstitución de la TurboID en el compartimento de interés, decidimos analizar la expresión y actividad de TurboID mediante *Western Blot* (WB) en células HEK293 (**Figura 28**).

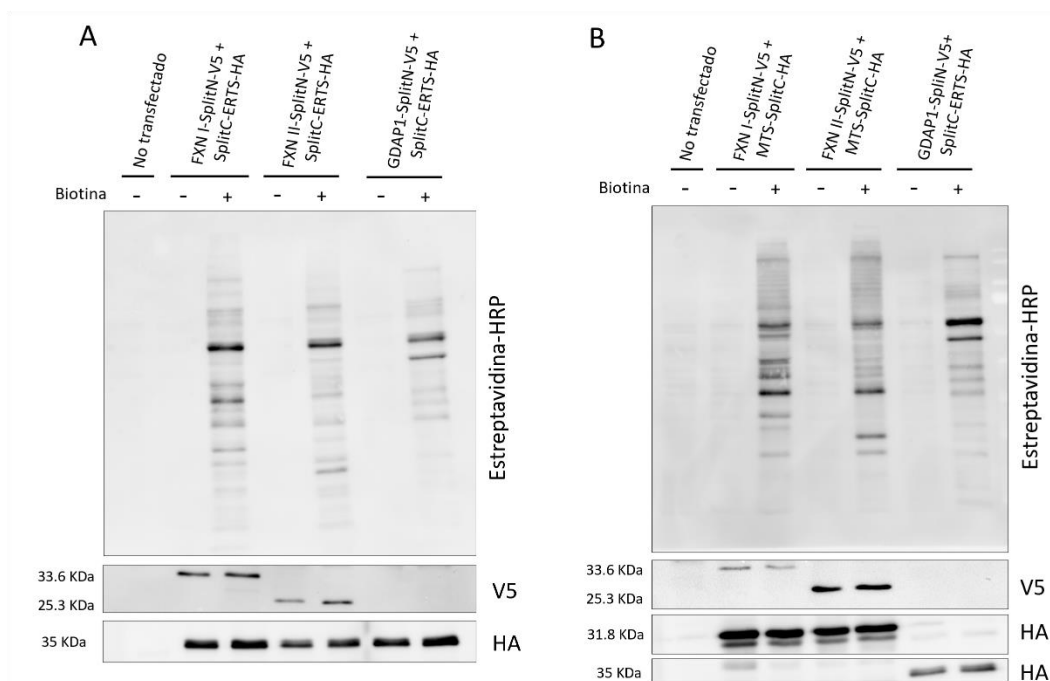


Figura 28: Caracterización de la expresión y reconstitución de TurboID por *Western Blot*. (A, B) Análisis por WB de la coexpresión de los plásmidos FXN I/II-SplitN-V5 con ERTS-SplitC-HA (dirigido a RE/citosol) (A) y MTS-SplitC-HA (dirigido a matriz mitocondrial) (B) en células HEK293. Las células se incubaron con biotina 500 μ M durante 4h. Se utilizó GDAP1, localizada en las MAMs, como control positivo de actividad biotina-ligasa. La estreptavidina-HRP marca las bandas correspondientes a proteínas biotiniladas, mientras que las bandas V5 y HA indican la expresión de los constructos SplitN y SplitC respectivamente. GDAP1: *ganglioside induced differentiation associated protein 1*.

Se generaron líneas celulares estables de expresión de los constructos ERTS/MTS-SplitC-HA y se coexpresaron junto con los FXN I/II-SplitN-V5. Las células se incubaron con biotina 500 μ M durante las 4 h previas a la extracción de proteínas. La expresión de los plásmidos se comprobó con anticuerpos anti-V5 y HA y las proteínas biotiniladas se marcaron con Estreptavidina-HRP. En la **Figura 28A** se observa que, al coexpresar tanto FXN I como FXN II con el plásmido de RE, TurboID reconstituye su actividad biotina-ligasa al igual que en los experimentos de imagen, dando como resultado un patrón de proteínas biotiniladas diferente, en comparación con la condición basal (No transfectada). Por otro lado, al coexpresar FXN I con el plásmido dirigido a mitocondria, puede observarse un patrón de proteínas biotiniladas distinto al del RE (**Figura 28B**). Sin embargo, y a diferencia de las imágenes de microscopía confocal, FXN II también muestra actividad biotina-ligasa al coexpresarla con el plásmido MTS-SplitC-HA, aunque su patrón de bandas parece ser reducido en comparación con FXN I.

Con la finalidad de determinar si los patrones de biotinilación observados se deben a actividad auto-ligasa de los fragmentos Split-TurboID o a la reconstitución específica biotina-ligasa en cada compartimento, llevamos a cabo un análisis mediante WB de diferentes condiciones (**Figura 29**). Además, utilizamos la proteína GDAP1 (*ganglioside induced differentiation associated protein 1*) fusionada con SplitC como control positivo de interacción con el ERTS y control negativo de interacción con el MTS, ya que se localiza en la MME. Al incubar únicamente el plásmido ERTS-SplitC-HA con biotina, pueden observarse varias bandas, indicando actividad auto-ligasa (**Figura 29A, línea 4**). Sin embargo, cuando co-transfectamos ERTS-SplitC-HA con FXN I-SplitN-V5, el patrón de proteínas biotiniladas denota una actividad biotina-ligasa más robusta, tanto para FXN I (**Figura 29A, línea 5**), como para FXN II (**Figura 29A, línea 6**). En cambio, la biotinilación de los plásmidos MTS-

RESULTADOS

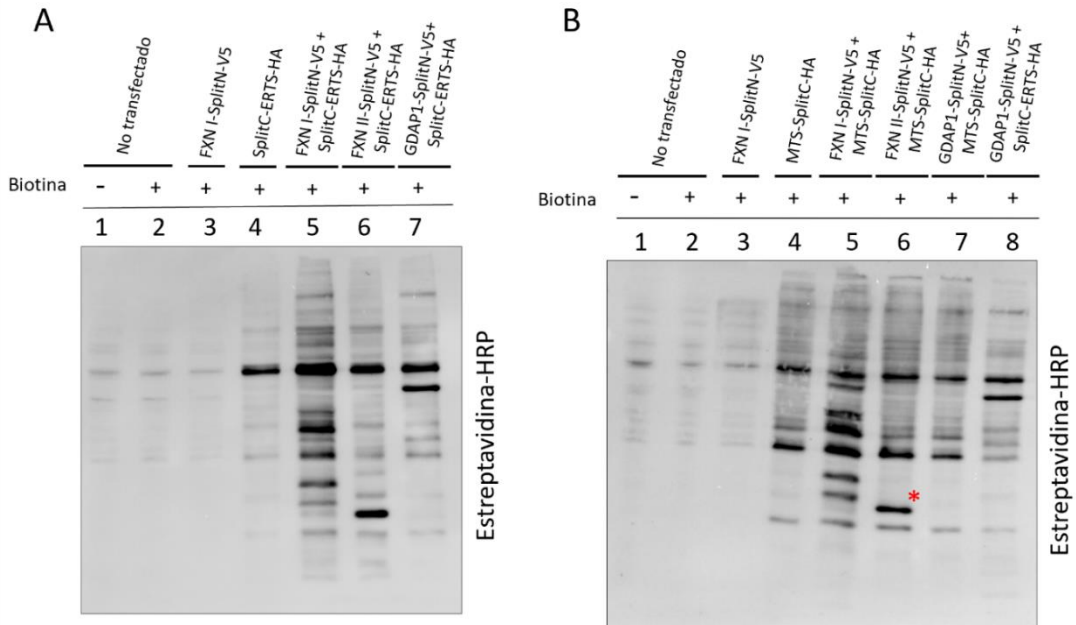


Figura 29: Estudio de la actividad biotina-ligasa específica de los fragmentos SplitC y SplitN mediante *Western Blot*. (A, B) Análisis de WB de la coexpresión de los plásmidos FXN I/II-SplitN-V5 con los ERTS-SplitC-HA (A) y MTS-SplitC-HA (B) en células HEK293. Para evaluar la actividad biotina-ligasa específica de los fragmentos de TurboID se utilizaron como control extractos no transfectados, los plásmidos individuales y la proteína GDAP1. GDAP1 se localiza en la membrana mitocondrial externa y, por tanto, se utilizó como control positivo con el plásmido dirigido a RE/citosol y control negativo para el del MTS. Las células se incubaron durante 4h con biotina 500 μ M antes de la extracción de proteínas. Las proteínas biotiniladas se marcaron con Estreptavidina-HRP. El asterisco rojo indica la banda correspondiente a la auto-biotinilación de la proteína de fusión FXN II-SplitN-V5.

SplitC-HA muestra una pauta diferente (Figura 29B). La expresión del plásmido dirigido a mitocondria por sí sola también presenta actividad auto-ligasa (Figura 29B, línea 4). Además, mientras que FXN I muestra un patrón robusto de biotinilación al coexpresarla con el plásmido MTS-SplitC-V5 (Figura 29B, línea 5), el patrón de biotinilación de FXN II es muy similar al obtenido tras expresar solamente MTS-SplitC-V5 (Figura 29B, línea 6) o un control negativo (Figura 29B, línea 6). La banda que difiere de estas dos últimas condiciones (marcada con un asterisco) coincide con el tamaño esperado para FXN II, lo cual nos llevó a suponer que puede

deberse a la auto-biotinilación de la proteína FXN II-SplitN-V5 al coexpresarla junto con MTS-SplitC-HA. Por tanto, estos resultados sugieren que FXN II reconstituye únicamente la actividad biotina ligasa en el RE/citosol.

En general, los datos indican que FXN I está presente tanto en la mitocondria como en el dominio RE/citosol, ya que la actividad biotina-ligasa de la Split-TurboID se reconstituye en ambas condiciones. Por el contrario, parece que FXN II solamente está presente en el citosol, interaccionando con proteínas de la membrana del RE, ya que solamente se observa una actividad biotina-ligasa robusta en este compartimento. Por tanto, ambas isoformas podrían tener un papel en la regulación de las MAMs.

3.2. Frataxina I y II muestran interactomas distintos en el dominio retículo/citosol

Una vez confirmada la reconstitución de Split-TurboID en los compartimentos deseados, procedimos a la preparación de las muestras para identificar el proteoma de interacción de FXN I y II. Dado que TurboID es una biotina-ligasa promiscua, es necesario minimizar los tiempos de incubación con biotina con la finalidad de reducir la identificación de falsos positivos. La línea celular HEK293 de expresión estable ERTS-SplitC-HA se incubó con biotina 500 μ M durante 30, 60, 120 y 240 minutos, en ausencia o presencia de la proteína FXN I-SplitN-V5. Tras el análisis de actividad de la TurboID, se determinó que el tiempo óptimo de incubación de las células con biotina 500 μ M es de 1 hora (**Figura 30A**). De este modo, se diseñó el experimento de proteómica para mapear las proteínas proximales a FXN I y II en el citosol/RE en células HEK293. Para ello utilizamos la línea celular HEK293 de expresión estable ERTS-SplitC-HA, que incubamos con biotina 500 μ M en ausencia y presencia de FXN I/II-SplitN-V5 (**Figura 30B**).

RESULTADOS

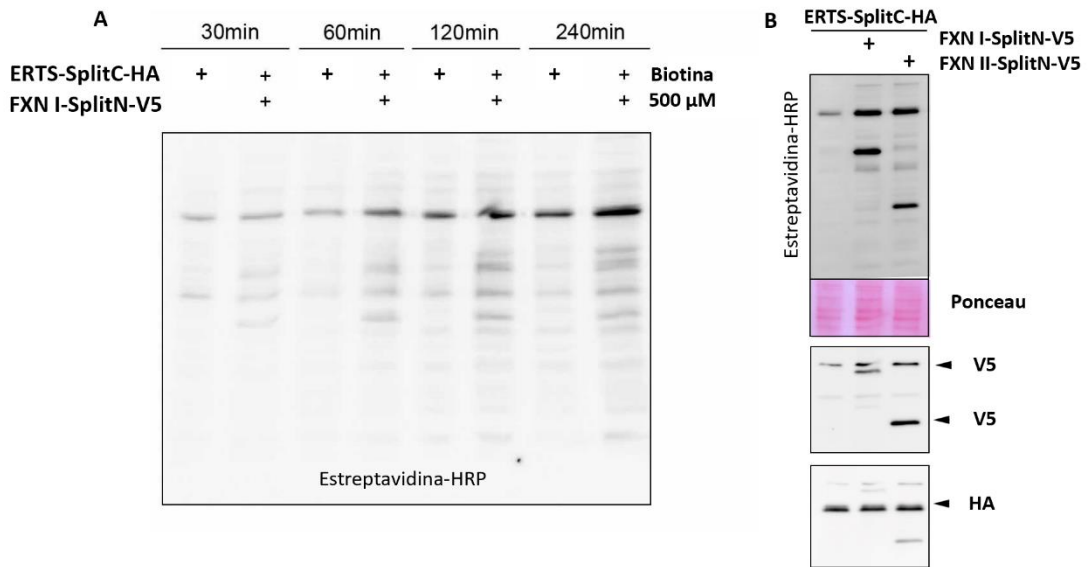


Figura 30: Puesta a punto del marcaje de proteínas con biotina previo al análisis proteómico. (A) Análisis mediante WB del tiempo óptimo de incubación con biotina para marcaje de proteínas proximales a las isoformas de FXN el RE/citosol. La línea celular HEK293 de expresión estable ERTS-SplitC-HA se incubó con biotina 500 μ M durante 30, 60, 120 y 240 minutos, en ausencia o presencia de la proteína FXN I-SplitN-V5. Las proteínas biotiniladas se revelaron con Estreptavidina-HRP. (B) WB representativo de los lisados proteicos preparados para el análisis proteómico antes de su enriquecimiento con Estreptavidina. Las células HEK293 con expresión estable de ERTS-SplitC-HA se incubaron con biotina 500 μ M durante 1h en ausencia y presencia de FXN I/II-SplitN-V5. La expresión de las proteínas de fusión se comprobó con el marcaje de V5 (SplitN) y HA (SplitC).

Posteriormente, realizamos análisis de espectrometría de masas (LC-MS/MS) en las muestras enriquecidas con esferas de agarosa recubiertas de Estreptavidina. En el análisis de datos de proteómica de FXN I y II en el RE/citosol se detectaron 701 proteínas con dos o más péptidos únicos. Se tomaron los triplicados de cada condición experimental (ERTS, ERTS + FXN I, ERTS + FXN II) y se seleccionaron las proteínas significativas para FXN I o FXN II comparadas con el proteoma control ERTS-SplitC-HA, ya que esta proteína de fusión presenta actividad biotina-ligasa por sí misma. Para minimizar la selección de falsos positivos,

se estableció un filtro de p valor ajustado menor a 0,05 por el método FDR. Dado que la cara externa de la membrana del RE es un dominio subcelular abierto y continuo con el citosol, no se llevaron a cabo filtros adicionales relacionados con la compartimentalización subcelular. Tras realizar el cribado estadístico, se encontraron 59 proteínas significativas de interacción con FXN I (**Figura 31**) y 113 de interacción con FXN II (**Figura 32**).

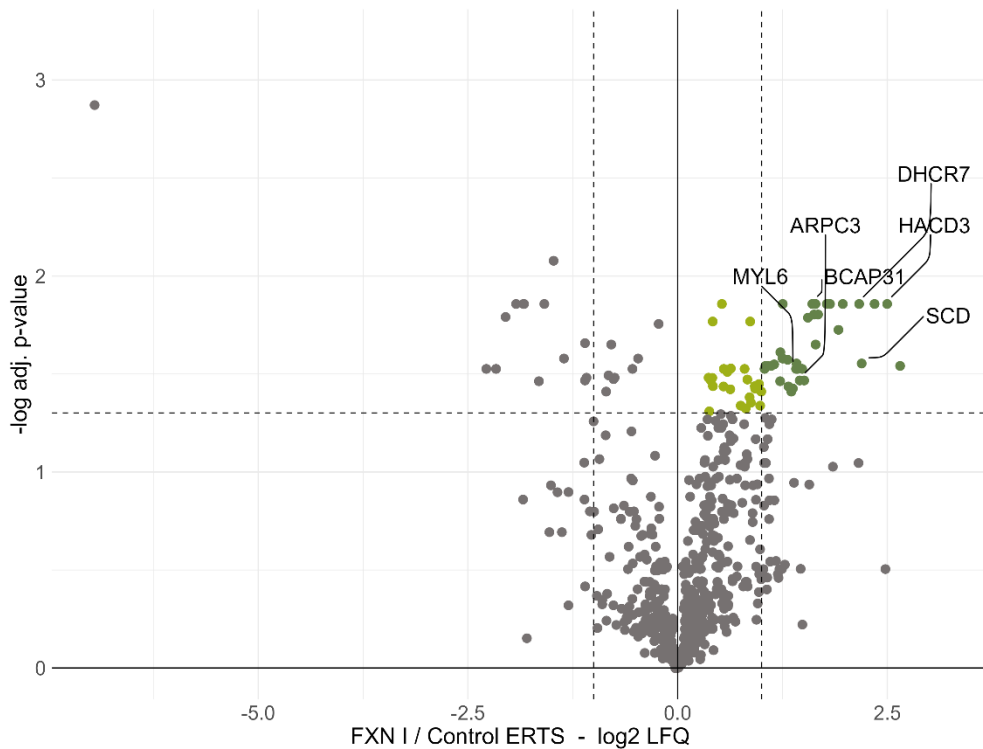


Figura 31: *Volcano plot* del proteoma identificado por LC-MS/MS al coexpresar FXN I con el plásmido ERTS-SplitC-HA. Representación de las proteínas detectadas en el análisis proteómico de FXN I, indicando en el eje de x el Log₂ del *fold change* de los valores de LFQ FXN I sobre los LFQ control ERTS frente al $-\log$ del p-valor ajustado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test *two-tailed t-Student*. El proteoma de alta confianza se representa en color verde (claro y oscuro). Las proteínas con valores que muestran cambios de gran magnitud en el *fold change* (ratio Log₂ LFQ FXN I/control ERTS > 1) se marcan en color verde oscuro.

RESULTADOS

En el interactoma de FXN I encontramos proteínas de alta significancia estadística (**Figura 31**) como DHCR7 (*7-dehydrocholesterol reductase*), SCD (*Stearoyl-CoA desaturase*) y HACD3 (*Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3*), localizadas en el RE e involucradas en el metabolismo lipídico (REACTOME ID HSA-556833: *Metabolism of Lipids*). Por otro lado, identificamos a BCAP31/BAP31 (*B-cell receptor-associated protein 31*), una chaperona transmembrana muy abundante en el RE y crucial en la regulación de la función mitocondrial a través de las MAMs [273]. Asimismo, también encontramos a MYL6 (*Myosin light polypeptide 6*), una subunidad de la ATPasa miosina localizada en el citosol. Esta proteína está implicada en la contracción muscular (REACTOME ID R-HSA-397014.3: *Muscle contraction*), la guía del axón (REACTOME ID R-HSA-422475.6: *Axon guidance*) y además está estrechamente relacionada con la cardiomiopatía hipertrófica [274]. Por tanto, la identificación de proteínas del RE/citosol en el interactoma de FXN I confirma su presencia en este dominio.

Como era de esperar, en el proteoma de interacción de FXN II identificamos también proteínas pertenecientes a la membrana del RE (HACD3, SCD, BCAP31) y citosólicas como MYL6, comunes a ambas isoformas (**Figura 32**). Sin embargo, es importante destacar que VDAC1, VDAC3 (MME) y STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*, membrana del RE) son proteínas altamente significativas, exclusivas en el interactoma de FXN II. Están relacionadas con la regulación del Ca^{2+} intracelular (REACTOME ID R-HSA-139853.3: *Elevation of cytosolic Ca^{2+} levels*; R-HSA-8949215: *Mitochondrial calcium ion transport*). Estos hallazgos indican la participación de FXN II en la regulación del intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria y, por tanto, en la modulación de las MAMs. Adicionalmente, ARPC1A (*Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A*), una subunidad del complejo Arp2/3, responsable del proceso de regulación de la dinámica de la actina (REACTOME ID R-HSA-2029482: *Regulation*

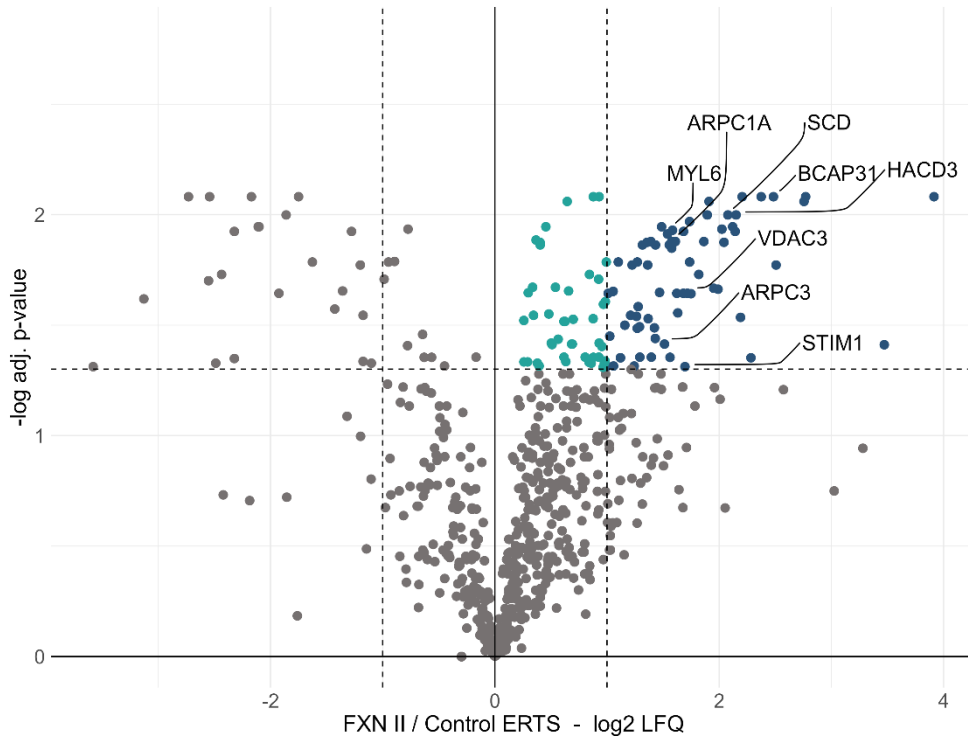


Figura 32: *Volcano plot* del proteoma identificado por LC-MS/MS al coexpresar FXN II con el plásmido ERTS-SplitC-HA. Representación de las proteínas detectadas en el análisis proteómico de FXN II, indicando en el eje de x el Log2 del *fold change* de los valores de LFQ FXN II sobre los LFQ control ERTS frente al $-\log$ del p-valor ajustado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test *two-tailed* t-Student. El proteoma de alta confianza se representa en color azul (claro y oscuro). Las proteínas con valores que muestran cambios de gran magnitud en el *fold change* (ratio Log2 LFQ FXN II/control ERTS > 1) se marcan en color azul oscuro.

of actin dynamics for phagocytic cup formation), aparece en el interactoma de FXN II, mientras que ARPC3 (*Actin-related protein 2/3 complex subunit 3*) se encuentra en ambos proteomas. Esto sugiere que tanto FXN I como FXN II podrían estar implicadas en la remodelación del citoesqueleto. Por tanto, en este primer análisis del proteoma de FXN I y FXN II encontramos integrantes de la membrana del RE, de la mitocondria, y pertenecientes al citoesqueleto y el citosol, incluyendo

RESULTADOS

proteínas previamente descritas en las MAMs. Por tanto, estos resultados confirman la localización extramitocondrial de ambas isoformas.

Las Figuras 33 (FXN I) y 34 (FXN II) muestran las redes de interacción proteína-proteína de cada set de datos. En ellas se observa que el proteoma de interacción de FXN II es mucho más compacto que el de FXN I, lo cual sugiere un papel extramitocondrial más relevante para FXN II.

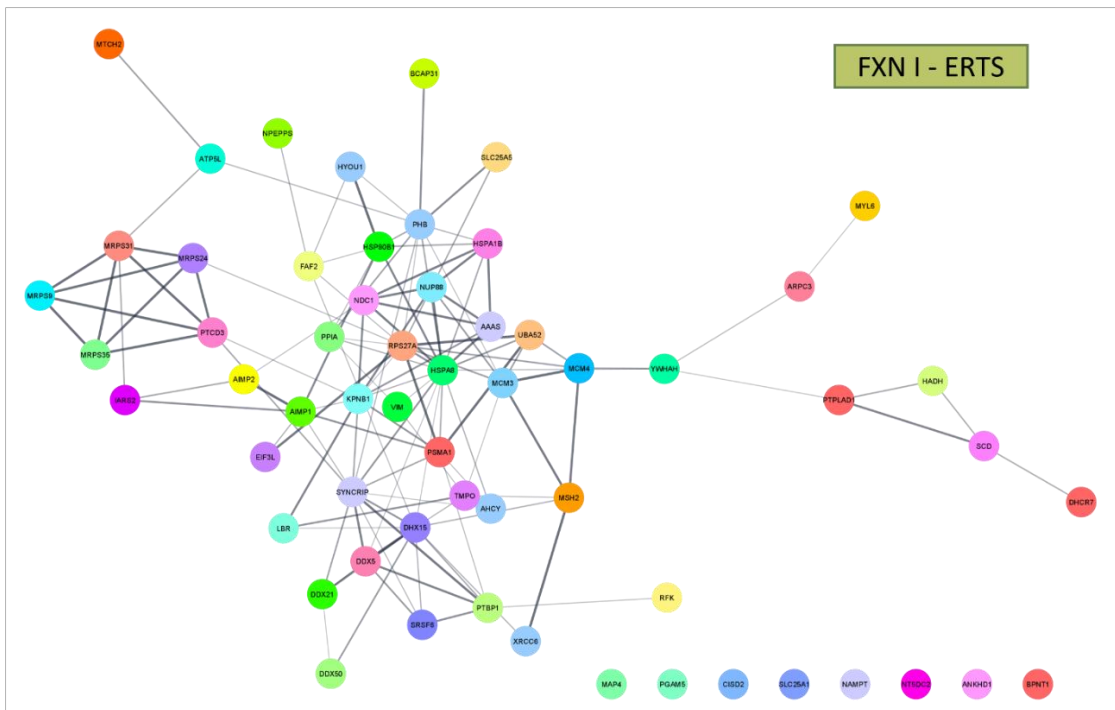


Figura 33: *Clusters* de Markov del proteoma de interacción de FXN I en el RE/citosol. La imagen muestra la red de las interacciones proteína-proteína disponibles en la base de datos STRING [395], trazadas a partir de datos experimentales y bioinformáticos. Las líneas más gruesas indican un mayor grado de evidencia en la interacción de sus nodos. Las proteínas identificadas en el interactoma de FXN I sin evidencia de interacción con el resto del proteoma se indican en la esquina inferior derecha.

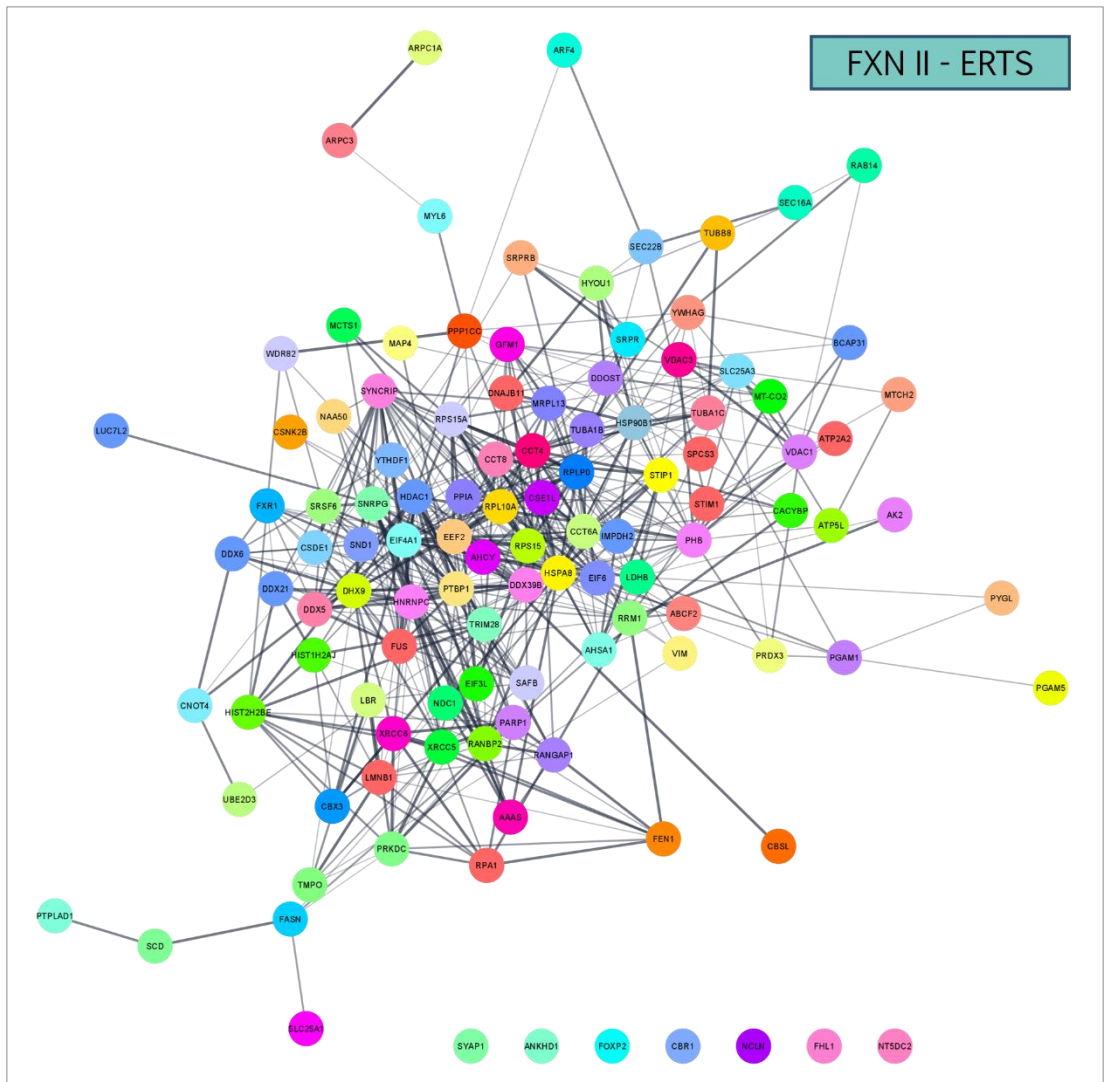


Figura 34: *Cluster* de Markov del proteoma de interacción de FXN II en el RE/citosol. La imagen muestra la red de las interacciones proteína-proteína disponibles en la base de datos STRING [395], trazadas a partir de datos experimentales y bioinformáticos. Las líneas más gruesas indican un mayor grado de evidencia en la interacción de sus nodos. Las proteínas identificadas en el interactoma de FXN II sin evidencia de interacción con el resto del proteoma se indican en la parte inferior.

Al analizar el proteoma de interacción de las isoformas en profundidad, identificamos 30 proteínas comunes en ambos conjuntos de datos, mientras que FXN I presenta 29 proteínas exclusivas, y FXN II, 83

RESULTADOS

(Figura 35A). Estos datos, junto con la morfología de las redes de interacción, refuerzan la premisa de una función más amplia para FXN II en el compartimento RE/citosol. El análisis ORA de las rutas enriquecidas para cada una de las isoformas desveló funciones celulares relevantes en las que podrían estar implicadas FXN I y II (Figura 35B). Por un lado, las rutas KEGG exclusivas en el interactoma de FXN I se relacionan con la biosíntesis de esteroides, la elongación de ácidos grasos y la mitofagia. Las rutas REACTOME significativas para FXN I incluyen la apoptosis, la traducción mitocondrial, la síntesis de ADN, la ruta de señalización de

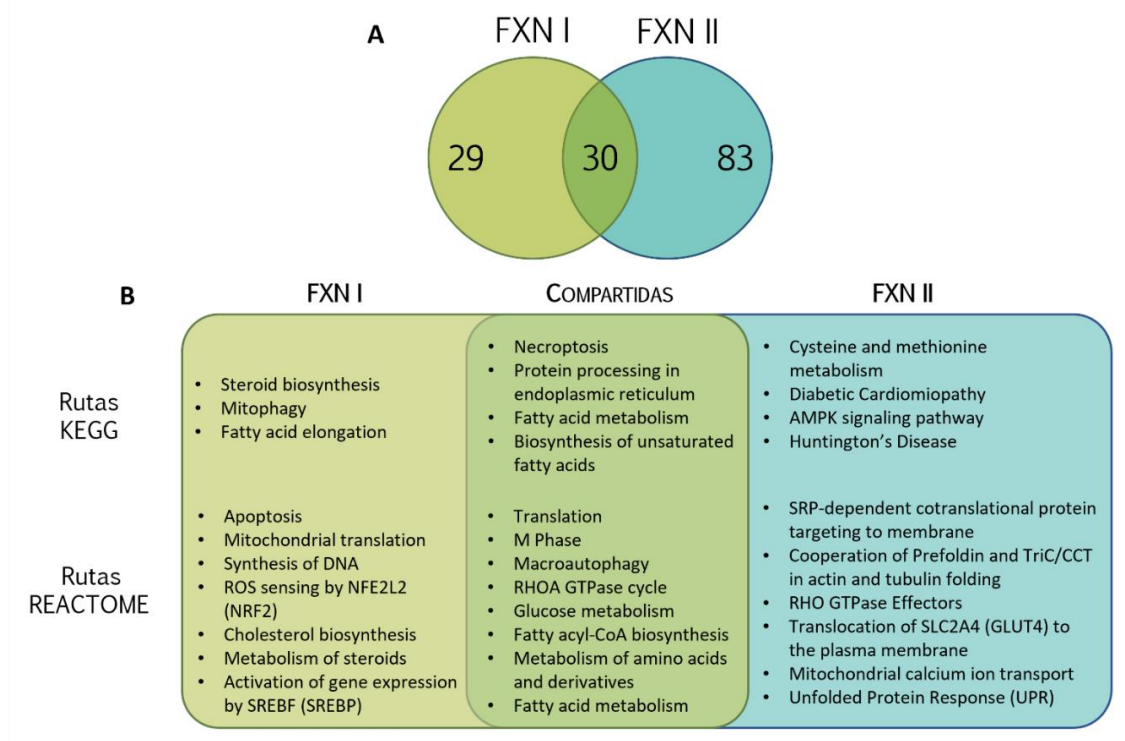


Figura 35: Análisis de las rutas de señalización del proteoma de interacción de FXN I y II en el RE/citosol. (A) Diagrama de Venn de los proteomas de FXN I y II en el RE/citosol en el que se recogen el número de proteínas comunes y exclusivas de cada isoforma. (B) Rutas KEGG y REACTOME sobrerrepresentadas tras el análisis ORA del conjunto de datos del proteoma de FXN I y II, incluyendo las enriquecidas comunes a ambos proteomas. Se muestran las rutas más representativas, ordenadas por p valor de mayor a menor.

NRF2 y rutas relacionadas con el metabolismo de lípidos, como la biosíntesis de colesterol (**Figura 35B, panel izquierdo**). En el proteoma de FXN II encontramos un mayor número de rutas KEGG enriquecidas relevantes, involucradas en el metabolismo de cisteína y metionina, la señalización de AMPK (*AMP-activated protein kinase*) y enfermedades relacionadas con la FRDA, como la cardiomiopatía diabética y neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington. Las rutas REACTOME sobrerrepresentadas en el proteoma de interacción de FXN II incluyen el transporte de Ca^{2+} mitocondrial, la respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response* o UPR) y rutas relacionadas con la dinámica del citoesqueleto (**Figura 35B, panel derecho**). En cuanto a las rutas KEGG enriquecidas y comunes a ambos proteomas, se encuentran la necroptosis, el procesamiento de proteínas en el RE y el metabolismo de ácidos grasos. Las rutas REACTOME más relevantes en ambos proteomas son la traducción de proteínas, la fase M del ciclo celular, la macroautofagia y rutas relacionadas con el metabolismo de la glucosa, lípidos y aminoácidos (**Figura 35B, panel central**). Los **Anexos I y II** recogen información sobre las proteínas identificadas en los interactomas de FXN I y II pertenecientes a cada ruta KEGG (**Anexo 1**) y REACTOME (**Anexo 2**).

El análisis ORA de los términos GO *Biological Process* reveló los eventos celulares y subprocesos asociados enriquecidos en el proteoma de interacción de cada isoforma (**Figuras 36 y 37**). Los procesos más relevantes en los que están implicadas las proteínas cercanas a FXN I se relacionan con el desenrollamiento del ADN, la traducción mitocondrial y el procesamiento de ARNt. También encontramos procesos de transporte de proteínas desde el RE al citosol (**Figura 36**).

En cambio, el *treemap* de los términos GO *Biological process* del interactoma de FXN II en el RE/citosol es mucho más amplio que el de la isoforma canónica (**Figura 37**). En primer lugar, los procesos enriquecidos

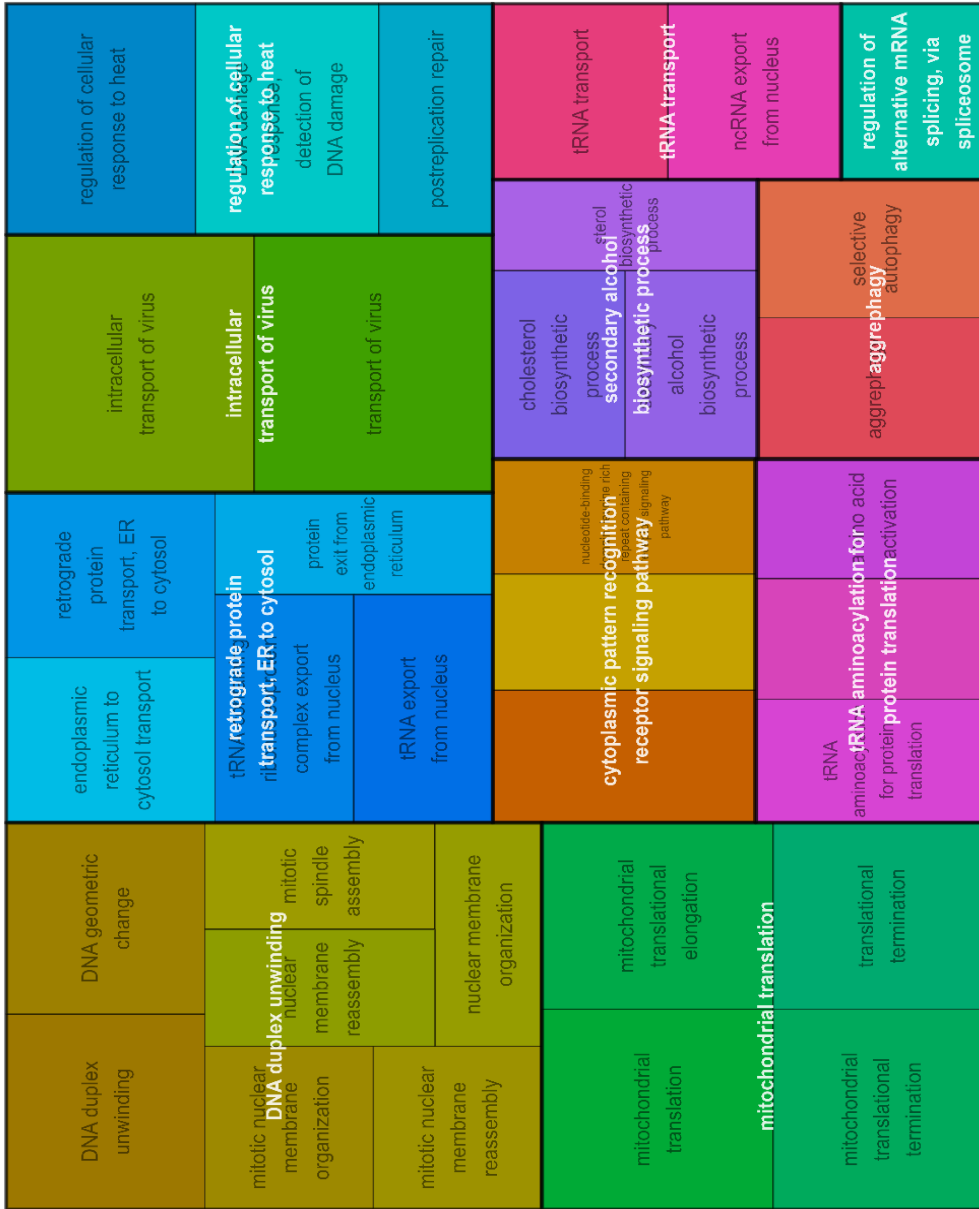


Figura 36: *Treemap* de los términos GO *Biological Process* sobrerrepresentados en el interactoma de FXN I en el RE/citosol. El mapa muestra los procesos y subprocesos sobrerrepresentados en el análisis ORA del proteoma de FXN I anotados en diferentes términos GO asociados a procesos biológicos. El tamaño de cada cuadrado se corresponde con el p valor de significancia para cada término GO en el set de datos del proteoma de FXN I.

RESULTADOS

más significativos se relacionan con funciones del RE y el tráfico de proteínas RE-citosol. También encontramos eventos implicados en la expresión y el mantenimiento del ADN, como la biosíntesis del ADN, el mantenimiento de telómeros y el procesamiento y regulación del ARNm. El proceso de traducción también se encuentra enriquecido en el interactoma de FXN II, pero a diferencia de FXN I, en este caso es citosólico y no mitocondrial. Por último, destacan procesos metabólicos como la regulación de las purinas y la biosíntesis de la Acil-Coenzima A unida a ácidos grasos. En general, el análisis de rutas de señalización y procesos biológicos nos ofrece una visión amplia sobre la implicación de ambas isoformas de FXN en el compartimento subcelular RE/citosol, permitiendo identificar nuevos eventos y confirmando otros previamente descritos, que podrían ser clave en la fisiopatología de la FRDA.

3.3. El interactoma mitocondrial de FXN I indica nuevas rutas de señalización

De igual modo que en el compartimento RE/citosol, se generó una línea celular HEK293 de expresión estable MTS-SplitC-HA. Las células se incubaron con biotina 500 μ M en ausencia y presencia de FXN I/II-SplitN-V5 antes de la extracción de proteínas y su posterior enriquecimiento con esferas de Estreptavidina (**Figura 38**).

En el análisis por LC-MS/MS se detectaron un total de 1146 proteínas con dos o más péptidos únicos. De nuevo, se tomaron los triplicados de cada condición experimental (MTS, MTS + FXN I, MTS + FXN II) y se seleccionaron las proteínas significativas para FXN I o II comparadas con el proteoma control MTS-SplitC-HA. En este caso, las proteínas se seleccionaron en base a dos filtros. En primer lugar, se aplicó el filtro estadístico de p valor $< 0,05$ por FDR. Seguidamente, y dado que el objetivo es identificar el interactoma de FXN en la mitocondria, se seleccionaron únicamente las proteínas anotadas en la base de datos Mitocarta 3.0 [255]. Tras aplicar el cribado, se identificaron 50 proteínas

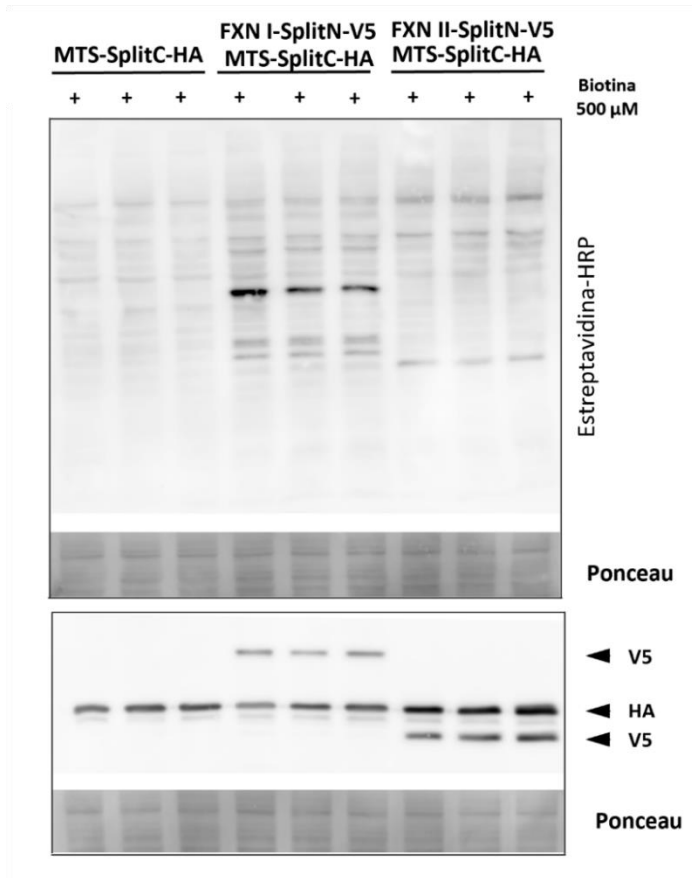


Figura 38: Marcaje con biotina del interactoma de FXN I y II en la mitocondria. WB de los lisados proteicos preparados para el análisis proteómico antes de su enriquecimiento con Estreptavidina. Las células HEK293 con expresión estable de MTS-SplitC-HA se incubaron con biotina 500 μ M durante 1h en ausencia y presencia de FXN I/II-SplitN-V5. La expresión de las proteínas de fusión se comprobó con el marcaje de V5 (SplitN) y HA (SplitC).

mitocondriales significativas para FXN I (**Figura 39**), mientras que únicamente se encontraron 3 para FXN II (**Figura 40**). Entre las proteínas de mayor significancia para FXN I encontramos a α -MPP, codificada por el gen *PMPCA* (*Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha*), encargada en la maduración mitocondrial de FXN (**Figura 39**) [153], [154]. Cabe destacar que esta proteína no aparece en el interactoma de FXN II, que carece de MTS, lo cual reafirma la localización extramitocondrial para esta isoforma. Dos de las proteínas más significativas son TIMM44 (*Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44*), una

RESULTADOS

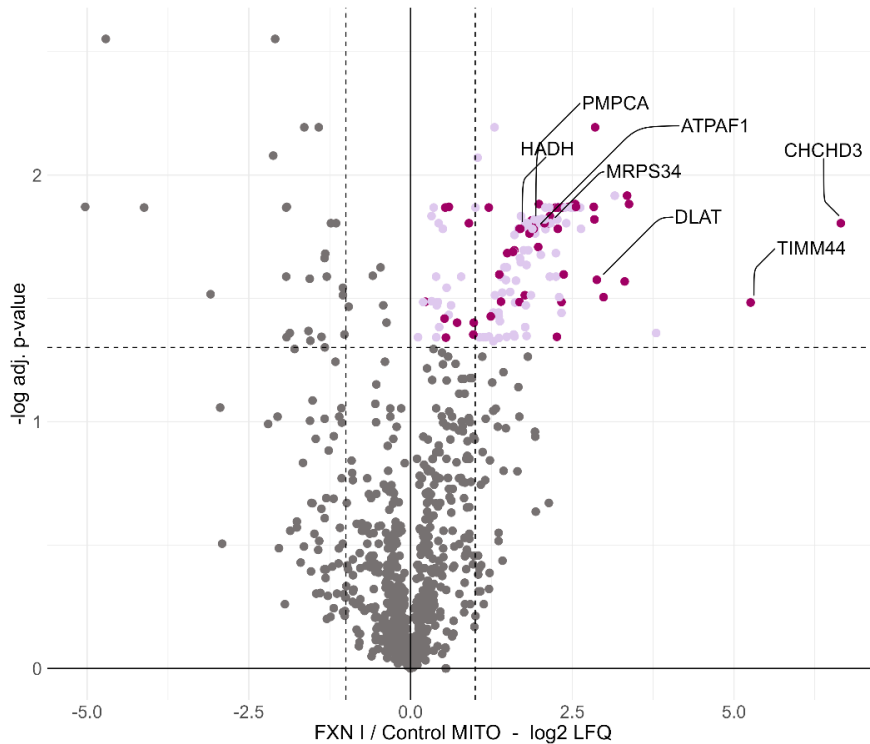


Figura 39: Volcano plot del proteoma identificado por LC-MS/MS al coexpresar FXN I con el plásmido MTS-SplitC-HA. Representación de las proteínas detectadas en el análisis proteómico de FXN I, indicando en el eje de x el Log2 del *fold change* de los valores de LFC FXN I sobre los LFC control MTS frente al -log del p-valor ajustado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test *two-tailed* t-Student. El proteoma de alta confianza se representa en color morado (claro y oscuro). Las proteínas anotadas como pertenecientes en la mitocondria según la base de datos Mitocarta 3.0 [255] se representan en color morado oscuro.

subunidad del complejo encargado de la importación de proteínas a la matriz mitocondrial, y CHCHD3 (*Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 3*), crucial en el andamiaje de la MMI, la integridad de las crestas mitocondriales y la regulación de la síntesis de ATP [275]. Asimismo, también encontramos proteínas implicadas en el metabolismo energético, como DLAT (*Dihydrolipoamide S-Acetyltransferase*), una subunidad del complejo Piruvato Deshidrogenasa, ATPAF1 (*ATP Synthase Mitochondrial F1 Complex Assembly Factor 1*), esencial en el

ensamblaje de la ATP sintasa. HADH aparece de nuevo en el interactoma mitocondrial de FXN I.

En cambio, al realizar el análisis aplicando el cribado mencionado, el interactoma de FXN II presenta únicamente 3 proteínas significativas que se encuentran anotadas en Mitocarta 3.0 (**Figura 40**): FASN, HADH y ABCD3 (*ATP Binding Cassette Subfamily D Member 3*). Cabe destacar que, de acuerdo con la base de datos COMPARTMENTS [259], que recoge

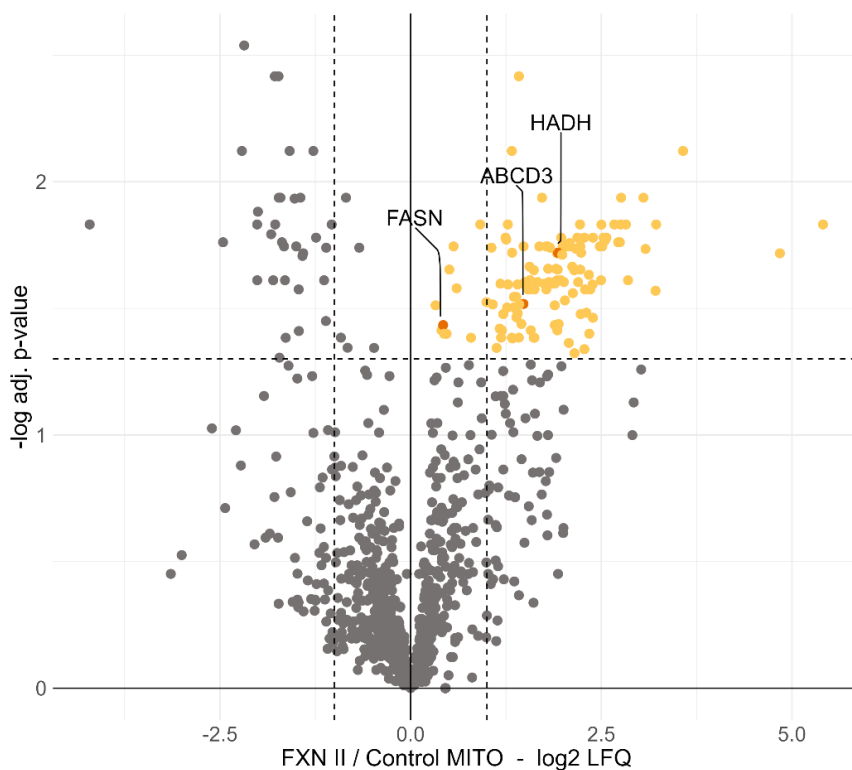


Figura 40: *Volcano plot* del proteoma identificado por LC-MS/MS al coexpresar FXN II con el plásmido MTS-SplitC-HA. Representación de las proteínas detectadas en el análisis proteómico de FXN II, indicando en el eje de x el Log₂ del *fold change* de los valores de LFQ FXN I sobre los LFQ control MTS frente al -log del p-valor ajustado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test *two-tailed* t-Student. El proteoma de alta confianza se representa en color naranja (claro y oscuro). Las proteínas anotadas como pertenecientes en la mitocondria según la base de datos Mitocarta 3.0 [255] se representan en color naranja oscuro.

