



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS**

**EFFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA BIOGÉNESIS DE PROTEÍNAS
CON CENTROS Fe-S SOBRE LA TOLERANCIA A ETANOL Y SU
RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN *Saccharomyces cerevisiae***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

M.C. ROCÍO VIRIDIANA PÉREZ GALLARDO

ASESOR DE TESIS:

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA
JESÚS CAMPOS GARCÍA**

COASESOR DE TESIS:

**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
JOSÉ SALUD RODRÍGUEZ ZAVALA**

MORELIA, MICHOACÁN.

FEBRERO DEL 2014

INDICE GENERAL

Resumen	3
Abstract.....	4
1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1 La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.1.1 Aspectos históricos	5
1.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : un organismo modelo	6
1.2 Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.2.1 Metabolismo glicolítico	8
1.3 Cadena transportadora de electrones de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.4 Efectos asociados al metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
1.4.1 Efecto Pasteur	15
1.4.2 Efecto Crabtree	15
1.5 Alternativas metabólicas del piruvato y regulación de la fermentación y respiración en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.6 Metabolismo del etanol en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.7 Efectos tóxicos del etanol en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.7.1 Mecanismos para contrarrestar los efectos tóxicos del etanol en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.8 Centros [Fe-S]	21
1.9 Función de las proteínas con centros [Fe-S].....	23
1.9.1 Trasferencia de electrones	23
1.9.2 Catálisis enzimática	25
1.9.3 Regulación	25
1.10 Biogénesis de proteínas con centros [Fe-S].....	26
1.10.1 Biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
1.10.2 El sistema ISC mitocondrial en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
1.11 Metabolismo de hierro en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
1.12 Estrés oxidativo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
1.12.1 Cadena respiratoria y producción de ERO en la mitocondria	38
1.12.2 Daño a biomoléculas por las ERO	40
1.12.3 Defensas antioxidantes	42
2.- HIPOTESIS	45
3.- OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo General.....	45
3.2 Objetivos específicos	45
4.- RESULTADOS	46
4.1.-CAPITULO 1	46
4.2.-CAPITULO 2	63
5.- RESULTADOS ADICIONALES	105
5.1 La tolerancia a estrés oxidativo es afectada por mutaciones en el sistema ISC de <i>S. cerevisiae</i>	105
5.2 Las defensas antioxidantes son alteradas por mutaciones en el sistema ISC y etanol en <i>S. cerevisiae</i>	107
6.- DISCUSIÓN	109
7.- REFERENCIAS	126

Resumen

El etanol es el metabolito de la fermentación más importante producido por la *Saccharomyces cerevisiae*. A pesar de la inherente capacidad que posee esta levadura para producir y tolerar etanol, éste puede ser letal a altas concentraciones. La toxicidad del etanol involucra la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). La biogénesis de proteínas con centros Fe-S es uno de los procesos metabólicos más conservados entre los organismos. En lo que respecta a las levaduras, este proceso es llevado a cabo por un grupo de proteínas codificadas en un conjunto de genes denominados *ISC* (iron-sulphur-cluster), entre los que se encuentran los genes *NFS1*, *ISU1*, *ISU2*, *ISA1*, *ISA2*, *JAC1*, *SSQ1*, *YAH1*, *GRX5* e *IBA57*. Las proteínas con centros Fe-S están implicadas en un gran número de procesos celulares, sin embargo, son altamente susceptibles al daño por ERO, lo que da lugar a la liberación de sus átomos de hierro, y a la aparición de un ciclo de daño oxidativo. Por lo tanto, la integridad del sistema *ISC* podría ser fundamental para mantener niveles bajos de ERO durante estímulos relacionados con el estrés oxidativo. A este respecto estudios previos sugieren que el sistema *ISC* podría estar relacionado con la tolerancia a etanol. El objetivo de la presente investigación fue estudiar el mecanismo de tolerancia a etanol, su relación con el estrés oxidativo y la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] en *S. cerevisiae*. Los resultados revelaron que la tolerancia a etanol y otras sustancias generadoras de ERO disminuye con la mutación de los genes *SSQ1*, *ISA1* e *IBA57* e incrementa la producción mitocondrial de ERO. Estas mutantes muestran también disminución de las defensas antioxidantes, disfunción mitocondrial e incremento en los niveles de hierro libre. Además el tratamiento con 10 % de etanol estimuló la liberación del citocromo *c* y se observó una exacerbación de este fenómeno en las mutantes *ISC*, lo que indica que el etanol desencadena una respuesta de apoptosis. Lo anterior sugiere que un adecuado control en la homeóstasis del hierro mitocondrial así como una correcta funcionalidad de la cadena de transporte de electrones son necesarios para prevenir un incremento en la formación de ERO producidas por el etanol.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, biogénesis de Fe-S, tolerancia a etanol, estrés oxidativo.