RESULTADOS

evidencia sobre la localización subcelular de proteínas, la ubicación de estas proteínas no es exclusivamente mitocondrial. Por este motivo, decidimos no continuar con el análisis del interactoma de FXN II en esta condición, dado que, en conjunto, los resultados obtenidos indican que su localización es citosólica y no mitocondrial.

La **Figura 41** muestra la red de interacción proteína-proteína de los elementos identificados en el interactoma mitocondrial de FXN I. La

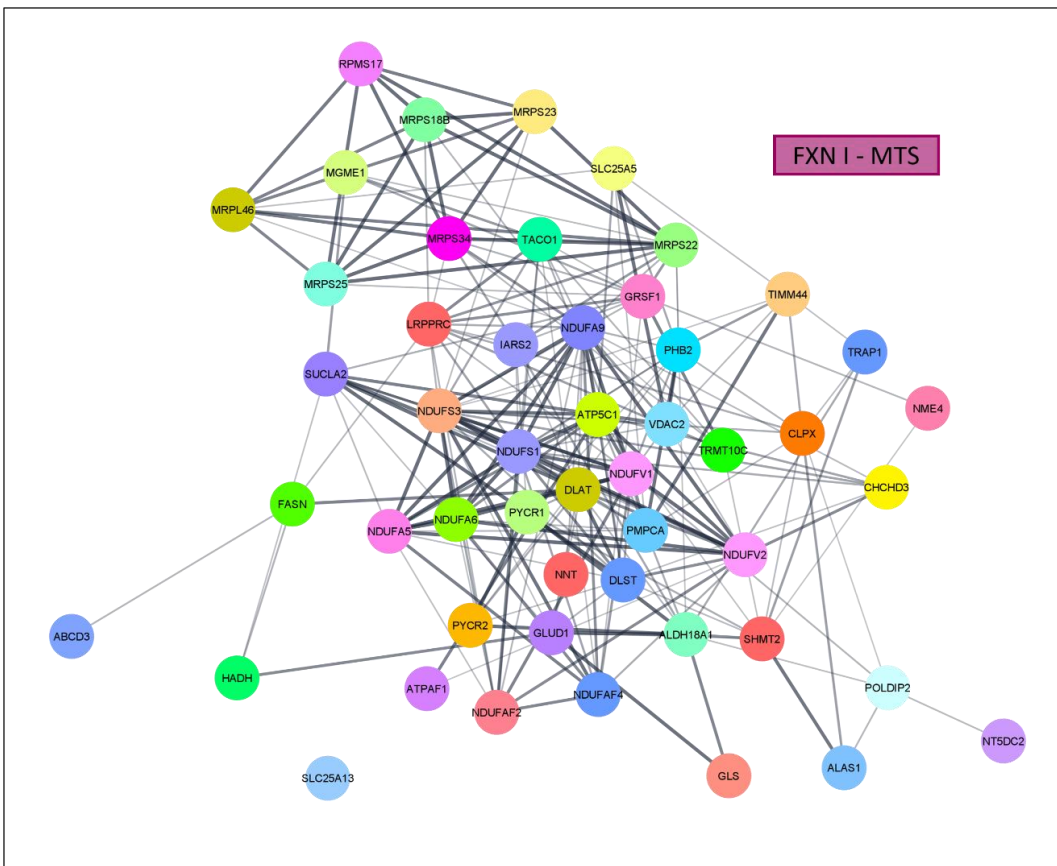


Figura 41: *Cluster* de Markov del proteoma de interacción de FXN I en la mitocondria. La imagen muestra la red de las interacciones proteína-proteína disponibles en la base de datos STRING [395], trazadas a partir de datos experimentales y bioinformáticos. Las líneas más gruesas indican un mayor grado de evidencia en la interacción de sus nodos. La única proteína perteneciente interactoma de FXN I sin evidencia de interacción con el resto del proteoma (SLC25A13) se indica en la parte inferior izquierda.

morfología de esta red es mucho más compacta que su equivalente extramitocondrial (**Figura 33**), con numerosos elementos interconectados.

El análisis en profundidad de las proteínas mitocondriales identificadas reveló que las 3 proteínas de interacción con FXN II están incluidas en el proteoma de FXN I (**Figura 42A**). Al analizar las rutas de señalización KEGG enriquecidas en el set de datos, encontramos de nuevo rutas relacionadas con enfermedades estrechamente relacionadas con la FRDA, como el Párkinson, el Huntington y la cardiomiopatía diabética

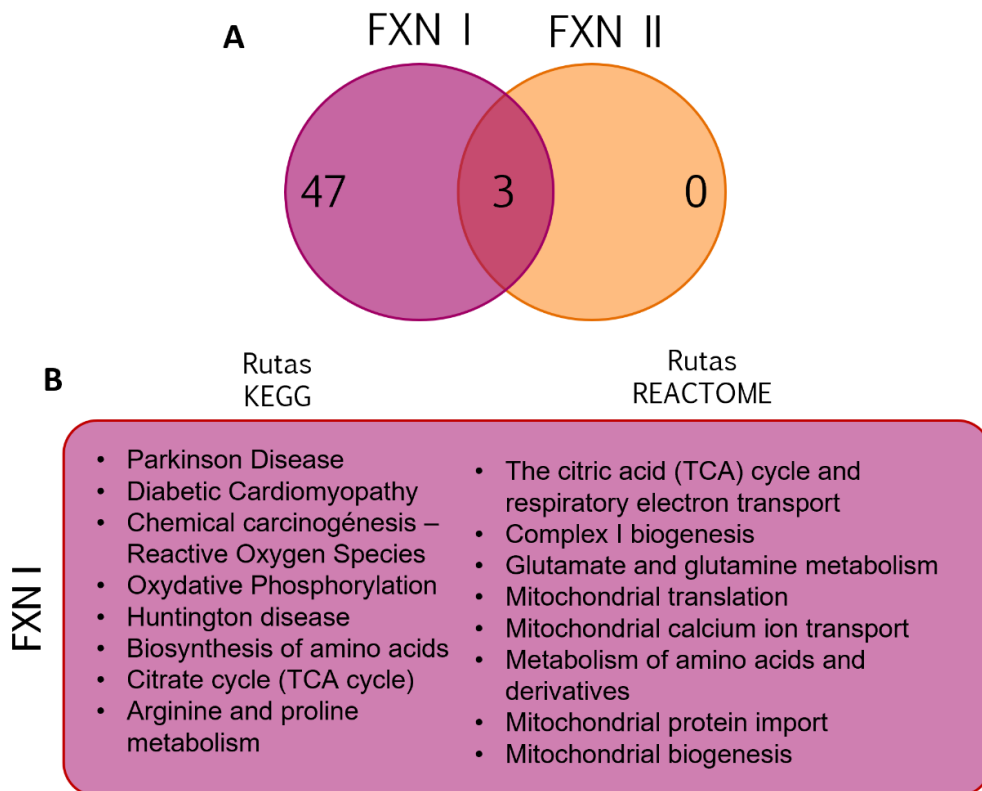


Figura 42: Análisis de las rutas de señalización del proteoma de interacción mitocondrial de FXN I. (A) Diagrama de Venn de los proteomas de FXN I y II en la mitocondria en el que se recogen el número de proteínas comunes y exclusivas de cada isoforma. (B) Rutas KEGG y REACTOME sobrerrepresentadas tras el análisis ORA del conjunto de datos del proteoma mitocondrial de FXN I. Se muestran las rutas más representativas, ordenadas por p valor de mayor a menor.

RESULTADOS

(**Figura 42B**). Otras rutas significativas se relacionan con el daño oxidativo por generación de ROS, y el metabolismo bioenergético, incluyendo la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs y el metabolismo de aminoácidos (arginina y prolina). En el análisis ORA de las rutas REACTOME destacan rutas relacionadas con el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones, incluyendo la biogénesis del complejo I, el metabolismo de aminoácidos y rutas mitocondriales como la traducción mitocondrial, la importación mitocondrial de Ca^{2+} y proteínas, y la biogénesis mitocondrial. El **Anexo III** recoge información sobre las proteínas identificadas en el interactoma mitocondrial de FXN I anotadas en cada ruta KEGG y REACTOME significativa.

En concordancia, los eventos sobrerrepresentados en el análisis ORA de los términos GO *Biological Process* se presentan agrupados en 5 grandes categorías, relacionadas con la respiración celular y el ensamblaje del complejo I, la síntesis de glutamina y aminoácidos y la traducción mitocondrial, incluyendo el proceso de terminación traduccional (**Figura 43**).

Es interesante destacar que FXN I presenta en su interactoma proteínas encargadas de promover la transferencia de Ca^{2+} a la mitocondria, lo cual sugiere su participación en este proceso. Asimismo, algunas de las rutas mencionadas ya se habían descrito con anterioridad en relación con FXN y la FRDA, como la bioenergética y la fosforilación oxidativa, así como la biogénesis mitocondrial. Estos resultados aportan un mayor peso a la técnica Split-TurboID a la hora de validar las proteínas y rutas relacionadas con las isoformas en cada compartimento. El ejemplo más representativo es el proceso REACTOME que abarca las proteínas implicadas en el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (R-HSA-1428517). En el conjunto de datos del interactoma mitocondrial de FXN I encontramos 17 proteínas clasificadas en esta ruta (**Figura 44**). 9 de ellas están involucradas en la biogénesis del complejo I de la cadena de

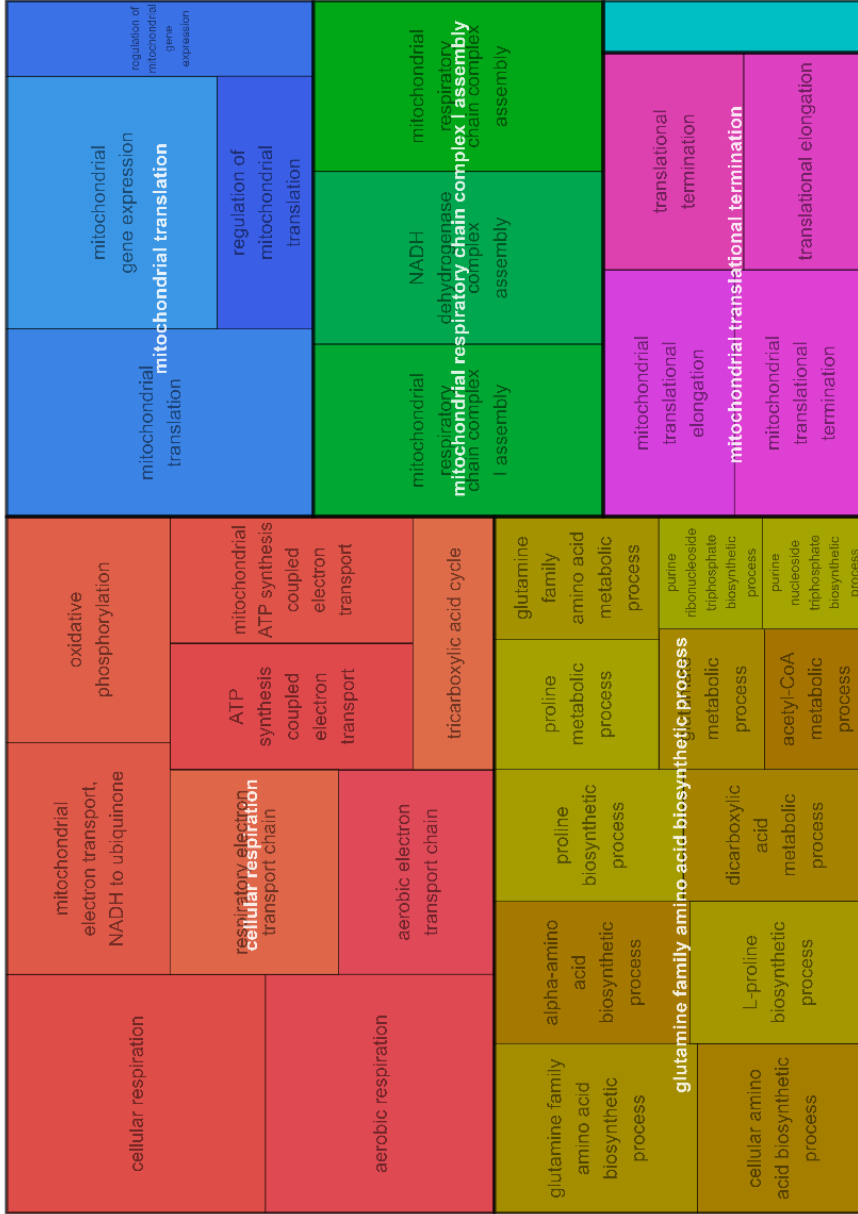
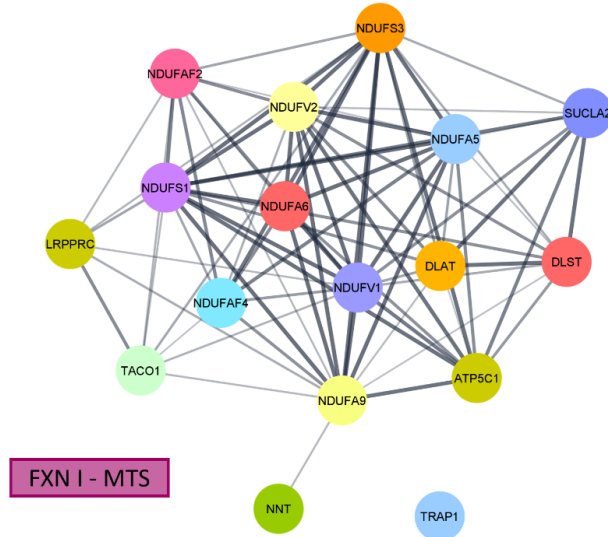


Figura 43: Treemap de los términos GO Biological Process sobrerrepresentados en el interactoma de FXN I en la mitocondria. El mapa muestra los procesos y subprocesos sobrerrepresentados en el análisis ORA del proteoma de FXN I anotados en diferentes términos GO asociados a procesos biológicos. El tamaño de cada cuadrado se corresponde con el p valor de significancia para cada término GO en el set de datos del proteoma de FXN I.

RESULTADOS

A



B

R-HSA-1428517: The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport

GEN	NOMBRE DE LA PROTEÍNA
NDUFV1, 2	NADH dehidrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, 2
NDUFA5, 6, 9	NADH dehidrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5, 6, 9
NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit
NDUFS3	NADH dehidrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3
NDUFAF2, 4	NADH dehidrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2, 4
ATP5F1C	ATP synthase subunit gamma
SUCLA2	Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta
DLAT	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex
DLST	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex
NNT	NAD(P) transhydrogenase
TACO1	Translational activator of cytochrome c oxidase 1
LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein
TRAP1	TNF Receptor Associated Protein 1

Biogénesis del Complejo I

Metabolismo del piruvato y ciclo de Krebs

Figura 44: Interactoma mitocondrial de FXN I implicado en el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones. Cluster de Markov de las interacciones proteína-proteína del interactoma mitocondrial de FXN I anotado en la ruta REACTOME R-HSA-1428517: *The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport*. Los Clusters de Markov se representan según la base de datos STRING [395]. Las líneas más gruesas indican un mayor grado de evidencia en la interacción de proteínas. La tabla muestra el nombre del gen (*SYMBOL*) y de cada proteína.

transporte de electrones, bien formando parte de la enzima o participando en su ensamblaje (**Figura 44A y B**). También se encuentran la subunidad γ de la ATP sintasa, dos componentes de la enzima piruvato deshidrogenasa y otras enzimas relacionadas con la producción de energía mitocondrial.

Por otro lado, la ruta REACTOME de traducción mitocondrial (RR-HSA-5368287) está enriquecida en los dos proteomas de interacción analizados para FXN I. En el interactoma analizado al coexpresar FXN I con ERTS-SplitC-HA se identificaron como significativas la proteína PTCD3 (*Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3*) y cuatro subunidades MRPS (28S *Mitochondrial Ribosomal Protein S*), la subunidad pequeña (28S) del ribosoma mitocondrial (**Figura 45A**). En línea con estos resultados, en el interactoma mitocondrial de FXN I se identificaron 7 componentes adicionales de la subunidad 28S del ribosoma mitocondrial (**Figura 45B**). En conjunto, los datos indican, por primera vez, un papel de FXN I en la regulación de la traducción mitocondrial.

3.4. Frataxina I y II participan en procesos celulares regulados por las MAMs

El RE y la mitocondria se comunican a través de las MAMs para coordinar la regulación de procesos como el intercambio de Ca^{2+} , la producción de energía, la apoptosis y el metabolismo y tráfico lipídico [276]. Tanto la localización de FXN I y II en el espacio RE/citosol, como su interacción con proteínas enriquecidas en las MAMs, sugieren que ambas isoformas podrían tener un papel en este dominio. Con la finalidad de indagar en este asunto, decidimos analizar en detalle las proteínas del interactoma de ambas isoformas implicadas en funciones celulares reguladas por las MAMs. En la literatura, numerosos trabajos han realizado estudios proteómicos de la interacción RE-mitocondria mediante diferentes aproximaciones, en diferentes tejidos y células humanas [22], [27], [277]–[279], así como estudios concretos de la yuxtaposición entre

RESULTADOS

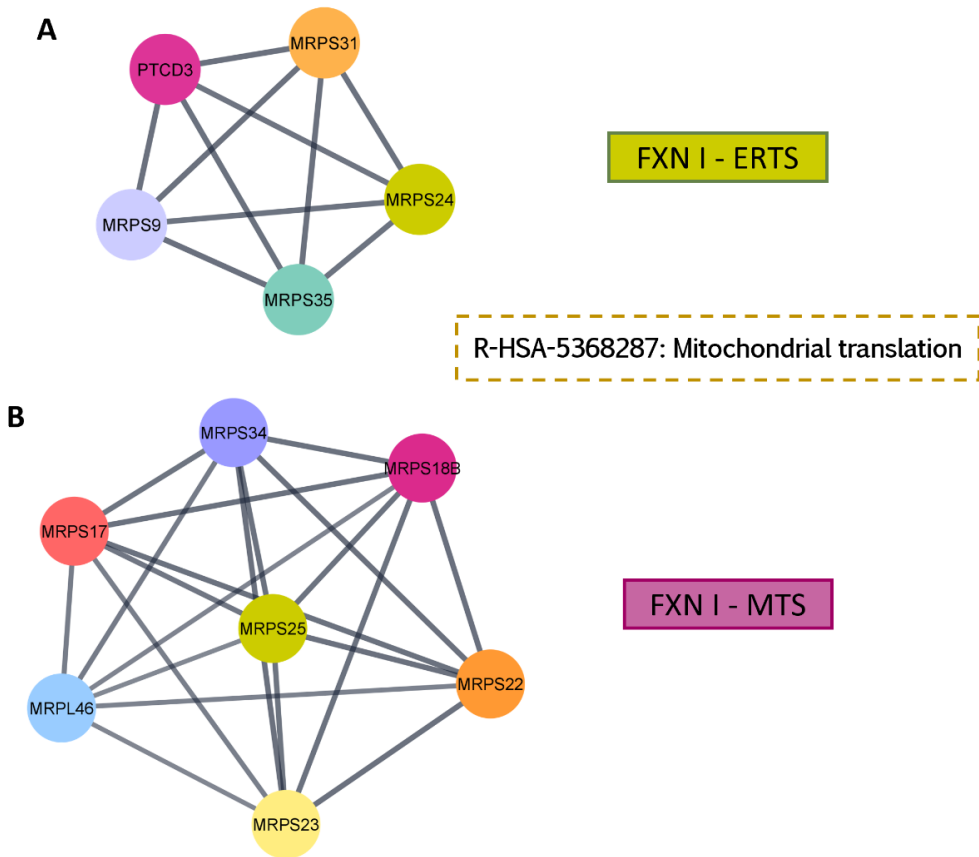


Figura 45: *Clusters* de Markov del interactoma de FXN I implicado en la traducción mitocondrial. Redes de interacción de las proteínas identificadas en el interactoma de FXN I al coexpresarla con ERTS-SplitC-HA (A) o MTS-SplitC-HA (B). Los *clusters* se representan según la base de datos STRING [395]. Las líneas gruesas indican un mayor grado de evidencia en la interacción de proteínas.

proteínas de ambos compartimentos [273], [280], [281]. Sin embargo, a pesar de que existe un término GO asociado a las MAMs (GO: 0044233 [*mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane*]), muchas de estas proteínas no han sido anotadas dentro de este término. En la actualidad no existe un consenso sobre las proteínas que pertenecen al dominio MAMs, dado que su composición depende del tipo celular y/o tejido. Por este motivo, cruzamos nuestros datos con los proteomas de MAMs identificados en la literatura. La **Figura 46** muestra el número de proteínas identificadas en los proteomas analizados de FXN I y II que se

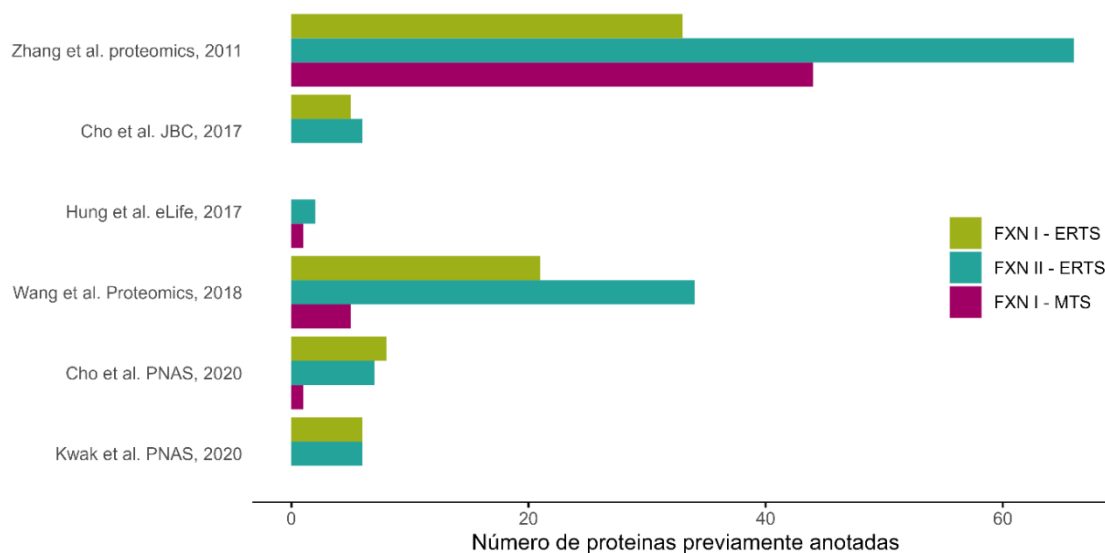


Figura 46. Análisis específico de los interactomas de FXN I y II comparado con proteínas previamente identificadas en el dominio MAMs. La gráfica de barras muestra el número de proteínas del proteoma de interacción de FXN I (ERTS y MTS) y II (ERTS) que se han descrito anteriormente como miembros de los contactos RE-mitocondria. Los datos se han contrastado con los proteomas disponibles en cada una de las publicaciones [22], [27], [277]–[279].

han caracterizado previamente como pertenecientes al dominio MAMs. Los trabajos que recogen un mayor número de proteínas coincidentes con nuestros resultados son los llevados a cabo por Zhang *et al.* y Wang *et al.* De acuerdo con Zhang y colaboradores, el interactoma extramitocondrial de FXN I incluye 33 proteínas identificadas en el dominio MAMs, mientras que el de FXN II incluye 66. Asimismo, los autores describieron 45 de las proteínas identificadas en el proteoma mitocondrial de FXN I como miembros de los contactos RE-mitocondria [22]. Por otro lado, 21 de las proteínas del interactoma extramitocondrial de FXN I coinciden con las identificadas por Wang *et al.*, mientras que 34 coinciden con el interactoma de FXN II. Tan solo 5 de las pertenecientes al proteoma mitocondrial de FXN I se hallaron en el dominio MAMs en este trabajo [279]. El Anexo IV recoge una tabla con las proteínas identificadas en el interactoma de FXN I (ERTS y MTS) y II (ERTS) que se han localizado en cada uno de

RESULTADOS

los estudios proteómicos de los contactos RE-mitocondria realizados hasta el momento. Estos resultados aportan evidencia sobre la complejidad del dominio MAMs, cuya composición depende de las condiciones celulares y el tejido.

A continuación, decidimos estudiar en profundidad las proteínas implicadas en rutas de señalización reguladas por las MAMs. En primer lugar, tanto los resultados previamente descritos [88], [89], [189], como los obtenidos en el presente trabajo, nos indujeron a estudiar las proteínas implicadas en la regulación del Ca^{2+} intracelular. En el análisis del proteoma de interacción de FXN I (MTS) y FXN II (RE/citosol) hemos identificado proteínas anotadas en procesos de regulación del Ca^{2+} intracelular y el intercambio de este catión entre el RE y la mitocondria (**Figura 47**). En concreto, VDAC2, PHB2 y PMPCA aparecen en el interactoma mitocondrial de FXN I, mientras que PHB aparece en su interactoma extramitocondrial (**Figura 47A**). Estas proteínas se encuentran anotadas en la ruta REACTOME de transporte mitocondrial de Ca^{2+} . Curiosamente, esta ruta también está enriquecida en el interactoma de FXN II, en el que se han encontrado isoformas de estas mismas proteínas (VDAC1, VDAC3 y PHB) (**Figura 47B**). Estos resultados, junto con los datos obtenidos en apartados anteriores de este trabajo, apuntan hacia una clara participación de ambas isoformas en la incorporación de Ca^{2+} mitocondrial. La **Tabla 6** recoge información sobre las proteínas identificadas, así como la función relacionada con la homeostasis del Ca^{2+} de cada una de ellas.

Por otro lado, el proteoma de interacción de FXN II incluye proteínas del RE esenciales en rutas de regulación del Ca^{2+} intracelular, como STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) (**Figura 47B**), un sensor de Ca^{2+} que promueve la captación de este catión desde el espacio extracelular hacia los depósitos intracelulares de Ca^{2+} a través del SOCE [282]. FXN II parece estar también relacionada con SERCA2 (codificada por el gen

ATP2A2), la ATPasa encargada de abastecer al RE de Ca^{2+} desde el citosol. Por tanto, dado que encontramos proteínas involucradas en la

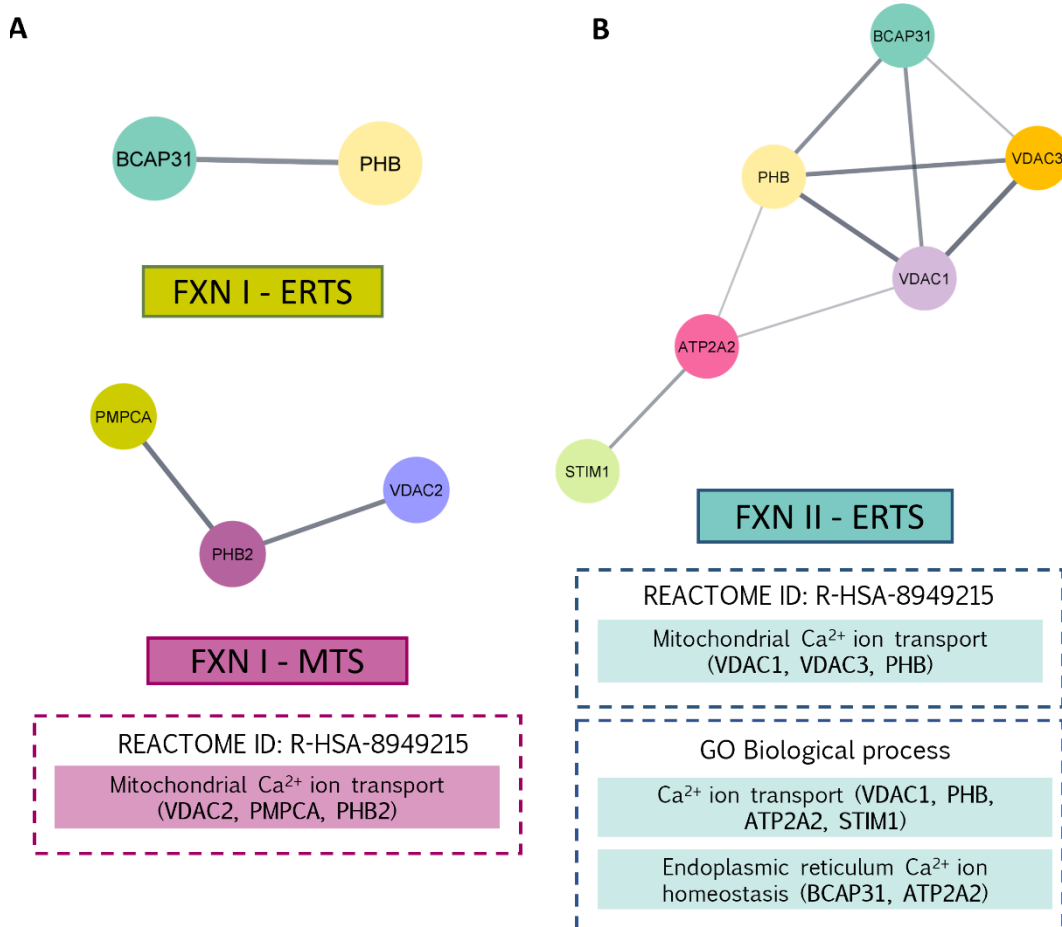


Figura 47: Interactoma de FXN I y II involucrado en la regulación del Ca^{2+} intracelular. (A, B) La imagen muestra los *clusters* de interacción proteína-proteína de los interactomas de FXN I (ERTS y MTS) (A) y II (ERTS) (B) implicados en la regulación intracelular de Ca^{2+} , así como la ruta REACTOME enriquecida en el análisis ORA de ambos proteomas (*Mitochondrial Ca^{2+} ion transport*). Adicionalmente, se incluyen los eventos anotados en el término GO *Biological Process* en el que intervienen otras proteínas significativas para FXN II. Los *Clusters* de Markov se representan según la base de datos STRING [395]. Las líneas más gruesas indican un mayor grado de evidencia en la interacción de proteínas.

RESULTADOS

regulación del Ca^{2+} , tanto de la mitocondria como del RE, nuestros datos apuntan a un papel regulador por parte de ambas isoformas en las MAMs.

Nuestros datos apuntan a que ambas isoformas contribuirían de forma sinérgica con la regulación de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, mientras que FXN II estaría implicada en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular también en el RE.

GEN (SYMBOL)	DESCRIPCIÓN	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN	INTERACCIÓN CON FXN	REFERENCIAS
VDAC1/2/3	Canal de Ca^{2+}	Entrada de Ca^{2+} a la mitocondria	MME	FXN I y II	[283]–[285]
PHB1/2	Chaperona mitocondrial	Biogénesis del MCU	MMI	FXN I y II	[286]–[288]
PMPCA	Peptidasa de procesamiento mitocondrial	Biogénesis del MCU	MMI, matriz mitocondrial	FXN I	[288], [289]
BCAP31	Chaperona del RE	Entrada de Ca^{2+} a la mitocondria	RE	FXN I y II	[273], [290], [291]
STIM1	Mediador del SOCE	Entrada de Ca^{2+} a la célula	RE	FXN II	[282], [292]
ATP2A2	Canal de Ca^{2+}	Entrada de Ca^{2+} al RE	RE	FXN II	[293], [294]

Tabla 6: Proteínas del interactoma de FXN I y II relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Se muestran el nombre (symbol) del gen de cada una de las proteínas identificadas, así como una pequeña descripción de las mismas, su función relacionada con la regulación del Ca^{2+} , su localización y su interacción con FXN I, FXN II o ambas. SOCE: *Store-operated Ca^{2+} entry*; MCU: *Mitochondrial Ca^{2+}* MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna; RE: retículo endoplasmático.

La segunda función regulada por las MAMs que analizamos fue el metabolismo lipídico. Numerosos modelos de FRDA han mostrado alteraciones en el metabolismo de los lípidos, con acumulación de estos en el citoplasma, pero se desconoce el mecanismo subyacente a esta alteración [219], [225], [240], [243]. Por ello nos centramos en esclarecer qué rutas relacionadas con el metabolismo de lípidos se encuentran enriquecidas en nuestro conjunto de datos, así como las proteínas específicas implicadas en ellas. La **Figura 48** muestra la red de proteínas pertenecientes a rutas del metabolismo lipídico enriquecidas tras el análisis ORA KEGG y

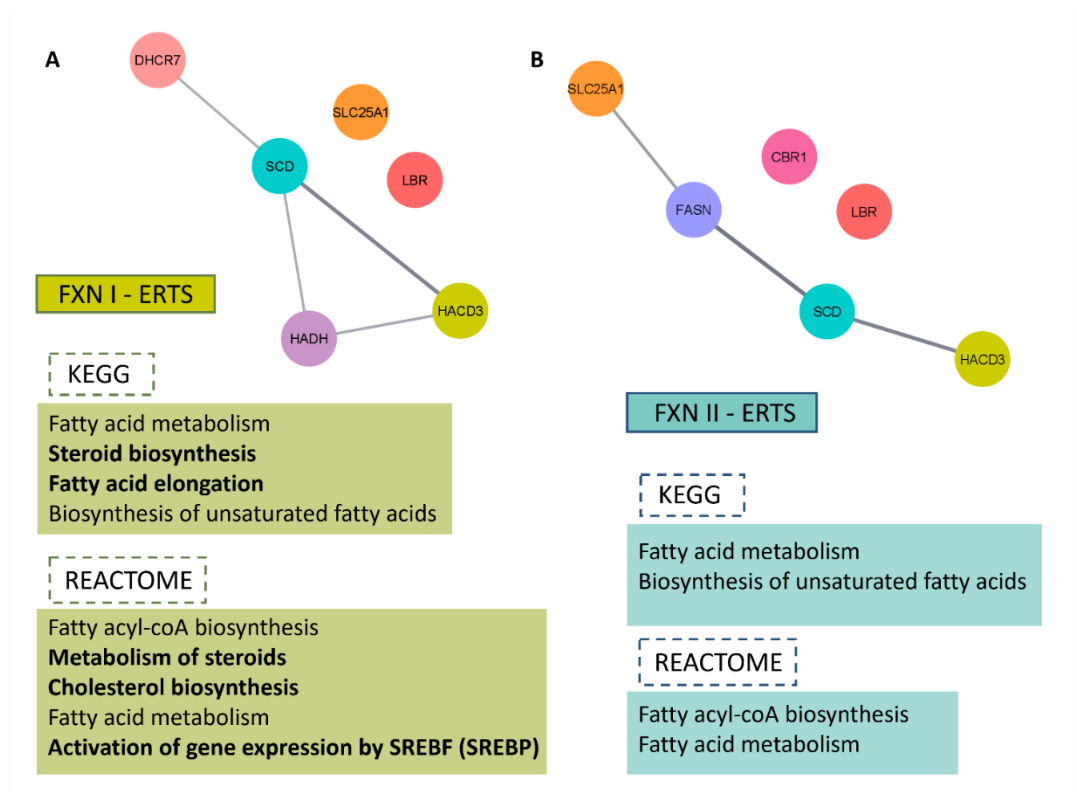


Figura 48: Interactoma de FXN I y II relacionado con el metabolismo lipídico. (A, B) La imagen los *clusters* de interacción proteína-proteína del interactoma de FXN I (A) y II (B) implicado en el metabolismo de lípidos, así como las rutas KEGG y REACTOME enriquecidas en el análisis ORA de cada proteoma. Los *Clusters* de Markov se representan según la base de datos STRING [395]. Las líneas más gruesas indican un mayor grado de evidencia en la interacción de proteínas. Se marcan en negrita las rutas únicas en el interactoma de FXN I.

RESULTADOS

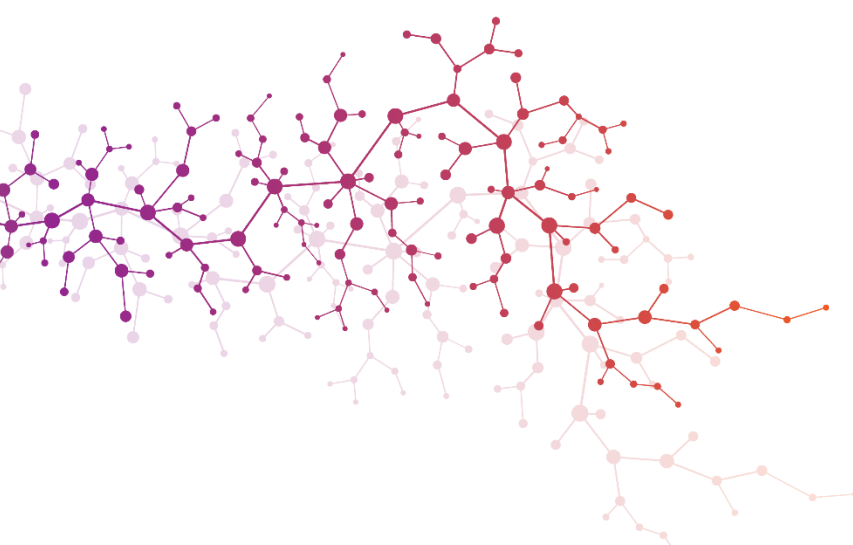
REACTOME del interactoma de FXN I (ERTS) y FXN II (ERTS). La **Tabla 7** recoge información sobre las proteínas identificadas, así como la función relacionada con el metabolismo lipídico de cada una de ellas.

GEN (SYMBOL)	DESCRIPCIÓN	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN	INTERACCIÓN CON FXN	REFERENCIAS
DHCR7	7-dehidrocolesterol reductasa	Síntesis del colesterol	RE	FXN I	[295]
LBR	C-14 esterol reductasa	Síntesis del colesterol	RE	FXN I y II	[296]
SLC25A1	Transportador de Citrato/malato	Metabolismo del ácido araquidónico	MME	FXN I y II	[297]
SCD	Stearoil-CoA desaturasa	Metabolismo del ácido araquidónico	RE	FXN I y II	[298]
HACD3	3-Hidroxiacil-CoA deshidratasa	Elongación de ácidos grasos / Metabolismo del ácido araquidónico	RE	FXN I y II	[299]
HADH	Hidroxiacil-CoA Deshidrogenasa	β -oxidación / Metabolismo del ácido araquidónico	Matriz mitocondrial /núcleo	FXN I y II	[300]
FASN	Sintasa de ácidos grasos	Síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos / Metabolismo del ácido araquidónico	Citosol	FXN II	[301]
CBR1	Reductasa dependiente de NADPH	Metabolismo del ácido araquidónico	Citosol	FXN II	[302]

Tabla 7: Proteínas del interactoma de FXN I y II relacionadas con el metabolismo lipídico. Se muestran el nombre (symbol) del gen de

cada una de las proteínas identificadas, así como una pequeña descripción de las mismas, su función relacionada con el metabolismo de lípidos, su localización y su interacción con FXN I, FXN II o ambas. MME: membrana mitocondrial externa; RE: retículo endoplasmático.

Por un lado, FXN I parece ser la isoforma con mayor relevancia en el metabolismo de lípidos, ya que presenta rutas significativas que no aparecen enriquecidas en el interactoma de FXN II (**Figura 48A**). Destacan la síntesis de colesterol y esteroides, estrechamente relacionadas con la ruta de activación de la expresión génica por SREBP. Esto se debe, principalmente, a DHCR7 y LBR (*Lamin-B Receptor*), cuya función principal es la síntesis de colesterol. Sin embargo, FXN II no presenta rutas de lípidos únicas en su proteoma, aunque sí proteínas como FASN (*Fatty acid synthase*) y CBR1 (*Carbonyl reductase [NADPH] 1*), que no aparecen en el interactoma de FXN I (**Figura 48B**). Las dos proteínas son citosólicas y participan en procesos de síntesis de ácidos grasos, presentando en común el metabolismo del ácido araquidónico. En general, las proteínas comunes a ambas isoformas participan en rutas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos a partir de la síntesis de la Acil-Coenzima A, un proceso llevado a cabo por enzimas del RE/citosol, y el metabolismo del ácido araquidónico (**Tabla 7**). Es interesante destacar que las rutas mencionadas contribuyen al anabolismo de lípidos, por lo que estos resultados sugieren que FXN podría intervenir en la formación de estructuras lipídicas. Estos hallazgos explicarían los defectos observados en el metabolismo de lípidos de diferentes modelos celulares y animales de FRDA.



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

1. El dominio MAMs como diana terapéutica de la Ataxia de Friedreich

1.1. El déficit de frataxina produce una alteración estructural y funcional en las MAMs

La comunicación entre el RE y la mitocondria es especialmente importante para mantener una adecuada homeostasis del Ca^{2+} intracelular, esencial en la regulación de procesos celulares como el suministro bioenergético y la supervivencia celular. En especial, existen funciones fisiológicas estrechamente relacionadas con el flujo de Ca^{2+} en el sistema nervioso, como el ensamblaje sináptico, la generación de potenciales de acción y la transmisión de la sinapsis [191]. En la literatura se han descrito alteraciones en el número de contactos RE-mitocondria que afectan a la neurobiología de enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares como el Alzheimer, el Huntington y el Párkinson. Curiosamente, muchas de las proteínas involucradas en la fisiopatología de estas enfermedades se han identificado como residentes del dominio de las MAMs y están implicadas en la regulación de estas estructuras. Por ejemplo, las mutaciones en las Presenilinas 1 y 2, involucradas en la enfermedad de Alzheimer, incrementan los contactos RE-mitocondria, sobrerregulando la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. Asimismo, la Huntingtina, implicada en la enfermedad de Huntington, es fundamental para la morfología del RE, dado que la Huntingtina mutante desencadena estrés de RE y altera la transferencia de Ca^{2+} a la mitocondria [78], [303]. En concreto, estas enfermedades presentan un aumento en los contactos RE-mitocondria, lo que conduce a una captación tóxica de Ca^{2+} mitocondrial, una menor viabilidad celular y la disfunción de los mecanismos regulados en este dominio [78]–[80]. Sin embargo, se desconoce el papel que podrían ejercer las MAMs en la fisiopatología de la FRDA. Para esclarecer esta cuestión, en el presente trabajo hemos realizado por primera vez un estudio sobre la

DISCUSIÓN

funcionalidad e integridad de los contactos RE-mitocondria, también denominados MAMs, bajo condiciones de déficit de FXN.

En los últimos años se ha acumulado evidencia sobre la alteración en la captación de Ca^{2+} mitocondrial en diferentes modelos deficientes en FXN, acompañada en algunos de ellos por una acumulación de Ca^{2+} citosólico [88], [89], [189]. En consonancia, el tratamiento con quelantes de Ca^{2+} logró mejorar el fenotipo mostrado en neuronas sensitivas del modelo murino de FRDA denominado YG8R [189]. Posteriormente, Abeti y colaboradores observaron también que, tanto en neuronas cerebelosas como en cardiomiocitos deficientes en FXN, existía una desregulación en la afluencia de Ca^{2+} mitocondrial, concomitantemente caracterizada por niveles reducidos de Ca^{2+} en el RE [89]. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a una transferencia anormal de Ca^{2+} a la mitocondria provocada por una deficiencia de FXN no se habían estudiado en detalle. Las principales proteínas encargadas del intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria son IP_3R , situada en el RE, VDAC (MME) y MCU (MMI). La chaperona GRP75, localizada en el citosol, media la interacción entre ambos compartimentos, ejerciendo de puente entre IP_3R y VDAC (**Figura 49**, panel superior). Por tanto, una desregulación en las MAMs bajo condiciones de déficit de FXN provocaría un intercambio anormal de Ca^{2+} por parte de ambos orgánulos.

Es necesario recalcar que la localización de FXN en las MAMs sugiere un papel tanto estructural como funcional en este dominio. La interacción entre FXN y GRP75 ya se había descrito anteriormente [234]. Por tanto, nuestros datos no sólo confirman la interacción entre estas proteínas, sino que también representan un control positivo. Nuestra hipótesis se fundamenta en que FXN interviene en las MAMs de formas distintas, pero no necesariamente excluyentes. En primer lugar, nuestros resultados descubren por primera vez a FXN como miembro de la red proteica de las MAMs (**Figura 11**), lo cual indica un papel clave en los

procesos moleculares regulados en este dominio, incluyendo el mantenimiento del ambiente redox. En segundo lugar, el hecho de que FXN interactúe de forma directa con GRP75 e IP₃R señala su implicación en la estabilización del puente IP₃R-GRP75-VDAC-MCU y, por tanto, su participación en el control del Ca²⁺ intracelular.

Asimismo, mediante el uso de una novedosa aproximación experimental, denominada *Proximity Ligation Assay* [304], diseñada para el análisis cuantitativo de interacción entre proteínas, hemos determinado que el número de interacciones de las MAMs se encuentra firmemente reducido en nuestro modelo celular de FRDA (**Figuras 12 y 13**). Estos hallazgos se correlacionan con un desequilibrio en la captación de Ca²⁺ mitocondrial, lo cual puede contribuir con la disfunción mitocondrial. Publicamos estos resultados en colaboración con el Dr. Juan Antonio Navarro en 2020, cuyo modelo *in vivo* de *D. melanogaster* proporcionó un mayor conocimiento sobre el mecanismo de desorganización de las MAMs en la FRDA. La sobreexpresión del MCU, con el objetivo de promover la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria, tuvo efectos neuroprotectores en el modelo, recuperando el fenotipo severo causado por la deficiencia de frataxina en la mosca. Además, la sobreexpresión del MCU indujo un aumento de la bioenergética mitocondrial, recuperando la síntesis de ATP deficiente en el modelo, posiblemente, por un aumento de la afluencia de Ca²⁺ mitocondrial [218].

En línea con nuestros resultados, algunas neuropatías presentan características similares en la regulación de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular, caracterizándose por conexiones RE-mitocondria deficientes y una consecuente acumulación de Ca²⁺ en el citosol. Esto conduce a una perturbación en la comunicación entre ambos compartimentos, lo cual genera disfunción mitocondrial. Por ejemplo, varias formas de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) se caracterizan por una alteración mitocondrial acompañada de una regulación anormal del Ca²⁺ mitocondrial. Esto

DISCUSIÓN

incluye las formas de ELA con mutaciones en SOD1, cuyos modelos murinos presentan defectos mitocondriales y un déficit en la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} [305], [306]. Asimismo, mutaciones homocigotas en Sig-1R, una de las chaperonas que refuerzan los contactos RE-mitocondria, provocan la forma juvenil de ELA16 [307]. Estas mutaciones en Sig-1R contribuyen a una disociación ER-mitocondria en las neuronas motoras, acompañada de una reducción en el flujo de Ca^{2+} mitocondrial a través de IP_3R y una menor producción de ATP. Estos defectos provocan una vulnerabilidad celular, directamente relacionada con la fisiopatología de la enfermedad [85]. La neuropatía hereditaria Charcot-Marie-Tooth (CMT) también está provocada por mutaciones en proteínas que contribuyen a la función de las MAMs. Uno de los tipos de CMT, causado por deficiencia de GDAP1, conduce a defectos mitocondriales y una dishomeostasis en el Ca^{2+} neuronal acompañados de alteraciones en la interacción RE-mitocondria [72], [308], [309]. Por tanto, la evidencia descrita en otras enfermedades neurológicas, junto con los resultados encontrados en este trabajo, contribuyen a la comprensión del mecanismo de desregulación del Ca^{2+} observado en modelos con déficit de FXN.

En definitiva, nuestros hallazgos indican que la deficiencia de FXN provoca una alteración en la comunicación RE-mitocondria, con una consecuente desregulación en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (**Figura 49**, panel inferior). Los resultados proporcionan un nuevo enfoque sobre la funcionalidad extramitocondrial de FXN, lo cual influye, a su vez, en la disfunción mitocondrial. Entre las preguntas que originan estos resultados, se encuentra la incógnita del papel que desempeña FXN en el dominio MAMs. Asimismo, sería esencial dilucidar si la desorganización de las MAMs provocada por el déficit de FXN es el evento crítico en la progresión de la patología, lo cual supone un nuevo campo de investigación en relación con las MAMs como diana terapéutica de la FRDA.

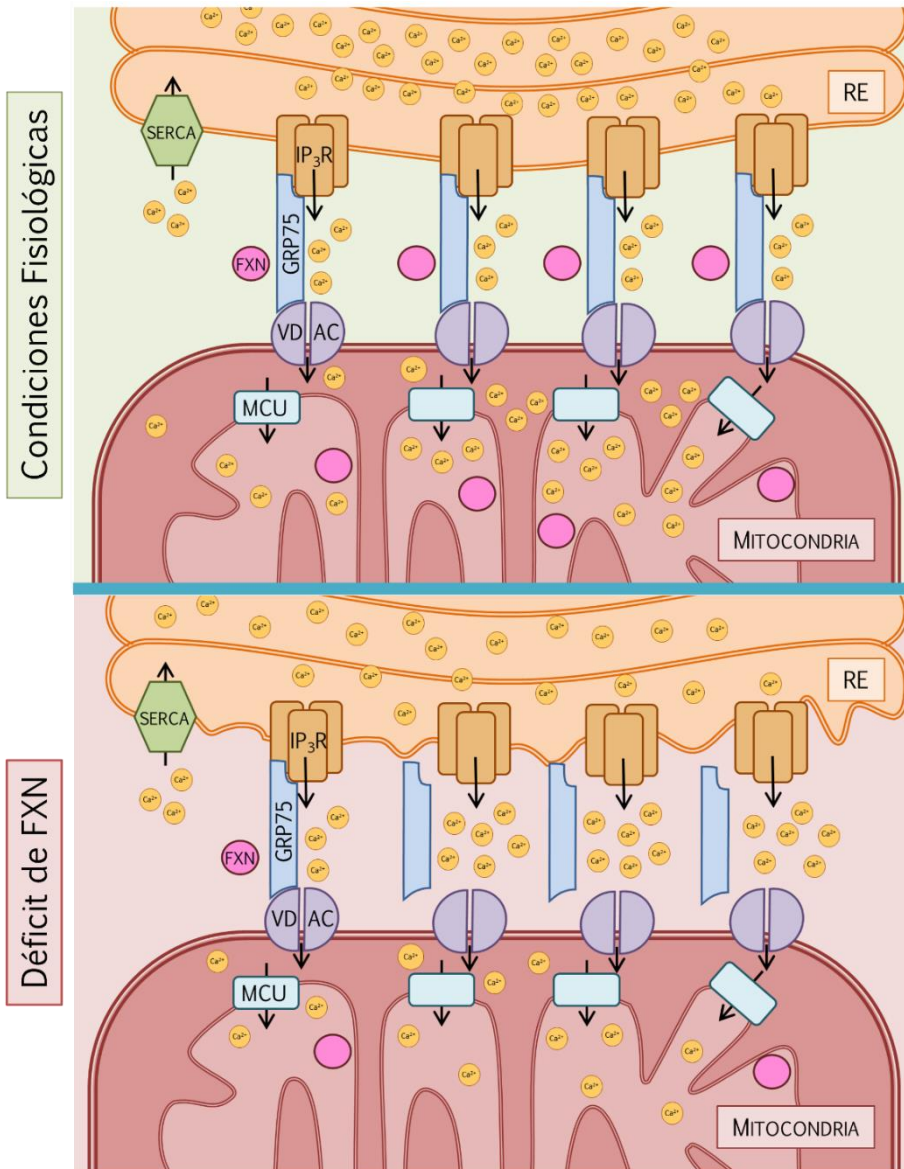


Figura 49: La comunicación RE-mitocondria está alterada en condiciones de déficit de FXN. En condiciones fisiológicas (arriba), el puente proteico IP₃R-GRP75-VDAC-MCU facilita una rápida transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. Cuando la expresión de FXN se reduce, (abajo), la comunicación entre los dos compartimentos se ve alterada, tanto en estructura (reducción de las interacciones), como en función (transferencia de Ca^{2+} mitocondrial inadecuada). RE: Retículo endoplasmático, GRP75: *Glucose-regulated protein 75*, IP₃R: *Inositol Triphosphate Receptor*, MCU: *Mitochondrial Calcium Uniporter*, SERCA: *Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*, VDAC: *Voltage-dependent anion channel*. Figura original creada a partir de recursos Creative Commons de Servier Medical Art [393]. Publicada y adaptada de [218].

DISCUSIÓN

1.2. Restauración de la funcionalidad de las MAMs mediante distintas terapias farmacológicas en un modelo con déficit de frataxina

1.2.1. Antioxidantes

Con la finalidad de estudiar el impacto de la disfunción en las MAMs provocada por la deficiencia de FXN sobre el intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria, tratamos nuestras células con antioxidantes. En este sentido, Abeti *et al.* consiguieron previamente restablecer la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en cardiomiocitos procedentes del modelo murino con déficit de FXN YG8R tratados con vitamina E [89]. En línea con estos resultados, el tratamiento con el análogo soluble de la vitamina E (Trolox) en nuestro modelo celular deficiente en FXN consiguió recobrar la comunicación de las MAMs, promoviendo la transferencia de Ca^{2+} a la mitocondria (**Figuras 14 y 16**). En efecto, esta recuperación podría estar asociada al aumento de contactos RE-mitocondria, promovidos por una disminución en el ambiente redox del microdominio proteico. Aunque son necesarios más experimentos para demostrarlo fehacientemente. En cualquier caso, estos resultados ponen de manifiesto la necesidad del mantenimiento de contactos de las MAMs como evento clave en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en condiciones de déficit de FXN.

Existen numerosas contribuciones científicas previas que destacan el papel de los antioxidantes en la FRDA (para una revisión completa, ver: [310]). De hecho, Cooper y colaboradores observaron efectos prometedores tras la terapia combinada de Coenzima-Q10 y vitamina E en pacientes [311]. Por otro lado, la NAC se ha utilizado como modulador de NRF2 en fibroblastos de pacientes de FRDA, mostrando propiedades neuroprotectoras e incrementando la expresión de FXN [220]. En nuestro modelo, tanto el Trolox como la NAC, recuperan la estructura y función de las MAMs, demostrando una relación directa entre el estrés oxidativo y la desorganización RE-mitocondria, contribuyendo a la dishomeostasis

del Ca^{2+} intracelular. Algunos autores han señalado la presencia de estrés oxidativo en distintos modelos de FRDA, acompañado de una desregulación del Ca^{2+} intracelular [89], [233], [250], [312]. Además, es interesante destacar que la peroxidación lipídica es un biomarcador de estrés oxidativo que se ha encontrado tanto en modelos *in vivo* de FRDA [194], [200], [219], [313], como en pacientes afectados por la enfermedad [203]. Nuestros resultados muestran que tanto Trolox como NAC alivian la peroxidación de lípidos de membrana en las células deficientes en FXN, lo cual destaca la importancia de un microambiente reducido en el entorno de las MAMs para preservar su arquitectura fisiológica. De este modo, aunque la recuperación de los niveles de peroxidación en nuestro modelo no alcanza los niveles del control tras el tratamiento con antioxidantes, este efecto es suficiente para recuperar la comunicación RE-mitocondria (**Figura 16C**).

Por otro lado, la Omav se ha descrito como un activador de la vía de señalización de NRF2, un potente activador de la respuesta antioxidante celular [216]. El tratamiento con diferentes concentraciones de Omav en nuestro modelo con déficit de FXN recuperó satisfactoriamente la captación de Ca^{2+} mitocondrial. Esto puede deberse al mismo efecto ejercido por Trolox y NAC, en el que el efecto antioxidante promueve la comunicación RE-mitocondria. La primera vez que este fármaco se probó en modelos de FRDA fue en neuronas granulares cerebelosas del modelo murino YG8R y en fibroblastos de pacientes. En esta publicación, los autores describieron la recuperación de la expresión y actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones en ambos modelos. El tratamiento con Omav consiguió, además, revertir el fenotipo de los fibroblastos derivados de pacientes, que mostraban niveles elevados de peroxidación lipídica y ROS mitocondriales, a la vez que niveles disminuidos de GSH. También ejerció un papel protector en la disfunción mitocondrial, promoviendo la respiración celular y evitando la muerte

DISCUSIÓN

celular [216]. La Omap se revela por tanto como un potente activador de la respuesta antioxidante, capaz de revertir los defectos observados en modelos *in vitro* deficientes en FXN.

En el ámbito clínico, la Omap (RTA-408) es el único fármaco que ha conseguido mejorar de forma significativa la disfunción neurológica de los pacientes en comparación con el grupo placebo. El estudio MOXIe (NCT02255435), un ensayo clínico de fase II, aleatorizado, controlado por placebo y de doble ciego, fue implementado para la evaluación de la Omap en pacientes de FRDA. Comenzó en 2014 y consta de dos partes, más una extensión que se prevé que finalice en diciembre de 2022. La primera parte del estudio valoró la seguridad, farmacodinámica y potenciales efectos de diferentes dosis de Omap en 69 pacientes de FRDA. Tras determinar que la Omap tiene buena tolerancia y presenta efectos adversos leves, se observó que la dosis de 160 mg diarios ejerce efectos beneficiosos en la función neurológica de los pacientes. Esto se determinó mediante la puntuación mFARS, que se utiliza en ensayos clínicos de FRDA para evaluar la progresión natural de la enfermedad a través de la participación directa del paciente en actividades de movilidad [106]. No se encontró correlación entre la respuesta al Omap y la edad de debut de la enfermedad, la longitud de la expansión GAA de los pacientes, el sexo o la edad [108]. La segunda parte del estudio incluyó un total de 103 pacientes y evaluó la eficacia de 150 mg diarios de Omap en diferentes países durante 48 semanas. Las mejoras en la mFARS fueron homogéneas en todas las cohortes, aunque los mayores beneficios se registraron en pacientes pediátricos. El estudio calculó que la magnitud del beneficio del tratamiento es equivalente a dos años de la progresión natural de la enfermedad. De este modo, la Omap representa, por primera vez, una terapia esperanzadora para mejorar la calidad de vida de los pacientes y aminorar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en ambas fases del estudio se concluyó que los pacientes con pie cavo mostraron una menor

respuesta al tratamiento [109]. Dado que en torno al 50-70% de los individuos diagnosticados con FRDA presentan esta anomalía musculoesquelética, debería tenerse en consideración en el futuro para la búsqueda de terapia complementaria que se ajuste a cada paciente. También cabe destacar que en este estudio se descartaron los pacientes con cardiomiopatía significativa, aunque los pacientes que desarrollaron cardiomiopatía a lo largo del estudio continuaron en el mismo. Los objetivos del ensayo no incluyeron la evaluación de los pacientes en relación con la disfunción cardíaca, aunque no se observaron efectos, positivos o negativos, sobre el ecocardiograma o el electrocardiograma de los participantes. En definitiva, se hace evidente la búsqueda de estrategias terapéuticas complementarias a la Omav, con la finalidad de aliviar otros síntomas característicos de la enfermedad que no responden a la Omav.

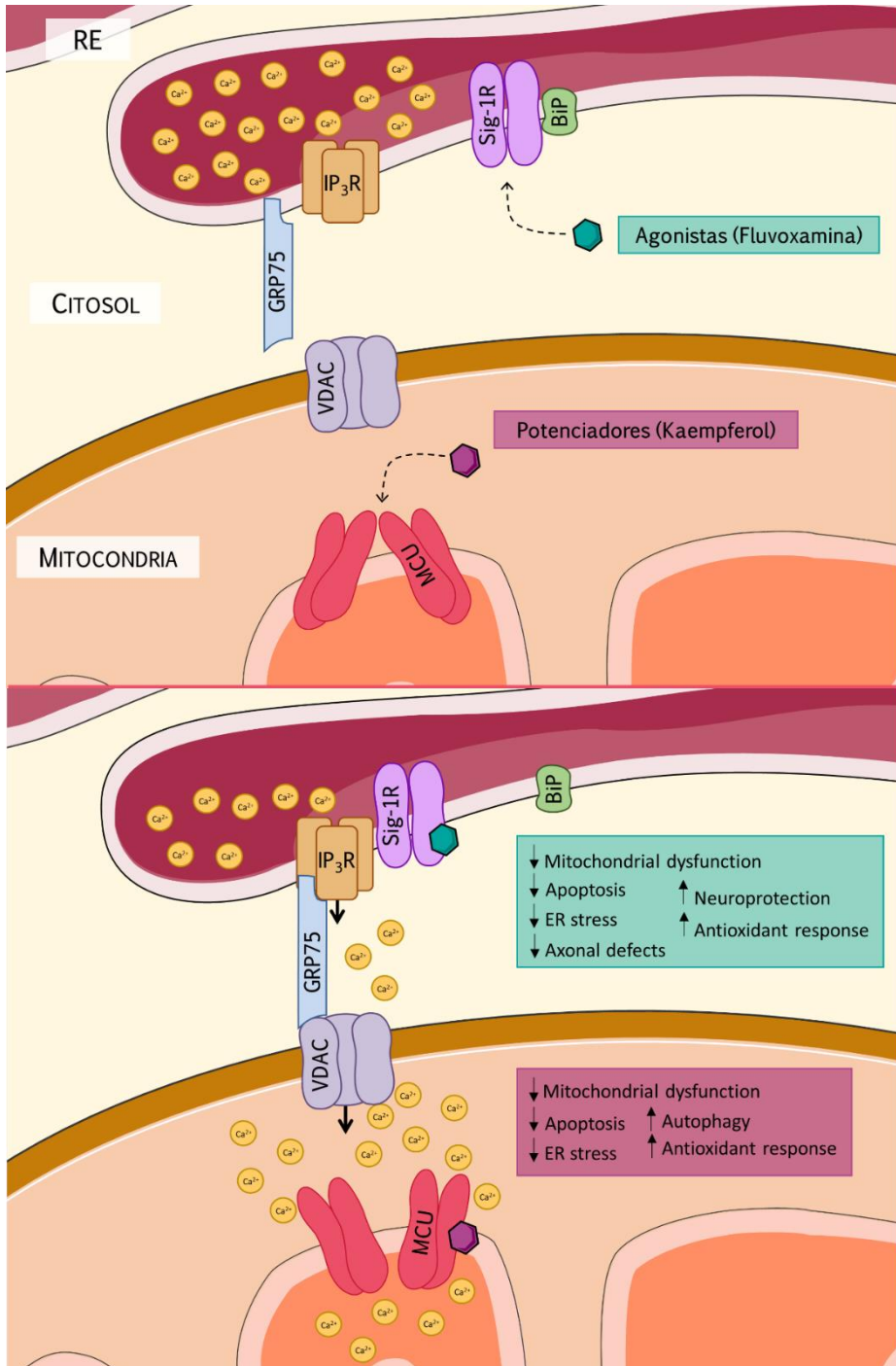
Otro fármaco que está ganando interés en la FRDA es la Elamipretida o SS-31, un tetrapéptido catiónico aromático permeable a membrana que se dirige a la MMI. Este agente dirigido a mitocondria interacciona con la cardiolipina, un fosfolípido aniónico esencial para la formación de las crestas mitocondriales. Además, el SS-31 acelera la síntesis de ATP e incrementa la actividad de las enzimas que poseen complejos Fe-S, incluyendo la aconitasa y los complejos II y III de la cadena de transporte de electrones [314], [315]. También se ha sugerido que el SS-31 podría tener efectos terapéuticos neuroprotectores, mediante la prevención del daño oxidativo [316], y cardioprotectores [317]. El SS-31 ha demostrado buena tolerancia clínica, además de no presentar efectos adversos severos [317]. Recientemente, la Elamipretida ha sido designada por la FDA como medicamento huérfano de la FRDA [318]. En la actualidad, ha comenzado un ensayo clínico en fase IIa que está reclutando pacientes con síntomas avanzados de FRDA (NCT05168774), incluyendo la disfunción visual y cardíaca [319]. Dependiendo de los resultados

DISCUSIÓN

obtenidos, la Elamipretida podría utilizarse como terapia coadyuvante de la Omap en pacientes con afección cardíaca y/o pie cavo.

1.2.2. Fluvoxamina

Nuestra estrategia farmacológica para la FRDA se centra en dirigir fármacos a la restauración de la captación mitocondrial del Ca^{2+} . Para ello, hemos escogido dos fármacos implicados en reforzar la comunicación ER-mitocondria y así promover el intercambio de Ca^{2+} entre ambos compartimentos (**Figura 50**). Por un lado, la Fluvoxamina (Flv), dirigida a estabilizar IP_3R a través de Sig-1R, (**Figura 20**) consiguió reestablecer la incorporación de Ca^{2+} mitocondrial en nuestras células deficientes en FXN. Sig-1R es un elemento clave en el mantenimiento de la estructura y función de las MAMs, pero no se había explorado como diana farmacológica de la FRDA hasta el momento. Se ha descrito que la utilización de Sig-1R como diana terapéutica puede regular el estrés de RE, un mecanismo común en la neurodegeneración y también presente en modelos de FRDA [88], [320], [321]. La expresión de Sig-1R aumenta durante la respuesta al estrés de RE, lo cual previene la apoptosis celular desencadenada bajo estas condiciones [322]. También se ha señalado como indispensable para la bioenergética mitocondrial en los procesos tempranos de estrés de RE, promoviendo la entrada de Ca^{2+} mitocondrial [323]. Asimismo, Sig-1R se ha relacionado con la prevención del estrés oxidativo celular y la activación de los AREs [324], [325]. De forma inversa, el silenciamiento de Sig-1R promueve la producción de ROS y una menor expresión de NRF2 [326]. Por tanto, estas observaciones señalan a Sig-1R como una potencial diana de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. En este contexto, se ha observado que la deficiencia de Sig-1R exacerba la progresión de los trastornos neurológicos, incrementando la sintomatología comúnmente asociada a las enfermedades neurodegenerativas [327]–[329]. Muchos de los agonistas de Sig-1R han



DISCUSIÓN

Figura 50: Esquema de los efectos provocados por fármacos dirigidos a restablecer la afluencia de Ca^{2+} mitocondrial. En condiciones fisiológicas, Sig-1R reside en la membrana del RE, en un estado latente, dependiente de Ca^{2+} . Tras su activación por agonistas, Sig-1R se disocia de BiP/GRP78 y se reubica dentro de la membrana de RE, interaccionando con IP_3R y estabilizando el puente proteico que transfiere Ca^{2+} a la mitocondria. Este complejo, formado por IP_3R -GRP75-VDAC-MCU facilita un rápido flujo transitorio de Ca^{2+} al espacio intermembrana mitocondrial. Esto desencadena un cambio de conformación en MCU, lo cual permite la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial. En condiciones de fisiopatológicas, varios modelos de enfermedades neurológicas como la ELA, CMT y la FRDA han mostrado alteraciones en la captación mitocondrial de Ca^{2+} . Tanto los agonistas de Sig-1R (Fluvoxamina), como los potenciadores del MCU (Kaempferol) utilizados en este y otros estudios han demostrado promover de forma eficiente el intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria. En la literatura se han demostrado efectos beneficiosos tras inducir Sig-1R a través de la Fluvoxamina, demostrando mejoras en la función mitocondrial, la supervivencia celular y el estrés de RE. Además, la Fluvoxamina ha demostrado incrementar la defensa antioxidante y un papel efectos neuro y cardioprotector en diferentes modelos de enfermedad. Por otro lado, el Kaempferol ha demostrado mejorar la disfunción mitocondrial, activar la respuesta al estrés oxidativo, modular la autofagia, regular el estrés de RE y prevenir las células de la apoptosis. BiP/GRP78: *Binding immunoglobulin protein/Glucose-regulated protein 78*; ER: Endoplasmic reticulum; GRP75: *Glucose-regulated protein 75*; IP_3R : *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*; MCU: *Mitochondrial calcium uniporter*; Sig-1R: *Sigma non-opioid intracellular receptor 1*; VDAC: *voltage-dependent anion channel*. Figura original creada a partir de recursos *Creative Commons* de Servier Medical Art [393]. Adaptada de [246].

demostrado efectos sinaptogénicos, anti-amnésicos y neuroprotectores en condiciones de estrés neuronal [330], [331]. La modulación farmacológica de Sig-1R ha demostrado mitigar algunos de los defectos y síntomas en diferentes modelos experimentales de ELA y las enfermedades de Alzhéimer, Párkinson y Huntington [322]. Dado que Sig-1R es una chaperona, su actividad está dirigida a proteínas con alteraciones conformacionales y solo ocurre en tales condiciones de alteración, por lo que la activación de Sig-1R solo presenta efectos terapéuticos en

condiciones patológicas, no ejerciendo efecto en los controles [332], [333]. Esto evidencia la especificidad farmacológica de los ligandos de Sig-1R, poniendo de manifiesto su idoneidad como diana terapéutica.

Concretamente, la Fluvoxamina es un inhibidor de la recaptación de serotonina con alta afinidad por Sig-1R que se usa ampliamente en la clínica como antidepresivo. Este compuesto ha demostrado revertir la desregulación en la captación de Ca^{2+} mitocondrial y la producción de ATP de cardiomiocitos hipertróficos, ejerciendo un efecto cardioprotector [334], [335]. También alivia el estrés de RE, presentando un papel neuroprotector [264]. La modulación de Sig-1R a través de Flv ha demostrado, además, la activación de rutas antioxidantes, reduciendo la peroxidación lipídica y aumentando los niveles de GSH reducido [335]–[337]. Clínicamente, este compuesto posee buena tolerancia y está ampliamente disponible en el mercado. Debido a los resultados obtenidos en nuestro modelo deficiente en FXN, junto con los efectos que presenta en rutas de señalización relacionadas con la FRDA, la Flv debería tenerse en consideración para su estudio como posible terapia de la enfermedad.

Asimismo, otros agonistas de Sig-1R han demostrado efectos beneficiosos relacionados con la neuro- y/o cardioprotección, el estrés oxidativo y el Ca^{2+} mitocondrial en diferentes modelos de enfermedades neurológicas, como la Pridopidina [338]–[340] la Cutamesina [341], [342], la Blacarmesina [343]–[345], o el PRE-084 [85], [346]. Por ello, estos fármacos podrían ser potenciales candidatos para evaluar su acción sobre los defectos provocados por la deficiencia de FXN.

1.2.3. Kaempferol

El tratamiento con Kaempferol (KAM) en nuestras células deficientes en FXN también consiguió promover la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria de forma significativa, aunque únicamente en la condición con la mayor concentración evaluada (**Figura 22**). Esto se debe, al efecto

DISCUSIÓN

negativo del DMSO observado al estudiar la respuesta mitocondrial al Ca^{2+} procedente del RE. El DMSO se utiliza ampliamente en procedimientos experimentales, ya que es un excelente solvente y crioprotector. Se ha demostrado que deforma las membranas celulares, permeabilizándolas al paso de moléculas pequeñas e iones, incluyendo el Ca^{2+} [347]. Por tanto, el efecto observado en nuestro modelo podría deberse a que el DMSO altera la estructura de las MAMs, provocando un menor intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria. De este modo, parte del efecto del KAM se ve enmascarado al contrarrestar la acción del solvente, por lo que este fármaco se presenta como un tratamiento eficaz para promover la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria a través de la activación del MCU.

Localizado en la MMI, el MCU se compone de varias subunidades reguladoras, lo que pone de manifiesto su complejidad. Debido a que la MMI es impermeable, se requieren altas concentraciones de Ca^{2+} para activar la conformación del MCU, que oligomeriza y permite el paso del catión hacia la matriz mitocondrial. Por tanto, es esencial una correcta transferencia de Ca^{2+} al espacio intermembrana [348], [349]. En la última década se ha prestado especial atención al MCU como diana terapéutica. La mayoría de las aproximaciones terapéuticas experimentales se centran en la inhibición del intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria, principalmente en cáncer [350], [351], y enfermedades neurodegenerativas [352] como el Alzheimer [353] y el Parkinson [354]. Sin embargo, estudios en diabetes tipo 2 han señalado los beneficios de la activación del MCU para aliviar la disfunción mitocondrial asociada a una desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, la desorganización de las MAMs y alteraciones en funciones reguladas en este dominio [355], [356]. La terapia dirigida al MCU ha demostrado efectos positivos en modelos con una comunicación RE-mitocondria desregulada. Por ejemplo, la activación del MCU a través de la espermina incrementó la eliminación del Ca^{2+} citosólico, promoviendo el flujo de Ca^{2+} mitocondrial en cardiomiocitos con hipertrofia cardíaca.

En este modelo celular, las conexiones RE-mitocondria se encontraban disminuidas, lo que condujo a una menor síntesis de ATP y contribuyó a la patogénesis del proceso [357]. Asimismo, la sobreexpresión del MCU o su activación mediante la espermina consiguió revertir el estrés oxidativo y la inhibición de la entrada de Ca^{2+} mitocondrial presente en un modelo celular de neuroblastoma [358]. Como se ha comentado anteriormente, en el artículo que publicamos junto al Dr. Juan Antonio Navarro, la sobreexpresión del MCU *in vivo*, recuperó el fenotipo degenerativo y la producción de ATP en un modelo de *D. melanogaster* deficiente en FXN [218]. Por tanto, el MCU se presenta como una novedosa y potencial diana terapéutica de la FRDA.

Específicamente, el KAM es el único potenciador del MCU relevante descrito hasta la fecha, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Fue identificado como el activador más potente del MCU comparado con otros flavonoides [359]. Además, el KAM modula la autofagia y protege a las células del estrés de RE [360], [361]. Como flavonoide, el KAM posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, promoviendo la expresión y liberación de NRF2, y permitiendo su entrada al núcleo [265], [362]. En este contexto, el KAM ha demostrado bloquear la producción de ROS en células del cerebelo [363], además de ejercer efecto sobre la peroxidación lipídica [364]–[366]. En el ámbito clínico, un estudio realizado en 921 ancianos sin demencia conocida determinó que el KAM y otros flavonoides reducen el riesgo de desarrollo de Alzheimer [367]. Además, un estudio computacional ha propuesto al KAM como candidato idóneo para el desarrollo de terapias contra la ELA de tipo familiar [368]. En definitiva, dados los resultados obtenidos en este estudio y las observaciones descritas en la literatura, nos encontramos ante otro compuesto con propiedades antioxidantes que podría ejercer efectos beneficiosos sobre la fisiopatología de la FRDA.

DISCUSIÓN

2. La expresión de las isoformas de FXN y su localización subcelular

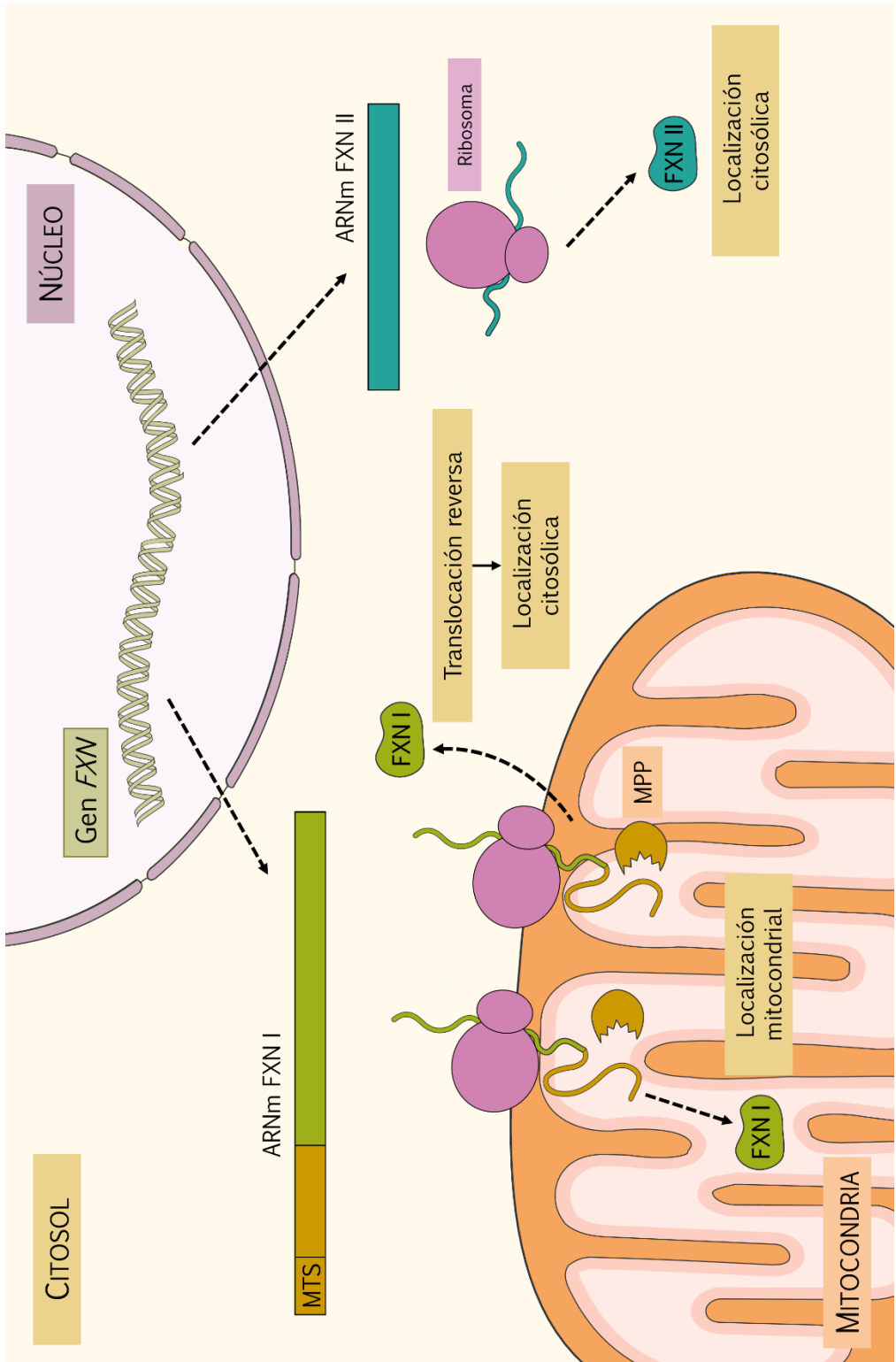
Tradicionalmente, el estudio de la FRDA se ha abordado desde un punto de vista fundamentalmente mitocondrial. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la evidencia que apunta a la implicación de otros compartimentos subcelulares en la fisiopatología de la enfermedad. En eucariotas, FXN es una proteína altamente conservada codificada por el núcleo. La isoforma canónica (FXN I) se sintetiza como una pre-proteína que requiere de su procesamiento proteolítico mitocondrial por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) para convertirse en la forma madura funcional FXN⁸¹⁻²¹⁰ [154]. Sin embargo, la isoforma FXN II (FXN⁷⁶⁻²¹⁰) carece de la secuencia MTS en su extremo N-terminal, por lo que no sufre este proceso, y su secuencia proteica funcional difiere en 5 aminoácidos de la isoforma canónica madura [162]. Nuestros resultados previos acerca de la localización y el potencial papel de FXN en las MAMs [218] nos llevaron a postular que FXN II era la isoforma presente en estas estructuras. Por ello, nos dispusimos a averiguar cuál de las isoformas se localizaba en este dominio, así como su función en este compartimento. En primer lugar, en el análisis de expresión de las isoformas de FXN en líneas celulares humanas y tejidos de ratón encontramos que las variantes de *splicing* citosólicas se expresan de forma drásticamente reducida en comparación con las isoformas canónicas (FXN I y Fxn I) (**Figuras 23 y 24**). Asimismo, como hemos podido comprobar en linfoblastos, esta expresión disminuye aún más en pacientes de FRDA, no llegando a detectarse en algunas líneas de pacientes (**Figura 23D**). En este sentido, un estudio reciente en pacientes de la enfermedad ha determinado que la deficiencia de FXN II (isoforma E) es más severa en pacientes comparada con la isoforma canónica y está directamente relacionada con la longitud de la expansión GAA y los niveles de metilación en la región FRDA-DMR [165].

Por otra parte, la falta de anticuerpos diferenciales para cada isoforma nos llevó a estudiar en profundidad la localización subcelular de cada una mediante la técnica Split-TurboID. Para nuestra sorpresa, la reconstitución de su actividad biotina-ligasa al coexpresar FXN I y el plásmido dirigido a RE nos indicó su localización fuera de la mitocondria (**Figura 26B**). Estos resultados se ven reforzados por estudios realizados hace más de una década, en la que aún no se habían descrito variantes de *splicing* en el extremo N-terminal de FXN. Acquaviva *et al.* observaron por primera vez la localización extramitocondrial de FXN funcional en células Caco-2. Diferentes procedimientos experimentales les llevaron a concluir que parte de esta proteína se localizaba en el citoplasma celular [159]. En consonancia, Condò y colaboradores identificaron la localización citosólica de FXN madura (FXN⁸¹⁻²¹⁰) al sobreexpresar la forma FXN¹⁻²¹⁰ en varios modelos celulares [153], [161]. Los autores coincidieron en la hipótesis de que FXN se dirigiría a la mitocondria, donde se procesaría por la MPP y después, parte de la proteína se reubicaría hacia el citosol. Sin embargo, el proceso por el cual, FXN I se transporta hacia el citosol tras su procesamiento proteolítico en la mitocondria, es desconocido. Lo que sí está claro es que el procesamiento mitocondrial de FXN canónica es fundamental para su funcionalidad. De hecho, se ha descrito que la mutación Ala377Thr en la α -MPP conduce a un tipo de ataxia cerebelosa no progresiva, caracterizada por la acumulación de las formas inmaduras FXN⁴²⁻²¹⁰ y FXN⁵⁶⁻²¹⁰ y disfunción mitocondrial [369]. Los pacientes manifiestan síntomas similares a la FRDA, incluyendo ataxia en la marcha, disartria, alteraciones en los reflejos de los tendones, hipotonía y problemas visoespaciales.

A lo largo de la evolución, numerosas proteínas han desarrollado más de una función en diferentes compartimentos subcelulares, por lo que es usual encontrar proteínas con una misma secuencia de aminoácidos y diferente localización subcelular. Existen varios mecanismos celulares que

DISCUSIÓN

permiten que una proteína mitocondrial se distribuya adicionalmente en otro compartimento subcelular. Es lo que se conoce como localización dual de proteínas mitocondriales (*dual targeting*) [370]. Dado que FXN I necesita entrar a la mitocondria para ser procesada por la MPP, el mecanismo más plausible que explicaría su localización mitocondria/citosol es el llamado translocación reversa (*reverse translocation*). Se trata de un mecanismo de localización dual basado en el transporte retrógrado de proteínas con MTS durante su traducción e importación a la mitocondria. En él, algunas de las moléculas ya traducidas y con procesamiento en su extremo N-terminal, sufren un proceso de translocación reversa hacia el citosol, por lo que no llegan a entrar en la mitocondria por completo [370]. Uno de los ejemplos mejor descritos es el de la Fumarasa, una de las enzimas fundamentales del ciclo de Krebs. En eucariotas presenta una localización dual mitocondria/citosol con extremo N-terminal idéntico. Dado que todas las moléculas de ARNm de esta proteína contienen MTS, su traducción y translocación a la mitocondria es simultánea, a la vez que su procesamiento por la MPP. Sin embargo, parte de estas moléculas ya procesadas regresan al citosol, mientras que el resto permanecen en la mitocondria [371]. La distribución en cada compartimento depende del lugar en el que comience el plegamiento de los péptidos nacientes que se están procesando [372]. De hecho, se ha descrito un papel extramitocondrial para la Fumarasa no relacionado con el metabolismo bioenergético [373]. Por tanto, la doble localización subcelular de FXN I que observamos en nuestros resultados podría ser consecuencia de un mecanismo de translocación reversa (**Figura 51**). Asimismo, es necesario destacar también que NFS1 (*Cysteine desulfurase*) y la aconitasa, dos proteínas estrechamente relacionadas con FXN [161], [374], [375], han mostrado un mecanismo de translocación reversa [376], [377]. Ambas se localizan en la mitocondria y sufren un proceso de redistribución de algunas de sus moléculas a compartimentos extramitocondriales.



DISCUSIÓN

Figura 51: Esquema del mecanismo de localización subcelular propuesto para FXN I y II. Tanto FXN I como FXN II son variantes de splicing codificadas nuclearmente por el gen FXN. En el proceso de localización dual (dual targeting) de FXN I, el ARNm se traduciría y translocaría a la mitocondria señalado por el MTS, al igual que otras proteínas mitocondriales. A la vez, estas se procesarían proteolíticamente por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP). En general, la proteína se quedaría en la mitocondria, pero algunas de sus moléculas sufrirían un proceso denominado translocación reversa, redistribuyéndose al citosol. Por otro lado, FXN II se traduciría en el citosol/RE y su localización sería exclusivamente citosólica. De este modo, existiría un pool citosólico de las isoformas FXN I y II, mientras que la isoforma presente en la mitocondria sería FXN I. Figura original creada a partir de recursos

Nuestros resultados confirman que FXN I es la isoforma presente tanto en la mitocondria como el citosol, siendo FXN II una variante citosólica. La localización de ambas isoformas en el citosol señala la existencia de un *pool* de FXN I y II, que podrían variar su proporción de expresión dependiendo del tejido. Esta idea se ve reforzada en los estudios de expresión, que han observado que FXN II (o isoforma E) es muy abundante en eritrocitos humanos y el sistema nervioso central, especialmente en el cerebelo, pero su expresión es escasa en músculo esquelético e indetectable en corazón [162], [164], [165], [378]. Por otro lado, la expresión de la variante citosólica murina no se había analizado hasta el momento. Nuestros resultados muestran que la expresión de Fxn II en tejidos de ratón es muy escasa en comparación con la variante canónica. La mayor expresión la encontramos en corazón, seguida de DRG y cerebelo. Sin embargo, se ha determinado recientemente que la localización predominante de Fxn en ratones es citosólica [167], lo cual refuerza la idea de un *pool* citosólico formado por Fxn I y II.

3. El interactoma diferencial de Frataxina I y II

Dada la relación tradicional de FXN con la mitocondria, los estudios de expresión diferencial de proteínas en pacientes de FRDA se han centrado exclusivamente en este compartimento, desviando el foco de atención de otras rutas que podrían ser relevantes en la fisiopatología de la enfermedad [379], [380]. Sin embargo, la localización extramitocondrial de las isoformas de FXN abre nuevas posibilidades de estudio funcional que podrían atribuirse al fenotipo de la FRDA. Los ensayos de función diferencial de las isoformas FXN I y II realizados hasta el momento han concluido que ambas isoformas intervienen en la regulación de los ISCs, la aconitasa, la respiración celular y la dinámica mitocondrial [162], [163]. De hecho, Agrò y Díaz-Nido apuntaron hacia la participación de ambas isoformas en un mecanismo de comunicación cruzada citosol-mitocondria, desempeñando funciones similares desde cada compartimento [163].

Nuestros resultados aportan una nueva perspectiva, ampliando las rutas de señalización relacionadas con ambas isoformas determinadas por su localización subcelular. Dado que el RE/citosol es un dominio abierto, hemos podido desvelar proteínas de interacción con las dos variantes pertenecientes al citosol, como es el caso de MYL6. También de la mitocondria, como las proteínas PHB, VDAC, de la membrana del RE, las proteínas BAP31, SCD, y del citoesqueleto, como ARPC3 (**Figuras 31 y 32**). Algunas de las rutas enriquecidas en nuestros proteomas se habían descrito en trabajos anteriores como afectadas en el contexto de la FRDA, como la apoptosis, el metabolismo de aminoácidos, la ruta de las AMPK, la modulación del citoesqueleto o el metabolismo de la glucosa [217], [312], [379]–[381]. Sin embargo, otras de ellas no se han caracterizado en profundidad, como el procesamiento de proteínas en el RE o el ciclo celular, o no se han mencionado con anterioridad, como es el caso de las implicadas en el proceso de traducción. Por otro lado, gran parte de las funciones mitocondriales destacadas en nuestro análisis del interactoma de FXN I

DISCUSIÓN

están ampliamente descritas en relación con la FRDA, como el metabolismo del piruvato y la bioenergética mitocondrial [88], [185], [194], [195], lo cual aporta solidez a nuestros resultados. Asimismo, resulta llamativo encontrar de nuevo un gran número de proteínas centradas en la traducción en el interactoma de FXN I, en este caso, mitocondrial (**Figuras 45**). Curiosamente, algunas subunidades ribosomales y otras proteínas relacionadas con la traducción mitocondrial se han encontrado disminuidas en estudios proteómicos realizados en pacientes [379], [380].

3.1. FXN I y II participan en rutas de señalización reguladas por las MAMs

Lo más señalado de este estudio es la confirmación de que FXN I y II están involucradas en las MAMs y su relación con los procesos celulares regulados en esta región. En concreto, las proteínas pertenecientes a los contactos RE-mitocondria juegan un papel fundamental en la apoptosis, la homeostasis del Ca^{2+} , la síntesis de ATP y el metabolismo lipídico. Curiosamente, todas estas funciones aparecen enriquecidas en los interactomas de FXN I y II, lo cual pone de manifiesto la importancia de este dominio en la FRDA, ya que también se han visto alteradas en modelos de la enfermedad [88], [194], [200], [218], [242], [382]. En este contexto, nos hemos centrado en analizar las proteínas identificadas que intervienen en la regulación del Ca^{2+} intracelular (**Figura 47**). En particular, nuestros resultados confirman la participación de ambas isoformas en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular regulada por las MAMs, ya que en su interactoma hemos identificado proteínas involucradas en el intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria, como PMPCA, PHB/PHB2, VDAC1,2 y 3 y SERCA2. Por un lado, tanto FXN I como FXN II interactúan con proteínas que regulan la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. VDAC1/2/3 son porinas dependientes de voltaje que constituyen uno de los mayores componentes de la MME, encargadas de regular la importación de metabolitos e iones a la mitocondria. Es uno de los principales componentes del puente proteico RE-mitocondria para

facilitar la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria [283]–[285]. PHB1/2 son dos chaperonas situadas en la MMI que forman un gran complejo heterodimérico que estabiliza las proteínas de la cadena respiratoria y mantiene la integridad de la MMI, esencial en la morfogénesis mitocondrial y la supervivencia neuronal. Su función relacionada con la regulación del Ca^{2+} mitocondrial no está clara, aunque se cree que participa en la biogénesis de EMRE (*essential MCU regulator*) una de las subunidades del MCU [286]–[288]. Asimismo, la subunidad α de la MPP o PMPCA, encargada de la maduración de precursores mitocondriales, estaría relacionada con la homeostasis del Ca^{2+} a través del procesamiento proteolítico de EMRE [288]. Por último, BCAP31/BAP31 también interacciona con FXN I y II desde la membrana del RE. Es una chaperona transmembrana esencial en la arquitectura de las MAMs y la regulación de la función mitocondrial, ya que se encarga del ensamblaje y transporte de NDUFS4, uno de los componentes del complejo I de la cadena de electrones [273]. A su vez, BCAP31 es esencial en la regulación de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, ya que promueve el intercambio de este catión desde el RE a la mitocondria para desencadenar la apoptosis [290]. Estos hallazgos, junto con los resultados del **apartado 1.1.** de resultados de este trabajo sobre la localización de FXN en este dominio y su interacción con GRP75 e IP_3R [218], apuntan hacia un claro papel de FXN en la regulación de la entrada de Ca^{2+} mitocondrial. Además, el hecho de que FXN II interaccione con STIM1, la proteína que media la entrada de Ca^{2+} a la célula desde el medio extracelular a través del SOCE, sugiere su implicación directa en este mecanismo, alterado en varios modelos deficientes en FXN [88], [89], [189].

La desregulación del Ca^{2+} podría ser un evento temprano en la FRDA [250], desencadenando de las alteraciones observadas en los procesos consecuentemente regulados por la movilización de este catión y segundo mensajero, como la muerte celular, la síntesis de ATP y la generación de

DISCUSIÓN

ROS [246]. De ahí surge la necesidad de restablecer la comunicación RE-mitocondria a través de terapias dirigidas a las MAMs, para así prevenir o paliar los procesos disruptivos de la enfermedad. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en el **apartado 1.4.** del presente trabajo en relación con la Omav (**Figura 18**), capaz de incrementar la captación de Ca^{2+} mitocondrial en nuestro modelo celular deficiente en FXN. La búsqueda de tratamientos complementarios o alternativos a este fármaco sería relevante en el tratamiento de la disfunción cardíaca que presentan algunos pacientes. En este contexto, es necesario destacar que la desregulación intracelular del Ca^{2+} es un evento frecuente en la cardiomiopatía. De hecho, el Ca^{2+} podría estar implicado en la patología cardíaca de la FRDA, ya que el tratamiento con Propanolol y el antagonista de Ca^{2+} Verapamil consiguieron reducir el grosor de la pared ventricular en pacientes [383]. Además, se ha demostrado recientemente que los cardiomiocitos derivados de iPSCs procedentes de pacientes de FRDA presentan deficiencias en la homeostasis del Ca^{2+} [252]. En nuestros datos aparecen enriquecidas numerosas proteínas involucradas en la cardiomiopatía diabética, una patología cardíaca derivada de la resistencia a la insulina y la hiperglucemia. Se caracteriza por una captación de Ca^{2+} mitocondrial alterada, ROS elevados, estrés de RE y disfunción mitocondrial [384]. Algunas de las estrategias terapéuticas que se están estudiando en la actualidad en esta enfermedad se centran en reducir los niveles anormales de Ca^{2+} citosólico, bien potenciando la recaptación de Ca^{2+} en el RE a través de SERCA o aumentando su entrada en la mitocondria vía MCU [385], [386]. Por tanto, dada la relación de FXN I y II en las rutas que participan en la cardiomiopatía diabética, junto con las similitudes moleculares que presenta con la FRDA, cabría esperar que los avances terapéuticos fueran aplicables a ambas enfermedades.

Por otro lado, el papel de la disfunción metabólica de lípidos en la fisiopatología de la FRDA no está claro. En general, diferentes modelos de

la enfermedad han descrito una desregulación en el metabolismo lipídico, con acumulación intracelular de lípidos [219], [235], [240], [242], [243], pero se desconoce el mecanismo subyacente. Con la finalidad de arrojar luz en este asunto, analizamos las proteínas involucradas en rutas significativas del metabolismo lipídico. Tanto FXN I como FXN II parecen estar implicadas en la síntesis de lípidos. En primer lugar, nuestros resultados indican que FXN I está implicada en la regulación de la biosíntesis del colesterol y los esteroides, así como la activación de la expresión génica inducida por el factor de transcripción SREBP. Estas tres rutas metabólicas se encuentran estrechamente relacionadas, ya que las dos primeras están reguladas por SREBP, que resultó estar incrementado en un modelo murino con déficit de FXN [135]. Un elemento común a estas vías es DHCR7, la enzima responsable de transformar el 7-dehidrocolesterol en colesterol en el RE liso, precursor de hormonas esteroideas y la vitamina D [387]. Dada la importancia de la regulación del colesterol en la función neurológica [388], la síntesis del colesterol, y en especial la enzima DHCR7, podrían ser objeto de estudio en el futuro en la FRDA. Por otro lado, el metabolismo de los ácidos grasos es un proceso estrechamente relacionado con el RE y la mitocondria. El silenciamiento de FXN en ratones y *D. melanogaster* provoca una acumulación intracelular anormal de gotas lipídicas, lo cual contribuye con un fenotipo patológico [219], [243], [389]. Por tanto, nuestros resultados, junto con un metabolismo incrementado en condiciones de déficit de FXN, sugieren que ésta podría ejercer un papel de regulación negativa en la síntesis de ácidos grasos.

La técnica Split-TurboID nos ha permitido confirmar rutas previamente descritas y distinguir otras nuevas que no se han explorado por el momento. En conjunto, nuestros resultados apoyan la idea de que la FRDA no es una enfermedad puramente mitocondrial. Estos hallazgos destacan la relevancia que pueden tener ambas isoformas en la

DISCUSIÓN

fisiopatología de la FRDA, por lo que deberían tenerse en cuenta en el diseño de terapias, especialmente las dirigidas a aumentar la expresión del gen *FXN*. En definitiva, en este trabajo se ha realizado el primer estudio sobre el proteoma de interacción de FXN I y II, que aporta información sobre las rutas de señalización celular que podrían estar implicadas en la fisiopatología de la FRDA. Una de las limitaciones de la técnica es el hecho de que TurboID tenga actividad biotina-ligasa basal sin necesidad de reconstituirse por completo, algo que también ha sido descrito por otros autores [390], [391]. Por tanto, es posible que algunas de las proteínas relacionadas con FXN se identifiquen como falsos negativos al encontrarse biotiniladas en la condición control (SplitC). Lo que sí podemos afirmar es que las proteínas descritas en este estudio presentan diferencias significativas con respecto a ese control, por lo que las vías de señalización identificadas estarían estrechamente ligadas a cada isoforma. Para solucionar este inconveniente, recientemente se han desarrollado proteínas de nueva generación, denominadas microID y UltraID [392]. Estas proteínas de biotinilación dependiente de proximidad son más pequeñas, eficientes y con menor actividad basal que TurboID, por lo que podrían utilizarse en el futuro para obtener interactomas más precisos.

4. Perspectivas de futuro

La FRDA es una enfermedad donde la disfunción mitocondrial está muy presente, aunque hemos visto que la comunicación con otros compartimentos como el RE/citosol y las MAMs están estrechamente relacionadas con FXN, por lo que es realista asumir que en su fisiopatología participan diferentes mecanismos moleculares. De ahí surge la necesidad de diseñar terapias que, si bien se dirigen a paliar los efectos provocados por la deficiencia de FXN, tengan un amplio efecto en las diferentes vías de señalización afectadas. Los desalentadores resultados obtenidos en los ensayos clínicos con pacientes de FRDA (salvo con la Omay) indican que

podrían entrar en juego otros elementos patológicos que no son objetivo de esas terapias.

En los últimos años, diferentes autores han observado una desregulación en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en modelos deficientes en FXN. Sin embargo, el mecanismo no se había explorado en profundidad. Los resultados del presente trabajo aportan evidencias sobre la implicación de las isoformas canónica y citosólica en el dominio MAMs, que se encuentra alterado tanto estructural como funcionalmente en condiciones de déficit de FXN. En concreto, el ambiente oxidativo generado por la deficiencia de FXN parece estar directamente implicado en esta desregulación, ya que el tratamiento con antioxidantes como el Trolox, la NAC y la Omav son capaces de rescatar la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en nuestro modelo celular. En consonancia, el tratamiento con fármacos dirigidos a restablecer la comunicación RE-mitocondria como la Flv y el KAM restablecen también la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en nuestro modelo, poniendo de manifiesto la importancia de las MAMs como diana terapéutica de la FRDA. Debido a la naturaleza multifactorial de la FRDA, el estudio en profundidad de las rutas de señalización afectadas es crucial para comprender su fisiopatología.

En este ámbito, es esencial esclarecer la contribución de cada isoforma en el desarrollo de la enfermedad, con el foco orientado a los tejidos en los que presentan una mayor expresión. De este modo, el diseño de terapias podrá realizarse de forma más específica. Particularmente, el conjunto de resultados obtenidos en este estudio destaca la importancia de la comunicación recíproca entre el RE y la mitocondria en la FRDA. Dado que las MAMs son las estructuras encargadas de dicha comunicación, su desorganización conlleva consecuencias dramáticas que afectan a las vías de señalización reguladas en este dominio. Un ejemplo de esta alteración se ve reflejado en las enfermedades neurológicas como la ELA, el Párkinson o el Huntington, ya que las proteínas implicadas en estas enfermedades forman parte de la red proteica de las MAMs. De este modo, las MAMs surgen como una diana de modulación terapéutica amplia, ya que muchas

DISCUSIÓN

de las rutas afectadas, como el estrés oxidativo, la bioenergética y el Ca^{2+} mitocondrial, son comunes en estas enfermedades neurodegenerativas [36]. Además, tanto los fármacos utilizados en este trabajo como otros dirigidos a restablecer la comunicación RE-mitocondria presentan también propiedades antioxidantes, lo cual los hace más versátiles a la hora de restablecer los defectos moleculares involucrados en la patogénesis de estas enfermedades, incluyendo la FRDA. Por otro lado, la lista de proteínas localizadas en las MAMs es creciente, lo cual destaca el concepto de su complejidad y dinamismo y, en definitiva, de los mecanismos involucrados en su regulación. Por esta razón es crucial determinar las propiedades de las MAMs en diferentes tipos celulares y bajo distintas condiciones. Esclarecer en profundidad estas rutas proporcionará información valiosa sobre la fisiopatología de las enfermedades con una comunicación RE-mitocondria alterada, lo cual abrirá nuevos campos de investigación para el diseño de terapias específicas.

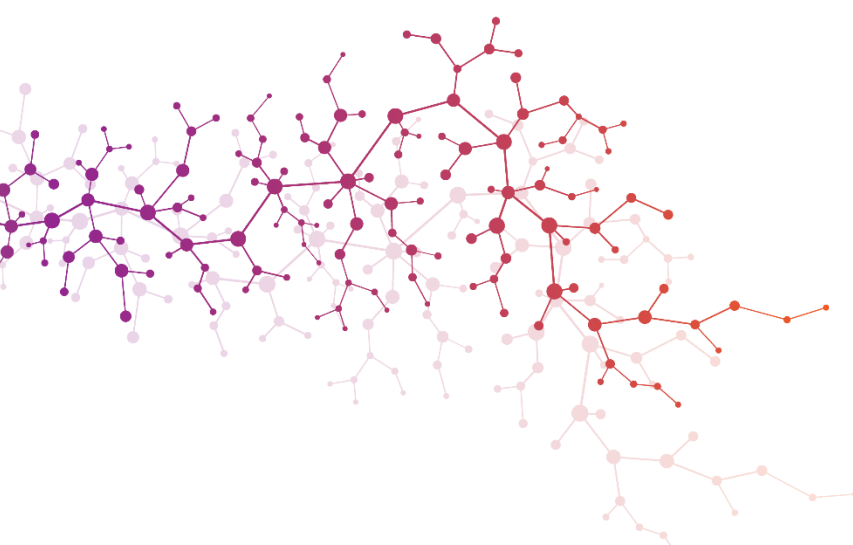
Nuestros datos demuestran que el restablecimiento de la comunicación de las MAMs es una estrategia adecuada para paliar los defectos provocados por la deficiencia de FXN. El uso de miARNs está ganando especial atención como aproximación terapéutica. Estas pequeñas moléculas regulan la expresión génica uniéndose a su ARNm objetivo y pueden detectarse en fluidos biológicos. La identificación de firmas de miARN podría aportar avances en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, incluso en fases tempranas. Un ejemplo de ello es el miR-20b, involucrado en el desarrollo de cardiomiopatía hipertrófica a través de la inhibición del intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria vía MFN2 [48]. Estas observaciones abren un campo de posibilidades terapéuticas centradas en la comunicación de las MAMs.