Abstract

Ethanol is the most important metabolite produced by fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. The inherent ability possessed by this yeast to produce ethanol and tolerate, it can be lethal in high concentrations. The toxicity of ethanol involved the production of reactive oxygen species (ROS). The protein biogenesis with Fe-S is one of the most conserved among organisms metabolic processes. With relation to yeast, this process is carried out by a group of proteins encoded in a set of genes called *ISC* (iron-sulphur-cluster), among which are the genes *NFS1*, *ISU1*, *ISU2*, *ISA1*, *ISA2*, *JAC1*, *SSQ1*, *YAH1*, *GRX5* and *IBA57*. The proteins with centers Fe-S are involved in many cellular processes, however, are highly susceptible to damage by ROS leading to the release of atoms of iron, and the occurrence of a cycle of oxidative damage. Thus, the ISC system integrity may be critical to maintain low levels of ROS during stimuli associated with oxidative stress. In this regard, previous studies suggest that the ISC system may be related to ethanol tolerance. The objective of this research was to study the mechanism of ethanol tolerance, their relationship with oxidative stress and biogenesis of proteins with [Fe- S] centers in *S. cerevisiae*. The results revealed that tolerance to ethanol and other ROS-generating substances decreases with gene mutation *SSQ1*, *ISA1* and *IBA57* and increases mitochondrial production of ROS. These mutants also show decreased antioxidant defenses, mitochondrial dysfunction and increased levels of free iron. Furthermore, treatment with 10% ethanol stimulated cytochrome c release exacerbation of this phenomenon was observed in the ISC mutants, indicating that ethanol trigger an apoptotic response. This suggests that an adequate control of mitochondrial iron homeostasis and correct functionality of the electron transport chain are necessary to prevent an increase in the formation of ROS produced by ethanol.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Fe-S biogenesis, ethanol tolerance, oxidative stress.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 La levadura *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.1 Aspectos históricos

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una amplia variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad para el hombre. De hecho, se considera que las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad (Jacques *et al.*, 2003).

En el lenguaje cotidiano, el término levadura es sinónimo de *Saccharomyces cerevisiae*, nombre dado a la cepa de levadura descubierta en la malta en 1833 durante la elaboración de cerveza, aunque es conocida desde la antigüedad como la levadura del pan y/o de la cerveza. Por su utilización en estos procesos, es probablemente el organismo doméstico más antiguo, puesto que en Sumeria y en Babilonia, alrededor del año 6000 A.C., ya la utilizaban para la elaboración de cerveza. En Egipto, la cerveza era un regalo otorgado a los funcionarios públicos y trabajadores que realizaban servicios extraordinarios (Feldmann, 2012). La palabra francesa “*levure*” se remonta al latín “*levare*” (levadura) y remite a la experiencia visual de la masa del pan que se “levanta”. La palabra inglesa yeast, así como la holandesa *guist*, o incluso la palabra alemana *hefe*, se derivan de la expresión haf-jon del oeste de Alemania, refiriéndose a la capacidad de levantar (leaven=levadura). Las palabras usadas en lenguaje europeo para cerveza (francés “*bière*”, alemán “*Bier*” e italiano “*birra*”) están directamente relacionadas al organismo (*cerevisiae*) usado para la fabricación de la cerveza (brewing), cuya relación es más obvia en el lenguaje español “*cerveza*” o portugués “*cerveja*”. La palabra griega *zymi* (ζυμι) es usada para referirse tanto a levadura como a la masa, de cuya raíz proviene la palabra cerveza o fermentación. De hecho la expresión moderna de “*enzima*” (en *zymi* = en levadura) originalmente acuñado por Wilhelm Kühne (1877) designa los compuestos derivados de las levaduras capaces de fermentar azúcar (Feldmann, 2012).