El reposicionamiento de los fármacos mencionados en este trabajo podría ser una buena estrategia para analizar sus efectos en modelos *in vivo* e *in vitro* de la enfermedad. Dado que la FRDA no tiene cura, es esencial encontrar estrategias terapéuticas que mejoren la calidad de vida

de los pacientes, complementarias a la fisioterapia, la terapia ocupacional y la cirugía, las únicas opciones en la actualidad.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo abren nuevos interrogantes que sería interesante estudiar en el futuro:

- Determinar en profundidad el papel de las variantes de FXN en las MAMs, para dilucidar si su implicación es puramente estructural en la interacción RE-mitocondria o si es también funcional.
- Estudiar el efecto del estrés oxidativo en los contactos RE-mitocondria bajo condiciones de déficit de FXN.
- Dilucidar si la alteración de las MAMs provocada por el déficit de FXN es un evento crítico en la progresión de la patología, para así centrar el foco en su papel como diana terapéutica de la FRDA.
- Evaluar en profundidad la Fluvoxamina y el Kaempferol como posibles fármacos de la FRDA en modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad, así como otros fármacos dirigidos a restablecer la comunicación RE-mitocondria.
- Esclarecer el mecanismo y las condiciones que determinan que FXN I madura presente una localización subcelular tanto dentro como fuera de la mitocondria.
- Estudiar la implicación de FXN en el proceso de traducción mitocondrial y su relación con la fisiopatología de la FRDA.
- Determinar el papel diferencial de cada isoforma de FXN en funciones como la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y el metabolismo lipídico.
- Analizar el interactoma de cada isoforma en neuronas o cardiomiocitos, para analizar en profundidad la implicación de FXN en las rutas dependientes de tejido relacionadas con la FRDA.



CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

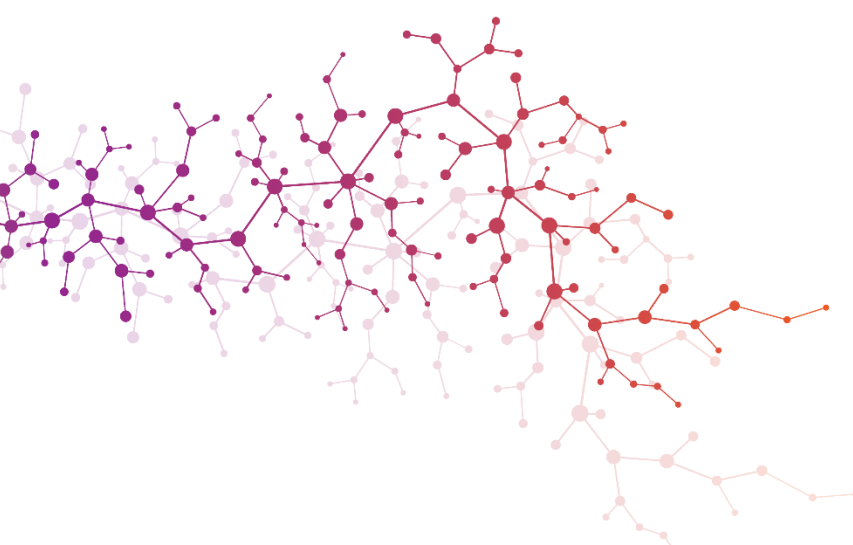
1. Frataxin is located in the domain of MAMs and interacts with IP₃R and GRP75, two of the main proteins involved in the regulation of Ca²⁺ exchange between the endoplasmic reticulum and the mitochondria.
2. Frataxin deficiency alters the organization of MAMs, both at the structural level, decreasing the appositions between the endoplasmic reticulum and the mitochondria, and at the functional level, in the Ca²⁺ exchange between the two compartments.
3. Treatment of frataxin-deficient cells with the antioxidants Trolox and NAC recovers the structure of MAMs and their function in Ca²⁺ transfer to the mitochondria, probably by decreasing oxidative stress in this microdomain.
4. Treatment with the compounds Omaveloxolone, Fluvoxamine and Kaempferol rescues Ca²⁺ influx to the mitochondria caused by frataxin deficiency, highlighting the importance of MAMs as a potential therapeutic target for Friedreich's Ataxia.
5. The expression of frataxin I is more abundant than the cytosolic variant (frataxin II) in different established cell lines, control-derived lymphoblasts and Friedreich's Ataxia patients. This proportion is also maintained in the heart, dorsal root ganglion and murine cerebellum of the C57BL/6J model.
6. Frataxin I exhibits a dual subcellular location, both mitochondrial and extramitochondrial, whereas the location of frataxin II is extramitochondrial. Likewise, both frataxin I and II are localized in the domain of MAMs, since their interactome includes proteins previously identified in the endoplasmic reticulum-mitochondria contacts.
7. The study of the interactome of both isoforms reveals that frataxin I and II have different functions. On the one hand, frataxin I interacts with numerous proteins involved in mitochondrial translation, a cellular process not previously related to this protein. Whereas frataxin I and II are involved in processes regulated in the domain of MAMs,

CONCLUSIONS

such as intracellular Ca^{2+} homeostasis and lipid metabolism, specifically lipid biosynthesis.

Final conclusion:

Our results demonstrate that frataxin has a direct role in intracellular Ca^{2+} homeostasis, regulating Ca^{2+} influx to the mitochondria. Both, frataxin I and II are involved in this process.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Frataxina se localiza en el dominio de las MAMs e interacciona con IP₃R y GRP75, dos de las principales proteínas implicadas en la regulación del intercambio de Ca²⁺ entre el retículo endoplasmático y la mitocondria.
2. La deficiencia de frataxina altera la organización de las MAMs, tanto a nivel estructural, disminuyendo los puntos de contacto entre el retículo endoplasmático y la mitocondria, como a nivel funcional, en el intercambio de Ca²⁺ entre ambos compartimentos.
3. El tratamiento con los antioxidantes Trolox y NAC en células deficientes en frataxina recupera la estructura de las MAMs y su función en la transferencia de Ca²⁺ a la mitocondria, probablemente a través de la disminución del estrés oxidativo en este microdominio.
4. El tratamiento con los fármacos Omaveloxolona, Fluvoxamina y Kaempferol rescata la transferencia de Ca²⁺ a la mitocondria provocada por la deficiencia de frataxina, poniendo de manifiesto la importancia de las MAMs como potencial diana terapéutica de la Ataxia de Friedreich.
5. La expresión de frataxina I es más abundante que la isoforma citosólica (frataxina II) en diferentes líneas celulares establecidas, linfoblastos derivados de controles y pacientes de Ataxia de Friedreich. Esta proporción se mantiene también en corazón, ganglio de la raíz dorsal y cerebelo murino del modelo C57BL/6J.
6. Frataxina I presenta una localización subcelular dual, tanto mitocondrial como extramitocondrial, mientras que la localización de frataxina II es extramitocondrial. Asimismo, tanto frataxina I

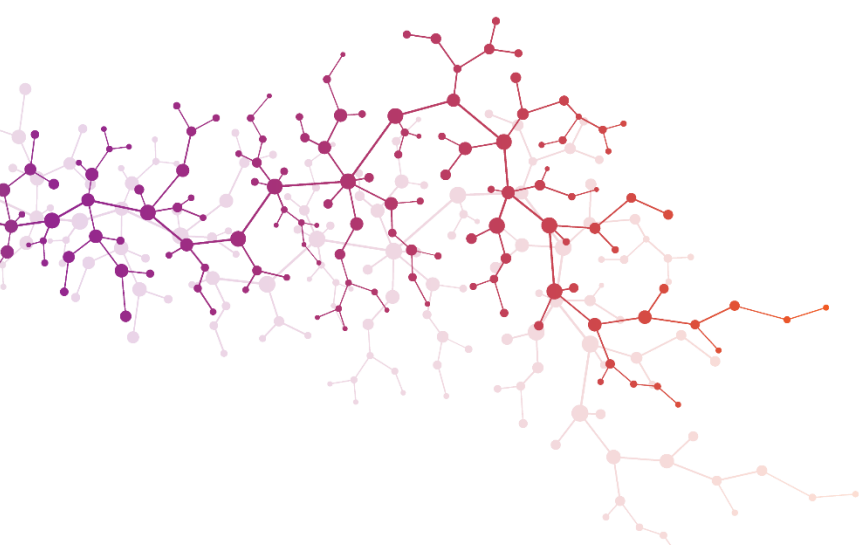
CONCLUSIONES

como frataxina II se localizan en el dominio MAMs, ya que en su interactoma se encuentran proteínas previamente identificadas en los contactos retículo endoplasmático-mitocondria.

7. El estudio del interactoma de frataxina I y II muestra que ambas isoformas presentan funciones diferentes. Por un lado, frataxina I interacciona con numerosas proteínas implicadas en la traducción mitocondrial, un proceso celular no relacionado previamente con esta proteína. Mientras que frataxina I y II están implicadas en procesos regulados en el dominio MAMs, como la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y el metabolismo lipídico, concretamente la biosíntesis de lípidos.

Conclusión final:

Nuestros resultados demuestran que frataxina tiene un papel directo en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, regulando la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. Ambas isoformas están implicadas en este proceso.



REFERENCIAS



REFERENCIAS

- [1] A. Skupin and K. Thurley, "Calcium signaling: From single channels to pathways," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 740, pp. 531–551, 2012, doi: 10.1007/978-94-007-2888-2_24.
- [2] M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, "The versatility and universality of calcium signalling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 1, no. 1. Nat Rev Mol Cell Biol, pp. 11–21, 2000, doi: 10.1038/35036035.
- [3] C. W. Taylor, "Controlling calcium entry," *Cell*, vol. 111, no. 6. Cell, pp. 767–769, Dec. 13, 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)01197-2.
- [4] M. S. Islam, "Calcium Signaling: From Basic to Bedside," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1131, Adv Exp Med Biol, 2020, pp. 1–6.
- [5] J. L. Farber, "The role of calcium ions in toxic cell injury," in *Environmental Health Perspectives*, 1990, vol. 84, pp. 107–111, doi: 10.1289/ehp.9084107.
- [6] R. Rizzuto, M. R. Duchen, and T. Pozzan, "Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison.," *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, vol. 2004, no. 215. Sci STKE, 2004, doi: 10.1126/stke.2152004re1.
- [7] M. J. Berridge, "Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1793, no. 6. Biochim Biophys Acta, pp. 933–940, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.005.
- [8] K. Mikoshiba, "Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases," *Advances in Biological Regulation*, vol. 57. Adv Biol Regul, pp. 217–227, Jan. 01, 2015, doi: 10.1016/j.jbior.2014.10.001.
- [9] M. J. Berridge, "The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease," *Physiol. Rev.*, vol. 96, no. 4, pp. 1261–1296, Oct. 2016, doi: 10.1152/physrev.00006.2016.
- [10] I. Bezprozvanny, "Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pathogenesis of Huntington's disease and spinocerebellar ataxias," *Neurochemical Research*, vol. 36, no. 7. Neurochem Res, pp. 1186–1197, Jul. 2011, doi: 10.1007/s11064-010-0393-y.
- [11] A. P. Landstrom, D. Dobrev, and X. H. T. Wehrens, "Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias," *Circulation Research*, vol. 120, no. 12. Circ Res, pp. 1969–1993, Jun. 09, 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310083.
- [12] T. Smani, I. Gallardo-Castillo, J. Ávila-Médina, M. F. Jimenez-Navarro, A. Ordoñez, and A. Hmadcha, "Impact of Diabetes on Cardiac and Vascular Disease: Role of Calcium Signaling," *Curr. Med. Chem.*, vol. 26, no. 22, pp. 4166–4177, May 2017, doi: 10.2174/0929867324666170523140925.
- [13] E. Izquierdo-Torres, A. Hernández-Oliveras, G. Fuentes-García, and Á. Zarain-Herzberg,

REFERENCIAS

- “Calcium signaling and epigenetics: A key point to understand carcinogenesis,” *Cell Calcium*, vol. 91. Cell Calcium, Nov. 01, 2020, doi: 10.1016/j.ceca.2020.102285.
- [14] I. Bezprozvanny, “Calcium signaling and neurodegenerative diseases,” *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 89–100, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.001.
- [15] X. Zhang, J. Connelly, E. S. Levitan, D. Sun, and J. Q. Wang, “Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Cerebrovascular Diseases,” *Translational Stroke Research*, vol. 12, no. 4. Transl Stroke Res, pp. 513–529, Aug. 01, 2021, doi: 10.1007/s12975-021-00901-9.
- [16] P. Thakore and S. Earley, “Transient receptor potential channels and endothelial cell calcium signaling,” *Compr. Physiol.*, vol. 9, no. 3, pp. 1249–1277, Jul. 2019, doi: 10.1002/cphy.c180034.
- [17] T. Hayashi, R. Rizzuto, G. Hajnoczky, and T. P. Su, “MAM: more than just a housekeeper,” *Trends in Cell Biology*, vol. 19, no. 2. Trends Cell Biol, pp. 81–88, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.tcb.2008.12.002.
- [18] M. Perrone *et al.*, “The role of mitochondria-associated membranes in cellular homeostasis and diseases,” *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 350, pp. 119–196, Jan. 2020, doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.11.002.
- [19] D. E. Copeland and A. J. Dalton, “An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost.,” *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 5, no. 3, pp. 393–396, 1959, doi: 10.1083/jcb.5.3.393.
- [20] M. S. Herrera-Cruz and T. Simmen, “Of yeast, mice and men: MAMs come in two flavors,” *Biology Direct*, vol. 12, no. 1. Biol Direct, Jan. 25, 2017, doi: 10.1186/s13062-017-0174-5.
- [21] R. Rizzuto *et al.*, “Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses,” *Science (80-.)*, vol. 280, no. 5370, pp. 1763–1766, Jun. 1998, doi: 10.1126/science.280.5370.1763.
- [22] A. Zhang *et al.*, “Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 10, Oct. 2011, doi: 10.1074/mcp.M111.009936.
- [23] C. N. Poston, S. C. Krishnan, and C. R. Bazemore-Walker, “In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM),” *J. Proteomics*, vol. 79, pp. 219–230, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.jprot.2012.12.018.
- [24] D. Cieri *et al.*, “SPLICS: A split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition,” *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 6, pp. 1131–1145, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41418-017-0033-z.
- [25] E. Tubbs and J. Rieusset, “Study of endoplasmic reticulum and mitochondria interactions by in situ proximity ligation assay in fixed cells,” *J. Vis. Exp.*, vol. 2016, no. 118, Dec.

- 2016, doi: 10.3791/54899.
- [26] M. R. Wieckowski, C. Giorgi, M. Lebiedzinska, J. Duszynski, and P. Pinton, "Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 11, pp. 1582–1590, 2009, doi: 10.1038/nprot.2009.151.
- [27] K. F. Cho *et al.*, "Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 22, pp. 12143–12154, Jun. 2020, doi: 10.1073/pnas.1919528117.
- [28] S. J. Stone and J. E. Vance, "Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 44, pp. 34534–34540, Nov. 2000, doi: 10.1074/JBC.M002865200.
- [29] D. R. Voelker, "Interorganelle transport of aminoglycerophospholipids," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1486, no. 1, pp. 97–107, Jun. 2000, doi: 10.1016/S1388-1981(00)00051-2.
- [30] E. Ingerman *et al.*, "Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria," *J. Cell Biol.*, vol. 170, no. 7, pp. 1021–1027, Sep. 2005, doi: 10.1083/JCB.200506078.
- [31] E. Smirnova, L. Griparic, D. L. Shurland, and A. M. Van der Bliek, "Dynamamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells," *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, no. 8, pp. 2245–2256, 2001, doi: 10.1091/MBC.12.8.2245.
- [32] H. Otera *et al.*, "Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells," *J. Cell Biol.*, vol. 191, no. 6, pp. 1141–1158, Dec. 2010, doi: 10.1083/JCB.201007152.
- [33] O. M. De Brito and L. Scorrano, "Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria," *Nature*, vol. 456, no. 7222, pp. 605–610, Dec. 2008, doi: 10.1038/nature07534.
- [34] A. D. Pilling, D. Horiuchi, C. M. Lively, and W. M. Saxton, "Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons," *Mol. Biol. Cell*, vol. 17, no. 4, pp. 2057–2068, Apr. 2006, doi: 10.1091/MBC.E05-06-0526.
- [35] E. E. Glater, L. J. Megeath, R. S. Stowers, and T. L. Schwarz, "Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent," *J. Cell Biol.*, vol. 173, no. 4, pp. 545–557, May 2006, doi: 10.1083/JCB.200601067.
- [36] G. Szabadkai *et al.*, "Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels," *J. Cell Biol.*, vol. 175, no. 6, pp. 901–911, Dec. 2006, doi: 10.1083/JCB.200608073.
- [37] A. A. Rowland and G. K. Voeltz, "Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 10, pp. 607–615, Oct. 2012, doi: 10.1038/NRM3440.

REFERENCIAS

- [38] G. A. Rutter, "Moving Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum to mitochondria: is spatial intimacy enough?," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 34, no. Pt 3, pp. 351–355, Jun. 2006, doi: 10.1042/BST0340351.
- [39] R. Rizzuto, M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan, "Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria," *Science*, vol. 262, no. 5134, pp. 744–747, 1993, doi: 10.1126/SCIENCE.8235595.
- [40] M. J. Berridge, "The endoplasmic reticulum: A multifunctional signaling organelle," *Cell Calcium*, vol. 32, no. 5–6, pp. 235–249, 2002, doi: 10.1016/S0143416002001823.
- [41] T. P. Su, T. Hayashi, T. Maurice, S. Buch, and A. E. Ruoho, "The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 31, no. 12, pp. 557–566, Dec. 2010, doi: 10.1016/J.TIPS.2010.08.007.
- [42] T. Hayashi and T. P. Su, "Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival," *Cell*, vol. 131, no. 3, pp. 596–610, Nov. 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.08.036.
- [43] S. Marchi, S. Patergnani, and P. Pinton, "The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1837, no. 4, pp. 461–469, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.BBABIO.2013.10.015.
- [44] D. De Stefani, A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabó, and R. Rizzuto, "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter," *Nature*, vol. 476, no. 7360, pp. 336–340, Jun. 2011, doi: 10.1038/nature10230.
- [45] H. Qi, L. Li, and J. Shuai, "Optimal microdomain crosstalk between endoplasmic reticulum and mitochondria for Ca²⁺ oscillations," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 7984, Jan. 2015, doi: 10.1038/srep07984.
- [46] G. Csordás *et al.*, "Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria," *J. Cell Biol.*, vol. 174, no. 7, pp. 915–21, Sep. 2006, doi: 10.1083/jcb.200604016.
- [47] I. Drago, P. Pizzo, and T. Pozzan, "After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves," *EMBO J.*, vol. 30, no. 20, pp. 4119–25, Sep. 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.337.
- [48] L. Boyman, M. Karbowski, and W. J. Lederer, "Regulation of Mitochondrial ATP Production: Ca²⁺ Signaling and Quality Control," *Trends Mol. Med.*, vol. 26, no. 1, pp. 21–39, 2020, doi: 10.1016/j.molmed.2019.10.007.
- [49] R. Moreno-Loshuertos and P. Fernandez-Silva, "Tissue specificity of energy metabolism in mitochondria," *Clin. Bioenerg.*, pp. 3–60, 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-819621-2.00001-2.

- [50] J. J. Harris, R. Jolivet, and D. Attwell, “Synaptic Energy Use and Supply,” *Neuron*, vol. 75, no. 5, pp. 762–777, Sep. 06, 2012, doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.019.
- [51] G. Szabadkai and M. R. Duchen, “Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling,” *Physiology (Bethesda)*, vol. 23, pp. 84–94, Apr. 2008, doi: 10.1152/physiol.00046.2007.
- [52] L. S. Jouaville, P. Pinton, C. Bastianutto, G. A. Rutter, and R. Rizzuto, “Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 24, pp. 13807–12, Nov. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.24.13807.
- [53] R. M. Denton, D. A. Richards, and J. G. Chin, “Calcium ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues.,” *Biochem. J.*, vol. 176, no. 3, pp. 899–906, Dec. 1978, doi: 10.1042/bj1760899.
- [54] J. G. McCormack and R. M. Denton, “The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex.,” *Biochem. J.*, vol. 180, no. 3, pp. 533–44, Jun. 1979, doi: 10.1042/bj1800533.
- [55] C. Cárdenas *et al.*, “Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP₃ Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria,” *Cell*, vol. 142, no. 2, pp. 270–83, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.007.
- [56] R. Bravo-Sagua, V. Parra, C. López-Crisosto, P. Díaz, A. F. G. Quest, and S. Lavandero, “Calcium Transport and Signaling in Mitochondria.,” *Compr. Physiol.*, vol. 7, no. 2, pp. 623–634, 2017, doi: 10.1002/cphy.c160013.
- [57] M. Frieden, D. James, C. Castelbou, A. Danckaert, J. C. Martinou, and N. Demaurex, “Ca(2+) homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 21, pp. 22704–22714, May 2004, doi: 10.1074/JBC.M312366200.
- [58] G. Csordás *et al.*, “Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface.,” *Mol. Cell*, vol. 39, no. 1, pp. 121–32, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.029.
- [59] V. Eisner, G. Lenaers, and G. Hajnóczky, “Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling.,” *J. Cell Biol.*, vol. 205, no. 2, pp. 179–95, Apr. 2014, doi: 10.1083/jcb.201312066.
- [60] A. L. Wozniak, X. Wang, E. S. Stieren, S. G. Scarbrough, C. J. Elferink, and D. Boehning, “Requirement of biphasic calcium release from the endoplasmic reticulum for Fas-mediated apoptosis.,” *J. Cell Biol.*, vol. 175, no. 5, pp. 709–14, Dec. 2006, doi: 10.1083/jcb.200608035.
- [61] S. Marchi *et al.*, “Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death.,” *Cell Calcium*, vol. 69, pp. 62–72, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ceca.2017.05.003.
- [62] H. K. Baumgartner *et al.*, “Calcium elevation in mitochondria is the main Ca²⁺

REFERENCIAS

- requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 31, pp. 20796–20803, Jul. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.025353.
- [63] M. T. Lin and M. F. Beal, “Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases,” *Nature*, vol. 443, no. 7113. Nature, pp. 787–795, Oct. 19, 2006, doi: 10.1038/nature05292.
- [64] A. Nickel, M. Kohlhaas, and C. Maack, “Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 73. J Mol Cell Cardiol, pp. 26–33, 2014, doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.011.
- [65] M. A. Aon, S. Cortassa, and B. O’Rourke, “Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1797, no. 6–7, pp. 865–877, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.016.
- [66] D. M. Booth, B. Enyedi, M. Geiszt, P. Várnai, and G. Hajnóczky, “Redox Nanodomains Are Induced by and Control Calcium Signaling at the ER-Mitochondrial Interface,” *Mol. Cell*, vol. 63, no. 2, pp. 240–248, 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.040.
- [67] R. K. Hopper *et al.*, “Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium,” *Biochemistry*, vol. 45, no. 8, pp. 2524–36, Feb. 2006, doi: 10.1021/bi052475e.
- [68] J. V Gerasimenko, O. V Gerasimenko, A. Palejwala, A. V Tepikin, O. H. Petersen, and A. J. M. Watson, “Menadione-induced apoptosis: roles of cytosolic Ca(2+) elevations and the mitochondrial permeability transition pore,” *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 3, pp. 485–97, Feb. 2002, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861756>.
- [69] F. Zoccarato, L. Cavallini, and A. Alexandre, “Respiration-dependent Removal of Exogenous H₂O₂ in Brain Mitochondria. Inhibition by Ca²⁺,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 6, pp. 4166–4174, Feb. 2004, doi: 10.1074/jbc.M308143200.
- [70] A. Stepanova and J. Magrané, *Mitochondrial dysfunction in neurons in Friedreich’s ataxia*, vol. 102. Mol Cell Neurosci, 2020, p. 103419.
- [71] E. Obrador, R. Salvador-Palmer, R. López-Blanch, A. Jihad-Jebbar, S. L. Vallés, and J. M. Estrela, “The link between oxidative stress, redox status, bioenergetics and mitochondria in the pathophysiology of als,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 12. Int J Mol Sci, Jun. 02, 2021, doi: 10.3390/ijms22126352.
- [72] N. Bernard-Marissal *et al.*, “Altered interplay between endoplasmic reticulum and mitochondria in Charcot-Marie-Tooth type 2A neuropathy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 6, pp. 2328–2337, Feb. 2019, doi: 10.1073/pnas.1810932116.
- [73] S. H. Park, P. P. Zhu, R. L. Parker, and C. Blackstone, “Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network,” *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 4, pp. 1097–1110, Apr. 2010, doi: 10.1172/JCI40979.

- [74] R. Villegas *et al.*, “Calcium release from intra-axonal endoplasmic reticulum leads to axon degeneration through mitochondrial dysfunction,” *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 21, pp. 7179–7189, 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4784-13.2014.
- [75] M. H. Ellisman and K. R. Porter, “Microtrabecular structure of the axoplasmic matrix: Visualization of cross-linking structures and their distribution,” *J. Cell Biol.*, vol. 87, no. 2, p. 464, Nov. 1980, doi: 10.1083/jcb.87.2.464.
- [76] S. L. Mironov and N. Symonchuk, “ER vesicles and mitochondria move and communicate at synapses,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 23, pp. 4926–4934, Dec. 2006, doi: 10.1242/jcs.03254.
- [77] G. Manfredi and H. Kawamata, “Mitochondria and endoplasmic reticulum crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis,” *Neurobiology of Disease*, vol. 90, Neurobiol Dis, pp. 35–42, Jun. 01, 2016, doi: 10.1016/j.nbd.2015.08.004.
- [78] M. Rodríguez-Arribas *et al.*, “Mitochondria-Associated Membranes (MAMs): Overview and Its Role in Parkinson’s Disease,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 54, no. 8, pp. 6287–6303, Oct. 2017, doi: 10.1007/s12035-016-0140-8.
- [79] F. Eysert, P. F. Kinoshita, A. Mary, L. Vaillant-Beuchot, F. Checler, and M. Chami, “Molecular dysfunctions of mitochondria-associated membranes (Mams) in alzheimer’s disease,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 24, pp. 1–29, Dec. 2020, doi: 10.3390/ijms21249521.
- [80] P. Veeresh *et al.*, “Endoplasmic reticulum–mitochondria crosstalk: from junction to function across neurological disorders,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1457, no. 1, pp. 41–60, Dec. 2019, doi: 10.1111/nyas.14212.
- [81] C. Guardia-Laguarta *et al.*, “ α -synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes,” *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 1, pp. 249–259, 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2507-13.2014.
- [82] T. Cali, D. Ottolini, A. Negro, and M. Brini, “ α -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 22, pp. 17914–29, May 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.302794.
- [83] M. Cherubini, L. Lopez-Molina, and S. Gines, “Mitochondrial fission in Huntington’s disease mouse striatum disrupts ER-mitochondria contacts leading to disturbances in Ca²⁺ efflux and Reactive Oxygen Species (ROS) homeostasis,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 136, p. 104741, 2020, doi: 10.1016/j.nbd.2020.104741.
- [84] D. Del Prete *et al.*, “Localization and Processing of the Amyloid- β Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes,” *J. Alzheimer’s Dis.*, vol. 55, no. 4, pp. 1549–1570, 2017, doi: 10.3233/JAD-160953.
- [85] S. Watanabe *et al.*, “ Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR 1 - and SOD 1 -linked ALS ,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 8, no. 12, pp. 1421–1437, Dec. 2016, doi: 10.15252/emmm.201606403.

REFERENCIAS

- [86] A. Matilla-Dueñas *et al.*, “Consensus Paper: Pathological Mechanisms Underlying Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxias,” *Cerebellum*, vol. 13, no. 2, p. 269, 2014, doi: 10.1007/S12311-013-0539-Y.
- [87] X. Chen *et al.*, “Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 48, pp. 12713–12724, Nov. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3909-08.2008.
- [88] A. Bolinches-Amorós, B. Mollá, D. Pla-Martín, F. Palau, and P. González-Cabo, “Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, no. MAY, p. 124, May 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00124.
- [89] R. Abeti, A. F. Brown, M. Maiolino, S. Patel, and P. Giunti, “Calcium Deregulation: Novel Insights to Understand Friedreich’s Ataxia Pathophysiology,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, no. October, pp. 1–13, Oct. 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00264.
- [90] P. Vankan, “Prevalence gradients of Friedreich’s ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge.,” *J. Neurochem.*, vol. 126 Suppl, pp. 11–20, Aug. 2013, doi: 10.1111/jnc.12215.
- [91] M. Labuda *et al.*, “Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion.,” *Neurology*, vol. 54, no. 12, pp. 2322–4, Jun. 2000, doi: 10.1212/wnl.54.12.2322.
- [92] V. Campuzano *et al.*, “Friedreich’s ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion,” *Science (80-.)*, vol. 271, no. 5254, pp. 1423–1427, Mar. 1996, doi: 10.1126/science.271.5254.1423.
- [93] C. A. Galea *et al.*, “Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in friedreich ataxia,” *Ann. Neurol.*, vol. 79, no. 3, pp. 485–495, Mar. 2016, doi: 10.1002/ana.24595.
- [94] V. Campuzano *et al.*, “Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 6, no. 11, pp. 1771–1780, 1997, doi: 10.1093/hmg/6.11.1771.
- [95] M. Cossée *et al.*, “Evolution of the Friedreich’s ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 14, pp. 7452–7457, Jul. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.14.7452.
- [96] A. Dürr *et al.*, “Clinical and Genetic Abnormalities in Patients with Friedreich’s Ataxia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 335, no. 16, pp. 1169–1175, Oct. 1996, doi: 10.1056/NEJM199610173351601.
- [97] A. Filla *et al.*, “The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 59, no. 3, pp. 554–560, Sep. 1996.

- [98] N. Friedreich, “Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge,” *Arch. für Pathol. Anat. und Physiol. und für Klin. Med.*, vol. 26, no. 3, pp. 391–419, 1863, doi: 10.1007/BF01930976.
- [99] L. Schöls, G. Amoiridis, H. Przuntek, G. Frank, J. T. Epplen, and C. Epplen, “Friedreich’s ataxia. Revision of the phenotype according to molecular genetics.,” *Brain*, vol. 120, no. 12, pp. 2131–2140, Dec. 1997, doi: 10.1093/brain/120.12.2131.
- [100] M. B. Delatycki *et al.*, “Clinical and genetic study of Friedreich ataxia in an Australian population.,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 87, no. 2, pp. 168–174, Nov. 1999, doi: 10.1002/(sici)1096-8628(19991119)87:2<168::aid-ajmg8>3.0.co;2-2.
- [101] C. Lecocq *et al.*, “Delayed-onset Friedreich’s ataxia revisited.,” *Mov. Disord.*, vol. 31, no. 1, pp. 62–69, Jan. 2016, doi: 10.1002/mds.26382.
- [102] P. Trouillas *et al.*, “International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology.,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 145, no. 2, pp. 205–211, Feb. 1997, doi: 10.1016/s0022-510x(96)00231-6.
- [103] S. J. Cano, J. C. Hobart, P. E. Hart, L. V. P. Korlipara, A. H. V. Schapira, and J. M. Cooper, “International cooperative ataxia rating scale (ICARS): Appropriate for studies of Friedreich’s ataxia?,” *Mov. Disord.*, vol. 20, no. 12, pp. 1585–1591, Dec. 2005, doi: 10.1002/mds.20651.
- [104] S. H. Subramony *et al.*, “Measuring Friedreich ataxia: Interrater reliability of a neurologic rating scale.,” *Neurology*, vol. 64, no. 7, pp. 1261–1262, Apr. 2005, doi: 10.1212/01.WNL.0000156802.15466.79.
- [105] T. Schmitz-Hubsch *et al.*, “Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale.,” *Neurology*, vol. 66, no. 11, pp. 1717–1720, Jun. 2006, doi: 10.1212/01.wnl.0000219042.60538.92.
- [106] M. Patel *et al.*, “Progression of Friedreich ataxia: quantitative characterization over 5 years,” *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, vol. 3, no. 9, pp. 684–694, Sep. 2016, doi: 10.1002/acn3.332.
- [107] C. Rummey *et al.*, “Psychometric properties of the Friedreich Ataxia Rating Scale,” *Neurol. Genet.*, vol. 5, no. 6, p. 371, Dec. 2019, doi: 10.1212/nxg.0000000000000371.
- [108] D. R. Lynch *et al.*, “Safety, pharmacodynamics, and potential benefit of omaveloxolone in Friedreich ataxia,” *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, vol. 6, no. 1, pp. 15–26, Jan. 2019, doi: 10.1002/acn3.660.
- [109] D. R. Lynch *et al.*, “Safety and Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia (MOXIe Study),” *Ann. Neurol.*, vol. 89, no. 2, pp. 212–225, Feb. 2021, doi: 10.1002/ANA.25934.
- [110] “EU/3/18/2037 | European Medicines Agency.”

REFERENCIAS

- <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu3182037>
(accessed Mar. 16, 2022).
- [111] “Reata Pharmaceuticals Inc. - Reata Pharmaceuticals, Inc. Announces Fourth Quarter and Full Year 2021 Financial Results and Provides an Update on Clinical Development Programs.” <https://reatapharma.com/investors/news/news-details/2022/Reata-Pharmaceuticals-Inc.-Announces-Fourth-Quarter-and-Full-Year-2021-Financial-Results-and-Provides-an-Update-on-Clinical-Development-Programs/default.aspx> (accessed Mar. 15, 2022).
- [112] M. B. Delatycki and L. A. Corben, “Clinical features of Friedreich ataxia,” in *Journal of Child Neurology*, 2012, vol. 27, no. 9, pp. 1133–1137, doi: 10.1177/0883073812448230.
- [113] A. H. Koeppen and J. E. Mazurkiewicz, “Friedreich Ataxia: Neuropathology Revised,” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 72, no. 2, pp. 78–90, Feb. 2013, doi: 10.1097/NEN.0b013e31827e5762.
- [114] R. S. Ackroyd, J. A. Finnegan, and S. H. Green, “Friedreich’s ataxia. A clinical review with neurophysiological and echocardiographic findings,” *Arch. Dis. Child.*, vol. 59, no. 3, pp. 217–221, Mar. 1984, doi: 10.1136/adc.59.3.217.
- [115] J. A. Morral, A. N. Davis, J. Qian, B. B. Gelman, and A. H. Koeppen, “Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich’s ataxia,” *Acta Neuropathol.*, vol. 120, no. 1, pp. 97–108, Jul. 2010, doi: 10.1007/s00401-010-0675-0.
- [116] A. Cook and P. Giunti, “Friedreich’s ataxia: clinical features, pathogenesis and management.,” *Br. Med. Bull.*, vol. 124, no. 1, pp. 19–30, Dec. 2017, doi: 10.1093/bmb/ldx034.
- [117] A. H. Koeppen, R. L. Ramirez, A. B. Becker, and J. E. Mazurkiewicz, “Dorsal root ganglia in Friedreich ataxia: satellite cell proliferation and inflammation,” *Acta Neuropathol. Commun.*, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1186/s40478-016-0288-5.
- [118] A. H. Koeppen, A. N. Davis, and J. A. Morral, “The cerebellar component of Friedreich’s ataxia.,” *Acta Neuropathol.*, vol. 122, no. 3, pp. 323–330, Sep. 2011, doi: 10.1007/s00401-011-0844-9.
- [119] M. C. França J. *et al.*, “A combined voxel-based morphometry and 1 H-MRS study in patients with Friedreich ’ s ataxia,” *J. Neurol.*, vol. 256, pp. 1114–1120, 2009, doi: 10.1007/s00415-009-5079-5.
- [120] R. Della Nave *et al.*, “Brain structural damage in Friedreich’s ataxia,” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 79, no. 1, pp. 82 LP – 85, Jan. 2008, doi: 10.1136/jnnp.2007.124297.
- [121] J. Folker, B. Murdoch, L. Cahill, M. Delatycki, L. Corben, and A. Vogel, “Dysarthria in Friedreich’s ataxia: a perceptual analysis.,” *Folia Phoniatr. Logop.*, vol. 62, no. 3, pp. 97–103, 2010, doi: 10.1159/000287207.

- [122] M. C. Mantovan *et al.*, “Exploring mental status in Friedreich ’ s ataxia: a combined neuropsychological , behavioral and neuroimaging study,” *Eur. J. Neurol.*, vol. 13, pp. 827–835, 2006, doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01363.x.
- [123] G. Rance *et al.*, “Speech perception ability in individuals with Friedreich ataxia,” *Brain*, vol. 131, no. 8, pp. 2002–2012, May 2008, doi: 10.1093/brain/awn104.
- [124] F. Fortuna *et al.*, “Visual system involvement in patients with Friedreich ’ s ataxia,” *Brain*, vol. 132, pp. 116–123, 2009, doi: 10.1093/brain/awn269.
- [125] P. Rojas *et al.*, “Neuro-Ophthalmological Findings in Friedreich’s Ataxia,” *J. Pers. Med.*, vol. 11, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/JPM11080708.
- [126] M. J. Keage, M. B. Delatycki, I. Gupta, L. A. Corben, and A. P. Vogel, “Dysphagia in Friedreich Ataxia,” *Dysphagia*, vol. 32, no. 5, pp. 626–635, 2017, doi: 10.1007/s00455-017-9804-4.
- [127] F. Weidemann *et al.*, “The heart in Friedreich ataxia: Definition of cardiomyopathy, disease severity, and correlation with neurological symptoms,” *Circulation*, vol. 125, no. 13, pp. 1626–1634, Apr. 2012, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.059477.
- [128] A. Y. Tsou *et al.*, “Mortality in Friedreich ataxia.,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 307, no. 1–2, pp. 46–49, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.jns.2011.05.023.
- [129] A. H. Koeppen *et al.*, “The Pathogenesis of Cardiomyopathy in Friedreich Ataxia,” *PLoS One*, pp. 1–16, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0116396.
- [130] B. Rajagopalan *et al.*, “Analysis of the factors influencing the cardiac phenotype in Friedreich’s ataxia.,” *Mov. Disord.*, vol. 25, no. 7, pp. 846–852, May 2010, doi: 10.1002/mds.22864.
- [131] K. A. Schadt, L. S. Friedman, S. R. Regner, G. E. Mark, D. R. Lynch, and K. Y. Lin, “Cross-Sectional Analysis of Electrocardiograms in a Large Heterogeneous Cohort of Friedreich Ataxia Subjects,” *J. Child Neurol.*, vol. 27, no. 9, pp. 1187–1192, Jun. 2012, doi: 10.1177/0883073812448461.
- [132] T. Bourke and D. Keane, “Friedreich’s Ataxia: a review from a cardiology perspective.,” *Ir. J. Med. Sci.*, vol. 180, no. 4, pp. 799–805, Dec. 2011, doi: 10.1007/s11845-011-0744-y.
- [133] G. Finocchiaro, G. Baio, P. Micossi, G. Pozza, and S. Di Donato, “Glucose metabolism alterations in Friedreich’s ataxia,” *Neurology*, vol. 38, no. 8, pp. 1292–1296, Aug. 1988, doi: 10.1212/wnl.38.8.1292.
- [134] M. Cnop, H. Mulder, and M. Igoillo-Esteve, “Diabetes in Friedreich ataxia,” *J. Neurochem.*, vol. 126, no. SUPPL.1, pp. 94–102, 2013, doi: 10.1111/jnc.12216.
- [135] G. Coppola *et al.*, “Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPARgamma pathway as a therapeutic target in Friedreich’s

REFERENCIAS

- ataxia.,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 18, no. 13, pp. 2452–61, Jul. 2009, doi: 10.1093/hmg/ddp183.
- [136] S. V Raman *et al.*, “Impaired myocardial perfusion reserve and fibrosis in Friedreich ataxia: a mitochondrial cardiomyopathy with metabolic syndrome,” *Eur. Heart J.*, vol. 32, no. 5, pp. 561–567, Dec. 2010, doi: 10.1093/eurheartj/ehq443.
- [137] A. J. Worth *et al.*, “Stable isotopes and LC-MS for monitoring metabolic disturbances in Friedreich’s ataxia platelets.,” *Bioanalysis*, vol. 7, no. 15, pp. 1843–55, 2015, doi: 10.4155/bio.15.118.
- [138] M. B. Delatycki *et al.*, “Surgery for Equinovarus Deformity in Friedreich’s Ataxia Improves Mobility and Independence,” *A Publ. Assoc. Bone Jt. Surg. / CORR®*, vol. 430, 2005.
- [139] R. Santos, S. Lefevre, D. Sliwa, A. Seguin, J.-M. Camadro, and E. Lesuisse, “Friedreich Ataxia: Molecular Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Opportunities,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 13, no. 5, pp. 651–690, Sep. 2010, doi: 10.1089/ars.2009.3015.
- [140] J. Gerhardt *et al.*, “Stalled DNA Replication Forks at the Endogenous GAA Repeats Drive Repeat Expansion in Friedreich’s Ataxia Cells,” *Cell Rep.*, vol. 16, no. 5, pp. 1218–1227, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.CELREP.2016.06.075.
- [141] N. Sakamoto *et al.*, “Sticky DNA: self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich’s ataxia,” *Mol. Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 465–475, 1999, doi: 10.1016/S1097-2765(00)80474-8.
- [142] D. Kumari, R. E. Biacsi, and K. Usdin, “Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in friedreich ataxia cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4209–4215, Feb. 2011, doi: 10.1074/JBC.M110.194035.
- [143] S. Al-Mahdawi *et al.*, “The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 17, no. 5, pp. 735–746, Mar. 2008, doi: 10.1093/HMG/DDM346.
- [144] D. Herman, K. Jenssen, R. Burnett, E. Soragni, S. L. Perlman, and J. M. Gottesfeld, “Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich’s ataxia,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 10, pp. 551–558, 2006, doi: 10.1038/nchembio815.
- [145] M. Rai *et al.*, “HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model,” *PLoS One*, vol. 3, no. 4, Apr. 2008, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0001958.
- [146] G. S. Erwin *et al.*, “Synthetic transcription elongation factors license transcription across repressive chromatin,” *Science*, vol. 358, no. 6370, pp. 1617–1622, Dec. 2017, doi: 10.1126/SCIENCE.AAN6414.
- [147] G. Vilema-Enríquez *et al.*, “Inhibition of the SUV4-20 H1 histone methyltransferase increases frataxin expression in Friedreich’s ataxia patient cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 295, no. 52, pp. 17973–17985, Dec. 2020, doi: 10.1074/JBC.RA120.015533.

- [148] P. G. Mazzara *et al.*, “Frataxin gene editing rescues Friedreich’s ataxia pathology in dorsal root ganglia organoid-derived sensory neurons,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41467-020-17954-3.
- [149] E. Greene, L. Mahishi, A. Entezam, D. Kumari, and K. Usdin, “Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 10, pp. 3383–3390, May 2007, doi: 10.1093/NAR/GKM271.
- [150] L. N. Rodden *et al.*, “Methylated and unmethylated epialleles support variegated epigenetic silencing in Friedreich ataxia,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 29, no. 23, p. 3818, Feb. 2020, doi: 10.1093/HMG/DDAA267.
- [151] I. Castaldo *et al.*, “DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients,” *J. Med. Genet.*, vol. 45, no. 12, pp. 808–812, Dec. 2008, doi: 10.1136/JMG.2008.058594.
- [152] M. V. Evans-Galea *et al.*, “FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia,” *Ann. Neurol.*, vol. 71, no. 4, pp. 487–497, Apr. 2012, doi: 10.1002/ANA.22671.
- [153] I. Condò, N. Ventura, F. Malisan, A. Rufini, B. Tomassini, and R. Testi, “In vivo maturation of human frataxin,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, no. 13, pp. 1534–1540, Jul. 2007, doi: 10.1093/hmg/ddm102.
- [154] S. Schmucker, M. Argentini, N. Carelle-Calmels, A. Martelli, and H. Puccio, “The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 17, no. 22, pp. 3521–3531, Nov. 2008, doi: 10.1093/hmg/ddn244.
- [155] S. Jiralerspong, Y. Liu, L. Montermini, S. Stifani, and M. Pandolfo, “Frataxin shows developmentally regulated tissue-specific expression in the mouse embryo,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 4, no. 2, pp. 103–113, 1997, doi: 10.1006/NBDI.1997.0139.
- [156] G. Musco *et al.*, “Towards a structural understanding of Friedreich’s ataxia: the solution structure of frataxin,” *Structure*, vol. 8, no. 7, pp. 695–707, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0969-2126(00)00158-1.
- [157] D. P. Sirano, R. Shigeta, Y. I. Chi, M. Ristow, and S. E. Shoelson, “Crystal structure of human frataxin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 40, pp. 30753–30756, Oct. 2000, doi: 10.1074/JBC.C000407200.
- [158] L. Pianese, A. Tammaro, M. Turano, I. De Biase, A. Monticelli, and S. Coccozza, “Identification of a novel transcript of X25, the human gene involved in Friedreich ataxia,” *Neurosci. Lett.*, vol. 320, no. 3, pp. 137–140, Mar. 2002, doi: 10.1016/S0304-3940(02)00048-4.
- [159] F. Acquaviva *et al.*, “Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2,” *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. 17, pp. 3917–3924, Sep. 2005, doi: 10.1242/jcs.02516.

REFERENCIAS

- [160] A. Martelli, M. Wattenhofer-donzé, S. Schmucker, S. Bouvet, L. Reutenauer, and H. Puccio, “Frataxin is essential for extramitochondrial Fe - S cluster proteins in mammalian tissues,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, no. 22, pp. 2651–2658, Nov. 2007, doi: 10.1093/hmg/ddm163.
- [161] I. Condò, F. Malisan, I. Guccini, D. Serio, A. Rufini, and R. Testi, “Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 7, pp. 1221–1229, Apr. 2010, doi: 10.1093/hmg/ddp592.
- [162] H. Xia *et al.*, “Novel frataxin isoforms may contribute to the pathological mechanism of Friedreich ataxia.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e47847, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0047847.
- [163] M. Agrò and J. Díaz-Nido, “Effect of Mitochondrial and Cytosolic FXN Isoform Expression on Mitochondrial Dynamics and Metabolism,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 21, pp. 1–22, Nov. 2020, doi: 10.3390/IJMS21218251.
- [164] L. Guo *et al.*, “Characterization of a new N-terminally acetylated extra-mitochondrial isoform of frataxin in human erythrocytes,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41598-018-35346-Y.
- [165] L. N. Rodden *et al.*, “DNA methylation in Friedreich ataxia silences expression of frataxin isoform E,” *Sci. Reports 2022 121*, vol. 12, no. 1, pp. 1–14, Mar. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-09002-5.
- [166] S. Pérez-Luz, A. Gimenez-Cassina, I. Fernández-Frías, R. Wade-Martins, and J. Díaz-Nido, “Delivery of the 135kb human frataxin genomic DNA locus gives rise to different frataxin isoforms,” *Genomics*, vol. 106, no. 2, pp. 76–82, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.ygeno.2015.05.006.
- [167] L. Weng *et al.*, “Extra-mitochondrial mouse frataxin and its implications for mouse models of Friedreich’s ataxia.,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 15788, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72884-w.
- [168] A. Rotig *et al.*, “Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia.,” *Nat. Genet.*, vol. 17, no. 2, pp. 215–217, Oct. 1997, doi: 10.1038/ng1097-215.
- [169] G. Sanchez-Casis, M. Cote, and A. Barbeau, “Pathology of the heart in Friedreich’s ataxia: review of the literature and report of one case.,” *Can. J. Neurol. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 349–354, Nov. 1976, doi: 10.1017/s0317167100025580.
- [170] C.-L. Tsai and D. P. Barondeau, “Human Frataxin Is an Allosteric Switch That Activates the Fe–S Cluster Biosynthetic Complex,” *Biochemistry*, vol. 49, no. 43, pp. 9132–9139, Nov. 2010, doi: 10.1021/bi1013062.
- [171] S. Schmucker *et al.*, “Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e16199, Jan. 2011, doi:

- 10.1371/journal.pone.0016199.
- [172] S. Gervason *et al.*, “Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 3566, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11470-9.
- [173] C. Lu and G. Cortopassi, “Frataxin knockdown causes loss of cytoplasmic iron-sulfur cluster functions, redox alterations and induction of heme transcripts,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 457, no. 1, pp. 111–122, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.abb.2006.09.010.
- [174] A. Moreno-Cermeño, È. Obis, G. Bellí, E. Cabisco, J. Ros, and J. Tamarit, “Frataxin Depletion in Yeast Triggers Up-regulation of Iron Transport Systems before Affecting Iron-Sulfur Enzyme Activities,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 53, pp. 41653–41664, Dec. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.149443.
- [175] J. A. Navarro, J. A. Botella, C. Metzendorf, M. I. Lind, and S. Schneuwly, “Mitoferrin modulates iron toxicity in a Drosophila model of Friedreich’s ataxia,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 85, pp. 71–82, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.014.
- [176] T. Ast *et al.*, “Hypoxia Rescues Frataxin Loss by Restoring Iron Sulfur Cluster Biogenesis,” *Cell*, vol. 177, no. 6, pp. 1507–1521.e16, May 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.03.045.
- [177] J. V. Llorens, S. Soriano, P. Calap-Quintana, P. Gonzalez-Cabo, and M. D. Moltó, “The Role of Iron in Friedreich’s Ataxia: Insights From Studies in Human Tissues and Cellular and Animal Models,” *Front. Neurosci.*, vol. 13, p. 75, Feb. 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.00075.
- [178] O. Gakh, J. Adamec, A. M. Gacy, R. D. Twesten, W. G. Owen, and G. Isaya, “Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein,” *Biochemistry*, vol. 41, no. 21, pp. 6798–6804, May 2002, doi: 10.1021/bi025566+.
- [179] T. Yoon, E. Dizin, and J. A. Cowan, “N-terminal iron-mediated self-cleavage of human frataxin: Regulation of iron binding and complex formation with target proteins,” *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 12, no. 4, pp. 535–542, Apr. 2007, doi: 10.1007/s00775-007-0205-2.
- [180] T. Yoon and J. A. Cowan, “Frataxin-mediated Iron Delivery to Ferrochelatase in the Final Step of Heme Biosynthesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 25, pp. 25943–25946, Jun. 2004, doi: 10.1074/jbc.C400107200.
- [181] R. A. Schoenfeld *et al.*, “Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 24, pp. 3787–3799, Dec. 2005, doi: 10.1093/hmg/ddi393.
- [182] M. Grazia Cotticelli *et al.*, “Ferroptosis as a novel therapeutic target for Friedreich’s ataxia,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 369, no. 1, pp. 47–54, Apr. 2019, doi: 10.1124/jpet.118.252759.
- [183] J. Du *et al.*, “Identification of Frataxin as a regulator of ferroptosis,” *Redox Biol.*, vol. 32,

REFERENCIAS

- no. February, 2020, doi: 10.1016/j.redox.2020.101483.
- [184] M. Ristow *et al.*, “Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 22, pp. 12239–12243, Oct. 2000, doi: 10.1073/pnas.220403797.
- [185] P. González-Cabo *et al.*, “Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 15, pp. 2091–2098, Aug. 2005, doi: 10.1093/hmg/ddi214.
- [186] A. P. Runko, A. J. Griswold, and K. T. Min, “Overexpression of frataxin in the mitochondria increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*,” *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 5, pp. 715–719, Mar. 2008, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2008.01.046.
- [187] A. B. Uceda, J. Donoso, J. Frau, B. Vilanova, and M. Adrover, “Frataxins Emerge as New Players of the Intracellular Antioxidant Machinery,” *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 315*, vol. 10, no. 2, p. 315, Feb. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10020315.
- [188] D. Doni *et al.*, “A combined spectroscopic and in silico approach to evaluate the interaction of human frataxin with mitochondrial superoxide dismutase,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 12, p. 1763, Dec. 2021, doi: 10.3390/BIOMEDICINES9121763/S1.
- [189] B. Mollá *et al.*, “Reversible axonal dystrophy by calcium modulation in frataxin-deficient sensory neurons of YG8R mice,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 10, Aug. 2017, doi: 10.3389/fnmol.2017.00264.
- [190] S. Mincheva-Tasheva, E. Obis, J. Tamarit, and J. Ros, “Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 23, no. 7, pp. 1829–1841, Apr. 2014, doi: 10.1093/hmg/ddt576.
- [191] M. T. Islam, “Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders,” *Neurol. Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 73–82, Jan. 2017, doi: 10.1080/01616412.2016.1251711.
- [192] P. Gonzalez Cabo and F. Palau, “Mitochondrial pathophysiology in Friedreich’s ataxia,” *J. Neurochem.*, vol. 126, pp. 53–64, 2013, doi: 10.1111/jnc.12303.
- [193] A.-L. Bulteau, H. A. O’Neill, M. C. Kennedy, M. Ikeda-Saito, G. Isaya, and L. I. Szweda, “Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity.,” *Science (80-.)*, vol. 305, no. 5681, pp. 242–245, Jul. 2004, doi: 10.1126/science.1098991.
- [194] R. Abeti *et al.*, “Mitochondrial energy imbalance and lipid peroxidation cause cell death in friedreich’s ataxia,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 5, p. e2237, May 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.111.
- [195] H. Lin *et al.*, “Early cerebellar deficits in mitochondrial biogenesis and respiratory chain complexes in the KIKO mouse model of Friedreich ataxia,” *Dis. Model. Mech.*, vol. 10, no.

- 11, pp. 1343–1352, Nov. 2017, doi: 10.1242/DMM.030502.
- [196] R. Sutak, X. Xu, M. Whitnall, M. A. Kashem, D. Vyoral, and D. R. Richardson, “Proteomic analysis of hearts from frataxin knockout mice: Marked rearrangement of energy metabolism, a response to cellular stress and altered expression of proteins involved in cell structure, motility and metabolism,” *Proteomics*, vol. 8, no. 8, pp. 1731–1741, Apr. 2008, doi: 10.1002/pmic.200701049.
- [197] J. B. Lamarche, M. Côté, and B. Lemieux, “The Cardiomyopathy of Friedreich’s Ataxia Morphological Observations in 3 Cases,” *Can. J. Neurol. Sci. / J. Can. des Sci. Neurol.*, vol. 7, no. 4, pp. 389–396, Nov. 1980, doi: 10.1017/S0317167100022927.
- [198] R. Meneghini, “Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 23, no. 5, pp. 783–92, 1997, doi: 10.1016/s0891-5849(97)00016-6.
- [199] R. Lodi *et al.*, “Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 20, pp. 11492–11495, Sep. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.20.11492.
- [200] R. Abeti, E. Uzun, I. Renganathan, T. Honda, M. A. Pook, and P. Giunti, “Targeting lipid peroxidation and mitochondrial imbalance in Friedreich’s ataxia,” *Pharmacol. Res.*, vol. 99, no. 3, pp. 344–350, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.phrs.2015.05.015.
- [201] S. Lefevre, D. Sliwa, P. Rustin, J.-M. Camadro, and R. Santos, “Oxidative stress induces mitochondrial fragmentation in frataxin-deficient cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 418, no. 2, pp. 336–341, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.022.
- [202] E. Hatem *et al.*, “Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 67, pp. 103–114, 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.807.
- [203] M. Emond, G. Lepage, M. Vanasse, and M. Pandolfo, “Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia.,” *Neurology*, vol. 55, no. 11, pp. 1752–3, Dec. 2000, doi: 10.1212/wnl.55.11.1752.
- [204] J. B. Schulz *et al.*, “Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia,” *Neurology*, vol. 55, no. 11, pp. 1719–1721, Dec. 2000, doi: 10.1212/WNL.55.11.1719.
- [205] G. Tozzi, “Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich’s ataxia,” *Arch. Dis. Child.*, vol. 86, no. 5, pp. 376–379, May 2002, doi: 10.1136/adc.86.5.376.
- [206] S. J. Dixon *et al.*, “Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death.,” *Cell*, vol. 149, no. 5, pp. 1060–72, May 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [207] G. O. Latunde-Dada, “Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1861, no. 8, pp. 1893–1900, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.BBAGEN.2017.05.019.

REFERENCIAS

- [208] M. J. Jasoliya, M. Z. McMackin, C. K. Henderson, S. L. Perlman, and G. A. Cortopassi, "Frataxin deficiency impairs mitochondrial biogenesis in cells, mice and humans.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 26, no. 14, pp. 2627–2633, Jul. 2017, doi: 10.1093/hmg/ddx141.
- [209] V. Paupe *et al.*, "Impaired nuclear Nrf2 translocation undermines the oxidative stress response in Friedreich ataxia," *PLoS One*, vol. 4, no. 1, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004253.
- [210] S. K. Niture, R. Khatri, and A. K. Jaiswal, "Regulation of Nrf2-an update.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 66, pp. 36–44, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008.
- [211] R. Li, Z. Jia, and H. Zhu, "Regulation of Nrf2 Signaling.," *React. Oxyg. species (Apex, N.C.)*, vol. 8, no. 24, pp. 312–322, Nov. 2019, doi: 31692987.
- [212] A. Anzovino, S. Chiang, B. E. Brown, C. L. Hawkins, D. R. Richardson, and M. L. H. Huang, "Molecular Alterations in a Mouse Cardiac Model of Friedreich Ataxia: An Impaired Nrf2 Response Mediated via Upregulation of Keap1 and Activation of the Gsk3 β Axis," *Am. J. Pathol.*, vol. 187, no. 12, pp. 2858–2875, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.021.
- [213] V. D’Oria *et al.*, "Frataxin deficiency leads to reduced expression and impaired translocation of NF-E2-related factor (Nrf2) in cultured motor neurons.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 7853–65, Apr. 2013, doi: 10.3390/ijms14047853.
- [214] Y. Shan *et al.*, "Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich’s Ataxia YG8R mouse model," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 19, no. 13, pp. 1481–1493, Nov. 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4537.
- [215] K. M. Holmström *et al.*, "Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration.," *Biol. Open*, vol. 2, no. 8, pp. 761–70, Aug. 2013, doi: 10.1242/bio.20134853.
- [216] R. Abeti, A. Baccaro, N. Esteras, and P. Giunti, "Novel Nrf2-inducer prevents mitochondrial defects and oxidative stress in friedreich’s ataxia models," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, p. 188, 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00188.
- [217] D. C. Muñoz-Lasso *et al.*, "Cofilin dysregulation alters actin turnover in frataxin-deficient neurons.," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 5207, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62050-7.
- [218] L. R. Rodríguez *et al.*, "Oxidative stress modulates rearrangement of endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and calcium dysregulation in a Friedreich’s ataxia model.," *Redox Biol.*, vol. 37, p. 101762, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.redox.2020.101762.
- [219] J. A. Navarro *et al.*, "Altered lipid metabolism in a Drosophila model of Friedreich’s ataxia," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 14, pp. 2828–2840, Jul. 2010, doi: 10.1093/hmg/ddq183.

- [220] L. R. Rodríguez, T. Lapeña, P. Calap-quintana, M. D. Moltó, P. Gonzalez-cabo, and J. A. N. Langa, “Antioxidant therapies and oxidative stress in friedreich’s ataxia: The right path or just a diversion?,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 8, pp. 1–23, Jul. 2020, doi: 10.3390/antiox9080664.
- [221] M. L.-H. Huang *et al.*, “Molecular and Functional Alterations in a Mouse Cardiac Model of Friedreich Ataxia,” *Am. J. Pathol.*, vol. 183, no. 3, pp. 745–757, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.032.
- [222] M. Whitnall *et al.*, “The MCK mouse heart model of Friedreich’s ataxia: Alterations in iron-regulated proteins and cardiac hypertrophy are limited by iron chelation.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 28, pp. 9757–62, Jul. 2008, doi: 10.1073/pnas.0804261105.
- [223] M. Whitnall *et al.*, “Identification of nonferritin mitochondrial iron deposits in a mouse model of Friedreich ataxia.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 50, pp. 20590–5, Dec. 2012, doi: 10.1073/pnas.1215349109.
- [224] M. L.-H. Huang, E. M. Becker, M. Whitnall, Y. Suryo Rahmanto, P. Ponka, and D. R. Richardson, “Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich’s ataxia by analysis of a mouse mutant.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 38, pp. 16381–6, Sep. 2009, doi: 10.1073/pnas.0906784106.
- [225] H. Puccio *et al.*, “Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits,” vol. 27, no. 2, pp. 181–186, Feb. 2001, doi: 10.1038/84818.
- [226] M. L. H. Huang, D. J. R. Lane, and D. R. Richardson, “Mitochondrial Mayhem: The Mitochondrion as a Modulator of Iron Metabolism and Its Role in Disease,” <https://home.liebertpub.com/ars>, vol. 15, no. 12, pp. 3003–3019, Oct. 2011, doi: 10.1089/ARS.2011.3921.
- [227] D. Simon, “Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia,” *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 8, pp. 1987–1995, Feb. 2004, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4549-03.2004.
- [228] A. H. Koeppen *et al.*, “The dorsal root ganglion in Friedreich’s ataxia,” *Acta Neuropathol.*, vol. 118, no. 6, pp. 763–776, Dec. 2009, doi: 10.1007/S00401-009-0589-X/FIGURES/10.
- [229] Y. Ikeda *et al.*, “New insights into the role of mitochondrial dynamics and autophagy during oxidative stress and aging in the heart,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/210934.
- [230] S. Frank, “Dysregulation of mitochondrial fusion and fission: An emerging concept in neurodegeneration,” *Acta Neuropathol.*, vol. 111, no. 2, pp. 93–100, Feb. 2006, doi: 10.1007/S00401-005-0002-3/FIGURES/6.
- [231] R. J. Youle and A. M. Van Der Bliek, “Mitochondrial fission, fusion, and stress,” *Science (80-.)*, vol. 337, no. 6098, pp. 1062–1065, Aug. 2012, doi:

REFERENCIAS

- 10.1126/SCIENCE.1219855/ASSET/C3B6BC71-F565-4092-BCAA-4AFD65982687/ASSETS/GRAPHIC/337_1062_F3.JPEG.
- [232] M. N. Serasinghe and J. E. Chipuk, “Mitochondrial fission in human diseases,” *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 240, pp. 159–188, 2017, doi: 10.1007/164_2016_38/FIGURES/3.
- [233] S. Chiang, D. S. Kalinowski, P. J. Jansson, D. R. Richardson, and M. L.-H. Huang, “Mitochondrial dysfunction in the neuro-degenerative and cardio-degenerative disease, Friedreich’s ataxia,” *Neurochemistry International*, vol. 117, pp. 35–48, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.neuint.2017.08.002.
- [234] Y. N. Dong, E. McMillan, E. M. Clark, H. Lin, and D. R. Lynch, “GRP75 overexpression rescues frataxin deficiency and mitochondrial phenotypes in Friedreich ataxia cellular models,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 28, no. 10, pp. 1594–1607, May 2019, doi: 10.1093/hmg/ddy448.
- [235] O. Edenharter, S. Schneuwly, and J. A. Navarro, “Mitofusin-Dependent ER Stress Triggers Glial Dysfunction and Nervous System Degeneration in a Drosophila Model of Friedreich’s Ataxia,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, Mar. 2018, doi: 10.3389/fnmol.2018.00038.
- [236] B. Chidipi *et al.*, “The dynamin-related protein 1 is decreased and the mitochondrial network is altered in Friedreich’s ataxia cardiomyopathy,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 143, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.biocel.2021.106137.
- [237] M. L.-H. Huang *et al.*, “Molecular and functional alterations in a mouse cardiac model of Friedreich ataxia: activation of the integrated stress response, eIF2 α phosphorylation, and the induction of downstream targets,” *Am. J. Pathol.*, vol. 183, no. 3, pp. 745–57, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.032.
- [238] P. Puigserver and B. M. Spiegelman, “Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator,” *Endocr. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 78–90, Feb. 2003, doi: 10.1210/er.2002-0012.
- [239] D. Marmolino *et al.*, “PGC-1 α down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich’s ataxia,” *PLoS One*, vol. 5, no. 4, p. e10025, Apr. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010025.
- [240] È. Obis, V. Irazusta, D. Sanchís, J. Ros, and J. Tamarit, “Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets mitochondria and lipid metabolism,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 73, pp. 21–33, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.016.
- [241] J. L. García-Giménez *et al.*, “Differential Expression of PGC-1 α and Metabolic Sensors Suggest Age-Dependent Induction of Mitochondrial Biogenesis in Friedreich Ataxia Fibroblasts,” *PLoS One*, vol. 6, no. 6, p. e20666, 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0020666.
- [242] R. Turchi *et al.*, “Frataxin deficiency induces lipid accumulation and affects thermogenesis in brown adipose tissue,” *Cell Death Dis.*, vol. 11, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1038/S41419-

- 020-2253-2.
- [243] A. Martelli *et al.*, “Clinical data and characterization of the liver conditional mouse model exclude neoplasia as a non-neurological manifestation associated with Friedreich’s ataxia,” *DMM Dis. Model. Mech.*, vol. 5, no. 6, pp. 860–869, Nov. 2012, doi: 10.1242/dmm.009829.
- [244] J. Tamarit, È. Obis, and J. Ros, “Oxidative stress and altered lipid metabolism in Friedreich ataxia,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 100, pp. 138–146, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.007.
- [245] V. Swarup, A. K. Srivastava, M. V. Padma, and M. R. Rajeswari, “Quantitative profiling and identification of differentially expressed plasma proteins in Friedreich’s ataxia,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 91, no. 11, pp. 1483–1491, Nov. 2013, doi: 10.1002/JNR.23262.
- [246] L. R. Rodríguez *et al.*, “Therapeutic Strategies Targeting Mitochondrial Calcium Signaling: A New Hope for Neurological Diseases?,” *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 1, p. 165, Jan. 2022, doi: 10.3390/ANTIOX11010165.
- [247] G. Gilbert *et al.*, “Calcium Signaling in Cardiomyocyte Function,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 12, no. 3, 2020, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A035428.
- [248] B. Lu and M. Fivaz, “Neuronal SOCE: Myth or Reality?,” *Trends Cell Biol.*, vol. 26, no. 12, pp. 890–893, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.TCB.2016.09.008.
- [249] P. C. Kruger, K. X. Yang, P. J. Parsons, A. B. Becker, P. J. Feustel, and A. H. Koeppen, “Abundance and Significance of Iron, Zinc, Copper, and Calcium in the Hearts of Patients With Friedreich Ataxia,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 118, no. 1, pp. 127–131, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.AMJCARD.2016.04.024.
- [250] A. Wong *et al.*, “The Friedreich’s ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 8, no. 3, pp. 425–430, Mar. 1999, doi: 10.1093/hmg/8.3.425.
- [251] Y. K. Lee *et al.*, “Modeling of Friedreich ataxia-related iron overloading cardiomyopathy using patient-specific-induced pluripotent stem cells,” *Pflugers Arch.*, vol. 466, no. 9, pp. 1831–1844, 2014, doi: 10.1007/S00424-013-1414-X.
- [252] D. E. Crombie *et al.*, “Friedreich’s ataxia induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes display electrophysiological abnormalities and calcium handling deficiency,” *Aging (Albany. NY)*, vol. 9, no. 5, pp. 1440–1452, 2017, doi: 10.18632/aging.101247.
- [253] I. Annunziata, A. Patterson, and A. D’Azzo, “Isolation of mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and glycosphingolipid-enriched microdomains (GEMs) from brain tissues and neuronal cells,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1264, pp. 25–33, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2257-4_3.
- [254] N. T. H. Nga, T. T. B. Ngoc, N. T. M. Trinh, T. L. Thuoc, and D. T. P. Thao,

REFERENCIAS

- “Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells,” *Anal. Biochem.*, vol. 610, no. April, p. 113937, 2020, doi: 10.1016/j.ab.2020.113937.
- [255] S. Rath *et al.*, “MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D1541–D1547, Jan. 2021, doi: 10.1093/NAR/GKAA1011.
- [256] M. Fernandes and H. Husi, “ORA, FCS, and PT Strategies in Functional Enrichment Analysis,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 2361, pp. 163–178, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-1641-3_10.
- [257] G. Yu, L. G. Wang, Y. Han, and Q. Y. He, “ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters,” *Omi. A J. Integr. Biol.*, vol. 16, no. 5, pp. 284–287, May 2012, doi: 10.1089/OMI.2011.0118/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE1.JPEG.
- [258] G. Yu and Q. Y. He, “ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization,” *Mol. Biosyst.*, vol. 12, no. 2, pp. 477–479, Jan. 2016, doi: 10.1039/C5MB00663E.
- [259] J. X. Binder *et al.*, “COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence,” *Database*, vol. 2014, Jan. 2014, doi: 10.1093/DATABASE/BAU012.
- [260] S. Patergnani *et al.*, “Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs),” *Cell Commun. Signal.*, vol. 9, no. 1, p. 19, Sep. 2011, doi: 10.1186/1478-811X-9-19.
- [261] E. E. Çelik, J. M. A. Rubio, and V. Gökmen, “Behaviour of Trolox with macromolecule-bound antioxidants in aqueous medium: Inhibition of auto-regeneration mechanism,” *Food Chem.*, vol. 243, pp. 428–434, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.009.
- [262] G. Aldini *et al.*, “N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why,” *Free Radic. Res.*, vol. 52, no. 7, pp. 751–762, Jul. 2018, doi: 10.1080/10715762.2018.1468564.
- [263] S. A. Reisman, S. S. Gahir, C. Y. I. Lee, J. W. Proksch, M. Sakamoto, and K. W. Ward, “Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel Nrf2 activator omaveloxolone in primates,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 13, pp. 1259–1270, 2019, doi: 10.2147/DDDT.S193889.
- [264] T. Omi *et al.*, “Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor,” *Cell Death Dis.*, vol. 5, no. 7, p. e1332, Jul. 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.301.
- [265] R. M. Hussein, W. R. Mohamed, and H. A. Omar, “A neuroprotective role of kaempferol against chlorpyrifos-induced oxidative stress and memory deficits in rats via GSK3 β -Nrf2 signaling pathway,” *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 152, pp. 29–37, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.pestbp.2018.08.008.

- [266] H. Feng, J. Cao, G. Zhang, and Y. Wang, “Kaempferol Attenuates Cardiac Hypertrophy via Regulation of ASK1/MAPK Signaling Pathway and Oxidative Stress,” *Planta Med.*, vol. 83, no. 10, pp. 837–845, Jul. 2017, doi: 10.1055/s-0043-103415.
- [267] Z. Guo, Z. Liao, L. Huang, D. Liu, D. Yin, and M. He, “Kaempferol protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury via mitochondrial pathway mediated by SIRT1,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 761, pp. 245–253, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.056.
- [268] M. K. Schweitzer *et al.*, “Suppression of Arrhythmia by Enhancing Mitochondrial Ca²⁺ Uptake in Catecholaminergic Ventricular Tachycardia Models,” *JACC Basic to Transl. Sci.*, vol. 2, no. 6, pp. 737–747, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.jacbts.2017.06.008.
- [269] B. G. Sanganahalli, P. Herman, F. Hyder, and S. S. Kannurpatti, “Mitochondrial calcium uptake capacity modulates neocortical excitability.,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 33, no. 7, pp. 1115–26, Jul. 2013, doi: 10.1038/jcbfm.2013.61.
- [270] D. Thierry-Mieg and J. Thierry-Mieg, “AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation.,” *Genome Biol.*, vol. 7 Suppl 1, no. 1, pp. 1–14, Aug. 2006, doi: 10.1186/GB-2006-7-S1-S12/TABLES/2.
- [271] “NCBI AceView: Mus musculus complex locus Fxn, encoding frataxin.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=mouse&q=Fxn>.
- [272] K. F. Cho, T. C. Branon, N. D. Udeshi, S. A. Myers, S. A. Carr, and A. Y. Ting, “Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID,” *Nat. Protoc.*, vol. 15, no. 12, pp. 3971–3999, 2020, doi: 10.1038/s41596-020-0399-0.
- [273] T. Namba, “BAP31 regulates mitochondrial function via interaction with Tom40 within ER-mitochondria contact sites,” *Sci. Adv.*, vol. 5, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1126/SCIADV.AAW1386.
- [274] “Cardiomyopathy, Familial Hypertrophic, 1 disease: Malacards - Research Articles, Drugs, Genes, Clinical Trials.” https://www.malacards.org/card/cardiomyopathy_familial_hypertrophic_1 (accessed May 03, 2022).
- [275] M. Darshi *et al.*, “ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 4, pp. 2918–2932, Jan. 2011, doi: 10.1074/JBC.M110.171975.
- [276] S. Lee and K. T. Min, “The Interface Between ER and Mitochondria: Molecular Compositions and Functions,” *Mol. Cells*, vol. 41, no. 12, pp. 1000–1007, 2018, doi: 10.14348/MOLCELLS.2018.0438.
- [277] I. T. Cho, G. Adelmant, Y. Lim, J. A. Marto, G. Cho, and J. A. Golden, “Ascorbate peroxidase proximity labeling coupled with biochemical fractionation identifies promoters of endoplasmic reticulum–mitochondrial contacts,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 39, pp. 16382–16392, Sep. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.795286.

REFERENCIAS

- [278] V. Hung *et al.*, “Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation,” *Elife*, vol. 6, Apr. 2017, doi: 10.7554/ELIFE.24463.
- [279] X. Wang, Y. Wen, J. Dong, C. Cao, and S. Yuan, “Systematic In-Depth Proteomic Analysis of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Mouse and Human Testes,” *Proteomics*, vol. 18, no. 14, Jul. 2018, doi: 10.1002/PMIC.201700478.
- [280] P. Gomez-Suaga, S. Paillusson, R. Stoica, W. Noble, D. P. Hanger, and C. C. J. Miller, “The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy,” *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 3, pp. 371–385, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.CUB.2016.12.038.
- [281] S. Casellas-Díaz *et al.*, “Mfn2 localization in the ER is necessary for its bioenergetic function and neuritic development,” *EMBO Rep.*, vol. 22, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.15252/EMBR.202051954.
- [282] J. Roos *et al.*, “STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function,” *J. Cell Biol.*, vol. 169, no. 3, pp. 435–445, May 2005, doi: 10.1083/JCB.200502019.
- [283] “VDAC1 Gene - GeneCards | VDAC1 Protein .” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VDAC1&keywords=VDAC#pathways_interactions (accessed Jun. 17, 2022).
- [284] “VDAC2 Gene - GeneCards | VDAC2 Protein .” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VDAC2&keywords=VDAC> (accessed Jun. 17, 2022).
- [285] “VDAC3 Gene - GeneCards | VDAC3 Protein .” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VDAC3&keywords=VDAC#pathways_interactions (accessed Jun. 17, 2022).
- [286] “PHB1 Gene - GeneCards | PHB1 Protein.” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHB1&keywords=phb> (accessed Jun. 17, 2022).
- [287] “PHB2 Gene - GeneCards | PHB2 Protein.” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHB2&keywords=phb> (accessed Jun. 17, 2022).
- [288] T. König *et al.*, “The m-AAA Protease Associated with Neurodegeneration Limits MCU Activity in Mitochondria,” *Mol. Cell*, vol. 64, no. 1, pp. 148–162, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2016.08.020.
- [289] “PMPCA Gene - GeneCards | MPPA Protein .” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PMPCA&keywords=PMPCA#localization> (accessed Jun. 17, 2022).
- [290] D. G. Breckenridge, M. Stojanovic, R. C. Marcellus, and G. C. Shore, “Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol,” *J. Cell Biol.*, vol. 160, no. 7, pp.

- 1115–1127, Apr. 2003, doi: 10.1083/JCB.200212059.
- [291] “BCAP31 Gene - GeneCards | BAP31 Protein .” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCAP31&keywords=bap31#pathways_interactions (accessed Jun. 17, 2022).
- [292] “STIM1 Gene - GeneCards | STIM1 Protein .” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STIM1&keywords=STIM1> (accessed Jun. 17, 2022).
- [293] “ATP2A2 Gene - GeneCards | AT2A2 Protein .” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATP2A2&keywords=ATP2A2> (accessed Jun. 17, 2022).
- [294] J. O. Primeau, G. P. Armanious, M. L. E. Fisher, and H. S. Young, “The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase,” *Subcell. Biochem.*, vol. 87, pp. 229–258, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_8.
- [295] “DHCR7 Gene - GeneCards | DHCR7 Protein .” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DHCR7&keywords=DHCR7#localization> (accessed Jun. 21, 2022).
- [296] “LBR Gene - GeneCards | LBR Protein .” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LBR&keywords=LBR#pathways_interactions (accessed Jun. 21, 2022).
- [297] “SLC25A1 Gene - GeneCards | TXTP Protein.” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC25A1&keywords=SLC25A1#pathways_interactions (accessed Jun. 21, 2022).
- [298] “SCD Gene - GeneCards | SCD Protein.” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SCD&keywords=SCD#pathways_interactions (accessed Jun. 21, 2022).
- [299] “HACD3 Gene - GeneCards | HACD3 Protein .” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HACD3&keywords=HACD3#pathways_interactions (accessed Jun. 21, 2022).
- [300] “HADH Gene - GeneCards | HCDH Protein .” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HADH&keywords=HADH#localization> (accessed Jun. 21, 2022).
- [301] “FASN Gene - GeneCards | FAS Protein .” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FASN&keywords=FASN#pathways_interactions (accessed Jun. 21, 2022).
- [302] “CBR1 Gene - GeneCards | CBR1 Protein .” https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CBR1&keywords=CBR1#pathways_interactions (accessed Jun. 21, 2022).
- [303] S. Paillusson *et al.*, “There’s Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases.,” *Trends Neurosci.*, vol. 39, no. 3, pp. 146–157, Mar. 2016,

REFERENCIAS

- doi: 10.1016/j.tins.2016.01.008.
- [304] S. Bagchi, R. Fredriksson, and Å. Wallén-Mackenzie, “In Situ Proximity Ligation Assay (PLA),” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1318, pp. 149–159, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_15.
- [305] J. Zhou *et al.*, “Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 1, pp. 705–712, Jan. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.041319.
- [306] M. K. Jaiswal and B. U. Keller, “Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca²⁺ homeostasis in SOD1G93A mice.,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 75, no. 3, pp. 478–89, Mar. 2009, doi: 10.1124/mol.108.050831.
- [307] A. Y. C. Wong *et al.*, “Aberrant subcellular dynamics of sigma-1 receptor mutants underlying neuromuscular diseases,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 90, no. 3, pp. 238–253, Sep. 2016, doi: 10.1124/mol.116.104018.
- [308] A. Civera-Tregón *et al.*, “Mitochondria and calcium defects correlate with axonal dysfunction in GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth mouse model,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 152, May 2021, doi: 10.1016/j.nbd.2021.105300.
- [309] D. Pla-Martín *et al.*, “Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry.,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 55, pp. 140–51, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.nbd.2013.03.010.
- [310] T. V Aranca *et al.*, “Emerging therapies in Friedreich’s ataxia,” *Neurodegener. Dis. Manag.*, vol. 6, no. 1, pp. 49–65, 2016, doi: 10.2217/nmt.15.73.
- [311] J. M. Cooper, L. V. P. Korlipara, P. E. Hart, J. L. Bradley, and A. H. V. Schapira, “Coenzyme Q10 and vitamin e deficiency in Friedreich’s ataxia: Predictor of efficacy of vitamin e and coenzyme Q10 therapy,” *Eur. J. Neurol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1371–1379, Dec. 2008, doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02318.x.
- [312] B. Mollá *et al.*, “Phosphodiesterase Inhibitors Revert Axonal Dystrophy in Friedreich’s Ataxia Mouse Model,” *Neurotherapeutics*, vol. 16, no. 2, pp. 432–449, Apr. 2019, doi: 10.1007/s13311-018-00706-z.
- [313] S. Al-Mahdawi *et al.*, “GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology,” *Genomics*, vol. 88, no. 5, pp. 580–590, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.ygeno.2006.06.015.
- [314] A. V. Birk *et al.*, “The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1250–1261, Jul. 2013, doi: 10.1681/ASN.2012121216.

- [315] H. Zhao *et al.*, “Peptide SS-31 upregulates frataxin expression and improves the quality of mitochondria: Implications in the treatment of Friedreich ataxia,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10320-2.
- [316] W. Zhao *et al.*, “Elamipretide (SS-31) improves mitochondrial dysfunction, synaptic and memory impairment induced by lipopolysaccharide in mice,” *J. Neuroinflammation*, vol. 16, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s12974-019-1627-9.
- [317] C. Obi, A. T. Smith, G. J. Hughes, and A. A. Adeboye, “Targeting mitochondrial dysfunction with elamipretide,” *Heart Fail. Rev.*, 2022, doi: 10.1007/S10741-021-10199-2.
- [318] “Stealth BioTherapeutics Receives Orphan Drug Designation from FDA for Elamipretide for the Treatment of Friedreich’s Ataxia - Stealth BioTherapeutics Inc.” <https://investor.stealthbt.com/websites/stealthbio/English/5200/us-press-release.html?airportNewsID=1efca7d9-1764-435a-9b81-e231f563acff> (accessed Apr. 12, 2022).
- [319] “FRDA Investigator Initiated Study (IIS) With Elamipretide - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05168774?term=elamipretide&cond=Friedreich+Ataxia&draw=2&rank=1> (accessed Apr. 12, 2022).
- [320] C. Hetz and S. Saxena, “ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration,” *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 13, no. 8, pp. 477–491, Aug. 2017, doi: 10.1038/NRNEUROL.2017.99.
- [321] I. Celardo *et al.*, “Mitofusin-mediated ER stress triggers neurodegeneration in pink1/parkin models of Parkinson’s disease,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 6, pp. e2271–e2271, Jun. 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.173.
- [322] D. A. Ryskamp, S. Korban, V. Zhemkov, N. Kraskovskaya, and I. Bezprozvanny, “Neuronal sigma-1 receptors: Signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases,” *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, no. AUG. Front Neurosci, 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.00862.
- [323] Z. Koshenov *et al.*, “Sigma-1 Receptor Promotes Mitochondrial Bioenergetics by Orchestrating ER Ca²⁺ Leak during Early ER Stress.,” *Metabolites*, vol. 11, no. 7, Jun. 2021, doi: 10.3390/metabo11070422.
- [324] A. Pal, D. Fontanilla, A. Gopalakrishnan, Y.-K. Chae, J. L. Markley, and A. E. Ruoho, “The sigma-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements.,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 682, no. 1–3, pp. 12–20, May 2012, doi: 10.1016/j.ejphar.2012.01.030.
- [325] S. Couly, B. Khalil, V. Viguier, J. Roussel, T. Maurice, and J. C. Liévens, “Sigma-1 receptor is a key genetic modulator in amyotrophic lateral sclerosis,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 29, no. 4, pp. 529–540, Mar. 2020, doi: 10.1093/HMG/DDZ267.

REFERENCIAS

- [326] J. Wang, A. Shanmugam, S. Markand, E. Zorrilla, V. Ganapathy, and S. B. Smith, "Sigma 1 receptor regulates the oxidative stress response in primary retinal Müller glial cells via NRF2 signaling and system xc(-), the Na(+)-independent glutamate-cystine exchanger.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 86, pp. 25–36, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.009.
- [327] T. A. Mavlyutov, R. W. Nickells, and L.-W. Guo, "Accelerated retinal ganglion cell death in mice deficient in the Sigma-1 receptor.," *Mol. Vis.*, vol. 17, pp. 1034–43, Apr. 2011, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21541278>.
- [328] Y. Miki, K. Tanji, F. Mori, and K. Wakabayashi, "Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 74, pp. 25–31, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.nbd.2014.11.005.
- [329] T. Maurice, M. Strehaiano, F. Duhr, and N. Chevallier, "Amyloid toxicity is enhanced after pharmacological or genetic invalidation of the σ 1 receptor.," *Behav. Brain Res.*, vol. 339, pp. 1–10, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.bbr.2017.11.010.
- [330] V. Antonini *et al.*, "Anti-amnesic properties of (+/-)-PPCC, a novel sigma receptor ligand, on cognitive dysfunction induced by selective cholinergic lesion in rats.," *J. Neurochem.*, vol. 109, no. 3, pp. 744–54, May 2009, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06000.x.
- [331] K. Ruscher *et al.*, "The sigma-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke.," *Brain*, vol. 134, no. Pt 3, pp. 732–46, Mar. 2011, doi: 10.1093/brain/awq367.
- [332] T. Hayashi and T.-P. Su, "Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders.," *CNS Drugs*, vol. 18, no. 5, pp. 269–84, 2004, doi: 10.2165/00023210-200418050-00001.
- [333] L. Nguyen, B. P. Lucke-Wold, S. Mookerjee, N. Kaushal, and R. R. Matsumoto, "Sigma-1 Receptors and Neurodegenerative Diseases: Towards a Hypothesis of Sigma-1 Receptors as Amplifiers of Neurodegeneration and Neuroprotection.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 964, pp. 133–152, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-50174-1_10.
- [334] H. Tagashira, M. S. Bhuiyan, N. Shioda, and K. Fukunaga, "Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through σ 1-receptor in hypertrophic cardiomyocytes," *Life Sci.*, vol. 95, no. 2, pp. 89–100, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.019.
- [335] H. Tagashira, S. Bhuiyan, N. Shioda, H. Hasegawa, H. Kanai, and K. Fukunaga, " Σ 1-Receptor Stimulation With Fluvoxamine Ameliorates Transverse Aortic Constriction-Induced Myocardial Hypertrophy and Dysfunction in Mice," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 299, no. 5, pp. H1535–45, Nov. 2010, doi: 10.1152/ajpheart.00198.2010.
- [336] W. M. Elsaed, A. M. Alahmadi, B. T. Al-Ahmadi, J. A. Taha, and R. M. Tarabishi, "Gastroprotective and antioxidant effects of fluvoxamine on stress-induced peptic ulcer in rats," *J. Taibah Univ. Med. Sci.*, vol. 13, no. 5, pp. 422–431, Oct. 2018, doi:

- 10.1016/j.jtumed.2018.04.010.
- [337] O. M. E. Abdel-Salam, S. M. Youssef Morsy, and A. A. Sleem, "The effect of different antidepressant drugs on oxidative stress after lipopolysaccharide administration in mice," *EXCLI J.*, vol. 10, pp. 290–302, 2011, doi: 10.17877/DE290R-5131.
- [338] C. R. Eddings, N. Arbez, S. Akimov, M. Geva, M. R. Hayden, and C. A. Ross, "Pridopidine protects neurons from mutant-huntingtin toxicity via the sigma-1 receptor.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 129, pp. 118–129, 2019, doi: 10.1016/j.nbd.2019.05.009.
- [339] A. Ionescu *et al.*, "Targeting the Sigma-1 Receptor via Pridopidine Ameliorates Central Features of ALS Pathology in a SOD1G93A Model.," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 3, p. 210, 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1451-2.
- [340] V. Francardo *et al.*, "Pridopidine Induces Functional Neurorestoration Via the Sigma-1 Receptor in a Mouse Model of Parkinson's Disease.," *Neurotherapeutics*, vol. 16, no. 2, pp. 465–479, 2019, doi: 10.1007/s13311-018-00699-9.
- [341] J. Qin *et al.*, "Activation of Sigma-1 Receptor by Cutamesine Attenuates Neuronal Apoptosis by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction in a Rat Model of Asphyxia Cardiac Arrest," *Shock*, vol. 51, no. 1, pp. 105–113, 2019, doi: 10.1097/SHK.0000000000001119.
- [342] H. Tagashira *et al.*, "Stimulation of σ_1 -receptor restores abnormal mitochondrial Ca²⁺ + mobilization and ATP production following cardiac hypertrophy," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, no. 4, pp. 3082–3094, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.12.029.
- [343] N. Gogvadze, E. Zhuravliova, D. Morin, D. Mikeladze, and T. Maurice, "Sigma-1 Receptor Agonists Induce Oxidative Stress in Mitochondria and Enhance Complex I Activity in Physiological Condition but Protect Against Pathological Oxidative Stress.," *Neurotox. Res.*, vol. 35, no. 1, pp. 1–18, Jan. 2019, doi: 10.1007/s12640-017-9838-2.
- [344] V. Lahmy *et al.*, "Blockade of Tau hyperphosphorylation and A β_{1-42} generation by the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX2-73, a mixed muscarinic and σ_1 receptor agonist, in a nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease.," *Neuropsychopharmacology*, vol. 38, no. 9, pp. 1706–23, Aug. 2013, doi: 10.1038/npp.2013.70.
- [345] V. Lahmy, R. Long, D. Morin, V. Villard, and T. Maurice, "Mitochondrial protection by the mixed muscarinic/ σ_1 ligand ANAVEX2-73, a tetrahydrofuran derivative, in A β_{25-35} peptide-injected mice, a nontransgenic Alzheimer's disease model.," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, p. 463, 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00463.
- [346] A. Hyrskyluoto, I. Pulli, K. Törnqvist, T. H. Ho, L. Korhonen, and D. Lindholm, "Sigma-1 receptor agonist PRE084 is protective against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of calpastatin and the NF- κ B pathway.," *Cell Death Dis.*, vol. 4, p. e646, May 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.170.

REFERENCIAS

- [347] B. Gironi *et al.*, “Effect of DMSO on the Mechanical and Structural Properties of Model and Biological Membranes,” *Biophys. J.*, vol. 119, no. 2, p. 274, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.BPJ.2020.05.037.
- [348] J. M. Baughman *et al.*, “Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter,” *Nature*, vol. 476, no. 7360, pp. 341–345, Jun. 2011, doi: 10.1038/nature10234.
- [349] K. Oxenoid *et al.*, “Architecture of the mitochondrial calcium uniporter,” *Nature*, vol. 533, no. 7602, pp. 269–273, 2016, doi: 10.1038/nature17656.
- [350] G. Bustos, P. Cruz, A. Lovy, and C. Cárdenas, “Endoplasmic reticulum-mitochondria calcium communication and the regulation of mitochondrial metabolism in cancer: A novel potential target,” *Front. Oncol.*, vol. 7, no. SEP, p. 199, 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00199.
- [351] Y. Liu *et al.*, “MCU-induced mitochondrial calcium uptake promotes mitochondrial biogenesis and colorectal cancer growth,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 5, no. 1, p. 59, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0155-5.
- [352] Y. Liao, Y. Dong, and J. Cheng, “The function of the mitochondrial calcium uniporter in neurodegenerative disorders,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 2, Feb. 2017, doi: 10.3390/ijms18020248.
- [353] A. Venugopal, M. Iyer, V. Balasubramanian, and B. Vellingiri, “Mitochondrial calcium uniporter as a potential therapeutic strategy for Alzheimer’s disease,” *Acta Neuropsychiatr.*, vol. 32, no. 2, pp. 65–71, Apr. 2020, doi: 10.1017/neu.2019.39.
- [354] S. Soman *et al.*, “Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter rescues dopaminergic neurons in pink1^{-/-} zebrafish,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 45, no. 4, pp. 528–535, 2017, doi: 10.1111/ejn.13473.
- [355] E. Tubbs *et al.*, “Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance,” *Diabetes*, vol. 63, no. 10, pp. 3279–3294, Oct. 2014, doi: 10.2337/db13-1751.
- [356] C. H. Wang and Y. H. Wei, “Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca²⁺ homeostasis in the pathophysiology of insulin resistance and type 2 diabetes,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 24, no. 1, p. 70, Sep. 2017, doi: 10.1186/s12929-017-0375-3.
- [357] Y. Qiu *et al.*, “MicroRNA-20b Promotes Cardiac Hypertrophy by the Inhibition of Mitofusin 2-Mediated Inter-organelle Ca²⁺ Cross-Talk,” *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 19, pp. 1343–1356, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.017.
- [358] I. Drago, D. De Stefani, R. Rizzuto, and T. Pozzan, “Mitochondrial Ca²⁺ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca²⁺ peaks in cardiomyocytes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 32, pp. 12986–12991, Aug. 2012, doi: 10.1073/pnas.1210718109.
- [359] M. Montero *et al.*, “Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural

- plant flavonoids,” *Biochem. J.*, vol. 384, no. 1, pp. 19–24, Nov. 2004, doi: 10.1042/BJ20040990.
- [360] M. Ashrafizadeh, S. Tavakol, Z. Ahmadi, S. Roomiani, R. Mohammadinejad, and S. Samarghandian, “Therapeutic effects of kaempferol affecting autophagy and endoplasmic reticulum stress,” *Phytotherapy Research*, vol. 34, no. 5. *Phytother Res*, pp. 911–923, May 01, 2020, doi: 10.1002/ptr.6577.
- [361] H. Wang *et al.*, “Kaempferol protects mice from D-GalN/LPS-induced acute liver failure by regulating the ER stress-Grp78-CHOP signaling pathway,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 111, pp. 468–475, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.105.
- [362] P. Rajendran *et al.*, “Kaempferol Inhibits Zearalenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis via the PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway: In Vitro and In Vivo Studies,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–18, Jan. 2020, doi: 10.3390/IJMS22010217.
- [363] A. K. Samhan-Arias, F. J. Martín-Romero, and C. Gutiérrez-Merino, “Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 37, no. 1, pp. 48–61, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.002.
- [364] C. Yang *et al.*, “Kaempferol improves lung ischemia-reperfusion injury via antiinflammation and antioxidative stress regulated by SIRT1/HMGB1/NF- κ B axis,” *Front. Pharmacol.*, vol. 10, 2020, doi: 10.3389/fphar.2019.01635.
- [365] C. Yang *et al.*, “Kaempferol Alleviates Oxidative Stress and Apoptosis Through Mitochondria-dependent Pathway During Lung Ischemia-Reperfusion Injury,” *Front. Pharmacol.*, vol. 12, Mar. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.624402.
- [366] J. Wang, J. Mao, R. Wang, S. Li, B. Wu, and Y. Yuan, “Kaempferol Protects Against Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Through Intervening Oxidative and Inflammatory Stress Induced Apoptosis,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, Apr. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00424.
- [367] T. M. Holland *et al.*, “Dietary flavonols and risk of Alzheimer dementia,” *Neurology*, vol. 94, no. 16, pp. E1749–E1756, Apr. 2020, doi: 10.1212/WNL.0000000000008981.
- [368] E. Srinivasan and R. Rajasekaran, “Comparative binding of kaempferol and kaempferide on inhibiting the aggregate formation of mutant (G85R) SOD1 protein in familial amyotrophic lateral sclerosis: A quantum chemical and molecular mechanics study,” *BioFactors*, vol. 44, no. 5, pp. 431–442, Sep. 2018, doi: 10.1002/biof.1441.
- [369] R. K. Jobling *et al.*, “PMPCA mutations cause abnormal mitochondrial protein processing in patients with non-progressive cerebellar ataxia,” *Brain*, vol. 138, no. Pt 6, pp. 1505–1517, Jun. 2015, doi: 10.1093/BRAIN/AWV057.
- [370] O. Yogeve and O. Pines, “Dual targeting of mitochondrial proteins: Mechanism, regulation and function,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, no. 3, pp. 1012–1020, Mar.

REFERENCIAS

- 2011, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2010.07.004.
- [371] O. Yogev, A. Naamati, and O. Pines, “Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions,” *FEBS J.*, vol. 278, no. 22, pp. 4230–4242, Nov. 2011, doi: 10.1111/J.1742-4658.2011.08359.X.
- [372] E. Sass, S. Karniely, and O. Pines, “Folding of Fumarase during Mitochondrial Import Determines its Dual Targeting in Yeast,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 46, pp. 45109–45116, Nov. 2003, doi: 10.1074/JBC.M302344200.
- [373] M. Leshets, Y. B. H. Silas, N. Lehming, and O. Pines, “Fumarase: From the TCA Cycle to DNA Damage Response and Tumor Suppression,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 5, p. 68, Jul. 2018, doi: 10.3389/FMOLB.2018.00068.
- [374] A. Rötig *et al.*, “Aconitase and mitochondrial iron–sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia,” *Nat. Genet.*, vol. 17, no. 2, pp. 215–217, Oct. 1997, doi: 10.1038/ng1097-215.
- [375] Y. Shan, E. Napoli, and G. Cortopassi, “Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, no. 8, pp. 929–941, Apr. 2007, doi: 10.1093/HMG/DDM038.
- [376] A. Naamati, N. Regev-Rudzki, S. Galperin, R. Lill, and O. Pines, “Dual Targeting of Nfs1 and Discovery of Its Novel Processing Enzyme, Icp55,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 44, pp. 30200–30208, Oct. 2009, doi: 10.1074/JBC.M109.034694.
- [377] N. Regev-Rudzki, S. Karniely, N. N. Ben-Haim, and O. Pines, “Yeast Aconitase in Two Locations and Two Metabolic Pathways: Seeing Small Amounts Is Believing,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 9, p. 4163, Sep. 2005, doi: 10.1091/MBC.E04-11-1028.
- [378] Q. Wang *et al.*, “Simultaneous Quantification of Mitochondrial Mature Frataxin and Extra-Mitochondrial Frataxin Isoform E in Friedreich’s Ataxia Blood,” *Front. Neurosci.*, vol. 16, Apr. 2022, doi: 10.3389/FNINS.2022.874768.
- [379] M. A. Selak *et al.*, “Blood cells from Friedreich ataxia patients harbor frataxin deficiency without a loss of mitochondrial function,” *Mitochondrion*, vol. 11, no. 2, pp. 342–350, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.MITO.2010.12.003.
- [380] L. Télot *et al.*, “Quantitative proteomics in Friedreich’s ataxia B-lymphocytes: A valuable approach to decipher the biochemical events responsible for pathogenesis,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1864, no. 4, pp. 997–1009, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.BBADIS.2018.01.010.
- [381] G. Tan, E. Napoli, F. Taroni, and G. Cortopassi, “Decreased expression of genes involved in sulfur amino acid metabolism in frataxin-deficient cells,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 12, no. 14, pp. 1699–1711, Jul. 2003, doi: 10.1093/HMG/DDG187.
- [382] E. Britti *et al.*, “Calcitriol increases frataxin levels and restores mitochondrial function in cell models of Friedreich Ataxia,” *Biochem. J.*, vol. 478, no. 1, pp. 1–20, Jan. 2021, doi:

- 10.1042/BCJ20200331.
- [383] J. Kosutic and D. Zamurovic, “High-dose beta-blocker hypertrophic cardiomyopathy therapy in a patient with Friedreich ataxia,” *Pediatr. Cardiol.*, vol. 26, no. 5, pp. 727–730, 2005, doi: 10.1007/S00246-005-0930-7.
- [384] G. Jia, A. Whaley-Connell, and J. R. Sowers, “Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease,” *Diabetologia*, vol. 61, no. 1, pp. 21–28, Jan. 2018, doi: 10.1007/S00125-017-4390-4.
- [385] W. H. Dillmann, “Diabetic Cardiomyopathy,” *Circ. Res.*, vol. 124, no. 8, pp. 1160–1162, Apr. 2019, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314665.
- [386] L. Ji *et al.*, “MICU1 Alleviates Diabetic Cardiomyopathy Through Mitochondrial Ca²⁺-Dependent Antioxidant Response,” *Diabetes*, vol. 66, no. 6, pp. 1586–1600, Jun. 2017, doi: 10.2337/DB16-1237.
- [387] A. V. Prabhu, W. Luu, D. Li, L. J. Sharpe, and A. J. Brown, “DHCR7: A vital enzyme switch between cholesterol and vitamin D production,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 64, pp. 138–151, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2016.09.003.
- [388] L. Goedeke and C. Fernández-Hernando, “microRNAs: A connection between cholesterol metabolism and neurodegeneration,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 72, no. Part A, pp. 48–53, Dec. 2014, doi: 10.1016/J.NBD.2014.05.034.
- [389] H. Puccio *et al.*, “Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits,” *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 2, pp. 181–186, 2001, doi: 10.1038/84818.
- [390] T. C. Branon *et al.*, “Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 36, no. 9, pp. 880–898, Oct. 2018, doi: 10.1038/NBT.4201.
- [391] D. G. May, K. L. Scott, A. R. Campos, and K. J. Roux, “Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation,” *Cells*, vol. 9, no. 5, Apr. 2020, doi: 10.3390/CELLS9051070.
- [392] L. Kubitz *et al.*, “Engineering of ultraID, a compact and hyperactive enzyme for proximity-dependent biotinylation in living cells,” *Commun. Biol.*, vol. 5, no. 1, p. 657, Dec. 2022, doi: 10.1038/s42003-022-03604-5.
- [393] “SMART - Servier Medical ART.” <https://smart.servier.com/> (accessed Dec. 14, 2021).
- [394] “Tissue expression of FXN - Summary - The Human Protein Atlas.” <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165060-FXN/tissue> (accessed Mar. 22, 2022).
- [395] D. Szklarczyk *et al.*, “STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. D1, pp. D607–D613, Jan. 2019, doi: 10.1093/NAR/GKY1131.