Su nombre alternativo de "fermento" viene del latín *fervere*, que significa hervir y proviene del movimiento del mosto durante la producción del vino y la cerveza. Por lo tanto, el conocimiento y percepción de la levadura está absolutamente condicionado por sus propiedades de fermentación del pan, el vino y la cerveza. De hecho, la investigación biotecnológica ha mantenido su uso tradicional mejorando e innovando los procesos de producción de bebidas alcohólicas.

Otro aspecto interesante es que gracias al estudio con levaduras se fundó la ciencia de la bioquímica. En 1897, los hermanos Hans y Edward Buchner obtuvieron extractos libres de células moliendo levadura para pan, a los cuales adicionaron grandes cantidades de azúcar de caña para evitar su posible contaminación. Para su sorpresa, encontraron que el azúcar se fermentaba rápidamente: por primera vez se había descubierto un modelo para el estudio de la fermentación alcohólica en un sistema carente de células. Este descubrimiento atrajo la atención de los bioquímicos, que decidieron analizar cada uno de los pasos que conducían a la producción de etanol y bióxido de carbono a partir de la glucosa. Este trabajo implicó el esfuerzo de muchos científicos y dio como resultado el descubrimiento y descripción del metabolismo del carbono; algunas de las vías metabólicas que conocemos actualmente, llevan los nombres de los científicos que participaron en este trabajo, como Embden y Meyerhof. La vía metabólica que permite la utilización de glucosa fue la primera ruta metabólica descrita, y la metodología empleada para lograrlo se utilizó para el estudio posterior de otras vías que constituyen el metabolismo celular, fundando así la bioquímica (Feldmann, 2012).

1.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*: un organismo modelo

Entre los organismos eucariotas, *S. cerevisiae* cuenta con grandes ventajas para ser usado como modelo de estudio de diversos procesos bioquímicos. Es un organismo unicelular que a diferencia de los eucariontes más complejos, se puede cultivar en medios específicos que permiten un control total sobre parámetros ambientales. *S. cerevisiae* es manipulable con técnicas de genética clásica; los análisis de segregación y estudio de mutantes son mucho más simples y fáciles de realizar que en un organismo multicelular, además esta levadura posee una alta tasa de recombinación homóloga endógena y cuenta

con elementos de ADN extracromosomal, lo que permite su transformación de manera estable. Así, el análisis y la clonación de los genes en este organismo es significativamente más fácil que en eucariontes más complejos. Además, la similitud entre los sistemas celulares fundamentales (división celular, cromosomas, respuesta al estrés y metabolismo primario, entre otros) de la levadura y de los animales superiores ha consolidado a este microorganismo como modelo eucariota a nivel celular y molecular (Chang y Burgess, 2002).

La levadura *S. cerevisiae* posee un genoma pequeño, solamente una cuantas veces mayor que el de la bacteria *Escherichia coli* y 200 veces menor que el de mamíferos; esto simplifica de manera importante el análisis genético y molecular del mismo. En 1996 se obtuvo la secuencia del genoma de *S. cerevisiae* y es todavía el genoma eucariota mejor conocido, tanto en los aspectos estructurales como funcionales. Una levadura haploide contiene 12 millones de pares de bases (12 Mb) repartidos en 16 cromosomas, variando en tamaño de 200 a 2200 kb, en los cuales se han localizado aproximadamente 6,183 marcos de lectura abiertos (ORF) (Dujon, 1996). A diferencia de los genomas de organismos multicelulares, el genoma de la levadura es muy compacto, dado que el 72% de la secuencia corresponde a secuencias codificantes y solamente el 3.8 % de los ORF's contienen intrones, incidiendo en una baja redundancia genética, lo que facilita el análisis de la función de sus genes.

El ADN mitocondrial codifica para los componentes de la maquinaria traduccional de la mitocondria y aproximadamente el 15 % de las proteínas mitocondriales. Existen mutantes que carecen de ADN mitocondrial, las cuales se denominan ρ^0 (Rho^0) y carecen de los polipéptidos que se sintetizan en los ribosomas mitocondriales. Estas mutantes son incapaces de llevar a cabo el metabolismo respiratorio, pero son viables y capaces de fermentar sustratos como la glucosa (Foury *et al.*, 1998).

El ciclo de vida de la levadura es similar a la de cualquier eucariota sexual, alternando entre estados haploides y diploides, los cuales contienen uno o dos conjuntos de cromosomas complementarios. En *S. cerevisiae* existen las cepas heterotáticas, que presentan formas vegetativas tanto haploides como diploides, ambas capaces de reproducirse asexualmente y formar colonias (Chang y Burgess, 2002).