ABREVIATURAS

8-OHdG – 8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina

ABCD3 – *ATP Binding Cassette Subfamily D Member 3*

AMPK – *AMP-activated protein kinase*

ARE – *Antioxidant Response Element*

ARPC – *Actin-related protein 2/3 complex*

ATPAF1 – *ATP Synthase Mitochondrial F1 Complex Assembly Factor 1*

BCAP31/BAP31 – *B-cell receptor-associated protein 31*

BiP/GRP78 – *Binding immunoglobulin protein/Glucose response protein 78*

Ca²⁺ – Calcio

CANX – Calnexina

CBR1 – *Carbonyl reductase [NADPH] 1*

Cch – Carbacol

CHCHD3 – *Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 3*

CMT – Charcot-Marie-Tooth

CPT1 – Carnitina Palmitoil-Transferasa I

DHCR7 – *7-dehydrocholesterol reductase*

DLAT – *Dihydrolipoamide S-Acetyltransferase*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRG – *Dorsal Root Ganglion*

Drp-1 – *Dynamamin-related protein 1*

ELA – Esclerosis Lateral Amiotrófica

ERTS – *Endoplasmic Reticulum Targeting Sequence*

FARS – *Friedreich Ataxia Rating Scale*

FASN – *Fatty acid synthase*

FDA – *Food and Drug Administration*

FDR – *False Discovery Rate*

Flv – Fluvoxamina

FRDA – *Friedreich's Ataxia* o Ataxia de Friedreich

FXN – Frataxina

GDAP1 – *ganglioside induced differentiation associated protein 1*

GO – *Gene Ontology*

GRP75 – *Glucose-regulated protein 75*

GSH – Glutati6n

H₂O₂ – Per6xido de Hidr6geno

HA – Hemaglutinina

HACD3 – *Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3*

HO[•] – Radical Hidroxilo

ICARS – *International Cooperative Ataxia Rating Scale*

IP₃R – *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*

iPSCs – *Induced Pluripotent Stem Cells*

ISCs – *Iron-Sulfur Clusters*

KAM – Kaempferol

KEAP1 – *Kelch-like ECH-associated protein 1*

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KO – *Knock Out*

LBR – *Lamin-B Receptor*

MAMs – *Endoplasmic reticulum-mitochondria associated membranes*

MCU – *Mitochondrial Calcium Uniporter*

MDA – Malondialdehído

ABREVIATURAS

MFN2 – Mitofusina 2	Sig-1R – <i>Sigma non-opioid intracellular receptor 1</i>
MME – Membrana mitocondrial externa	SOCE – <i>Store-operated Calcium Entry</i>
MMI – Membrana mitocondrial interna	SOD2 – Superóxido Dismutasa 2
MRPS/L – <i>28S Mitochondrial Ribosomal Protein S/L</i>	SplitC – Fragmento C-terminal de TurboID
MTS – <i>Mitochondrial Targeting Sequence</i>	SplitN – Fragmento N-terminal de TurboID
MYL6 – <i>Myosin light polypeptide 6</i>	SREBP1 – <i>Sterol-Responsive Element-Binding Protein 1</i>
NAC – N-Acetilcisteína	STIM1 – <i>Stromal Interaction Molecule 1</i>
NFS1 – <i>Cysteine desulfurase</i>	TIMM44 – <i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44</i>
NRF2 – <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>	VDAC1/2/3 – <i>Voltage-dependent Anion Channel</i>
O₂⁻ – Anión superóxido	WT – <i>Wild Type</i>
Omav – Omaveloxolona	
ORA – <i>Over-representation Analysis</i>	
Orai1 – <i>Calcium release-activated calcium channel protein 1</i>	
ORF – Open Reading Frame	
PGC-1α – <i>Peroxisome Proliferator-Activated Co-Activator 1-α</i>	
PHB1/2 – <i>Prohibitin</i>	
PLA – <i>Proximity Ligation Assay</i>	
PMPCA/α-MPP – <i>Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha</i>	
PPARγ – <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>	
ROS – <i>Reactive Oxygen Species</i>	
RS/RE – Retículo Sarcoplasmático/Endoplasmático	
RyR – <i>Ryanodine receptor</i>	
SARA – <i>Scale for the Assessment and Rating of Ataxia</i>	
SCD – <i>Stearoyl-CoA desaturase</i>	
SERCA – <i>Sarco/Endoplasmatic reticulum calcium ATPase</i>	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la formación del puente proteico para el intercambio de Ca^{2+} RE-mitocondria	- 4 -
Figura 2: Características clínicas de la FRDA	- 14 -
Figura 3: Estructura del gen <i>FXN</i> y mecanismos genéticos aberrantes de la FRDA	- 18 -
Figura 4: Secuencia proteica y estructura tridimensional de FXN	- 21 -
Figura 5: Datos consenso de expresión de mRNA de <i>FXN</i>	- 23 -
Figura 6: Representación de las variantes de splicing del gen <i>FXN</i> humano	- 25 -
Figura 7: Resumen de las características moleculares de la Ataxia de Friedreich (FRDA)	- 31 -
Figura 8: Esquema de la técnica Proximity ligation Assay (PLA)	- 56 -
Figura 9: Esquema del protocolo de fraccionamiento subcelular para la purificación de mitocondria, MAMs y RE	- 60 -
Figura 10: Representación esquemática de la técnica Split-TurboID	- 65 -
Figura 11: FXN se localiza en las MAMs	- 77 -
Figura 12: Las interacciones VDAC1-GRP75 disminuyen en condiciones de déficit de FXN	- 78 -
Figura 13: Las interacciones VDAC1-IP ₃ R disminuyen en condiciones de déficit de FXN	- 79 -
Figura 14: El tratamiento con antioxidantes rescata los contactos de las MAMs en células deficientes en FXN	- 82 -
	- 217 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 15: Curva de dosis-respuesta de Carbacol (Cch) en las células SH-SY5Y y FXN-138.2 _____ - 84 -

Figura 16: Los antioxidantes recuperan la entrada de Ca^{2+} mitocondrial y alivian la peroxidación lipídica en células deficientes en FXN_ - 86 -

Figura 17: Análisis de viabilidad celular ras el tratamiento con Omaveloxolona (Oma) en las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2 _____ - 88 -

Figura 18: La Omaveloxolona (Oma) restablece la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en condiciones de deficiencia de FXN _____ - 89 -

Figura 19: Análisis de viabilidad celular tras el tratamiento con Fluvoxamina (Flv) en las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2 _____ - 91 -

Figura 20: La Fluvoxamina (Flv) restablece la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en condiciones de déficit de FXN _____ - 92 -

Figura 21: Análisis de viabilidad celular ras el tratamiento con Kaempferol (KAM) en las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2 _____ - 93 -

Figura 22: El Kaempferol (KAM) restablece la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en condiciones de déficit de FXN _____ - 95 -

Figura 23: Expresión de las variantes canónica y citosólica de FXN en células humanas _____ - 97 -

Figura 24: Expresión de las variantes canónica y citosólica de Fxn en tejidos de ratón _____ - 99 -

Figura 25: Análisis de la localización subcelular de las proteínas de fusión ERTS/MTS-SplitC-HA mediante imagen _____ - 101 -

Figura 26: Valoración por imagen de la localización mitocondrial y extramitocondrial de FXN I-SplitN-V5 _____ - 103 -

Figura 27: Valoración por imagen de la localización mitocondrial y extramitocondrial de FXN II-SplitN-V5 _____ - 105 -

Figura 28: Caracterización de la expresión y reconstitución de TurboID por Western Blot _____ - 106 -

Figura 29: Estudio de la actividad biotina-ligasa específica de los fragmentos SplitC y SplitN mediante Western Blot _____ - 108 -

Figura 30: Puesta a punto del marcaje de proteínas con biotina previo al análisis proteómico _____ - 110 -

Figura 31: *Volcano plot* del proteoma identificado por LC-MS/MS al coexpresar FXN I con el plásmido ERTS-SplitC-HA _____ - 111 -

Figura 32: *Volcano plot* del proteoma identificado por LC-MS/MS al coexpresar FXN II con el plásmido ERTS-SplitC-HA _____ - 113 -

Figura 33: Clusters de Markov del proteoma de interacción de FXN I en el RE/citosol _____ - 114 -

Figura 34: Cluster de Markov del proteoma de interacción de FXN II en el RE/citosol _____ - 115 -

Figura 35: Análisis de las rutas de señalización del proteoma de interacción de FXN I y II en el RE/citosol _____ - 116 -

Figura 36: Treemap de los términos GO Biological Process sobrerrepresentados en el interactoma de FXN I en el RE/citosol _____ - 118 -

Figura 37: Treemap de los términos GO Biological Process sobrerrepresentados en el interactoma de FXN II en el RE/citosol _____ - 119 -

ÍNDICE DE FIGURAS

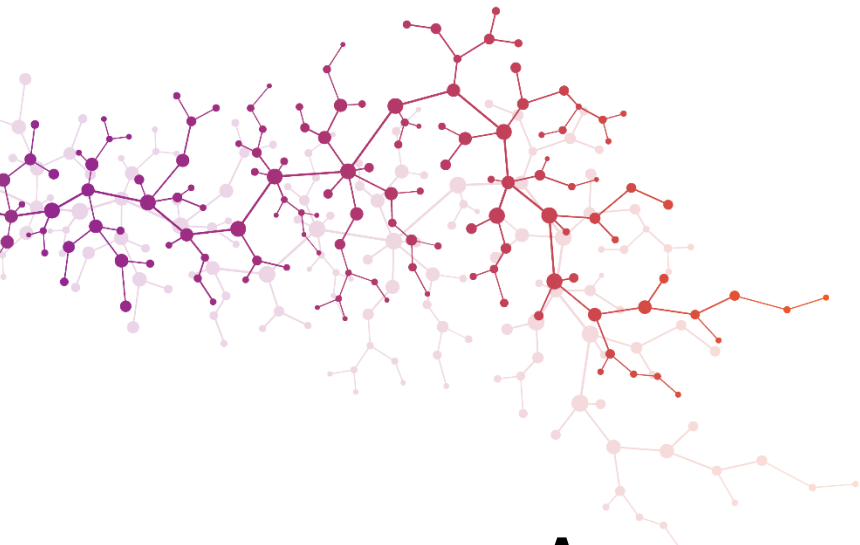
- Figura 38: Marcaje con biotina del interactoma de FXN I y II en la mitocondria _____ - 121 -
- Figura 39: Volcano plot del proteoma identificado por LC-MS/MS al coexpresar FXN I con el plásmido MTS-SplitC-HA _____ - 122 -
- Figura 40: Volcano plot del proteoma identificado por LC-MS/MS al coexpresar FXN II con el plásmido MTS-SplitC-HA _____ - 123 -
- Figura 41: Cluster de Markov del proteoma de interacción de FXN I en la mitocondria _____ - 124 -
- Figura 42: Análisis de las rutas de señalización del proteoma de interacción mitocondrial de FXN I _____ - 125 -
- Figura 43: Treemap de los términos GO Biological Process sobrerrepresentados en el interactoma de FXN I en la mitocondria _____ - 127 -
- Figura 44: Interactoma mitocondrial de FXN I implicado en el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones _____ - 128 -
- Figura 45: Clusters de Markov del interactoma de FXN I implicado en la traducción mitocondrial _____ - 130 -
- Figura 46. Análisis específico de los interactomas de FXN I y II comparado con proteínas previamente identificadas en el dominio MAMs _____ - 131 -
- Figura 47: Interactoma de FXN I y II involucrado en la regulación del Ca^{2+} intracelular _____ - 133 -
- Figura 48: Interactoma de FXN I y II relacionado con el metabolismo lipídico _____ - 135 -
- Figura 49: La comunicación RE-mitocondria está alterada en condiciones de déficit de FXN _____ - 145 -

Figura 50: Esquema de los efectos provocados por fármacos dirigidos a restablecer la afluencia de Ca^{2+} mitocondrial _____ - 152 -

Figura 51: Esquema del mecanismo de localización subcelular propuesto para FXN I y II _____ - 160 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variantes de <i>splicing</i> del gen <i>FXN</i> _____	- 28 -
Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados_____	- 52 -
Tabla 3: Reactivos utilizados como tratamiento en las líneas celulares SH-SY5Y y FXN-138.2._____	- 54 -
Tabla 4: Primers utilizados para el análisis de la expresión de las isoformas canónica (FXN I) y citosólica (FXN II) de frataxina_	- 63 -
Tabla 5: Plásmidos clonados para la técnica Split-TurboID_____	- 66 -
Tabla 6: Proteínas del interactoma de FXN I y II relacionadas con la homeostasis del Ca ²⁺ intracelular_____	- 134 -
Tabla 7: Proteínas del interactoma de FXN I y II relacionadas con el metabolismo lipídico_____	- 136 -



ANEXOS



ANEXOS

Anexo I: Tablas de las rutas KEGG sobrerrepresentadas en el análisis ORA de los proteomas de interacción de FXN I y II en el RE/citosol. Las rutas enriquecidas de forma exclusiva para cada isoforma se destacan en negrita.

FXN I - ERTS

KEGG ID	DESCRIPCIÓN	GEN (SYMBOL)
hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	HSPA1A;HSPA1B/BCAP31/HYOU1/HSP90B1/HSPA8
hsa01212	Fatty acid metabolism	HACD3/SCD/HADH
hsa00100	Steroid biosynthesis	DHCR7/LBR
hsa04137	Mitophagy - animal	PGAM5/UBA52/RPS27A
hsa00062	Fatty acid elongation	HACD3/HADH
hsa01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	HACD3/SCD
hsa04217	Necroptosis	PGAM5/PPIA/SLC25A5

FXN II - ERTS

KEGG ID	DESCRIPCIÓN	GEN (SYMBOL)
hsa04217	Necroptosis	PGAM5/VDAC3/VDAC1/H2AC14/PPIA/PYGL/PARP1
hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	DNAJB11/BCAP31/HYOU1/HSP90B1/HSPA8/DDOST/UBE2D3
hsa00270	Cysteine and methionine metabolism	CBS/AHCY/LDHB
hsa01212	Fatty acid metabolism	HACD3/SCD/FASN
hsa01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	HACD3/SCD
hsa05415	Diabetic cardiomyopathy	VDAC3/PPP1CC/VDAC1/ATP2A2/COX2/PARP1
hsa04152	AMPK signaling pathway	SCD/FASN/EEF2/RAB14
hsa05016	Huntington disease	VDAC3/HDAC1/VDAC1/TUBA1B/COX2/TUBA1C/TUBB8

Anexo II: Tablas de las rutas REACTOME sobrerrepresentadas en el análisis ORA de los proteomas de interacción de FXN I y II en el RE/citosol. Las rutas enriquecidas de forma exclusiva para cada isoforma se destacan en negrita.

FXN I - ERTS

REACTOME ID	DESCRIPCIÓN	GEN (SYMBOL)
R-HSA-72766	Translation	MRPS31/MRPS35/PTCD3/AIMP1/IARS2/MRPS24/MRPS9/EIF3L/UBA52/RPS27A/AIMP2
R-HSA-109581	Apoptosis	UBA52/RPS27A/YWHAH/PSMA1/KPNB1/BCAP31/VIM
RR-HSA-5368287	Mitochondrial translation	MRPS31/MRPS35/PTCD3/MRPS24/MRPS9
R-HSA-68886	M Phase	NDC1/UBA52/RPS27A/TMPO/AAAS/LBR/PSMA1/KPNB1/NUP88
R-HSA-69239	Synthesis of DNA	MCM4/UBA52/RPS27A/PSMA1/MCM3
R-HSA-1632852	Macroautophagy	PGAM5/UBA52/RPS27A/VIM/HSPA8
R-HSA-8980692	RHOA GTPase cycle	FAF2/TMPO/AAAS/LBR/BCAP31
R-HSA-75105	Fatty acyl-CoA biosynthesis	HACD3/SCD/SLC25A1
R-HSA-70326	Glucose metabolism	NDC1/SLC25A1/AAAS/NUP88
R-HSA-8932339	ROS sensing by NFE2L2	UBA52/RPS27A/PSMA1
R-HSA-8957322	Metabolism of steroids	DHCR7/SCD/LBR/KPNB1
R-HSA-191273	Cholesterol biosynthesis	DHCR7/LBR
R-HSA-71291	Metabolism of amino acids and derivatives	AIMP1/UBA52/RPS27A/AIMP2/AHCY/PSMA1
R-HSA-8978868	Fatty acid metabolism	HACD3/SCD/SLC25A1/HADH
R-HSA-2426168	Activation of gene expression by SREBF (SREBP)	DHCR7/SCD

FXN II - ERTS

REACTOME ID	DESCRIPCIÓN	GEN (SYMBOL)
R-HSA-72766	Translation	SPCS3/RPS15/EIF3L/SRPRA/GFM1/SRPRB/RPLP0/MRPL13/EEF2/RPS15A/EIF4A1/RPL10A/DDOST
R-HSA-68886	M Phase	NDC1/PPP1CC/TMPO/CSNK2B/YWHAG/AAAS/LBR/LMNB1/H2BC21/H2AC14/TUBA1B/RANGAP1/RANBP2/TUBA1C/TUBB8
R-HSA-1799339	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	SPCS3/RPS15/SRPRA/SRPRB/RPLP0/RPS15A/RPL10A/DDOST
R-HSA-389958	Cooperation of Prefoldin and Tric/CCT in actin and tubulin folding	CCT6A/CCT4/TUBA1B/CCT8/TUBA1C
R-HSA-1632852	Macroautophagy	PGAM5/VDAC1/CSNK2B/VIM/TUBA1B/HSPA8/TUBA1C/TUBB8
R-HSA-195258	RHO GTPase Effectors	PPP1CC/MYL6/YWHAG/ARPC3/H2BC21/H2AC14/TUBA1B/RANGAP1/RANBP2/ARPC1A/TUBA1C/TUBB8
R-HSA-75105	Fatty acyl-CoA biosynthesis	HACD3/SCD/SLC25A1/FASN
R-HSA-1445148	Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane	YWHAG/TUBA1B/RAB14/TUBA1C/TUBB8
R-HSA-8949215	Mitochondrial calcium ion transport	VDAC3/VDAC1/PHB
R-HSA-70326	Glucose metabolism	NDC1/SLC25A1/AAAS/RANBP2/PGAM1
R-HSA-381119	Unfolded Protein Response (UPR)	SRPRA/DNAJB11/HYOU1/HSP90B1/SRPRB
R-HSA-8978868	Fatty acid metabolism	HACD3/SCD/SLC25A1/CBR1/FASN
R-HSA-8980692	RHOA GTPase cycle	TMPO/AAAS/LBR/BCAP31
R-HSA-71291	Metabolism of amino acids and derivatives	RPS15/CBS/LOC102724560/AHCY/RPLP0/RPS15A/RPL10A

ANEXOS

Anexo III: Tablas de las rutas KEGG y REACTOME sobrerrepresentadas en el análisis ORA del proteoma mitocondrial de interacción de FXN I.

FXN I - MTS

KEGG ID	DESCRIPCIÓN	GEN (SYMBOL)
hsa05012	Parkinson disease	NDUFS3/SLC25A5/NDUFV2/NDUFS1/ATP5F1C/VDAC2/NDUFV1/NDUFA6/TRAP1/NDUFA5/NDUFA9
hsa05415	Diabetic cardiomyopathy	NDUFS3/SLC25A5/NDUFV2/NDUFS1/ATP5F1C/VDAC2/NDUFV1/NDUFA6/NDUFA5/NDUFA9
hsa05208	Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	NDUFS3/SLC25A5/NDUFV2/NDUFS1/ATP5F1C/VDAC2/NDUFV1/NDUFA6/NDUFA5/NDUFA9
hsa00190	Oxidative phosphorylation	NDUFS3/NDUFV2/NDUFS1/ATP5F1C/NDUFV1/NDUFA6/NDUFA5/NDUFA9
hsa05016	Huntington disease	NDUFS3/SLC25A5/NDUFV2/NDUFS1/ATP5F1C/VDAC2/NDUFV1/NDUFA6/NDUFA5/NDUFA9
hsa01230	Biosynthesis of amino acids	PYCR1/SHMT2/ALDH18A1/PYCR2
hsa00020	Citrate cycle (TCA cycle)	DLAT/DLST/SUCLA2
hsa00330	Arginine and proline metabolism	PYCR1/ALDH18A1/PYCR2

REACTOME ID	DESCRIPCIÓN	GEN (SYMBOL)
R-HSA-1428517	The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	NDUFS3/DLAT/NDUFV2/NDUFS1/ATP5F1C/DLST/LRPPRC/NDUFV1/NDUFA6/TRAP1/NNT/NDUFA5/NDUFA9/NDUF2/TACO1/NDUF4/SUCLA2
R-HSA-6799198	Complex I biogenesis	NDUFS3/NDUFV2/NDUFS1/NDUFV1/NDUFA6/NDUFA5/NDUFA9/NDUF2/NDUF4
R-HSA-8964539	Glutamate and glutamine metabolism	GLS/GLUD1/PYCR1/ALDH18A1/PYCR2
R-HSA-5368287	Mitochondrial translation	MRPS22/MRPS25/MRPS34/MRPL46/MRPS17/MRPS23/MRPS18B
R-HSA-8949215	Mitochondrial calcium ion transport	VDAC2/PMPCA/PHB2
R-HSA-71291	Metabolism of amino acids and derivatives	GLS/GLUD1/DLAT/PYCR1/DLST/ALDH18A1/PYCR2/SLC25A13
R-HSA-1268020	Mitochondrial protein import	TIMM44/PMPCA/CHCHD3/SLC25A13
R-HSA-1592230	Mitochondrial biogenesis	GLUD1/ALAS1/ATP5F1C/CHCHD3

Anexo IV: Tabla de las proteínas del interactoma de FXN I y II identificadas en estudios proteómicos de las MAMs

GEN	INTERACTOMA FXN I - ERTS	INTERACTOMA FXN II - ERTS	INTERACTOMA FXN I - MTS	KWAK ET AL. PNAS, 2020	CHO ET AL. PNAS, 2020	WANG ET AL. PROTEOMICS, 2018	HUNG ET AL. ELIFE, 2017	CHO ET AL. JBC, 2017	ZHANG ET AL. PROTEOMICS, 2011
MRPS31	+								+
DHCR7	+			+	+	+			+
PTCD3	+								+
PGAM5	+	+				+			+
NDC1	+	+		+	+				
AIMP1	+					+		+	
FAF2	+			+		+			+
HACD3	+	+				+			
IARS2	+		+						+
SCD	+	+			+			+	
MRPS9	+								+
EIF3L	+	+							+
CISD2	+			+	+	+		+	+
MSH2	+					+			
XRCC6	+	+				+			+
RPS27A	+								+
TMPO	+	+		+	+				+
YWHAH	+								+
MYL6	+	+				+			+
HSPA1B	+								+
SLC25A1	+	+			+				+
ARPC3	+	+				+			+
AIMP2	+					+			
DDX5	+	+				+			+
LBR	+	+		+	+	+			+
MTCH2	+	+				+			+
PTBP1	+	+				+			
MAP4	+	+							+
ATP5L	+	+				+			+
KPNB1	+								+

ANEXOS

GEN	INTERACTOMA FXN I - ERTS	INTERACTOMA FXN II - ERTS	INTERACTOMA FXN I - MTS	KWAK ET AL. PNAS, 2020	CHO ET AL. PNAS, 2020	WANG ET AL. PROTEOMICS, 2018	HUNG ET AL. ELIFE, 2017	CHO ET AL. JBC, 2017	ZHANG ET AL. PROTEOMICS, 2011
BCAP31	+	+			+			+	+
HYOU1	+	+				+			+
HSP90B1	+	+						+	+
VIM	+	+							+
PPIA	+	+				+			+
NUP88	+					+			
DHX15	+					+			+
HADH	+		+						+
PHB	+	+				+			+
SLC25A5	+		+						+
HSPA8	+	+							+
SPCS3		+				+			+
RPS15		+							+
SRPR		+							+
DNAJB11		+							+
VDAC3		+				+			+
STIM1		+			+	+		+	
VDAC1		+				+	+		+
YWHAG		+							+
CACYBP		+							+
NCLN		+				+			+
PRDX3		+				+			+
ARF4		+				+			+
DDX6		+				+			+
SEC22B		+		+				+	+
CCT6A		+							+
LMNB1		+				+			+
FXR1		+				+			
PRKDC		+				+			+
CSE1L		+							+
FHL1		+							+
CCT4		+							+
HNRNPC		+							+

GEN	INTERACTOMA FXN I - ERTS	INTERACTOMA FXN II - ERTS	INTERACTOMA FXN I - MTS	KWAK <i>ET AL.</i> PNAS, 2020	CHO <i>ET AL.</i> PNAS, 2020	WANG <i>ET AL.</i> PROTEOMICS, 2018	HUNG <i>ET AL.</i> ELIFE, 2017	CHO <i>ET AL.</i> JBC, 2017	ZHANG <i>ET AL.</i> PROTEOMICS, 2011
GFM1		+							+
CBR1		+				+			
HIST2H2BE		+							+
SRPRB		+		+		+		+	+
RPLP0		+							+
XRCC5		+				+			+
MRPL13		+							+
HIST1H2AJ		+							+
TUBA1B		+							+
LDHB		+				+			+
AK2		+					+		+
ATP2A2		+		+					+
FASN		+	+						+
DDX39B		+							+
EEF2		+							+
MT-CO2		+							+
RAB14		+				+			+
FUS		+				+			
SLC25A3		+							+
AHSA1		+				+			+
CCT8		+							+
RPS15A		+							+
EIF4A1		+							+
RPL10A		+							+
PARP1		+				+			
DHX9		+				+			+
SND1		+				+			+
DDOST		+							+
TUBA1C		+							+
UBE2D3		+							+
TIMM44			+						+
NDUFS3			+						+
CLPX			+						+

ANEXOS

GEN	INTERACTOMA FXN I - ERTS	INTERACTOMA FXN II - ERTS	INTERACTOMA FXN I - MTS	KWAK ET AL. PNAS, 2020	CHO ET AL. PNAS, 2020	WANG ET AL. PROTEOMICS, 2018	HUNG ET AL. ELIFE, 2017	CHO ET AL. JBC, 2017	ZHANG ET AL. PROTEOMICS, 2011
GLS			+						+
GLUD1			+						+
DLAT			+						+
NDUFV2			+						+
ABCD3			+		+	+			+
NDUFS1			+						+
PYCR1			+						+
SHMT2			+						+
ATP5C1			+						+
DLST			+						+
LRPPRC			+						+
VDAC2			+			+			+
NDUFV1			+						+
ALDH18A1			+						+
NDUFA6			+						+
MRPS22			+						+
MRPS25			+						+
MRPS34			+						+
PMPCA			+						+
GRSF1			+						+
TRAP1			+			+			+
NNT			+						+
NDUFA5			+						+
NDUFA9			+						+
TRMT10C			+						+
NDUFAF2			+						+
PYCR2			+						+
PHB2			+			+			+
TACO1			+			+			+
MRPL46			+						+
CHCHD3			+				+		+
NDUFAF4			+						+
SUCLA2			+						+

GEN	INTERACTOMA FXN I - ERTS	INTERACTOMA FXN II - ERTS	INTERACTOMA FXN I - MTS	KWAK <i>ET AL.</i> PNAS, 2020	CHO <i>ET AL.</i> PNAS, 2020	WANG <i>ET AL.</i> PROTEOMICS, 2018	HUNG <i>ET AL.</i> ELIFE, 2017	CHO <i>ET AL.</i> JBC, 2017	ZHANG <i>ET AL.</i> PROTEOMICS, 2011
SLC25A13			+						+
POLDIP2			+						+
MRPS23			+						+
MRPS18B			+						+

Anexo V: Producción científica

1. Publicaciones

- **Rodríguez L.R.** *et al.* Therapeutic Strategies Targeting Mitochondrial Calcium Signaling: A New Hope for Neurological Diseases? *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan 15;11(1):165. PMID: 35052668; **IF: 7.675 (D1, Q1)**
*Corresponding author
- Beltran-Beltran V, Benetó N, Lapeña-Luzón T, **Rodríguez LR**, *et al.* Role of Adenosine Receptors in Rare Neurodegenerative Diseases with Motor Symptoms. *Curr Protein Pept Sci*. 2021 Dec 27;22(9):675-694. PMID: 34514988; **IF: 3.118**
- Lapeña-Luzón T, **Rodríguez LR**, *et al.* Cofilin and Neurodegeneration: New Functions for an-Old but Gold Protein. *Brain Sci*. 2021 Jul 20;11(7):954. PMID: 34356188; **IF: 3.333 (Q3)**
- **Rodríguez LR**, *et al.* Oxidative stress modulates rearrangement of endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and calcium dysregulation in a Friedreich's ataxia model. *Redox Biol*. 2020 Oct;37:101762. PMID: 33128998; **IF: 11.799 (D1, Q1)**
- Pallardó FV, Pagano G, **Rodríguez LR**, *et al.* Friedreich Ataxia: current state-of-the-art, and future prospects for mitochondrial-focused therapies. *Transl Res*. 2021 Mar;229:135-141. PMID: 32841735; **IF: 10.171 (D1, Q1)**
- **Rodríguez LR** *et al.* Antioxidant Therapies and Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia: The Right Path or Just a Diversion? *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 24;9(8):664. PMID: 32722309; **IF: 6.313 (D1, Q1)**
- Romá-Mateo C, Seco-Cervera M, Ibáñez-Cabellos JS, Pérez G, Berenguer-Pascual E, **Rodríguez LR**, García-Giménez JL. Oxidative Stress and the Epigenetics of Cell Senescence: Insights from Progeroid Syndromes. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4755-4770. PMID: 30644344; **IF: 2.412 (Q3)**

2. Contribuciones a congresos

- The Biochemistry Global Summit (Lisboa, Portugal, 9-14 Julio 2022)
 - Presentación oral: **L.R. Rodríguez**, D. Pla-Martín, A. Lerma-Aguilera, T. Lapeña-Luzón, N. Benetó, R.R. Wiesner, F.V. Pallardó & P. González Cabo. Deciphering frataxin implication in

- endoplasmic reticulum-mitochondria associated membranes (MAMs). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13442>
- Presentación póster: C. Garcés Díaz, L. Diago-Domingo, A.J. Ibáñez, P.R. Tascón, **L.R. Rodríguez**, C. Romá-Mateo, F.V. Pallardó. Autophagy regulation and microRNA-mediated signalling pathways are altered in HUVEC cells in the presence of extracellular histones. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13440>
 - Presentación póster: T. Lapeña-Luzón, N. Benetó, L. Rodríguez-Pascau, P. Pizcueta, C. Vergara, **L. R. Rodríguez**, F.V. Pallardó, P. Gonzalez-Cabo. MIN-102 enhances the oxidative profile of FRDA mouse model. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13440>
 - Jurado de presentaciones orales y pósters. X Congreso de Investigación Biomédica. CIB 2022. (Valencia, España, 9-11 Feb. 2022)
 - Presentación oral: V. Beltran-Beltran, **L.R. Rodríguez**, C Aguado, S. Martí, T. Lapeña-Luzón, N. Benetó, F.V. Pallardó, P. Gonzalez-Cabo. Genetic editing of the FXN gene in Friedreich's ataxia patient-derived lymphocytes using the CRISPR/Cas9 system. 43rd EPSA Annual congress. (Lyon, Francia, 30 oct. 2021)
 - Presentación oral: P. Gonzalez-Cabo, V. Beltran-Beltran, **L.R. Rodríguez**, C Aguado, S. Martí, L. Bataller, T. Lapeña-Luzón, N. Benetó, F.V. Pallardó. Edición Génica del Gen FXN mediante el Sistema CRISPR/Cas9 en Linfocitos de pacientes con Ataxia de Friedreich. Charlas científicas sobre ATAXIA organizadas por FEDAES (Valladolid, España, 22-24 oct. 2021)
 - Presentación póster: **L.R. Rodríguez**, T. Lapeña-Luzón, F.V. Pallardó, P. Gonzalez-Cabo. Targeting oxidative stress to restore ER-mitochondria communication in Friedreich's Ataxia. SFRR-E International Annual meeting (Online, 15-18 Junio 2021) <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.125>
 - Presentación oral: **L.R. Rodríguez**, P Calap-Quintana, T Lapeña-Luzón, F.V. Pallardó, S. Schneuwly, J.A. Navarro, P. Gonzalez-Cabo. Calcium as key element in the pathology of Friedreich's Ataxia. Charlas científicas sobre ATAXIA organizadas por FEDAES (Online, 14-17 dic. 2020)
 - Presentación póster: **L.R. Rodríguez**, P. Calap-Quintana, T. Lapeña-Luzón, F.V. Pallardó, P. Gonzalez-Cabo. Disarrangement of endoplasmic reticulum-mitochondria communication impairs Ca²⁺ homeostasis in FRDA. IV Conferencia nacional de jóvenes investigadores en Biomedicina (Online, 4-6 nov. 2020)

ANEXOS

- Presentación oral: **L.R. Rodríguez**. Evaluación de las membranas asociadas a retículo endoplasmático y mitocondria (MAM) en la Ataxia de Friedreich. XIII Reunión anual del CIBERER (Online, 1-3 Julio 2020)
- Presentación póster: **L.R. Rodríguez**, P. Calap-Quintana, T. Lapeña-Luzón, F.V. Pallardó, P. Gonzalez-Cabo. La alteración de las membranas asociadas a mitocondria (MAM) afecta a la regulación del calcio en la Ataxia de Friedreich. Día mundial de las EERR organizado por AITER (Castellón, España, 28 Feb. 2020)
- Presentación póster: **L.R. Rodríguez**, P. Calap-Quintana, F.V. Pallardó, P. Gonzalez-Cabo. Assessment of endoplasmic reticulum-mitochondria associated membranes in Friedreich's ataxia. 2019 International Ataxia Research Conference organized by FARA (Washington, EEUU, 14-16 Nov. 2019)
- Presentación oral: P Gonzalez Cabo, P. Calap-Quintana, **L.R. Rodríguez**, E.G. Zucchet, M.D. Moltó. Phosphodiesterase inhibitors: pre-clinical assay in a mouse model of Friedreich's Ataxia. Charlas científicas sobre ATAXIA organizadas por FEDAES (Valladolid, España, 21 -23 Junio 2019)

3. Estancia Internacional

Título del Proyecto: *Evaluation of frataxin implication in the regulation of endoplasmic reticulum-mitochondria associated membranes*

Supervisado por Prof. Dr. Rudolf Wiesner y Dr. David Pla-Martín

Department of vegetative Physiology (Uniklinik Köln, Alemania)

Duración: 2/05/2021-3/08/2021 (3 meses)

Estancia financiada por una beca internacional EMBO. Código: STF_9014

Anexo VI: Summary

Antioxidant Therapies and Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia: The Right Path or Just a Diversion?

1. Introduction

Friedreich's ataxia (FRDA, OMIM no. 229300) is an autosomal recessive neurological disorder. It is the most common inherited ataxia in Europe, with a prevalence of around 1 in 30,000, although it shows large regional differences [1]. The disease is mostly affecting individuals of Indo-European and Afro-Asiatic origin, whereas the incidence on Amerindians, sub-Saharan, Chinese, Japanese, and Southeast Asiatic populations seems to be residual [2]. Most of the cases (96%) of FRDA are associated with a homozygous GAA triplet repeat expansion in intron 1 of the *FXN* gene, located on 9q21.11 [3]. The remainder are compound heterozygous, with an expansion in one allele and a point mutation, insertion or deletion in the other [4]. Consequently, FRDA patients show decreased levels of frataxin, the protein encoded by the *FXN* gene [5]. Longer expansions are associated with an earlier onset and more severe phenotypes [6–8]. Frataxin is a small protein highly conserved throughout evolution [9]. Human frataxin is expressed in the cytoplasm as a precursor of 210 amino acids (23 kDa) and then transported into the mitochondria due to a mitochondrial import signal in the C terminus [10]. Maturation of frataxin involves a two-step process by the mitochondrial processing peptidase leading to the formation of the form of 130 amino acids (14 kDa) that is the most abundant in controls and patients [10]. Mature frataxin lies within the mitochondrial matrix in association with the inner mitochondrial membrane. Frataxin mRNA is mainly expressed in tissues with high metabolic rate such as liver, kidney, neurons, and heart [5].

ANEXOS

Although the function of frataxin remains unclear, early studies observed a deficient activity of the iron–sulphur clusters (ISC) containing enzymes of the mitochondrial respiratory chain and Krebs cycle in heart homogenates, mitochondria from skeletal muscles, fibroblasts and lymphoblasts derived from patients [11,12]. In this line, several reports have detailed the function of frataxin as stimulator of ISC biogenesis by facilitating the persulfide transfer [13–15]. ISC are prosthetic cofactors, responsible for the activity of different enzymes which are involved in energy metabolism, iron metabolism, purine synthesis and DNA repair. Although, this role of frataxin is currently widely accepted among the FRDA community, some experimental evidences have questioned the real impact of frataxin’s function in ISC biosynthesis on the neurobiology of the disease. Indeed, molecular, and physiological defects have been reported in FRDA models even when deficits in mitochondrial ISC are still undetectable or absent [16–18]. Similarly, recovery of ISC formation without restoring frataxin levels has been recently described [19]. Moreover, frataxin has been suggested to participate in other crucial cellular processes such as controlling cellular iron homeostasis as an iron-storage protein [20], interacting with the electron transport chain to regulate oxidative phosphorylation (OXPHOS) [21,22], delivering ferrous iron to ferrochelatase for heme biosynthesis [23] and reactivating aconitase [24]. More recently, a role for frataxin in calcium homeostasis has been proposed as a key element for the pathobiology of the disease [25–28]. Therefore, the biological function of frataxin still remains largely obscure.

2. The Clinical Spectrum of FRDA

In 1863, Nikolaus Friedreich described a disease characterized by a “degenerative atrophy of the posterior columns of the spinal cord”. Clinically, Friedreich recognized the main features of the disease: Ataxia, sensory neuropathy, scoliosis, foot deformity, and cardiomyopathy [29]. In 1996, with the discovery of the underlying genetic cause of the disease, the clinical spectrum was expanded [30].

The typical age of symptom onset in FRDA is between 10 and 15 years. Initial symptoms are gait instability and clumsiness, but patients also develop trunk and limb ataxia, which difficult daily activities. Confinement in a wheelchair is required after approximately 11–15 years from disease onset [7,31]. The progression of the disease is different between individuals. Faster progression is associated with earlier symptom onset. Late-onset FRDA (first symptoms after 25 years) and very late-onset FRDA (first symptoms after 40 years) are atypical phenotypes of the disease with a slower progression [32]. Average age at death was reported to be 36.5 years (range 12–87), being cardiac dysfunction the most frequent cause of death (59%) [33].

The severity of the disease has been measured by means of different clinical rating scales. The International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS; [34]) was initially used but in 2005 a report evaluated the true ability of this scale to quantify the severity of FRDA. This report did recommend to use only the total ICARS score and to abandon the subscales [35]. Because of this, two other scales, the Friedreich Ataxia Rating Scale (FARS; [36]) and the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA; [37]) were established. More recently a modified version of FARS (mFARS), in which some items have been suppressed and the focus falls on functional abilities of the patients, has been developed [38] and endorsed by a recent study with more than thousand participants [39].

2.1. Neurological Features

The wide neurological pathology of FRDA is due to alterations in both the central and peripheral nervous system. Ataxia, the most common symptom in FRDA, occurs because of spinocerebellar degeneration, peripheral sensory neuropathy, and cerebellar and vestibular pathology [40]. The dorsal root ganglia (DRG) are particularly affected in FRDA, showing a smaller size of its neurons and a proliferation of satellite cells. In dorsal roots, there is an atrophy of large, myelinated fibers, whereas many thin myelinated axons remained [41]. Severe changes are present in sensory

ANEXOS

peripheral nerves, producing sensorial neuropathy and posterior column loss with severely reduced or completely absent sensory action potentials [42,43]. It is still unclear whether this peripheral neuropathy is a primary effect of the disease or the result of the lesion in DRG [44]. Consequently, the proprioception is impaired in the patients. The perception of the position, vibration, temperature, pain, and light touch are reduced or lost. Reflexes are absent, particularly in the lower limbs, reflecting the underlying peripheral neuropathy. The progressive degeneration of pyramidal tracts leads to muscular weakness and hypotonia, which suggest that motor nerves are also involved in FRDA [45]. Patients usually show Babinski sign (extensor plant response) and, a lower percentage, also exhibit spasticity [41], that can in turn cause pain, contractures and spasms. The major lesion of the central nervous system is the atrophy of the dentate nucleus in the cerebellum, which occurs as the disease progresses. Large nerve cells disappear, and GABAergic and glutamatergic motor control are lost. Atrophy of the dorsal nuclei of Clarke blocks transmission of spinocerebellar input to the cerebellar hemispheres [46]. Significant grey and white matter in the deep cerebellar nuclei and brainstem are also reduced, according to magnetic resonance imaging and morphometry studies [47,48]. Dysarthria is another primary symptom in FRDA, which is directly related to cerebellar lesions. In advanced stages of the disease, speech becomes unintelligible [49] and FRDA patients start to present a poor capacity in concept formation and visuospatial reasoning [50].

Patients can also present hearing difficulties, due to impaired neural conduction in the central auditory pathways [51]. Visual system is involved in FRDA too, with optic nerve involvement, abnormal visual evoked potentials (P-VEPs) and reduced retinal nerve fiber layer thickness [52]. Fixation instability with square-wave jerks (SWJs) is the main oculomotor feature and less frequently nystagmus and saccadic intrusions. Dysphagia is problematic in advanced stages, requiring gastrostomy feeding in some

cases. Aspiration pneumonia, related to dysphagia, is an important cause of death [53].

2.2. Non-Neurological Features

Although FRDA is described as a neurological disorder, it should be mentioned that cardiomyopathy is the main cause of death in FRDA, and it is present in a vast majority of the patients. The analysis of 205 patients with different cardiac imaging approaches revealed that neurological scales are unable to predict the severity of cardiac conditions and that age of onset is strongly related to the level of cardiac dysfunction [54]. This aspect has been confirmed in other independent studies. For example, Tsou and coworkers also found that when cardiac dysfunction is the cause of death, those patients displayed hypertrophic traits in earlier stages of the disease course [36]. A main feature of cardiomyopathy in FRDA is chronic myocarditis. Patients show inflammatory cells in the endomysium, attachment of monocytes to cardiomyocytes, and necrosis of heart fibers [55]. Cardiac wall abnormalities, like left ventricular hypertrophy, are also present in most patients, although the ejection fraction is usually preserved [56]. The electrocardiogram is abnormal in almost all cases, with T-wave inversion or flattening in lateral or inferior leads, and ST-segment alterations [57]. Supraventricular tachyarrhythmias can appear in advanced stages of the disease. Among them, atrial fibrillation is the most common and its presence has negative prognostic implications [58]. Furthermore, patients with FRDA have an increased risk of developing diabetes mellitus and glucose intolerance. Diabetes usually appears many years after the first symptoms of FRDA. The mechanism underlying diabetes may be due to a combination of both insulin resistance and insulin deficiency, secondary to pancreatic β -cell apoptosis [59,60]. Moreover, patients show abdominal fatness which correlates with β -cell dysfunctions. Lipogenesis is suggested to be increased in FRDA contributing to insulin resistance [61] that along with the reduced physical activity of the patients can promote metabolic syndrome [62]. Scoliosis is another typical feature

for FRDA. Foot abnormalities are also common, especially *pes cavus* and *talipes equinovarus*, which worsen stability and mobility [63].

3. Oxidative Stress Markers in FRDA Patients and Models

Oxidative stress was linked to FRDA since the initial molecular studies. The identification of iron deposits in the cardiomyocytes from patients [12,64] and the well-known redox biology of iron via the Fenton reaction [65] were the first elements suggesting such an intimate relation. In this reaction, reduced Fe^{2+} reacts with hydrogen peroxide (H_2O_2) to produce oxidized Fe^{3+} and the hydroxyl radical $\text{HO}\cdot$. In addition, other reactive oxygen species (ROS), such as superoxide (O_2^-) are produced under physiological conditions due to a leakage during the transport of electrons in the respiration process. Therefore, in the context of FRDA, we encounter a situation in which a defective ISC biosynthesis leads to an altered electron transport chain and abnormal OXPHOS activities. These defects increment electron leakage that along with the concomitant surplus of free iron in the mitochondria further contributes to increase ROS levels [66] even in those tissues that display altered metal regulation but no metal accumulations (reviewed in [67]). In agreement, increased levels of malondialdehyde [68] (a lipid peroxidation product), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine [69] (an indicator of oxidized DNA) and higher glutathione transferase activity [70] have been found *in vivo* in blood samples from patients. Furthermore, additional evidences indicate that frataxin-deficient cells are also unable to recruit antioxidant defenses to counteract ROS effects, which in turn enhances their sensitivity to oxidative stress [71,72]. Oxidative stress effects have been also associated to several other phenotypes observed in FRDA models such as impaired cytoskeletal dynamics [73], abnormal calcium homeostasis, lipid peroxidation [74], and apoptosis [28].

4. Reducing Oxidative Stress as a Therapeutic Avenue to Stop FRDA Progression

The current therapeutic strategies in FRDA can be classified in two main groups, those focused on increasing FXN levels and those focused on alleviating the consequences of frataxin loss. Some of them might belong to both categories (See Table 1, Table S1 and Figure 1 for further information). In this work, we will present an overview of the therapeutic avenues that directly or indirectly aim to mitigate the oxidative stress in frataxin models as well as in patients to improve their conditions and wellbeing. As shown in Table 1, these treatments include antioxidants, iron chelators and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1- α) modulators. Remarkably, they represent the majority (60%) of all current strategies (when comparing Table 1 and Table S1).

4.1. ROS Scavengers

4.1.1. Coenzyme Q₁₀ and Idebenone

Coenzyme Q₁₀ or ubiquinone is a small lipophilic molecule located in the inner mitochondrial membrane that exerts antioxidant properties as free radical scavenger, preventing the oxidation of cellular structures and maintaining other antioxidant molecules such as vitamins C and E [97,98]. Ubiquinone or its derivatives have showed positive effects when applied to fibroblasts from FRDA patients [99].

Almost 20 years ago, an open-label study enrolling 10 FRDA patients was conducted to assess the influence of Coenzyme Q₁₀-Vitamin E as antioxidant combined therapy. The outcome parameters included ICARS evaluation and echocardiography. After six months, participants did not show consistent clinical benefits [100]. Authors observed signs of bioenergetic improvement and attributed the short period of study as the reason for the lack of effects, so they continued monitoring the same patients. This long-term longitudinal follow-up study evaluated whether the improvements were sustained for 47 months with the same treatment. There were significant improvements in cardiac and skeletal muscle bioenergetics compared to cross-sectional data from 77 FRDA subjects.

ANEXOS

Although the posture and gait symptoms continued declining, the ICARS score remained unchanged [101]. A few years later, the same group addressed a double-blind randomized trial in 50 FRDA patients for 2 years. Participants were divided in high-and low-dose groups of coenzyme Q₁₀-Vitamin E combined therapy. Interestingly, 49% of the patients who completed the study (21 of 43) showed slower degeneration and clinical improvement leading to an increased ICARS score independently of the doses taken. A closer look into the data highlighted a strong correlation between efficacy of the therapy and decreased baseline Coenzyme Q₁₀ and vitamin E levels [102].

Idebenone is a structural analogue of coenzyme Q₁₀ with lower molecular weight and improved water solubility, which enhances bioavailability. This compound exhibits antioxidant properties as ROS scavenger, lipid peroxidation inhibitor and supports mitochondrial function through the transport of electrons within the mitochondrial respiratory chain, thus increasing ATP production [103]. Interestingly, it has been able to improve longevity, locomotion, and aconitase activity in a fly model of FRDA [104] and delay cardiac phenotypes in a mouse model of the disease [105].

The first preliminary clinical study with idebenone performed 20 years ago showed promising improvements of the cardiac outcome in three FRDA patients [106]. Numerous studies followed over the next decade in order to evaluate the effects of idebenone in additional cohorts of FRDA patients. Although, most of them reported cardiac improvements, the results obtained after the analysis of neurological parameters were highly variable (see [75] for further information). Furthermore, four randomized placebo-controlled phase-III clinical trials (NICOSIA, IONIA, MICONOS, and PROTI) did not obtain remarkable evidences on the neurological or cardiac function of idebenone in different groups of FRDA participants [107–111]. Despite these inconclusive results, many FRDA patients are currently using both coenzyme Q₁₀ and idebenone as a nutraceutical supplements due to its well tolerance and reduced side effects [112].

4.1.2. A0001

A0001 or alpha-tocopherol quinone is a synthetic compound, similar to Coenzyme Q₁₀ and idebenone, with enhanced redox potential. It is expected to alleviate mitochondrial oxidative stress, protect against lipid peroxidation and promote electron transfer to the respiratory complex [113].

Forty-five participants were enrolled in a double-blind placebo-controlled clinical trial with two doses of A0001 (see Table 1). This compound proved well tolerance and no major adverse effects were detected. Primary clinical outcomes included glucose-handling measures but did not show major differences for any of the groups. Importantly, FARS score improved significantly in a dose-dependent manner, specifically, 4 points above the placebo group [76]. There are no additional studies related to A0001 despite these encouraging results [16].

4.1.3. EGb-761

EGb-761 is a Ginkgo biloba extract that has been widely used in Alzheimer's disease. Despite its neuroprotective effects described in *in vitro* and *in vivo* Alzheimer models, EGb-761 failed to show any substantial benefits in patients, leading to controversy [114]. A phase II, randomized, placebo-controlled double-blind study evaluated the efficacy of EGb-761 in 22 FRDA participants. However, no major differences were found between both groups. Authors claimed the number of individuals was not sufficient to perform the statistical analysis, therefore the study was dismissed [78].

4.1.4. VP-20629

Indole-3-propionic acid or VP-20629 (also known as SHP622, OXIGON, or OX1) is present in human plasma and cerebrospinal fluid as a result of tryptophan metabolism by gut microbiota. It has demonstrated a potent hydroxyl radical-scavenging activity, mitigating lipid peroxidation and exerting neuroprotective properties in cellular and animal models of

ischemia and Alzheimer's disease [115,116]. Although VP-20629 was initially developed as a treatment for Alzheimer's disease due to its ability to inhibit beta-amyloid fibril formation [117], a multicenter randomized, double-blind placebo-controlled phase I trial enrolled 46 FRDA participants to evaluate its safety and tolerability. While all doses administered (see Table 1) were well tolerated and minor adverse events were reported, this compound failed to exert major benefits [77].

4.1.5. (+)-Epicatechin

Catechins are polyphenolic flavonoids found in fruits, red wine and cocoa whose mechanisms of action exert either direct or indirect antioxidant effects. These compounds act as ROS scavengers, metal ion chelators and promote the activity of antioxidant enzymes, also inhibiting pro-oxidants ones. In vitro studies performed with catechins revealed a protective role in neurons from oxidative stress and the promotion of mitochondrial function (reviewed in [118]). These results suggested that catechins might have potential benefits in reducing neurodegenerative processes.

An open-label study was conducted to evaluate the safety and efficacy of (+)-Epicatechin in 10 FRDA participants for 24 weeks. Primary outcome measures included changes from baseline in FARS score and changes in ventricular hypertrophy. The results have been recently published and indicate that the drug was well tolerated and was able to improve the mean left ventricle ejection fraction as a readout of cardiac function. However, no improvements of FARS/mFARS scores were observed [79].

4.1.6. Thiamine

Thiamine (vitamin B1) is a specific cofactor of many enzymes involved in the energetic metabolism and also plays a non-cofactor role as ROS scavenger. Thiamine deficiency results in severe neurological alterations in the central and peripheral nervous system [119]. Molecular and clinical alterations of thiamine deficiency, such as impaired oxidative metabolism, increased oxidative stress and selective neuronal loss, are similar to those described in FRDA [120]. In addition, significative decreased levels of

thiamine were measured in the cerebrospinal fluid of FRDA patients [121,122]. An open-label trial evaluated the influence of thiamine in 34 FRDA patients and reported significant SARA score improvements and recovery of swallowing difficulties, tendon reflexes and interventricular septum thickness. Despite these results, the absence of a placebo group and further studies about the role of thiamine in FRDA led to discard this compound as therapeutic candidate [80].

4.2. Promotion of Antioxidant Response

4.2.1. NRF2 Inducers

The NRF2 is a transcription factor responsible for the expression of antioxidant enzymes that share a common promoter sequence called the antioxidant response element (ARE). For this reason, NRF2 is considered a master regulator of the antioxidant response. Under homeostatic/physiological conditions, NRF2 is located in the cytoplasm where it is regulated by its inhibitor Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1). KEAP1 works as an adapter for CUL3/RBX1-mediated degradation of NRF2 via proteasome. Under oxidative stress conditions, NRF2 is stabilized and translocates to the nucleus, where activates the transcription of ARE-containing genes, maintaining a correct redox state in the cell (for further information about the regulation of NRF2 see [123,124]).

Elevated levels of KEAP1 have been observed in FRDA models, which in turn increases NRF2 ubiquitination and its subsequent degradation [125]. In addition to reduced levels of functional NRF2, other authors have observed an impairment of its translocation to the nucleus in response to oxidative stress [72,126] with some exceptions [127]. It is likely that abnormalities in the actin filaments participate in the mechanism affecting the subcellular distribution of NRF2 [72,128]. Accordingly, the expression of numerous cytoprotective genes is decreased and the antioxidant response is compromised, enhancing cellular hypersensitivity to oxidative insults. Moreover, NRF2 has been described to regulate mitochondrial

ANEXOS

biogenesis [129]. In agreement, reduced NRF2 levels also result in imbalanced mitochondrial potential membrane, ATP production and respiration in frataxin-deficient cells [130].

Omaveloxolone

Omaveloxolone or RTA-408 is a small molecule that activates NRF2 function [131] and modifies the inhibitory action of KEAP1 over NRF2 (reviewed in [132]). Compared to the finite potential of other antioxidants, this compound is capable of activating antioxidant defenses as well as mitochondrial bioenergetics. Abeti and coworkers reported encouraging benefits of omaveloxolone in different *in vitro* FRDA models, reverting the pathological phenotype by reducing lipid peroxidation, mitochondrial ROS production and preventing oxidative-stress induced cell death [133]. Omaveloxolone was assessed in a two-part multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial designated MOXIE. The first part of the study, revealed well tolerance, mild adverse effects and dose-dependent improvements in the mFARS score [81]. The second part includes a parallel group study to evaluate the safety and efficacy of 150 mg of omaveloxolone [82]. Although results are still pending publication after a peer reviewed process, the pharmaceutical company that sponsors this trial announced that omaveloxolone significantly improved the mFARS score after 48 weeks of treatment. Remarkably, this is the first study in FRDA to achieve its primary endpoint [83]. Now the company will proceed with the necessary steps for marketing approval.

Resveratrol

Resveratrol is a polyphenolic phytoalexin found in several plant species that exerts antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and neuroprotective properties. This versatile molecule participates in a wide variety of cellular processes, including the activation of the NRF2, PGC1- α and NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 (SIRT1), thus promoting mitochondrial biogenesis and antioxidant defenses [134].

Li *et al.* reported that resveratrol significantly promoted frataxin expression in HeLa cells, lymphoblasts from FRDA patients and mouse brain from the YG8R FRDA model [135]. Similar results were observed in a second study that used fibroblasts derived from patients [136]. However, when the authors explored the sensitivity to resveratrol in patient-derived induced pluripotent stem cells differentiated into mesenchymal and neuronal cells, they detected mild or no effect, respectively [136]. Due to these cell-specific responses, authors described resveratrol as a non-appropriate treatment for the disease. In agreement, an open-label clinical trial that evaluated two doses of resveratrol (low and high, see Table 1) in 27 participants for 12 weeks also showed that frataxin levels in peripheral blood mononuclear cells remained unchanged in both groups. Interestingly, the high-dose resveratrol treatment was able to decrease the lipid peroxidation biomarker F₂-Isoprostane. Also, FARS and ICARS scores showed improvements, especially in neurological features. Unfortunately, frequent gastrointestinal side effects were observed in the group of patients treated with high-dose resveratrol. As a result, the authors highlighted the necessity of enhancing tolerability and bioavailability of the compound [84]. In this line, a double-blind, randomized placebo-controlled crossover clinical trial is currently ongoing to assess the efficacy of a micronized resveratrol. The primary outcome measures will include the mFARS scale [85].

4.2.2. Mitochondrial Metabolism

Metabolic perturbations due to reduced frataxin levels have been described in the FRDA literature [60,74,137–142]. Several downstream pathways such as β -oxidation of lipids, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) signaling, lipogenesis via upregulation of the sterol-responsive element-binding protein 1 (SREBP1) or inhibition of the mitochondrial NAD⁺-dependent deacetylase sirtuin-3 (SIRT3) [142–144] have been proposed as contributors, but molecular mechanisms still need to be fully elucidated.

Pioglitazone and Leriglitazone

PGC-1 α is a transcriptional regulator that plays a main role in mitochondrial biogenesis and energy homeostasis. It is strongly induced at the transcriptional level by factors such as cold exposure, exercise and cytokines produced by stress conditions, glucagon or catecholamines through the PKA, p38 MAPK, cAMP, and calcineurin pathways [145]. PGC-1 α is then recruited to modulate the expression of several genes involved in metabolic pathways including nuclear respiratory factors (NRFs) or peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) [146]. PPAR- γ is a hormone nuclear receptor whose activation depends on PGC-1 α binding. PPAR- γ activation is related to glucose homeostasis, lipid storage, fatty acid oxidation or differentiation of adipocytes in brown adipose tissue [147].

A microarray analysis of skeletal muscle and liver from frataxin-depleted mice revealed reduced activity of PGC-1 α . PGC-1 α expression as well as the levels of PPAR- γ were corroborated in a myoblast model, in a second mouse model and cells derived from FRDA patients. Interestingly, downregulation of this pathway further affects frataxin expression due to a feedback loop [61]. PGC-1 α down-regulation is associated to impaired mitochondrial biogenesis and fatty acid β -oxidation, which may lead to the accumulation of lipids and, ultimately, insulin resistance [148]. Furthermore, reduced expression of PGC-1 α has been also related to lower levels of antioxidant enzymes such as of superoxide dismutase 2 (SOD2) in neurodegeneration models [149] including FRDA [150], thus decreasing the cellular ability to control oxidative stress. Because of this, PPAR- γ agonists, like thiazolidinediones (TZDs), have been proposed as a treatment for FRDA. Remarkably, they have been shown to promote mitochondrial biogenesis, antioxidant defense and neuronal survival, and reduce inflammation in many model systems [151]. Although TZDs have been mainly used as antidiabetic drugs [152], they are currently being tested as a treatment for neurodegenerative diseases such Alzheimer, Parkinson, or Huntington's disease [151].

Pioglitazone is a PPAR γ agonist that significantly increased the antioxidant response in fibroblasts from patients and in the knock-in/knock out (KIKO) FRDA mouse model by promoting the expression of SOD2 and PGC-1 α [150]. A prospective, randomized, double-blind clinical trial was conducted with the objective of exploring the effects of pioglitazone over neurological defects. The study was completed in 2013, but unfortunately the results are not yet available [86], which might suggest a lack of efficacy of this molecule. Leriglitazone or MIN-102 is a selective metabolite of pioglitazone indicated for diseases of the central nervous system. This compound increases DRG neurons survival, mitochondrial biogenesis, and bioenergetics and reduce oxidative stress and inflammation in the KIKO and YG8sR mice and fibroblasts from FRDA patients [153,154]. The FRAMES clinical study has recently started with 36 FRDA patients. It is a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial that will evaluate the effects of MIN-102 on biochemical, imaging, neurophysiological, and clinical markers [87]. Although no results are already available from the clinical trials with this couple of TZDs, it is important to mention that they might exacerbate the cardiovascular problems in FRDA patients as suggested from their ability to reduce cardiac fast fibers or to induce a thrombotic response [155].

Acetyl-L-Carnitine

Acetyl-L-carnitine (ALCAR) is an enhanced version of L-carnitine since the inclusion of the acetyl group increases water solubility and bioavailability. It is a mitochondrial cofactor considered as a good candidate for neuroprotective therapies in several clinical trials. It provides essential chemical groups for energy metabolism and has demonstrated anti-inflammatory and antioxidant properties [156]. This family of compounds was firstly assessed more than a decade ago in 16 FRDA patients with the aim to enhance mitochondrial energy imbalance. This was a double-blind, placebo-controlled, crossover trial that tested a combined therapy of L-carnitine and creatine. Although both compounds were well tolerated, there was no positive impact in FARS score and

echocardiographic data in the treated group compared to the placebo group [88]. An open-label trial using the improved version ALCAR was conducted few years ago including cardiovascular outcome measurements. However, results are not yet available [89].

4.3. Counteracting ROS Production

4.3.1. Iron Chelators

As already stated before, the potential role of frataxin as an activator of mitochondrial ISC biogenesis might underlie the iron accumulation in the mitochondria upon frataxin deficiency. This is considered one of the hallmarks of FRDA and a pivotal pathogenic consequence of frataxin depletion. The loss of iron homeostasis in patient's samples and FRDA models is not only reflected as the presence of iron deposits [12,157–159]. It can be also observed as alterations in the iron content or iron redistribution [67]. Other evidences such as changes in the expression of iron related proteins support an iron dyshomeostasis that would result in its accumulation in the mitochondria along with a concomitant depletion in the cytoplasm [18,160–162]. However, lack of alterations in the iron levels are also found in the literature [31,163–166]. This unexpected and significant variability of data among patients and models questions the true relevance of the accumulation of iron in the development and in the timing of either the cardiac or the neurological manifestations of the disorder.

Cellular iron can be found in its reduced (Fe^{2+}) or in its oxidized (Fe^{3+}) form and most of it is stored or bound as a prosthetic group to different proteins. However, a small proportion of less than 5% is found in the redox-active iron labile pool [167]. An increase in the amount of this free redox-active iron in FRDA is especially relevant, since it can generate highly toxic ROS via the Fenton and Haber–Weiss reaction [168]. Among all ROS, hydroxyl radicals are highly reactive, more than superoxide radicals or hydrogen peroxide. Furthermore, such radicals can damage proteins, lipids, and DNA through oxidation. Finally, Fe^{3+} is reduced back to Fe^{2+}

by the superoxide radical O_2^- produced mainly in the mitochondria. Despite the toxic outcomes derived from this iron dyshomeostasis, the number of therapeutically approaches aimed to improve it has been scarce being deferiprone the most relevant compound tested.

Deferiprone

Deferiprone is a lipid-soluble membrane-permeable iron chelator which can cross the blood-brain barrier and cellular membranes. It has been successfully used to treat iron overload in hemoglobinopathies [169]. Remarkably, it is capable of reaching mitochondrial iron deposits in all tissues including nervous system [170,171]. This chelator also has low affinity for iron and can transfer it to transferrin and to other cellular acceptors [172]. All these properties confer deferiprone promising therapeutic characteristics as a candidate compound for FRDA, since it removes iron surplus without inducing iron depletion [173].

An *in vitro* assay performed with frataxin-depleted cells demonstrated deferiprone reduced energetic defects and slowed oxidative destruction of ISC [174]. In agreement, Soriano et al reported improvement of longevity and motor abilities in a frataxin-deficient model of *Drosophila melanogaster* due to deferiprone treatment [104]. Several clinical trials have been conducted regarding deferiprone assessment in FRDA, without consistent outcomes. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial assessed the safety, tolerability and efficacy of three doses of deferiprone (20, 40, and 60 mg/kg/day). The highest dose was removed because of adverse effects that worsened ataxia in two patients. Interestingly, FARS score was stabilized in the lowest dose and worsened in the intermediate and significant improvements were reported in cardiac hypertrophy with 20 and 40 mg/kg/day [90]. An open-label single-arm study enrolled 20 patients to evaluate a combined therapy of idebenone and deferiprone for six months. No outstanding effects were found in ICARS score, but echocardiographic parameters showed significant differences again. Patients experienced mild adverse effects and two of them presented

reversible neutropenia restored after drug withdrawal [91]. A triple-combined therapy was implemented in an open-label study evaluating the efficacy of deferiprone, idebenone, and rivoflavin. There were inconclusive results concerning neurological and cardiological measurements in addition to deferiprone-related adverse effects [92]. The absence of neurological improvement highlights the necessity of further investigations to reevaluate deferiprone as a therapeutic molecule for FRDA. It is possible that the ability of deferiprone to target aconitase activity in controls and FRDA cells [175] may contribute to the outcome of the clinical trials using this compound.

4.3.2. Lipid Metabolism

A recent study in isolated platelets from FRDA patients has reported an increased lipid metabolism which strongly supports a metabolic switch in the patients [138]. Such a switch might precede other deregulations in lipid uptake, synthesis, storage, and utilization. Indeed, alterations in lipid metabolism, mostly linked to accumulations, have also been observed in mouse [141], cultured cells [142], *D. melanogaster* [74], and *Caenorhabditis elegans* [176]. On the other hand, studies from patient autopsies or plasma samples showed contradictory results regarding changes in total cholesterol, triacylglycerides, and fatty acids profiles [177,178]. Alterations of lipid metabolism might represent a critical issue in FRDA because fatty acids are extremely sensitive to oxidative modification, resulting in the formation of lipid peroxides, which are highly cytotoxic and promote damage to other lipids, proteins and DNA [179]. Moreover, the oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) leads to the generation of lipid peroxide breakdown products that can act as signals in this kind of cell death [180]. Indeed, frataxin-deficient cells and models also display increased levels of markers of lipid peroxidation [68,74,106,181,182]. In agreement, scavengers of lipid peroxides have been shown to improve frataxin-deficient conditions [74,182]. These evidences suggest lipid metabolism as a primary target of frataxin deficiency and place lipids as central elements in the pathology of FRDA.

Lipid peroxidation and the mitochondrial iron accumulation converge as hallmarks of a newly described form of regulated cell death named ferroptosis [183]. Ferroptosis is associated with a reduction in the detoxification of lipid peroxides by the glutathione peroxidase 4 (GPX4), being the peroxidation of PUFAs a main factor in this process of cell death [184]. Depletion of GSH or imbalance in the oxidized/reduced glutathione (GSSG/GSH) pools have been observed in some FRDA models [127,185–188] and patients [189]. Importantly, GPX4 requires GSH for its lipid repair function, reducing GSH to GSSG to reduce lipid hydroperoxides [190]. In agreement, depletion of GSH and loss of GPX4 activity results in accumulation of lipid peroxides and ferroptosis [191]. Furthermore, GSH can bind Fe^{2+} in the labile iron pool to prevent its oxidation and the production of the hydroxyl radical [192] and the subsequent lipid peroxides through the production of ROS in the Fenton reaction [184]. Ferroptosis is strongly linked with several types of cancer but also seems to be a pivotal element in some neurodegenerative disorders [193]. Different *in vitro* and *in vivo* FRDA models displayed increased sensibility to this form of cell death and ferroptosis inhibitors such as SRS11-92 and Fer-1 successfully protected FRDA cells against toxic iron concentrations or oxidative insults. This data suggests that such inhibitors might also induce clinical benefits [194]. Remarkably, the known roles of frataxin in iron metabolism and mitochondrial activity suggest that frataxin is instrumental in the regulation of ferroptosis [195].

EPI-743

Iron can promote ferroptosis as part of the catalytic subunit of iron-dependent lipoxygenases that catalyze the oxidation of fatty acids [196]. In this sense, different iron chelators such as deferoxamine or the knockdown of the iron importer transferrin receptor 1 are able to counteract the induction of ferroptosis by erastin or RSL3 [183,197,198]. EPI-743 or α -tocotrienol quinone is a novel redox therapy that inhibits 15-lipoxygenase activity, a key regulator of inflammation, oxidative stress and ferroptosis [199]. In comparison, EPI-743 exerts from 1000 to 10,000-fold

ANEXOS

antioxidant potential in vitro over coenzyme Q₁₀, idebenone or resveratrol [200].

An open-label study reported the impact of EPI-743 in patients suffering from different inherited mitochondrial diseases, including FRDA. The only FRDA participant, a 17 years-old female, showed improvements in the brain redox state, speech, sight and motor skills throughout the treatment [201]. Following this single result, a double-blind, multicenter trial assessed two doses of EPI-743 in FRDA participants (see Table 1). The study consisted of a 6-month placebo-controlled phase followed by an 18-month open-label phase. As visual loss is a frequent clinical symptom in FRDA patients, retinal nerve fiber layer thickness was included in the primary outcome measurements. The compound demonstrated well tolerance and safety in most patients, without several adverse effects reported. While there were no clinical improvements in sight measurements or echocardiography at 6 months, significant differences in the FARS score were found in the high-dose group compared to the placebo. Thus, patients received high dose of EPI-743 for the second phase of the study. The progression of the disease decelerated when compared with the natural history of the disease at 24 months, thus indicating significant improvements in neurological function [93]. The pharmaceutical company in charge of this compound includes EPI-743 (now PCT-743) in its pipeline for this year. Registration for a trial in FRDA seems to be still planned for 2020 [94].

Deuterated Fatty Acids: RT001

PUFAs are essential fatty acids required for the structure of cell membranes. Several studies have demonstrated that they display anti-inflammatory properties and beneficial effects reducing mitochondrial dysfunction, ROS production and endoplasmic reticulum (ER) stress [202]. However, PUFAs contain carbon-hydrogen bonds prone to be cleaved by ROS, creating a type of ROS that reacts with more PUFAs resulting in a chain reaction that damages cell membranes [179].

Cotticelli *et al.* described promising effects of linoleic and deuterated α -linolenic acids over oxidative-stress challenged FRDA cell models. The replacement of hydrogen (^1H) with the isotope deuterium (^2H) strengthens the structure, reducing toxicity and increasing the resistance to lipid peroxidation [203]. Remarkably, deuterated PUFAs (dPUFAs) prevented cell death and lipid peroxidation in fibroblasts from the KIKO and YG8R mouse models [182], paving the way for a clinical test. RT001 (Retrotope) is a deuterated homologue of linoleic acid assessed in a double-blind, placebo controlled clinical study which enrolled 18 FRDA participants for 28 days. This compound proved to be safe and well tolerated (see Table 1). Cardiopulmonary exercise testing showed improvements in the RT001 group compared to placebo one, as well as modest tendencies of neurological recovery [95]. These encouraging results led to further investigations. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial focused on the assessment of RT001 is currently recruiting FRDA patients. Outcome measures will include cardiopulmonary exercise testing and mFARS score [96].

5. Discussion and Conclusions

In this review, we have aimed to provide an overall and comprehensive view of the long-lived strategy of combating oxidative stress as an approach to cure or at least slow down the progression of FRDA. We reviewed 35 clinical trials that tested 15 drugs with different characteristics, including antioxidant properties. Unfortunately, the results in many cases have not been published, and thus it is difficult to assess whether the negative outcome of the trial was more related to the experimental design or to the intrinsic properties of the chemical compounds. Remarkably, five compounds have reached phase III in clinical trials. This represents a 14%, which is in the expected **success rate** when compared to a recent study from Massachusetts Institute of Technology that analyzed 21,000 compounds in different disease groups from 2005 until 2015 [204].

ANEXOS

Clinical trials in FRDA have to deal with the handicap that FRDA is a rare disease. This hampers the possibility to recruit a number of patients large enough to distribute them in homogeneous groups which in turn has a tremendous impact in the statistical analysis of the results. Another limitation is, in our opinion, the lack of a standardized methodology of data collection in all these clinical trials that compromises the correct compilation of natural histories of patients and their comparison. In addition, the influence of epigenetic and environmental factors in the progression of the pathology further impact on the capability to define the natural histories of patients. The development and consensus of new scales such as SARA [205] and mFARS [39], together with the generation of patient records containing comprehensive clinic and epidemiologic information is essential but results are still limited and dispersed. All these aspects hinder the proper classification of patients for the design and analysis of clinical tests. Overcoming these limitations seems pivotal to reveal whether the treatments display positive impact in FRDA patients with specific features, such as the stage of disease progression, a given length of the GAA repeat expansion, age of onset, and levels of specific metabolites (biomarkers). This approach will facilitate the way to a personalized pharmacological treatment. The need of such a customized process is clearly emphasized by one of the trials performed with the combination of coenzyme Q₁₀-Vitamin E. In this trial, the treatment only had a positive influence in patients displaying low endogenous levels of both molecules in blood samples [102]. Another difficulty is driven by the fact that FRDA is a disorder with a relatively slow but relentlessly progression. This might indicate that the molecular consequences of frataxin-deficiency also accumulate in the cell in a very gradual manner and therefore, the reversal process that might be triggered by the treatments follows the same trend. This will prevent the detection of clinical benefits during the short period of clinical trials.

Identification of easy-to-monitor surrogate end-point measures and disease biomarkers that accurately parallel the natural history of the disease is the

cornerstone to design solid clinical trials in which patients will be grouped in a more precise manner. In this sense, some progress is being made with surrogate tissues such as lymphoblasts to quantify expression levels of given mRNA or miRNA as potential markers [206–208] and platelets to monitor accurate frataxin levels or glucose/lipid metabolic disturbances in controls and patients [138,209]. However, these studies are based on cell types that might be not relevant to analyze neuronal features that are monitored in the clinical scales. In order to bypass this problem, Gino Cortopassi's team have compared the transcriptomic signatures of lymphoblasts and fibroblasts from patients with RNA-seq data from murine frataxin-deficient DRG neurons [210]. This approach allowed the identification in all 3 cell types of common alterations, that might become future biomarkers, in genes involved in mitochondrial stress, apoptosis, oxidative stress, and selenium metabolism. Paula Giunti's group opted for directly analyzing the presence of nervous system derived proteins in body fluids [211]. They found increased levels of plasma neurofilament-light chain and glial fibrillary acidic protein suggesting neuronal degeneration and glial activation. All these findings might be of high relevance for a multisystemic disease such as FRDA. We think that clinical trials should also embrace the same comprehensive view of the disease that the basic research is trying to achieve. Imaging systems might be a good and complementary approach to evaluate the progression of the disease and the response to therapies in sensitive FRDA tissues such as heart and central nervous system (reviewed in [212]). Although more expensive and less available to clinicians than serum biomarkers, imaging approaches will allow to follow the evolution of structural changes. These approaches comprise, among other methodologies, diffusion tractography of white matter, fiber tractography by diffusion tensor imaging, epidermal nerve fiber density via skin biopsies, and corticokinematic coherence using magnetoencephalography, myocardial perfusion reserve with cardiac magnetic resonance imaging, and heart bioenergetic via cardiac magnetic resonance spectroscopy, as well as changes in metabolites (*N*-acetylaspartate (tNAA), myo-inositol and iron).

ANEXOS

Nevertheless, it is striking that many treatments aimed to counteract the burden of oxidative stress, one of the best-described downstream consequences of frataxin deficiency, are generating such poor results. Although it is well documented that loss of frataxin leads to an increased in oxidative stress markers, several studies using the same model systems failed to detect the boost in ROS (reviewed in [213]). Remarkably, another phenotype conserved in yeast, flies and mammalian cellular models is the hypersensitivity of frataxin-deficient cells to oxidative stress [214–216], likely due to their inability to handle oxidative insults as already described in this review. It is possible that this alternative view of the oxidative stress problem in FRDA points towards a better route to discover promising therapies. Indeed, most of the trials that have been completed without a clear positive impact on patient wellbeing, involved drugs that aim to reduce ROS production. Importantly, the trials that are based on drugs focused on improving the ability of frataxin-deficient cells to deal with oxidative stress are still ongoing (Table 1) and results will be very informative to evaluate this hypothesis and to design new treatments. Furthermore, there are still some interesting options to test in future clinical trials. For example, dimethyl fumarate is the most successful NRF2 activator up to date and it might be of interest according to results in FRDA models [217].

6. Future Directions and Prospects

The discouraging results obtained in the clinical trials using drugs that exert direct or indirect effects on the cellular redox status might indicate that there are other pathological elements at play that are not targeted by these therapies. Additional pathways have been suggested to be involved in the molecular pathology of FRDA. ER stress, calcium-dependent mitochondrial dysfunction, metal metabolism beyond Fenton reaction and hypoxic response are cellular processes strongly related to the iron metabolism and the energetic failure of the mitochondria. The activation of ER stress response in FRDA is consistent with different hypotheses, such as aggregation of misfolded Fe-S proteins, redox alterations, and

abnormal calcium metabolism [218]. Administration of compounds that target the ER stress has been successful in fly models of the disease [219]. Interestingly, calcium deposits have also been observed in cardiac cells of FRDA patients [220]. Defects in calcium homeostasis are reported in several in vitro studies in multiple cellular FRDA models [25–28,221,222]. Remarkably, modulation of calcium signaling by means of calcium chelating agents is able to ameliorate FRDA defects [26,221,223]. Cytosolic iron starvation is present in mammalian and in invertebrate FRDA models [18,165,224]. Such a scarcity activates in turn an evolutionary-conserved response mediated by hypoxia inducible factors [165,218,224,225]. In this sense, a recent work shows that in 4 different models (mouse, human cells, *C. elegans* and yeast) low oxygen conditions restore ISC biosynthesis, iron availability, the activation of NRF2 and the ER stress response and attenuates the progression of the disease [19]. It would be of high interest to monitor if exposure of FRDA patients to controlled periods on normobaric hypoxia shows any improvement. Besides iron, it has been suggested that metal dysregulation in FRDA affects other metals [226]. Importantly, zinc and copper redistribution has been reported in the dentate nucleus of the cerebellum in FRDA patients [227]. The role of these metals in the FRDA pathology is completely unknown and therefore, the impact of a therapy focused on controlling cellular levels of these metals has not been addressed with the exception of a work using the fruit fly [226]. Among these metals, zinc might be of special relevance due to its ability to impair ISC assembly [15].

Finally, we think it is pivotal to promote the progression on treatments based on increasing frataxin levels (Table S1) and on gene replacement [228,229] and stem cell-based therapies (reviewed in [230]), since some improvements have been already observed in human patients with this last approach [231]. Besides that, it should also be explored the effect of cocktails containing compatible drugs. Many trials are based on administration of single drugs as shown in this review. Therefore, analysis of synergic effects arising from the combination of several compounds that

might revert simultaneously different downstream effects of frataxin deficiency (Figure 1) is an interesting avenue that it is worth to explore in both, disease models and patients.

Oxidative stress modulates rearrangement of Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and calcium dysregulation in a Friedreich's Ataxia model

Introduction

Friedreich Ataxia (FRDA) is a neurodegenerative disorder mainly caused by homozygous GAA repeat expansion mutations within intron 1 of the *FXN* gene, which encodes frataxin, a protein associated with the mitochondrial inner membrane [1]. The length of GAA expansions decreases the expression of frataxin, which involves neurological and neuromuscular manifestations in patients including progressive trunk and limb ataxia, dysarthria, scoliosis, cardiomyopathy and diabetes mellitus [2]. FRDA is characterized by the degeneration of the large sensory neurons at the dorsal root ganglia (DRG), in charge of proprioception and sense of positioning. This neurodegenerative process affects both, the central and peripheral nervous systems, including spinocerebellar tracts, corticospinal tracts, posterior columns and cerebellum [3].

Frataxin has been proposed to play a role in many physiological functions, mainly related to iron metabolism [4], such as the assembly of the iron-sulfur clusters in the mitochondria, acting as a chaperone [5–7], as an iron-storage protein regulating mitochondrial iron transport [8,9] and is associated with heme groups maturation [10,11]. Other processes like mitochondrial energy conversion [12] and oxidative phosphorylation [13] have been described regarding frataxin, as well as its participation in oxidative stress regulation by reducing the production of reactive oxygen species (ROS)[14–16]. Moreover, frataxin has an important role in proper calcium (Ca^{2+}) handling [17,18], whose effect in neurons is the formation of multiple axonal spheroids mainly caused by Ca^{2+} imbalance.

Mitochondria plays a key role in energy metabolism, specifically in ATP production through oxidative phosphorylation. It is considered the main source of ROS in most cells, which could generate an imbalance in cellular redox state in circumstances of alteration of the electron transport chain [19]. As frataxin is ligated to different mitochondrial processes, its deficiency leads to mitochondrial dysfunction associated with redox imbalance and reduced mitochondrial energy production [20].

Mitochondrial dysfunction also affects its communication with other cellular compartments and the processes they regulate [20]. In relation to this, we and others have observed increased endoplasmic reticulum (ER) stress in different FRDA models [18,21]. The physical interaction between these compartments termed ER-mitochondria associated membranes (MAMs) [22] requires specific protein networks. The wide variety of cellular processes in which MAMs are involved in, including lipid metabolism [23], autophagy [24], mitochondrial morphology and cell death [25] are usually altered in several neurodegenerative disorders [26–28], as well as in FRDA [18,29–31].

One of the better characterized functions of MAMs is the rapid exchange of Ca^{2+} between both organelles [32]. The main route for Ca^{2+} stored in the ER into mitochondria is throughout the channels VDAC1/porin and mitochondrial calcium uniporter (MCU), located at the outer and inner mitochondrial membrane, respectively [33,34]. Ca^{2+} homeostasis is crucial to maintain a proper physiology in different metabolic processes and signaling pathways, specifically mitochondrial regulation of cell survival and oxidative phosphorylation [35]. Importantly, we have also previously reported that frataxin-silenced cells show an impairment in Ca^{2+} buffering, as a consequence of reduced mitochondrial Ca^{2+} uptake capacity [18]. The involvement of MAMs in FRDA pathophysiology has been recently suggested in a *Drosophila* model of the disease in which downregulation of fly mitofusin (Mfn) was sufficient to counteract some frataxin-deficient phenotypes via reduction of ER stress [21]. However, undoubtful and

ANEXOS

definitive evidences regarding the intimate link between frataxin and MAMs are still elusive.

In this work, we assess MAMs architecture and integrity in a well established FRDA model in which frataxin is depleted in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line using through *FXN* gene silencing two independent short hairpins (FXN-138.1 and FXN-138.2). We confirm that the interactions between the ER and mitochondria are reduced in frataxin-depleted cells, which can be reverted by treating cells with the antioxidant Trolox, a compound that mimics vitamin E. Concomitantly, Trolox also improves mitochondrial Ca^{2+} uptake and alleviates oxidative stress effects in lipid membranes. In agreement with all this, promotion of Ca^{2+} transport into the mitochondria was sufficient to restore several defects triggered by frataxin silencing in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. Finally, our findings describe for the first time that frataxin is present in MAMs where it interacts with proteins implicated in ER-mitochondria communication highlighting a new role for frataxin in the stability and integrity of these structures. Our results indicate that FRDA pathology goes beyond pure mitochondrial defects and could open new therapeutic avenues for the treatment of the disease.

Materials and methods

Cell culture and production of stable SH-SY5Y cell lines

The human SH-SY5Y neuroblastoma cell line was grown in DMEM-12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 in air. For the generation of stable cell lines with the gene silencing of *FXN*, SH-SY5Y cells were transfected with pLKO.1 vector (MISSION® shRNA plasmid DNA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.) containing a hairpin sequence of *FXN* (TRCN0000006138) [18]. Transfection were performed using SuperFect Transfection (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The

stably transfected cells were selected and maintained in medium with 2 µg/ml puromycin.

Drosophila Maintenance and Stocks

Fly stocks were maintained at 25°C on standard cornmeal-agar medium (water: 36 l; yeast: 720 g; cornmeal: 3200 g; soy flour: 400 g; light malt extract: 3200 g; sugar beet syrup: 880 g; agar: 320 g, Nipagin 120 g). The crosses between the GAL4 drivers and the UAS responder lines were carried out at 25°C. UAS constructs were used in heterozygous configurations for all experiments. Genetic interactions were carried out by mating virgin females from the stocks *fhRNAi-1* / CyO; *Repo-GAL4* / TM6B *tub-GAL80* or *fhRNAi-2* / CyO; *actin-GAL4* / TM6B *tub-GAL80* with males of the corresponding UAS line. The stocks used in this work are described in Table S1.

Hyperoxia and negative geotaxis assays

In all experiments (normal conditions and food supplementation), flies were raised at 25°C under a 12hr:12hr light/dark cycle and male individuals were collected within 24-48 hours post-eclosion, placed at a density of 25 per vial and transferred to vials with fresh food every 2–3 days. Lifespan experiments were conducted in standard cornmeal agar medium and 100-150 males per genotype were used in each experiment. Hyperoxia treatment started one day post-eclosion and was performed by exposing flies in a glass container with a constant flux of 99.5% oxygen under a low positive pressure at 25°C (Botella et al., 2004). Flies were transferred every day to new vials. Locomotor assays were performed as previously described (Botella et al., 2004). 10-12 flies per genotype were assessed and each fly was recorded 3 times and the mean value of each fly was used for the subsequent analysis.

Semiquantitative Real Time PCR from *Drosophila* Samples

Total RNA was extracted from 15 thoraces using peqGold TriFast reagent (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany) following

ANEXOS

manufacturer's instructions. 500 ng mRNA were converted into cDNA using QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and then used for qPCR with ORA qPCR Green ROX L Mix (HighQu, Kralchtal, Germany) on a CFX connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-rad, Hercules, California, U.S.). The ribosomal protein 49 (*rp49*) was used as internal control. The results from at least four independent biological replicates were analyzed with the Bio-Rad CFX manager 3.1 software. Gene expression levels were referred to the internal control, the relative quantification was carried out by means of the $\Delta\Delta C_t$ method and the results were plotted as relative mRNA expression. Each experiment consisted of 3-5 independent biological replicates. The genes and primers used for the analysis are:

MCU - Fw: 5'-CGTCCTGCACCATCGAAAG-3'; Rv: 5'-GTTTGGGAGGATTACATCCAAT-3'

RP49 - Fw: 5'-CCAAGCACTTCATCCGCCACC-3'; Rv: 5'-GCGGGTGCGCTTGTTTCGATCC-3'

Analysis of *Drosophila* brain integrity and brain lipid homeostasis

Paraffin sections were performed from 35-day-old adult flies. Flies were fixed with carnoy (ethanol:chloroform:acetic acid at a proportion 6:3:1), dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin. Paraffin sections (7 μ m) from 10 flies of each genotype were analyzed under a fluorescence microscope. Brain vacuolization was quantified using the Image J 1.48v software. The affected area was referred as % of total brain area that includes the lamina (La), the outer chiasm (OC) and the medulla (Me). For examination of accumulation of lipid droplets, flies of appropriate age and genotype were fixed in 4% PFA for two hours. Brains were then dissected, washed with PBST and incubated 24 h at 4°C with the Bodipy™ 493/503 (D3922, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) at a dilution 1:500 (from a stock solution 1mg/ml in EtOH). Samples were embedded in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.). At least 5-10 flies per genotype were scanned using the Confocal

Laser Scanning Platform Leica SP8 (Leica, Germany). Samples were excited with an argon laser at 488nm (20% tube current). Signals were detected using a HC PL APO 40x/1.30 Oil CS2 objective at 490-540nm. Images were generated at a resolution of 1024 x 1024 pixels. Brains were scanned in z-stacks (1 μ m) with 30-35 images per brain. All images were acquired using the same exposure, light intensity and filter settings. Confocal images were further processed with the image processing software Fiji 2.0.0 [36]. In detail, background was subtracted in Fiji via the Rolling Ball method (Radius=50 pixels). Maximum projections of 30 slices were made and the resulting image was again subjected to background subtraction. Finally, contrast of each image was adjusted to improve quality of signal. In the experiment expressing the UAS-ChiMERA construct, lipids droplets were studied with light microscopy because the ChiMERA protein is coupled to GFP [37] and this prevents the correct observation of BodipyTM 493/503 signals. In this case, semithin epon plastic sections from 35-day-old adult fly brains were prepared and lipids were identified by characteristically dark droplet-like structures.

Quantifications of ATP amounts

ATP was determined using ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Roche, Mannheim, Germany) according to manufacturer's instructions with some modifications. Briefly, five flies were homogenized in 200 μ l pre-heated ATP assay buffer (100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 7.75), boiled for two minutes and centrifuged for one minute at 1000g. The supernatant was diluted 1:5 in ATP assay buffer and 50 μ l of the dilution were used to measure ATP levels. Luminescence was detected with a Tecan SparkTM 10M plate reader (Tecan Trading AG, Switzerland). Each experiment consisted of 3-5 independent biological replicates. ATP quantities were finally referred to protein amount using the Bradford assay (Coomassie PlusTM Protein Assay Reagent, Thermo Scientific, Schwerte, Germany).

Proximity Ligation Assay (PLA)

ANEXOS

Cells were seeded in a μ -Dish 35 mm, high Glass Bottom (Ibidi, Gräfelfind, Germany) at a density of 100000 cells/dish. After fixation with 4% paraformaldehyde for 10 minutes, cells were washed with PBS and permeabilized with 0,5% PBS-Triton-X for 10 minutes. Cells were washed with 0,05% PBS-Tween 20 and blocked with Duolink® Blocking solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.) for 1 h at 37°C. After incubation, blocking solution was removed and a combination of two of the following specific antibodies were incubated overnight at 4°C: Frataxin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S., MA3-085), VDAC1 (Abcam, Cambridge, United Kingdom, ab14734), GRP75 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, U.S., sc13967), IP₃R (Abcam, Cambridge, United Kingdom, ab125076), ATP5A (Abcam, Cambridge, United Kingdom, ab110273). Cells were incubated at 37°C for 1 h with Duolink® *in situ* PLA® Anti-rabbit PLUS and Anti-mouse MINUS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.) and later washed with 0,01% PBS-tween. Ligation and amplification steps were performed using Duolink® *in situ* Detection reagents Red (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.). Ligase was incubated for 30 minutes at 37°C and washed with 0,01% PBS-tween. Polymerase was incubated for 100 minutes and washed with 1x and 0,01x SSC buffer respectively for 5 minutes each. Nuclei were detected with DAPI Fluoromount-G® (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, U.S.). All the washes were performed three times for 5 minutes, at room temperature with agitation. All the incubations at 37°C were performed in a humidity chamber. Images were obtained using a Leica DMi8 with DC9000GT camera and a 63x oil immersion objective. Interactions were counted manually and expressed as number of puncta per number of nuclei in each field. Puncta per cell of each condition is expressed as percentage over the control condition.

Calcium Imaging

Cells were seeded at a density of 25000 cells/well in a 6-well plate. 16-20 h after, cells were transfected with pcDNA-4mtD3cpv plasmid using Lipofectamine® 3000 Transfection kit (Thermo Fisher). 24 h after

transfection, cells were trypsinized and seeded in a μ -Slide 8 Well chamber (Ibidi, Gräfelfind, Germany, 80826), suitable for life imaging. Measurements were carried out 48h after transfection. For all the experiments with carbachol (St. Louis, Missouri, U.S., 212385), medium was removed prior the beginning of the recordings and replaced with HBSS without Ca^{2+} (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S., 14175095). D3cpv was excited at 435 nm and fluorescence measured at 450-480 nm (CFP) and 520-540 nm (YFP). Images were recorded every 5 seconds using a DC9000GT camera (Leica, Germany) and a W-view Gemini (Hamamatsu, Hamamatsu city, Japan) for optic splitting imaging. 900 μM Carbachol was added at 60 seconds from the beginning of the experiment. FRET ratio (YFP/CFP) was calculated by measuring fluorescence intensity of the two emission wavelengths, where CFP channel represents fluorophore unbound to Ca^2 and YFP, Ca^{2+} -bond.

Lipid peroxidation measurements

In order to measure lipid peroxidation, cells were loaded with 5 μM C11 BODIPY (581/591) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) for 30 minutes and 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DAPI for 5 min prior to the beginning of the experiments. Fluorescence intensity was detected by flow cytometry with a BD FACSAria™ III cytometer equipped with 5 lasers, 355, 405, 488, 561, 640nm (BD, DIVA 6.0 software). Parameters FS-A, FS-H, SS-A were used for cell morphology, lipid peroxidation was measured with C11 BODIPY fluorochrome by selecting the RATIO parameter (586/530 nm) the discrimination of dead cells was performed with DAPI (excitation 405, emission 450/50). 5000 single events (FS-A vs FS-H) were acquired at medium speed. The mean fluorescence of the RATIO parameter of living cells was determined.

Purification and isolation of mitochondria, MAMs and ER from SH-SY5Y cells

The following protocol is based in the one described in [38] with some modifications. Cell cultures at 80-90 % confluence were harvested with

ANEXOS

trypsin and the pellet washed with 1 ml 1x PBS and centrifuged at 700 g for 3 min. The supernatant was removed, and the pellet resuspended in 500 µl of hypotonic buffer (250 mM Sucrose, 20 mM HEPES pH 7.45, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, Protease inhibitors) and kept on ice for 30 min. Cells were then disrupted by passing them through a 30G needle for 20 times. The solution was centrifuged at 700 g for 10 min at 4 °C and the supernatant transferred to a 2 ml clean tube. The pellet containing nuclei and intact cells was discarded. The collected solution was centrifuged at 10000 g for 20 min at 4 °C. The supernatant containing the ER was transferred to a clean 2 ml tube and the pellet containing the crude mitochondria was resuspended in 2 ml isolation medium (250 mM mannitol, 5 mM HEPES pH 7.45, 0.5 mM EGTA, 0.1 % BSA). 150 µl of the last suspension was kept as the crude mitochondria (c-mito) fraction. The tube containing the ER was filled with hypotonic buffer, centrifuged at 17000 g for 35 min at 4 °C, and the new supernatant transferred to an ultracentrifuge tube. The tube was filled with hypotonic buffer and centrifuged at 100000 g for 1 h at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet resuspended in 150 µl of hypotonic buffer to obtain the ER fraction. The rest of the solution of isolation medium containing crude mitochondria was transferred to an ultracentrifuge tube filled with 30 % Percoll with gradient buffer (30% Percoll, 225 mM mannitol, 25 mM HEPES pH 7.45, 1 mM EGTA, 0.1 % BSA) and centrifuged at 95000 g for 30 min at 4 °C. Two bands or fractions are observed at this point, an upper band or light fraction containing the MAMs and a lower band or heavy fraction containing the pure mitochondria. The lower band was collected with a glass Pasteur pipette, diluted in a clean tube with isolation medium and centrifuged at 6300 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet resuspended in 150 µl of isolation medium to obtain the pure mitochondria (p-mito) fraction. The previous upper band containing the MAMs was collected with a glass Pasteur pipette, diluted in isolation medium and centrifuged at 6300 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was transferred to an ultracentrifuge tube filled with isolation medium and centrifuged at

100000 g for 1 h at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 150 µl of isolation medium to obtain the MAM fraction.

Western Blot Analysis

The isolated ER, c-mito, p-mito and MAM fractions were resuspended in lysis buffer, separated on SDS-polyacrylamide gel, and blotted onto PVDF membranes. Western blots were probed with antibodies against specific protein markers to verify the purity of the fractions and the presence of frataxin. The primary antibodies used were anti-ATP5A (Abcam, Cambridge, United Kingdom, ab110273), anti-Sigma1R (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S., HPA018002), anti-GRP75 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, U.S., sc-13967), anti-VDAC1 (Abcam, Cambridge, United Kingdom, ab14734) and anti-FXN (Abcam, Cambridge, United Kingdom, ab110328). Secondary antibody (anti-mouse or anti-rabbit IgG) coupled to peroxidase was used for detection of the reaction with Amersham ECL Prime (GE Healthcare, Chicago, Illinois, U.S.). Imaging was performed with an ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, U.S.).

Statistical analysis

Survival data were analyzed using the Log-rank (Mantel-Cox) and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests. In all further experiments, data is represented as mean \pm s.e.m of three to five replicates. When comparing 2 samples, equal variances were confirmed by an F test. When comparing multiples samples, equal variances were confirmed by Bartlett and Brown-Forsythe tests. Normality of data was assessed in all cases with Shapiro & Wilk test and parametric or non-parametric tests were used accordingly. For data that passed normality test, significance was determined by two-tailed T-test or by One-way ANOVA with *post hoc* Dunnett or Tukey Multiple Comparison Test (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.05$). Samples that failed normality test were analyzed using non-parametric tests such as Mann-Whitney test or Kluskal-Wallis with *post hoc* Dunn's Test (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.05$). Statistical analysis was carried

out using Prism version 8.03 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, www.graphpad.com).

Results

Frataxin deficiency alters MAMs architecture

MAMs encompass a wide variety of proteins, from membrane channels to lipid and glucose metabolism enzymes [39], but it is mainly mediated by the voltage-dependent anionic channel 1 (VDAC1), located in the mitochondrial outer membrane, the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) in the ER membrane, and the chaperone glucose regulated protein 75 (GRP75), which links the former two.

To better understand if frataxin levels are able to modify MAMs' stability or expression, we assessed the connections between the ER and mitochondria in frataxin-depleted cells by performing a proximity ligation assay (PLA) (**Figure 1A-B**) using a neuroblastoma cell line as a model study. Neuroblastoma is a developmental tumor originated from neural crest, like DRG neurons. FXN-138.1 and FXN-138.2 lines were generated through the silencing of the *FXN* gene using two different hairpins, obtaining 82 and 78% of frataxin reduction, respectively [18].

Upon frataxin downregulation, we observed a dramatic decrease (around 90%) in the number of interactions between VDAC1 and IP₃R compared to control cells (SH-SY5Y, 100±5.48%; FXN-138.1, 9.14±1.07%; FXN-138.2, 5.99±1.5%). Accordingly, interactions between VDAC1 and GRP75 were also reduced (SH-SY5Y, 100±2%; FXN-138.1, 26±1.91%; FXN-138.2, 23.78±4.9%) in cells deficient in frataxin (**Figure S1A-B**). Our results indicate that the mitochondrial-endoplasmic reticulum interaction is disturbed in frataxin deficient cells and such impairment could contribute to the mitochondrial Ca²⁺ dysregulation described in frataxin deficiency models, including our previous results [18].

Trolox recovers MAMs interactions and Ca²⁺ transfer into mitochondria

In order to elucidate the likely relationship between MAMs and Ca^{2+} dyshomeostasis in FRDA, we decided to treat our FRDA cells with the purpose of improving Ca^{2+} management. Trolox is a water-soluble analogue of Vitamin E that acts as lipid peroxidation scavenger and therefore contributes to the stabilization of cellular membranes [40]. Interestingly, Abeti and coworkers have recently shown that vitamin E recovers mitochondrial Ca^{2+} uptake in frataxin-depleted cerebellar granule neurons and cardiomyocytes [41]. Thus, we have analyzed the impact of Trolox in the integrity of the ER-mitochondrial contacts. We incubated FXN-138.1 and FXN-138.2 clones with 1 mM Trolox for 24 hours. Importantly, we observed a marked increase (FXN-138.1: untreated $100 \pm 19.8\%$, treated $290.1 \pm 83.79\%$; FXN-138.2: untreated $100 \pm 25\%$, treated $352.2 \pm 79.4\%$) in the number of interactions between VDAC1-IP₃R (**Figure 1C-D**), which was also confirmed with the VDAC1-GRP75 interactions analysis (**Figure S1C-D**). Our results indicate that Trolox restores communication between these two compartments, probably by reducing oxidative stress environment in mitochondrial and ER membranes.

These results prompted us to analyze in our model the mitochondrial capability of Ca^{2+} uptake after Trolox treatment. FXN-138.2 and control cells were transfected with a mitochondrially targeted chameleon (4mtD3cv) and challenged with 900 μM carbachol in order to release ER Ca^{2+} through IP₃R (**Figure 2A**). Our results clearly show that SH-SH5Y cells do not show significant changes after Trolox treatment in the area under curve analysis (SH-SY5Y: Untreated 77.46, treated 87.72 ± 3.44). Importantly, the analysis of the mitochondrial response to carbachol showed that trolox successfully boosted Ca^{2+} uptake by mitochondria in cells with frataxin deficiency (**Figure 2B**, FXN-138.2: Untreated 24.59 ± 1.52 , Treated 43.78 ± 5.31). These results support the hypothesis that Trolox recovers the network connecting mitochondria and ER and this is sufficient to improve Ca^{2+} transfer between both compartments in frataxin-silenced cells.

ANEXOS

After confirming Trolox improves ER-mitochondria communication, in both structural and functional ways, we analyzed whether its effects in reducing lipid peroxidation might be underpinning the observed rescue. Quantification of lipid peroxidation by means of Bodipy C11 (481/491) fluorescence intensity by flow cytometry (**Figure 2C**) confirmed a significant increase of these oxidative species in our frataxin-deficient cells. Moreover, we also detected that Trolox was able to alleviate lipid peroxidation in FXN-138.2 cells, suggesting that oxidative insults affect MAMs integrity in FRDA cells.

Furthermore, we also treated FXN-138.2 cells with 5 mM N-acetylcysteine (NAC). NAC is a versatile thiol molecule related to three main antioxidant mechanisms in the cell. It has both direct and indirect antioxidant effects over oxidative species, including the restorage of thiol groups and cysteine donor in Glutathione synthesis, regulating the redox state [42]. In agreement with the Trolox results, we observed a recovery of lipid peroxidation levels in frataxin-deficient cells, as well as an increment in the number of VDAC1-GRP75 interactions (FXN-138.2: untreated $100\pm 26\%$, treated $506.95\pm 100.46\%$) (**Figure S2A-B**). These results reinforce the idea of an antioxidant-dependent recovery of MAMs and suggest oxidative stress has an important role in Ca^{2+} homeostasis impairment in our FRDA model.

Frataxin is a member of the protein network of MAMs

Frataxin has been extensively considered as a mitochondrial protein [43], but interestingly some authors have also described an additional extramitochondrial location [44,45]. Thus, given the reduced levels of MAMs interactions present in our frataxin silenced models, we wondered whether frataxin might be also present at the core of this structures. To elucidate this question, we isolated in our neuroblastoma model the subcellular fractions implicated in the architecture of MAMs (mitochondria, MAMs, ER) and performed a western blot analysis in order to assess the presence of frataxin in the different fractions. Interestingly,

we observed that frataxin is clearly located in MAMs, in addition to the characteristic mitochondrial presence (**Figure 3A**).

In order to further investigate the possibility of a direct implication of frataxin in the structure of MAMs, we performed a PLA by analyzing the interaction in SH-SY5Y cells of frataxin with GRP75 and IP₃R, two of the main proteins associated to the mitochondria-ER connections. Importantly, we observed a clear and robust direct relationship of frataxin with both proteins (**Figure 3B**), which suggests a pivotal role of frataxin in the regulation and maintenance of this protein network. Altogether, these results indicate that frataxin could have a direct role in the regulation of the contact sites set by mitochondria and the ER.

The induction of ER-mitochondrial contacts recovers brain degeneration in frataxin deficient flies

Next, we decided to evaluate whether the observations obtained in our cellular model might be also relevant in a multicellular organism. We chose a *Drosophila* model in which frataxin silencing was targeted to glia cells because in this model, the interactions ER and mitochondria have been already shown to participate in the development and progression of the pathology [21]. The loss of frataxin in *Drosophila* glia cells using the *Repo*-GAL4 line (*Repo*-G4) and a strong RNAi line (*fth*RNAi-1) induces 3 main defects, a locomotor dysfunction, a strong brain vacuolization and the accumulation of lipids within the fly brain [31].

In our first approach, we decided to express the ChiMERA construct in glia cells. The ChiMERA protein is the fusion of the mitochondrial protein Tom70 and the ER protein Ubc6. ChiMERA has been shown to successfully increase mitochondria-ER contacts in yeast and, more importantly, also in flies [37,46]. Then, we assessed whether increasing the bridges between ER and mitochondria was sufficient to recover loss of frataxin in the fly glial cells. Our experiments showed that glial expression of ChiMERA strongly reduced brain degeneration (**Figure 4A-B and Figure 4C**) although no improvement on locomotion (**Figure 4D**) or on

the lipid accumulation was observed (**Figure 4A-B**). Therefore, increasing mitochondrial-ER contacts seems to have a positive albeit minor impact on FRDA phenotypes in glia.

Promotion of Ca²⁺ import into the mitochondria recovers frataxin-deficient phenotypes in *Drosophila*

As stated in the introduction, frataxin-deficiency has been related to alterations in Ca²⁺ homeostasis in different models, specially a decreased Ca²⁺ buffering by mitochondria, as well as ER stress [18,41]. Furthermore, we have also observed that one of the consequences of reactivating MAMs in our cell culture model was the increase of mitochondrial Ca²⁺ uptake. Therefore, we decided to genetically manipulate Ca²⁺ transport into the mitochondria by altering the expression of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU), since misexpression of MCU or of other components of the MCU complex has been shown to change the mitochondrial Ca²⁺ content [47–50]. We observed that *MCU* mRNA levels were not altered in frataxin deficient flies (**Figure S3A**). Regarding *MCU* downregulation, unexpectedly a strong silencing using a RNAi line triggered preadult lethality when co-expressed with the *fh*RNAi-1 line, whereas such lethality was not observed in the control cross. To bypass this problem, we decided to use a mutant allele of MCU (MCU1, described in [50]) in a heterozygous configuration. 50% reduction of MCU expression in glia cells did not induce on their own any effect in the three parameters analyzed (negative geotaxis, brain integrity and lipid accumulation, (**Figure S3C-I**), and it is not able to suppress too the locomotor deficit of FRDA flies (**Figure 5A**) and the brain vacuolization (**Figure 5B-E**). In order to detect the accumulation of lipids *in vivo*, we have used a probe based on a Bodipy fluorophore that allows detection of neutral lipids (see material and methods). As described by Kis and collaborators [51] no lipids were detected in control flies (**Figure 5F**). In agreement with our previous results [31] loss of frataxin in glia cells triggered a strong accumulation of lipids (**Figure 5G**). However, reduction of MCU expression did not influence the presence of such lipid deposits (**Figure 5H**).