1.2 Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Las vías del metabolismo central del carbono son básicamente idénticas entre diferentes especies de levadura, lo que sugiere que estos microorganismos podrían constituir un grupo metabólico homogéneo. No obstante, los mecanismos de captación de nutrientes, el número de diferentes isoenzimas y lo más importante, la regulación de la fermentación y la respiración difieren sustancialmente, haciendo que las levaduras sean un grupo metabólico muy heterogéneo y complejo (Flores *et al.*, 2000).

1.2.1 Metabolismo glicolítico

En las levaduras, al igual que otros organismos heterótrofos, el metabolismo energético y del carbono se encuentran íntimamente interconectados, es decir, el anabolismo se acopla con el catabolismo. El ATP es generado por la oxidación de moléculas orgánicas que también actúan como fuentes de carbono para la biosíntesis y en última instancia se utiliza como moneda energética para todo tipo de trabajo celular (Rodrigues *et al.*, 2006).

Las levaduras tienen la capacidad de metabolizar una amplia variedad de fuentes de carbono para mantener su crecimiento (por ejemplo: polioles, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos), sin embargo, metabolizan preferentemente los carbohidratos (Rodrigues *et al.*, 2006). Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada por cinasas a glucosa-6-fosfato y posteriormente es isomerizada a fructosa-6-fosfato, por la fosfo-glucosa isomerasa. La fructosa-6-fosfato es entonces fosforilada a fructosa-1,6-bisfosfato por la enzima fosfo-fructocinasa, la cual está sujeta a regulación por parte de varios metabolitos. Estos pasos son la primera parte de la glicólisis que requieren de energía en forma de ATP (Fig. 1). Las enzimas que actúan posteriormente son la aldolasa, triosafosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato cinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y piruvato cinasa. El último paso de la glicólisis conduce a la formación de piruvato, asociada con una producción neta de energía y equivalentes reductores en forma de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido); en donde por cada molécula de glucosa catabolizada en la

glicolisis se producen dos moléculas de piruvato, dos de ATP y dos de NADH (Rodrigues *et al.*, 2006).

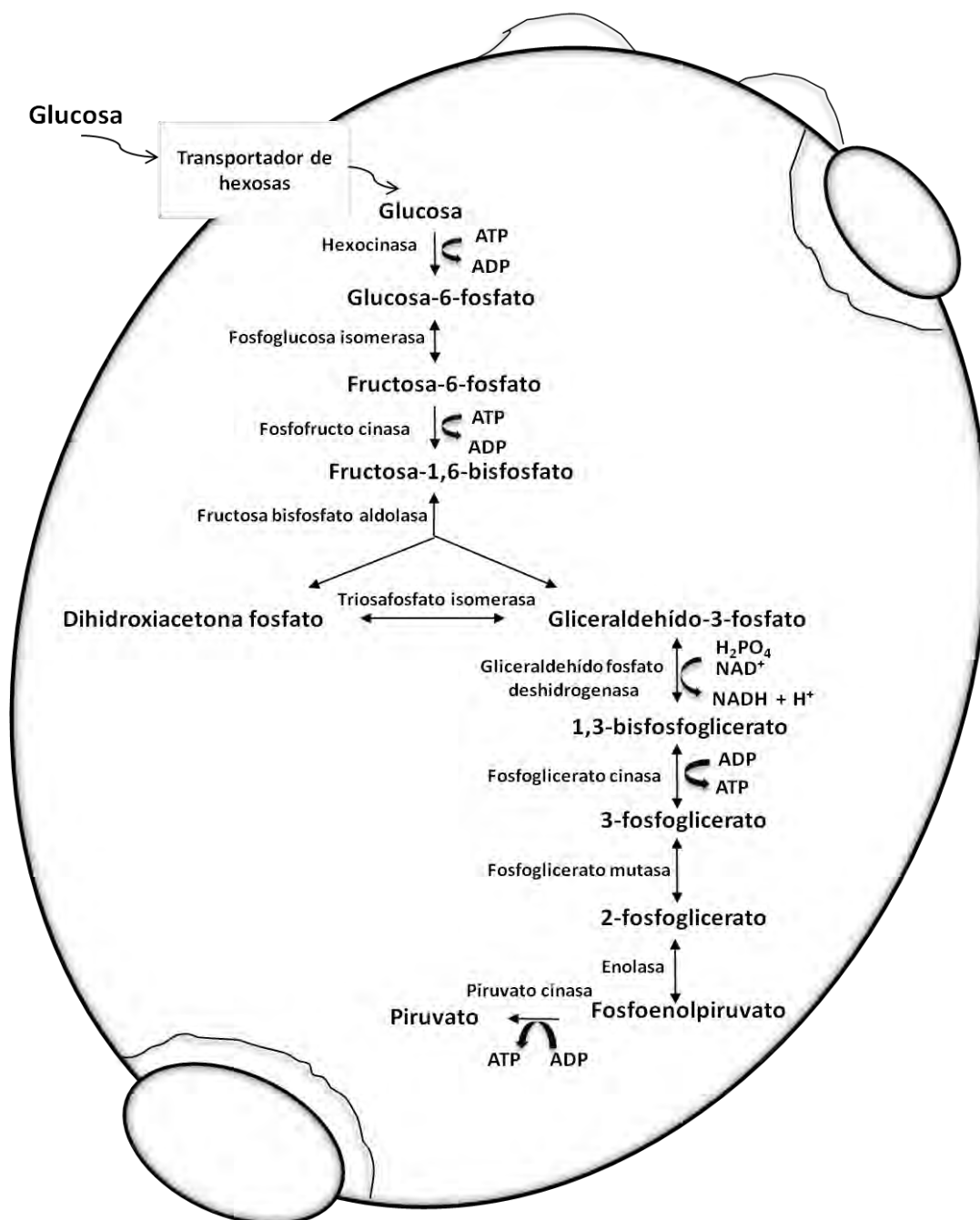


Figura 1.- Ruta glicolítica descrita en *Saccharomyces cerevisiae*. Consiste en 10 reacciones enzimáticas que permiten la transformación de una molécula de glucosa a dos moléculas de piruvato. Ésta se encuentra dividida en dos fases: la primera, de gasto de energía que consiste en transformar una molécula de glucosa en dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato mediante el uso de 2 ATP y la segunda fase, de obtención de energía, donde el gliceraldehído se transforma en un compuesto de alta energía, cuya hidrólisis genera una molécula de ATP. (Tomada y modificada de Jacques *et al.*, 2003).

El piruvato es un intermediario clave en el metabolismo de los azúcares. Este es el punto de bifurcación entre tres diferentes destinos metabólicos, dependiendo de la especie de levadura y las condiciones ambientales, siendo el punto de bifurcación entre la fermentación y la respiración (Pronk *et al.*, 1996). Cuando *S. cerevisiae* se encuentra bajo condiciones aeróbicas y con bajas concentraciones de azúcar en el medio, el piruvato puede ser transportado hacia la mitocondria por el transportador mitocondrial del piruvato donde sufre una descarboxilación oxidativa por el complejo multienzimático mitocondrial piruvato deshidrogenasa (PDH), produciendo una molécula de acetil-CoA, una de CO₂ y una de NADH (Fig. 2).