Next, we decided to increase MCU expression by means of two independent UAS lines [50]. Both lines trigger a 10-fold increase of MCU expression (**Figure S3B**). Interestingly, while promotion of MCU expression in glia cells did not induce any effect in the parameters analyzed in a control background (**Figure S3C-I**), overexpression of MCU completely suppressed the locomotion impairment (**Figure 6A**) as well as the brain vacuolization (**Figure 6B-E**) and the lipid accumulation (**Figure 6F-H**). Since both UAS lines display the same effects in a frataxin-deficient background (as observed in **Figure 6A-B**), only histological findings from line 1 (UAS-*MCUoe1*) are shown and only UAS-*MCUoe1* was used in the resistance to oxidative stress experiments. Reduced longevity under oxidative stress conditions (hyperoxia atmosphere) is another phenotype that is displayed by frataxin deficient flies in glia [31]. We confirmed such a defect and observed that, remarkably, overexpression of MCU almost duplicated the median and maximum longevity of FRDA flies under this stressor (**Figure 6I**). Finally, we wanted to assess whether all these rescues of FRDA phenotypes in the *Drosophila* glia were directly linked to an improvement of the mitochondrial function. In this case, we used a second frataxin RNAi line because *fh*RNAi-2 is compatible with a normal development compared to *fh*RNAi-1 when the silencing of frataxin is ubiquitous (*actin-G4*). However, the strong ubiquitous overexpression of MCU achieved with the UAS-MCUoe lines lead to some deleterious effects even in control flies. Therefore, we decided to take advantage of a *Drosophila* Stock containing an EP transposable element in the 5' untranslated region of the MCU promoter. The EP elements also contain UAS sequences in their structure and therefore they can be used to increase the expression of a nearby gene [52]. The EP MCU line only triggers a mild overexpression of MCU [53]. As it can be seen in **Figure 6J**, ubiquitous frataxin knockdown (KD) with *fh*RNAi-2 reduced ATP production around 65% and MCU overexpression was sufficient to restore ATP production in frataxin deficient mitochondria and to trigger a 70% increase of ATP amounts in a control scenario. These results might suggest

ANEXOS

that lack of mitochondrial Ca^{2+} is also a core component of the FRDA pathology.

Discussion

Communication between the mitochondria and the ER is especially important in order to maintain a proper Ca^{2+} transfer required to regulate processes such as energy supply and cell survival. Specifically, there are important physiological functions closely related to mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in the nervous system, such as synapse assembly, generation of action potentials and synaptic transmission [54]. Variations in the number and structure of MAMs are present in the neurobiology of several neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Amyotrophic Lateral Sclerosis, hereditary spastic paraplegia, and peripheral neuropathies. Interestingly, many proteins involved in these diseases have been found in the ER-mitochondria interface and exhibit an implication in the regulation of these structures. For instance, mutations in AD related proteins presenilin 1 and 2 increase ER-mitochondria contacts, upregulating mitochondrial Ca^{2+} uptake. Also, huntingtin, implicated in Huntington's disease (HD), is essential for ER morphology, so mutated huntingtin activates ER stress and alters Ca^{2+} transfer in MAMs domain [26,55]. However, little is known about the role of MAMs in the physiopathology of FRDA. In order to address this question, in this work we have performed the first comprehensive analysis of the functionality and integrity of ER-mitochondria contacts also known as MAMs under frataxin-loss conditions.

In the last years we described both in neuroblastoma cells [18] as well as in frataxin deficient sensory neurons of the YG8R mouse model [17] a clear loss of buffering Ca^{2+} capacity in mitochondria leading to increased levels of Ca^{2+} in the cytosol. In agreement, Ca^{2+} chelators were able to improve FRDA conditions [17]. More recently, Abeti and co-workers also observed that primary cultures of cerebellar granule neurons and cardiomyocytes

from the YG8R mouse model presented a reduced mitochondrial Ca^{2+} uptake that was concomitantly accompanied by lower Ca^{2+} amount in the mitochondria and in the ER [56]. However, the mechanisms underlying an improper mitochondrial Ca^{2+} buffering under frataxin loss conditions have not been studied in detail. It is known that Ca^{2+} is transferred from ER to mitochondria throughout a scaffold formed by IP_3R , VDAC in the outer mitochondrial membrane (OMM) and the MCU in the inner mitochondrial membrane (IMM). Therefore, alterations in MAMs in frataxin deficient cells would induce a clear Ca^{2+} deregulation. Using a novel experimental approach named proximity ligation assay that analyses interactions between proteins, we determined that the number of MAMs was strongly reduced in a neuroblastoma model of FRDA, which correlates with an impairment of Ca^{2+} buffering by the mitochondria.

In order to analyze the impact of MAMs' dysfunction in the FRDA over Ca^{2+} dyshomeostasis, we improved the mitochondrial Ca^{2+} uptake to associate it with a recovery of MAMs interactions. In cardiomyocytes from the YG8R mouse model treated with vitamin E, the mitochondrial capability of Ca^{2+} buffering was restored [41]. Accordingly, treatment with the vitamin E mimic Trolox also improved Ca^{2+} buffering capability in our neuroblastoma model. And more importantly, this was possible by increasing the ER-mitochondria contacts. Thus, the recovery of the network connecting mitochondria and ER is sufficient to improve mitochondrial Ca^{2+} uptake.

In order to test this hypothesis in an *in vivo* model, we decided to take advantage of the outstanding tools for genetic studies offered by the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). *Drosophila* FRDA models have provided along the last decade several evidences about FRDA-dependent mechanisms beyond the state of the art [57]. Our results with the overexpression of MCU are in favor of the hypothesis that increasing the Ca^{2+} uptake by the mitochondria is neuroprotective in FRDA flies. Using different sensors to visualize and quantify mitochondrial Ca^{2+} , overexpression of MCU has been shown to increase basal concentration of

ANEXOS

mitochondrial Ca^{2+} as well as to enhance Ca^{2+} uptake in drosophila cultured embryonic cells [58] and in living flies [48]. Therefore, in our experimental scenario, overexpression of MCU would increase the mitochondrial Ca^{2+} content and this would be sufficient to recover several loss-of frataxin phenotypes in the fly. It is known that the cellular bioenergetics are sustained by the transfer of Ca^{2+} from ER to mitochondria via MAMs [59]. Ca^{2+} seems to influence the activity of some enzymes such as mitochondrial ATP synthase pyruvate dehydrogenase complex (PDC), isocitrate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase [60]. All these evidences are validated in our *in vivo* model where we recovered ATP levels due to the reintroduction of Ca^{2+} in the mitochondria.

There are several lines of evidence highlighting the key role of antioxidants in FRDA [61]. In 2008, Cooper *et al.* found promising improvements with a combined Coenzyme Q10-Vitamin E therapy in FRDA patients [62] and NAC, a direct donor of cysteines, has recently been used as a Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) modulator in FRDA fibroblasts, exhibiting neuroprotective features and increasing frataxin expression [63]. We have recovered function and structure of MAMs with NAC or Trolox treatment, demonstrating a direct relationship between Ca^{2+} dyshomeostasis and oxidative stress. Several authors have described oxidative stress together with Ca^{2+} dysregulation in different FRDA models [19,41,64,65]. It is interesting to emphasize that lipid peroxidation has been described in FRDA patients [66] as well as in flies and different tissues from FRDA mice models [29,31,67,68]. Here we show that NAC and trolox treatment decreases membrane lipid peroxidation in our frataxin deficient cell model recovering Ca^{2+} homeostasis. The impact of lipid peroxidation *in vivo* was already tested a decade ago [31] in the fly model used in this work. We observed along with the lipid accumulation, a concomitant increase of lipid peroxides. Interestingly, we also found that co-expression of a lipid peroxides' scavenger was able to improve some frataxin-deficient conditions in the fly [31]. These results underscore the

importance of a reduced cytosolic microenvironment surrounding the MAMs to preserve its physiological architecture.

Bringing together these results, we hypothesize frataxin could participate in MAMs in two different but not necessarily exclusive ways. Firstly, our findings describe for the first time frataxin as a member of the protein network of MAMs, indicating a pivotal role in the processes regulated by these structures, including a proper redox environment. Secondly, the fact that frataxin has a direct interaction with GRP75 and IP₃R, two of the main proteins implicated in mitochondrial Ca²⁺ transfer from the ER, suggesting its implication in the VDAC-GRP75-IP₃R protein bridge stabilization. These results contribute to understand the mechanisms of Ca²⁺ dysregulation. Our results agree with previous results obtained after artificially increasing the amount of mitochondria-ER connections by means of the expression of the so-called ChiMERA construct [37] in an *in vivo* fly model of FRDA. Genetic manipulation of mitochondria-ER bridges has been shown to be a successful counteracting strategy in *Drosophila* models of AD [69] where the promotion of contacts was beneficial. Here we observed that expression of ChiMERA in glia cells was only able to revert the neurodegeneration whereas locomotion and lipid homeostasis were not improved. Such a limited effect might further support the role of frataxin in the stability of mitochondria-ER contacts, and more concretely in the mitochondrial calcium uptake.

In conclusion, our findings indicate that frataxin deficiency causes an impairment in both the ER-mitochondria communication and in the dysregulation of Ca²⁺ homeostasis, which provides a new approach regarding frataxin functionality and mitochondrial imbalance in FRDA. These results raise the question whether reduction of the interactions between these two organelles is the critical event in the progression of the pathology, offering a new field of investigation regarding MAMs as therapeutic targets.

Therapeutic Strategies Targeting Mitochondrial Calcium Signaling: A New Hope for Neurological Diseases?

1. Introduction

Calcium (Ca^{2+}) is the most ubiquitous secondary messenger in intracellular signalling of most living cells, acting as a key connection between extracellular signals and intracellular responses [1]. The most remarkable property of Ca^{2+} is that such a simple bivalent ion is involved in a plethora of different signalling pathways. Its versatility is achieved by its rich dynamics in concentration changes, which can be caused either by Ca^{2+} entry from the extracellular space or Ca^{2+} release from intracellular storage compartments [2] or by other side pumping Ca^{2+} out of the cell or to intracellular organelles. The main Ca^{2+} storage in mammal cells is, depending on the cell type, the sarcoplasmic–endoplasmic reticulum (SR/ER) [3]. Intracellular concentration of Ca^{2+} is in the range of nM, whereas extracellular Ca^{2+} is in the range of mM [1]. Changes in intracellular Ca^{2+} levels are required for different structures, cell compartments, receptors, channels, Ca^{2+} -binding proteins, pumps, transporters, enzymes, and transcription factors [4]. In addition, when intracellular levels rise above physiological concentration, a number of deleterious cellular processes can be triggered [5].

In non-excitabile cells, the pathways regulated by these Ca^{2+} signals encompass a wide variety of processes, including from gene expression to fertilization, secretion, protein folding, energy metabolism, and cell cycle regulation [6–8]. In excitable cells, the signal depends on Ca^{2+} entry through voltage or ligand-operated channels, which regulates muscle contraction, postsynaptic potentials, memory formation in neurons (long term potentiation), and insulin secretion from beta cells [9].

Due to the huge amount of Ca^{2+} -dependent events occurring in cells, alteration of its signalling pathways contributes to the development of multiple human disorders. Therefore, the study of Ca^{2+} signalling is essential for understanding the pathophysiology of many diseases,

including diabetes, carcinogenesis, cardio- and cerebrovascular diseases including endothelial dysfunction, as well as neurodegenerative disorders [4,10–16].

In this review, we describe the importance of Ca^{2+} signalling in mitochondria and how the mechanism of communication between the ER and the mitochondria is pivotal to the mitochondria. Lately, we address different therapeutic strategies targeting mitochondrial Ca^{2+} uptake as an emergent therapeutic approach for neurological disorders.

2. MAMs' Composition and Function

Mitochondria and the ER are structures that experience continuous remodelling to coordinate complex mechanisms of signal transduction and gene expression, generating physical interactions that facilitate a fast and efficient regulation of these processes [17]. Termed endoplasmic reticulum–mitochondria-associated membranes (MAMs), the contact sites between the two compartments are dynamic structures that are highly sensitive to the physiological changes of the cell [18].

The association between the ER and the mitochondria was described in the 1950s, when Copeland and Dalton observed a precise orientation of the ER with respect to the mitochondria [19]. The distance between membranes in this region is 10–30 nm depending on the cell type and cell conditions [20]. Besides, it is estimated that, in physiological conditions, 5–20% of the mitochondrial surface is transiently connected to the ER and these contacts are signalling-dependent [21].

MAMs encompass an extensive variety of different proteins. The first independent proteomic studies identified 911 and 1212 proteins [22,23] localized in the tethers, but only 44% of them were common. During the last decade, different authors have contributed to increment the list by different molecular approaches, such as microscopy or subcellular fractionation [24–26]. The development of new techniques has facilitated the proteomic analysis of subcellular domains in-depth. The group of Alice Y Ting has recently identified more than 100 new proteins located in

ANEXOS

MAMs by means of TurboID technique. This approach was developed to study the interactome of a protein of interest in a specific cell compartment [27]. This emphasizes the complexity of these structures, specialized in each cell type and organism. Indeed, the set of proteins involved in MAMs provides important information about the functions regulated in this domain. As proteins involved in essential cellular processes belong to both the ER and the mitochondrial membranes, the contacts between the organelles enable a coordinated regulation of events, such as lipid biosynthesis [28,29], mitochondrial biogenesis [30–33], mitochondrial dynamics [34,35], and Ca^{2+} transfer [21,36].

Ca^{2+} exchange between the ER and the mitochondria requires the formation of a protein bridge composed by proteins of both compartments [37]. In particular, the formation of microdomains localized in the ER–mitochondria contact sites promotes a rapid and efficient exchange of Ca^{2+} , fundamental for mitochondrial function, dynamics, and the regulation of apoptosis [38]. In 1993, Rosario Rizzuto and colleagues reported the increase in mitochondrial Ca^{2+} upon the cation mobilization through the ER channel IP_3R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor). Recently, the spatial relation between the ER and the mitochondria was described by the same group [39]. They observed numerous close appositions between these two organelles that contributed to Ca^{2+} entry into the mitochondria in HeLa cells [21].

The lumen of the ER is one of the main storages of free Ca^{2+} in the cell (about 100–500 μM) compared to the cytosol (~ 100 nM). Ca^{2+} is released to the cytosolic space upon the input signals from the ER through the IP_3R and through the RyR (ryanodine receptor) in the case of the SR [40]. Furthermore, Sig-1R (Sigma non-opioid intracellular receptor 1 or shortly Sigma 1R), located in the ER, is also involved in Ca^{2+} signalling regulation. Sig-1R is enriched in MAMs and stabilizes activated IP_3R , promoting Ca^{2+} influx into the mitochondria [41,42].

For the mitochondria, Ca^{2+} must cross both mitochondrial membranes. The outer mitochondrial membrane (OMM) is Ca^{2+} permeable due to VDAC (voltage-dependent anion channel), which enables different metabolites (succinate, malate, pyruvate, NADH, ATP, and phosphate) to cross from the cytosol to the mitochondria [36]. In connection with the inner mitochondrial membrane (IMM), Ca^{2+} enters the mitochondrial matrix through the mitochondrial calcium uniporter (MCU) since this layer is ion-impermeable [43].

In addition, another key protein that stabilizes the connections of both compartments is glucose-regulated protein 75 (GRP75), which chaperones IP_3R and VDAC, maintaining the junction and ensuring an efficient transfer of Ca^{2+} to the mitochondria [36,44]. Altogether, all these attributes highlight MAMs as a coordinated domain that requires an optimal communication between the ER and the mitochondria.

3. Ca^{2+} Regulates Mitochondrial Functions

IP_3R -GRP75-VDAC-MCU is one of the complexes in MAMs that is not only essential for the regulation of Ca^{2+} homeostasis, but also for the control of mitochondrial function in the regulation of bioenergetics, mitochondrial dynamics, and cell death [45,46]. Mitochondria are considered the powerhouse of the cell, providing at least 90% of energy in most cell types. In this context, energy requirements and, thus, mitochondrial function depend on the function of each tissue, as well as developmental and physiological conditions. Mitochondria mainly orchestrate the metabolic profile of tissues with high energy demand, such as heart, liver, kidney skeletal muscle, and brain [47]. In particular, neurons consume 70–80% of the total energy of the brain, being the remaining spent by glial cells [48]. Thus, disruption of bioenergetic pathways compromise mitochondrial function, contributing to pathological features displayed in neurological disorders.

The mechanism of ATP production depends on oxidative phosphorylation, and it is dynamically and promptly regulated by mitochondrial Ca^{2+} levels.

ANEXOS

Enzymes of the tricarboxylic acid cycle and the electron transport chain require an increase in mitochondrial Ca^{2+} uptake to promote ATP synthesis [49,50]. For instance, isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase are activated upon Ca^{2+} increase in the mitochondrial matrix [51,52]. Furthermore, pyruvate dehydrogenase is a key complex of oxidative metabolism that links glycolysis with the tricarboxylic acid cycle and is influenced by mitochondrial Ca^{2+} concentration. In this way, when energy demand increases, different neurotransmitter and hormone receptors increase mitochondrial Ca^{2+} through IP_3R [17,53].

Mitochondrial Ca^{2+} uptake is also influenced by mitochondrial dynamics. Several properties of mitochondria, in terms of network, orientation, and shape, regulate the amounts of Ca^{2+} that reach the mitochondrial matrix and, thus, the subsequent functions regulated by these events [54].

The first is distribution, because clustered mitochondria are able to buffer Ca^{2+} more efficiently than disperse mitochondria. Mitochondrial fusion/fission events require elevated amounts of cytosolic Ca^{2+} to be transferred to the mitochondria [33,55]. In this way, Ca^{2+} can activate the cytosolic GTPase dynamin-related protein (Drp-1), which is recruited to form a ring around mitochondria to promote mitochondrial fission [31]. On the other hand, mitofusin 2 (MFN2), the GTPase responsible for the OMM fusion, also participates as a key regulator of MAMs, contributing to intracellular Ca^{2+} homeostasis [33].

Connectivity, because elongated mitochondria are better Ca^{2+} conductors, distributing the cation along the fused network. It has been described that, while fragmented mitochondria buffer Ca^{2+} from the ER in a heterogeneous manner, tubular mitochondria incorporate Ca^{2+} in an equilibrated and connected way [54,56].

Vicinity is a dynamic property that also affects Ca^{2+} buffering, since elevated concentrations of Ca^{2+} near mitochondria are required to promote mitochondrial Ca^{2+} uptake. In this context, Csordás et al. demonstrated the importance of spacing distance in MAMs for an efficient Ca^{2+} transfer,

outlining that it is essential that the tethered bridge is properly assembled to ensure Ca^{2+} influx into the mitochondria [44,57].

Last but not least, the volume of mitochondria is also crucial for mitochondrial Ca^{2+} buffering, as forced mitochondrial expansion [57] and fragmentation reduce Ca^{2+} uptake capacity [58].

Furthermore, abnormal Ca^{2+} accumulation in the mitochondria normally precedes cell death driven by necrosis and apoptosis [59,60]. Under physiological and pathological conditions, impaired Ca^{2+} handling can lead to mitochondrial Ca^{2+} overload, thus activating the opening mitochondrial permeability transition pore. This causes mitochondrial swelling, which leads to release of cytochrome c and caspase cofactors into the cytosol [60,61].

4. Ca^{2+} and Oxidative Stress

Mitochondria is considered the main source of reactive oxygen species (ROS) in cells with high metabolic rates. In circumstances of mitochondrial dysfunction, an uncontrolled production of ROS would lead to an imbalance in the cellular redox state which, in turn, might likely contribute to pathogenesis [62]. Oxidative stress occurs when ROS production exceeds detoxification, causing cell damage. Thus, a balance between ROS production and antioxidant systems is crucial to maintain cell homeostasis and survival [63,64]. The electron transport chain located in mitochondrial cristae generates ROS, such as the superoxide anion (O_2^-), which are converted to the diffusible redox signaling molecule hydrogen peroxide (H_2O_2) by superoxide dismutase 2 (SOD2). There is mounting evidence about the role of H_2O_2 as a messenger located in redox nanodomains in MAMs [65]. H_2O_2 , mainly generated in the mitochondria, can modulate the activity of IP_3R and R_YR channels, promoting the release of Ca^{2+} from the ER to the mitochondria. This event can, in turn, induce redox signaling through the activation of mitochondrial metabolism, further inducing the accumulation of additional H_2O_2 . This positive feedback mechanism attenuates when Ca^{2+} returns from the mitochondrial matrix to the ER

[66,67]. This process can be beneficial or detrimental, depending on the cellular context and the levels of ROS generated. Indeed, excessive amounts of mitochondrial Ca^{2+} lead to high ROS levels, which may trigger cell death [65]. In addition, it has been reported that mitochondrial Ca^{2+} overload can inhibit H_2O_2 clearance, promoting its accumulation in the mitochondria [68].

Hence, this outstands the necessity of an equilibrate Ca^{2+} exchange ER–mitochondria through proper contacts between the two compartments. Nonetheless, a growing knowledge and a better understanding about the translational and clinical role of Ca^{2+} homeostasis and oxidative stress in the pathophysiology of neurological diseases are required to find novel therapeutic strategies.

5. MAMs' Communication and Neurological Diseases

As it has been discussed above, the regulation of MAMs is crucial to maintain a proper Ca^{2+} exchange and regulate key mechanisms in cell homeostasis. These processes (lipid metabolism, Ca^{2+} homeostasis, mitochondrial dynamics, and axonal maintenance) are usually involved in the pathophysiology of neurodegeneration. Mitochondrial dysfunction results in abnormal Ca^{2+} handling, leading to alterations in axonal transport, bioenergetics, redox status, contractility, and cell viability [69–71]. It is clear that ER–mitochondria communication is very important for axonal survival and degeneration. In fact, MAMs are functionally implicated in axons, dendrites, and neuronal soma, modulating and maintaining synaptic activity [72–75]. For this reason, ER–mitochondria assembly has been proposed as a common mechanism in neurodegenerative disorders [76–79].

The first proteomic description of MAMs detected proteins involved in mitochondrial dysfunction as well as in neuromuscular and degenerative diseases, including Huntington's disease (HD), Parkinson's disease (PD), and Alzheimer's disease (AD) [23]. Nowadays, it is well described that the proteins involved in these diseases are resident in MAMs [80–83].

Specifically, these diseases exhibit increased ER–mitochondria contacts, leading to toxic mitochondrial Ca^{2+} uptake, reduced cell viability, and dysfunction in the subsequent mechanisms regulated in this domain [77–79].

Conversely, several neuropathies exhibit reduced ER–mitochondria connections and Ca^{2+} accumulation in the cytosol, impairing the communication between the two compartments and displaying mitochondrial alterations. Several forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are characterized by mitochondrial disruption and abnormal mitochondrial Ca^{2+} handling. This includes ALS forms with mutations in superoxide dismutase 1 (SOD1), in which mouse models exhibit mitochondrial defects and deficits in mitochondrial Ca^{2+} uptake [84,85]. Homozygous mutations in the ER protein Sig-1R are the cause of the juvenile form of ALS16 [86], showing ER–mitochondria dissociation in motor neurons, as well as a reduction in mitochondrial Ca^{2+} influx via IP_3R , and lower ATP production. These defects lead to neuron vulnerability, directly associated with the physiopathology of the disease [87].

Accordingly, dominant cerebellar ataxias are multifactorial and progressive diseases with common mechanisms of mitochondrial dysregulation, Ca^{2+} handling defects, and oxidative stress that contribute to neurodegeneration [88]. Specifically, spinocerebellar ataxias type 2 and 3 (SCA2/3) have been found to exhibit mutations in the IP_3R channel, which leads to the abnormal Ca^{2+} release to the cytoplasm, potentially inducing Ca^{2+} buffering defects in mitochondria [89]. Interestingly, different models of the recessive neuromuscular disorder Friedreich’s ataxia (FRDA) exhibit cytosolic Ca^{2+} accumulation, as well as impaired mitochondrial Ca^{2+} uptake and decreased inter-organelle interactions in MAMs. The protein involved in the disease, frataxin, has recently been found as a member of the protein network of MAMs, interacting with GRP75 and IP_3R [90–92]. Charcot–Marie–Tooth (CMT) is an inherited neuropathy caused by mutations in an important number of proteins related to mitochondrial function. Specifically, the causative genes for

CMT type 2 are ganglioside-induced associated protein 1 (*GDAP1*) and *MFN2* [93], which encode proteins located in the OMM that contribute to MAM's function. Deficiency in *GDAP1* leads to neuronal Ca^{2+} and mitochondrial defects, coupled with altered interplay between ER–mitochondria and Ca^{2+} accumulation in the cytosol [71,94,95]. Hereditary spastic paraplegia is associated with alterations in genes related to the ER that also affect the axonal transport of mitochondria, including IP_3R , suggesting impaired ER–mitochondria communication [96–98].

6. Therapeutic Approaches Targeting MAMs

Mitochondrial Ca^{2+} modulation is fundamental to maintain the physiological mechanisms that regulate metabolism, mitochondrial dynamics, and cell death. Therefore, MAMs emerge as potential therapeutic targets of neurological disorders. In this review we will focus on different therapeutic approaches (see Figure 1 for further information [99]) aimed to stabilize the ER–mitochondria assembly and, thus, promote Ca^{2+} influx into the mitochondria.

6.1. Sigma-1 Receptor as a Therapeutic Target

Sig-1R is a Ca^{2+} -sensitive chaperone located in the ER membrane, specifically in MAMs, and regulates Ca^{2+} homeostasis, lipid dynamics, MAMs' stability, and the ER stress response [41,100]. Sig-1Rs of different species share a very high sequence identity (>93%) but share no sequence homology with any other mammalian protein. Interestingly, the Sig-1R displays a 30% identity, a 67% homology, and a similar ligand profile to the yeast sterol isomerase encoded by the *ERG2* gene [101,102]. This conservation points towards Sig-1R as a fundamental protein for cell functioning. It is highly expressed in the central nervous system, playing a key role in physiological functions, such as cell differentiation, axon formation, microglial activation, and astrocyte regulation [103].

Sig-1R resides specifically on ceramide and cholesterol-rich lipid microdomains at MAMs, acting as an inter-organelle Ca^{2+} signalling modulator and exerting a pivotal role in neuroprotection and

neuroplasticity [104]. In physiological conditions, Sig-1R forms a complex with the chaperone binding immunoglobulin protein/glucose response protein 78 (BiP/GRP78), in a dormant, Ca^{2+} -dependent state. Once activated by agonists or ER Ca^{2+} -depletion, Sig-1R dissociates from BiP and reallocates within the ER membrane, interacting with different proteins, such as IP_3R . Then, IP_3R is prevented from degradation and promotes mitochondrial Ca^{2+} uptake (see Figure 1 for further information [99]) [42]. Thus, Sig-1R is a key element for maintaining the structure and function of MAMs. Besides, during ER stress response, Sig-1R expression increases, which prevents cells from apoptosis triggered under such conditions [105]. Sig-1R has been recently identified as indispensable for mitochondrial bioenergetics during early ER stress, which gives rise to an increased ER–mitochondrial Ca^{2+} exchange [106]. Hence, targeting Sig-1R may regulate ER stress, a common mechanism displayed in neurodegeneration [107]. Interestingly, Sig-1R ligands have been found to potentially offer protection against the most severe symptoms of SARS-CoV-2, providing mitochondrial protection, activating mitophagy, preventing ER-stress, managing Ca^{2+} transport, and inducing autophagy to prevent cell death in response to infection [108].

Recently, the basic structural pharmacophore of Sig-1R has been identified, which is critical for drug development. There is evidence about different shifting monomerization–oligomerization states of Sig-1R modulated by its ligands. In this sense, agonists and antagonists regulate the association between Sig-1R and BiP, controlling the interactome of Sig-1R [105,109,110]. The regulation of these mechanisms has a pivotal role in the context of MAMs and neurodegenerative diseases [111]. Transcriptional upregulation of Sig-1R induces its neuroprotective properties. For instance, it has been reported that Sig-1R upregulates the expression of the antiapoptotic mitochondrial protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), preventing neuronal cell death [112]. On the other hand, Sig-1R has been involved in the protection of cellular oxidative stress and the activation of antioxidant response elements [113]. In this line,

ANEXOS

overexpression of Sig-1R enhanced resistance to oxidative stress in *Drosophila melanogaster* [114]. Conversely, knockdown of Sig-1R leads to increased ROS and decreased expression and activity of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), the protein implicated in the activation of the intracellular antioxidant response [115]. These data point Sig-1R as a potential therapeutic target against oxidative stress-related diseases.

While Sig-1R deficiency exacerbates progression of neurological disorders and symptoms commonly associated to neurodegenerative disorders [116–118], many Sig-1R agonists exert anti-amnestic, synaptogenesis, and neuroprotective effects under neuronal stress conditions [119,120]. Indeed, the absence of Sig-1R leads to motor neuron degeneration, associated with reduced ER–mitochondria contacts, disturbed mitochondrial dynamics, and intracellular Ca^{2+} dyshomeostasis [121]. Remarkably, pharmacological modulation of Sig-1R has been demonstrated to mitigate disease and symptoms in different models of ALS, AD, PD, and HD (reviewed in [105]). Given the chaperone nature of Sig-1R, its activity in targeting conformationally misfolded proteins occurs only under such conditions. Indeed, it has been described that Sig-1R activation only exhibits therapeutic effects under pathological conditions and has no effect in control animals [122,123]. This provides evidence about the specificity of Sig-1R ligands in pharmacotherapy.

6.1.1. Pridopidine

Pridopidine (ACR16) is a selective Sig-1R agonist and a dopamine stabilizer [124,125]. Great focus has been given to pridopidine in recent years, especially in HD, where it has demonstrated to improve motor function in both animal models and patients, protecting neurons from mutant huntingtin toxicity [126]. For instance, Ryskamp and colleagues evaluated the relevance of Sig-1R as a therapeutic target of pridopidine in HD. Action of pridopidine is mediated by Sig-1R, leading to restoration of IP_3R -dependent Ca^{2+} release and upregulation of key Ca^{2+} -regulating genes

[126]. Furthermore, early treatment of pridopidine prior to the appearance of disease phenotypes improved motor coordination and reduced anxiety and depressive-like phenotypes in the YAC128 HD mice model, whereas late treatment only rescued depressive-like symptoms [126]. Interestingly, the research carried out by Naia *et al.* using different models of HD has highlighted the effects of pridopidine in mitochondrial function, contributing to neuroprotection mediated by Sig-1R. Authors reported that pridopidine prevented the disruption of ER–mitochondria contacts, also improving the colocalization of IP₃R and Sig-1R with mitochondria in YAC128 neurons. Accordingly, this compound increased mitochondrial activity, elongation, and motility. In both HD human neural stem cells and YAC128 neurons, pridopidine increased mitochondrial respiration, rescued antioxidant response, and decreased mitochondrial ROS levels caused by Sig-1R knockdown. Additionally, apart from the improvement in motor coordination, YAC128 mice treated at early/pre-symptomatic age with pridopidine showed a reduction in mitochondrial ROS levels. Overall, these results highlighted the effects of pridopidine in mitochondrial function, contributing to neuroprotection mediated by Sig-1R [126].

Regarding clinical evaluation, pridopidine has demonstrated some improvements in motor symptoms. A phase-III randomized, double-blind, multicenter trial study (NCT00665223, MermaiHD) failed to provide evidence about the effects of pridopidine in the primary outcome (changes in modified Motor score). Despite this, some parameters related to motor scales improved significantly in the 90 mg/day group [127]. According to these results, a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial (HART study, NCT00724048) could not reach its primary endpoint after 12 weeks of treatment. Nevertheless, patients treated with the highest doses improved in secondary motor evaluation, suggesting modest beneficial effects of pridopidine in HD [127]. Altogether, these results suggest the reproducible positive effects of pridopidine on motor symptoms in HD. Currently, a phase-III, randomized, double-blind, placebo-

ANEXOS

controlled study is recruiting patients to evaluate the efficacy and safety of pridopidine in patients with early-stage HD (NCT04556656) [128].

The efficacy of pridopidine has been tested in in vitro and in vivo models of ALS, due to the fact that different forms of ALS are caused by mutations in the Sig-1R gene [87,129]. Authors demonstrated beneficial effects of pridopidine-targeting Sig-1R on axonal transport perturbations, neuromuscular junction disruption, and motor neuron death. In addition, pridopidine slowed the progression of the disease in an ALS mouse model [130]. There is currently an ongoing phase-II clinical trial on the efficacy of pridopidine in ALS patients (NCT04615923) [131].

Recently, pridopidine has demonstrated neuroprotective and neurorestorative effects in nigrostriatal dopamine neurons via Sig-1R in an animal model of PD [132]. A phase-II, double-blind, parallel-group study started in 2019 with the aim of assessing two doses of pridopidine in levodopa-induced dyskinesia patients with PD (gLIDE study, NCT03922711) [133]. Despite the pending results, it seems that the study was cancelled early due to COVID-19 pandemic.

6.1.2. SA4503

SA4503 or cutamesine is an orally available, potent, and selective Sig-1R agonist that exhibits antiarrhythmic and antidepressant effects [134]. It has been reported to alleviate mitochondrial dysfunction, recovering ATP production in a dose-dependent manner and mobilizing intracellular Ca^{2+} into the mitochondria. These effects attenuated neuronal apoptosis [135] and ameliorated cardiac hypertrophy [136]. In addition, SA4503 promoted the survival of cortical neurons from oxidative-stress-induced cell death [137]. In ALS models, this compound has shown to suppress motor neuron degeneration and symptom progression [137]. In this line, SA4503 also enhanced the cytosolic Ca^{2+} clearance in motoneurons and IP_3R -mediated ER Ca^{2+} release in ALS mice [138]. In alpha-thalassemia X-linked intellectual disability, SA4503 reversed axonal development and dendritic

spine abnormalities in cultured cortical neurons, as well as cognitive deficits exhibited in the mice model [139].

In the clinical field, SA4503 has been evaluated in two trials. In 2008, the safety and efficacy of SA4503 was assessed in subjects with major depressive disorder (NCT00551109) [140]. Results and outcomes are pending. Furthermore, a phase-II, double-blind, placebo-controlled, ascending dose study evaluated the safety and motor function restoration in subjects with acute ischemic stroke (NCT00639249). Even though it was safe and well tolerated, no significant improvements were found [139].

6.1.3. Blarcamesine

Blarcamesine (ANAVEX2-73) is a safe Sig-1R agonist and muscarinic receptor modulator with preliminary efficacy evidence in patients with AD and Rett syndrome [141]. Preclinically, blarcamesine exerted anticonvulsant, anti-amnesic, neuroprotective, and antidepressant effects in various animal models of Rett syndrome [141], fragile X syndrome [141], AD [142,143], and amnesia [144]. These data suggest its potential in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases.

After demonstrating good safety, bioavailability, and tolerability in AD patients (NCT02244541) [145], blarcamesine has been tested in a phase-II, placebo-controlled study with Rett Syndrome patients (NCT03758924) [146]. Even though the trial is completed, results are still pending. Currently, different phase-II/III trials focused on PD (NCT04575259) [147], AD (NCT04314934) [148], and Rett Syndrome (NCT03941444, NCT04304482) [149,150], which are recruiting patients to evaluate the tolerability and efficacy of blarcamesine.

6.1.4. PRE-084

PRE-084 is a selective Sig-1R agonist that has demonstrated promising effects against oxidative stress and modulating intracellular Ca²⁺ levels in preclinical studies using different disease models. For instance, PRE-084 exerted protective action against oxidation and improved viability in

ANEXOS

human retinal cells [151]. In a HD cell model, pre-treatment with PRE-084 resulted in the prevention of caspase 3-cleavage, stimulation of cellular antioxidants, and a reduction in ROS in mutant huntingtin-expressing neuronal cells [152].

Furthermore, in a model of AD, treatment with PRE-084 restored mitochondrial respiratory dysfunction in mouse hippocampus and prevented increases in lipid peroxidation levels and apoptosis markers [143]. In this line, Watanabe S. et al. evaluated a Ca^{2+} influx into the mitochondria and ATP levels after incubating motor neurons of ALS with PRE-084. In all the experiments, this compound restored the function of IP_3R impaired in the model, suggesting that Sig-1R activation by PRE-084 prevented the disruption of Sig-1R- IP_3R interaction. In addition, intraperitoneal administration of PRE-084 in pre-symptomatic ALS mice successfully restored co-localization of Sig-1R and IP_3R analyzed in neurons of the lumbar spinal cord. These data indicate that Sig-1R activation is crucial to prevent MAMs disruption and regulate the Ca^{2+} exchange between the ER and the mitochondria via IP_3R [87]. PRE-084 improved locomotor function and motor neuron survival in pre-symptomatic and early symptomatic mutant ALS mice. Authors reported a promising strategy of pharmacological manipulation of Sig-1R, pointing to an increased availability of growth factors, as well as modulation of astrocytosis and macrophage-microglia as part of the mechanisms involved in Sig-1R-mediated neuroprotection [87]. Nevertheless, one of the studies aforementioned about the treatment of ALS motor neurons with SA4503 also tested PRE-084. Contrary to SA4503, PRE-084 did not reduce the cytosolic Ca^{2+} levels [138]. These findings indicate that different Sig-1R ligands may have different effects on MAMs-regulated Ca^{2+} homeostasis.

6.1.5. Fluvoxamine

Fluvoxamine is a selective serotonin reuptake inhibitor with high affinity for Sig-1R that has been widely used in clinical practice as an antidepressant. Fluvoxamine has shown to increase Sig-1R expression,

inducing neuroprotection and protecting cells from ER-stress [153]. This compound has also been found to rescue impaired mitochondrial Ca^{2+} uptake and ATP production in hypertrophic cardiomyocytes [154] and protect against cardiac dysfunction [155]. Furthermore, activation of Sig-1R by fluvoxamine has been demonstrated to activate several antioxidant pathways [155,156]. For instance, in brain and liver of oxidative stress-induced mice, fluvoxamine alleviated lipid peroxidation and oxidative stress by reducing malondialdehyde and nitric oxide levels and increasing reduced glutathione (GSH) [157]. Accordingly, this drug exerted anti-inflammatory and antioxidant properties by enhancing GSH levels and reducing the nitric oxide-dependent oxidative marker 3-nitrotyrosine [158]. Special attention has been paid lately to fluvoxamine regarding COVID-19. Clinically, this compound is well tolerated and widely available. Its mechanisms of action are involved with the hallmarks of severe COVID-19 (reviewed in [159]). At the moment, fluvoxamine has not been used in the clinical field beyond antidepressant or COVID-19 purposes.

6.2. Mitochondrial Calcium Uniporter as a Therapeutic Target

The mitochondrial calcium uniporter (MCU) is one of the most important and highly selective Ca^{2+} transporting complexes [160]. MCU is a crucial element of MAMs, acting as a gatekeeper of Ca^{2+} and controlling the mitochondrial Ca^{2+} influx. In fact, it has been determined that MCU and IP_3R must have optimal distance to ensure mitochondrial Ca^{2+} signalling in physiological conditions [161]. Located in the IMM, this pore-protein is composed of several subunits. While the pore-forming and Ca^{2+} -conducting subunit of the MCU complex is named Mcu, the regulatory subunit encompasses MICU1; MICU2; mitochondrial calcium uptake protein 1, 2, 3 (MICU3); essential MCU regulator (EMRE); mitochondrial calcium uniporter regulator 1 (MCUR1); and mitochondrial calcium uniporter regulatory subunit (MCUb) [162,163].

Specifically, MICU1 is an important gatekeeper located towards the mitochondrial matrix, next to the IMM. MICU1 controls the mitochondrial

ANEXOS

Ca²⁺ influx by interacting with Mcu, so when binding to Ca²⁺, its conformation changes from hexamers to oligomers and activates MCU [164,165]. Knock out of MICU1 in mice causes significant mortality, marked ataxia, and muscle weakness. Furthermore, patients with mutations in MICU1 exhibit brain and muscle disorders, proximal myopathy, learning difficulties, and a progressive extrapyramidal movement disorder [166]. Besides, MICU2 is also a gatekeeper and exhibits an inhibitor role of Ca²⁺ uptake, preventing Ca²⁺ to cross the IMM unless it is above the threshold. In fact, elevated Ca²⁺ levels in the intermembrane space are required to reach the mitochondrial matrix through MCU due to its low Ca²⁺ affinity [167]. MICU3 displays the same role as MICU2 but, in comparison, has a different tissue-dependent expression pattern [168]. EMRE is a single-pass transmembrane protein that functions as a positive regulator of MCU, and its interaction with MCU is essential for mitochondrial Ca²⁺ uptake, acting as a gatekeeper and preventing mitochondrial Ca²⁺ overload [169,170]. MCUR1 exerts a scaffold role, binding Mcu and EMRE [171,172]. MCUB is the negative regulatory subunit of MCU since its overexpression leads to a decreased Ca²⁺ intake by the MCU [173].

In the last decade, special interest has been taken in the modulation of MCU activity as a novel therapeutic target. Most current therapeutic approaches are focused on the inhibition of ER-mitochondria Ca²⁺ exchange, mainly in cancer [174,175] and neurodegenerative disorders [176] (such as AD [177] and PD [178]).

However, diseases such as type 2 diabetes point towards MCU activation to alleviate mitochondrial dysfunction associated with dysregulation in intracellular Ca²⁺ homeostasis, MAMs disruption, and defects in several functions regulated in this domain [179,180]. Targeting the MCU has been demonstrated to be beneficial in models with impaired ER-mitochondria inter-organelle communication. For instance, MCU activation by spermine increased cytosolic Ca²⁺ clearance by promoting mitochondrial Ca²⁺ buffering capability in cardiomyocytes with cardiac hypertrophy. In this

cellular model, SR-mitochondria connections were decreased by the inhibition of Mfn2, leading to inhibition of ATP synthesis and contributing to pathogenesis [181].

Besides, genetic modulation of MCU expression has proved to modulate mitochondrial Ca^{2+} uptake [182]. In this line, either MCU overexpression or MCU activation by spermine reversed Pb^{2+} -induced oxidative stress and inhibition of mitochondrial Ca^{2+} uptake in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [183]. The promotion of mitochondrial Ca^{2+} import through MCU overexpression in glia recovered degenerative phenotypes and ATP production in a FRDA *Drosophila melanogaster* model [90].

Kaempferol

The most relevant MCU enhancer described until now is Kaempferol, which has demonstrated to enhance MCU, promoting Ca^{2+} import into the mitochondria and exhibiting neuro and cardioprotective properties [184–188]. In 2004, Montero and collaborators identified different flavonoids with the effect of stimulating mitochondrial Ca^{2+} entry through MCU activation. The most active compound was Kaempferol, which increased the rate of mitochondrial Ca^{2+} uptake by 85-fold [189]. In addition, Kaempferol modulates autophagy to protect cells from malfunction and regulates ER stress [190,191]. Special attention has been paid to Kaempferol recently due to its anti-inflammatory and antioxidant properties. For instance, Kaempferol was able to induce NRF2 expression in brain tissues [184]. A recent study suggests that Kaempferol augmented the phosphorylation of PIK3 and Akt, thus allowing Keap-1 to release NRF2 and promote antioxidant response in the nucleus [192].

Accordingly, in cerebellar granule cells, Kaempferol prevented cells from apoptosis, exerting potent effects by blocking ROS production [193]. In ischemia-reperfusion injury models, Kaempferol reduced mitochondrial dysfunction and reduced oxidative stress by decreasing ROS and malondialdehyde levels, whereas GSH and GSH peroxidase levels increased significantly [194–196]. In a *D. melanogaster* model of PD, kaempferol

delayed degenerative phenotype onset in a dose-dependent manner, accompanied by a reduction in oxidative stress markers [197]. Similar effects on phenotype and oxidative stress were reported in a *D. melanogaster* model of AD [198]. Indeed, a study conducted with 921 participants concluded that kaempferol and other flavonoids are associated with lower risk of developing AD [199]. Kaempferol was proposed as a bone-fide candidate for the design of therapeutic approaches against familial ALS from a computational perspective through molecular docking, quantum chemical studies, and molecular dynamics [200].

6.3. Other Approaches

In addition to the aforementioned approaches, other compounds may be suitable to increase mitochondrial Ca^{2+} uptake without a specific ER-mitochondria target.

6.3.1. Taurine

Taurine is a sulfur-containing amino acid present in abundance in many excitable tissues, including the brain, skeletal, and cardiac muscles. Physiological actions of taurine include membrane stabilization, neurotransmission, and modulation of cellular Ca^{2+} levels [201]. El Idrissi and Trenkner evaluated the neuroprotective role of taurine in the regulation of mitochondrial Ca^{2+} buffering in cerebellar granule cells. They demonstrated an active role in the regulatory mechanisms of Ca^{2+} homeostasis, suggesting an enhancement in mitochondrial function and regulation of intracellular Ca^{2+} [202,203]. Besides the suggestion of a selective mechanism of taurine in mitochondrial Ca^{2+} uptake enhancement, though the specific receptor of taurine is not known.

6.3.2. Nerve Growth Factor

Nerve growth factor (NGF) is a secreted neurotrophin involved in survival, maintenance, and regeneration of specific types of neurons in the central and peripheral nervous system [204]. It has been highlighted as a potential therapeutic option for neurodegeneration due its role in apoptosis

prevention [205], mitochondrial dysfunction protection [206], mitochondrial remodelling, and intracellular Ca^{2+} mobilization [207,208]. In the context of Ca^{2+} signalling, NGF has been demonstrated to increase cytosolic free Ca^{2+} concentration in C6-2B glioma cells and PC12 cells [209], as well as mitochondrial Ca^{2+} [207]. NGF was assessed in an open-label, dose-escalation study of encapsulated cell biodelivery of NGF in AD patients. Authors reported that preliminary data of the NGF treatment seemed to slow the rate of atrophy depending on the subtype of AD [210]. For this reason, NGF treatment should be further investigated for neuronal support.

6.3.3. MiCUPs

Mitochondrial Ca^{2+} uptake enhancers (MiCUPs) are a group of compounds recently identified to increase mitochondrial Ca^{2+} import, especially in cardiomyocytes. Using molecular ligand–protein docking and mutational analysis, a recent study has determined Efsevin as a MiCUP that shifts the opening of the VDAC2 channel, promoting Ca^{2+} entry to the mitochondria [211]. It has been mostly used in cardiac models, due to its ability to regulate cardiac rhythmicity [187,212]. Ezetimibe and disulfiram have been recently identified as MiCUPs, proving to efficiently suppress arrhythmogenesis in different experimental models. The identification of such compounds underscores mitochondrial Ca^{2+} uptake as a pharmacological target [213].

6.3.4. Antioxidants

Targeting the mitochondrial redox state could be a suitable therapeutic strategy to recover ER–mitochondria communication. In this context, compounds may modulate mitochondrial Ca^{2+} signalling to stabilize its redox state or directly target mitochondrial ROS [214]. The first strategy has been discussed before; many of the aforementioned compounds exert antioxidant properties in addition to its main mechanism of action, which can readjust the ER–mitochondria Ca^{2+} flux and, thus, ensure a correct balance in the ROS–antioxidant system. In the context of the second

ANEXOS

strategy, treatment with antioxidants has been demonstrated to recover ER–mitochondria communication and Ca^{2+} exchange between the two compartments. Vitamin E restored mitochondrial Ca^{2+} uptake in a cardiomyocyte model of FRDA [91]. Accordingly, trolox (mimic of vitamin E) and N-acetylcysteine were able to recover both function and structure of MAMs in a neuronal model of FRDA [90], suggesting an oxidative environment in MAMs is implied in the pathophysiology of the disease. In essence, the use of antioxidants may be a good strategy to both reduce redox environment in MAMs and potentiate Ca^{2+} influx in the mitochondria.

On the other hand, when mitochondrial function is impaired, it is realistic to assume the involvement of different effectors and mechanisms. For this reason, some authors point towards the use of a combination of antioxidants also known as ‘mitochondrial cocktails’, due to its irrelevant toxicity, providing relevant benefits by increasing the spectrum of action [215–218].

SS-31 or elamipretide is an aromatic–cationic tetrapeptide that readily penetrates cell membranes and transiently localizes to the inner mitochondrial membrane. This mitochondrial-targeted agent was found to interact with cardiolipin, an anionic phospholipid located in the IMM and required for cristae formation. In addition, SS-31 accelerates ATP recovery and increases the enzymatic activities of Fe-S enzymes, including aconitase and complex II and III of the respiratory chain [219,220]. Another study suggested that SS-31 could have therapeutic potential effects in preventing damage from oxidative stress in neurocognitive disorders [221]. SS-31 has demonstrated to be safe and well tolerated. It has been tested in a crossover clinical trial evaluating its efficacy in primary mitochondrial myopathy for 4 weeks. Patients experienced a clinically meaningful change in the primary endpoint, which was not significant [222]. Nonetheless, these and other relevant results provided efficacy to support the initiation of a 6-month-long, phase-III study. Another clinical trial (NCT04689360)

is currently recruiting patients with genetically confirmed rare diseases with known mitochondrial dysfunction [223].

Mitoquinone or MitoQ is an orally active mitochondria-targeted antioxidant that mimics the role of the endogenous mitochondrial antioxidant coenzyme Q10 [224]. In addition, MitoQ has demonstrated to substantially increase the antioxidant capacity of coenzyme Q10 by modulating oxidative stress via activating the NRF2 pathway [225,226] and increasing GSH levels [227]. Treatment in vitro and in vivo with MitoQ has provided evidence about its beneficial effects in neuroprotection, as well as in restoring mitochondrial dynamics, bioenergetics, and the redox state [228,229]. MitoQ is currently being evaluated in several clinical trials, including its assessment in AD (NCT03514875) [230], vascular function (NCT02966665) [231], and multiple sclerosis (NCT04267926) [232], among others.

These and other antioxidants targeting mitochondrial dysfunction in neurodegeneration have been extensively reviewed by several authors, including us [218,233–238].

7. Conclusions and Future Perspectives

Since mitochondria are intracellular dynamic compartments involved in multiple mechanisms, the in-depth study of these mitochondrial-dependent pathways is crucial to understand the pathophysiology of neurological and neuromuscular disorders. Particularly, we highlight the importance of crosstalk communication between the ER and the mitochondria in intracellular Ca^{2+} homeostasis and, therefore, in cell physiology. Since MAMs are the structures carrying out such communication, their disruption involves dramatic consequences that not only affect mitochondrial mechanisms, but also a plethora of intracellular signalling pathways. An example of such disarrangement is exerted in neurological disorders, as the proteins involved in these diseases are part of the protein network of MAMs [86,90,239].

ANEXOS

On the other hand, proteins belonging to MAMs are a growing list, which contributes to the idea of the complexity and dynamism of these structures and, thus, the mechanisms involved in its regulation. For this reason, it is also important to determine the properties of MAMs in different cell types under distinct cellular conditions. The elucidation of these pathways will provide valuable information about the physiopathology of diseases that present impaired ER–mitochondria communication, opening new fields of research to identify adequate treatments for patients.

We believe that restoration of MAMs communication may be a suitable strategy to reverse this impairment. In addition, some patients suffering from neuromuscular diseases usually undergo heart conditions [240–242]. Interestingly, the activation of targets, such as Sig-1R, has demonstrated to have both neuro and cardioprotective effects. As compounds such as pridopidine and blacarmesine are currently being evaluated in clinical trials, the results obtained may be applicable to other diseases with common impaired mechanisms. Furthermore, oxidative stress is a common hallmark in neurological disorders [234,243,244], so the activation of antioxidant mechanisms has always been a common therapeutic strategy. The fact that many compounds targeting mitochondrial Ca^{2+} uptake can, therefore, exert antioxidant properties, making them more versatile in restoring the molecular defects involved in these diseases.

In terms of future therapeutic approaches, special attention is being paid to miRNAs. These small molecules regulate genetic expression by binding to its target mRNA and can be detected in biological fluids. The identification of miRNA signatures could provide valuable information about diagnosis or prognosis, even in the early stages of the disease. Besides, this should address the nature of targets and the extent of the biological regulation of the occurring pathways. For instance, miR-20b has been found to mediate MFN2 signalling, which can impair ER–mitochondria Ca^{2+} crosstalk and contribute to cardiac hypertrophy [181]. This opens a new field of therapy development in MAMs communication.

Neurological diseases, such as ALS, CMT, and FRDA, have no cure, so it is essential to find therapeutic approaches that can improve patient's wellbeing by either slowing the onset of symptoms and/or delaying the progression of the disease, in addition to physical therapy, occupational therapy, and surgery. The repurposing of compounds outlined in this review could be a good strategy to test *in vitro* and *in vivo* models of disease. Furthermore, the use of new *in silico* approaches, such as pharmacophore modelling and molecular docking, are useful to ensure optimal molecular interactions with a specific biological target. This may contribute to identifying new targets, drug discovery, and optimization for specific treatments [245–247].