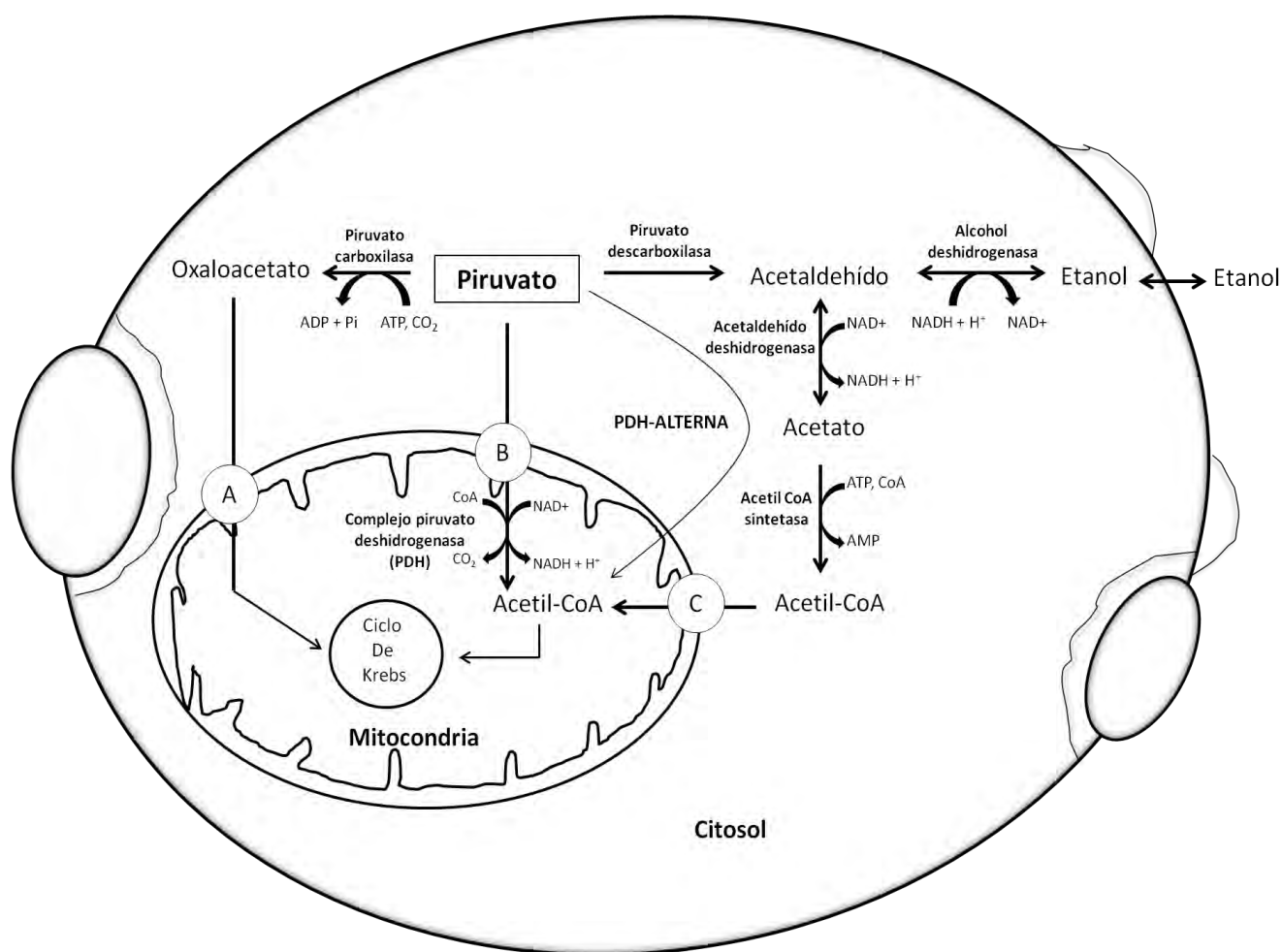


Figura 2.- Alternativas metabólicas del piruvato. El piruvato formado en la glicólisis es convertido a acetil CoA y/o oxalacetato, los cuales pueden entrar al ciclo del Krebs, o puede ser convertido a etanol dependiendo de las condiciones de cultivo. A) acarreador mitocondrial del oxalacetato; B) acarreador mitocondrial del piruvato y C) acetil-transferasa de la carnitina (Tomada y modificada de Rodrigues *et al.*, 2006).

Alternativamente, el piruvato también puede ser convertido en acetil-CoA en el citosol por la vía denominada PDH-alterna (Pronk *et al.*, 1996). El acetil-CoA generado ya sea por el complejo PDH o por la vía PDH-alterna es el enlace entre la glicólisis y el ciclo de Krebs. Esta ruta metabólica mitocondrial está conformada por ocho reacciones enzimáticas, cuya principal función catalítica es proporcionar equivalentes reductores (tres NADH y un FADH₂ por ciclo), los cuales son incorporados a la cadena respiratoria a través de la descarboxilación oxidativa del acetil-CoA. Sin embargo, el ciclo de Krebs también participa en el metabolismo biosintético y, con la excepción del isocitrato, cada intermediario de este ciclo es frecuentemente utilizado para otras reacciones metabólicas (Rodrigues *et al.*, 2006). Durante el metabolismo respiratorio los equivalentes reductores generados tanto en la mitocondria como en el citosol son re-oxidados por la cadena respiratoria o cadena transportadora de electrones (CTE). La CTE está compuesta por cinco complejos polipeptídicos, así como dos acarreadores móviles de electrones la ubiquinona y el citocromo *c*. (Fig. 3). La CTE acopla el transporte de electrones con la translocación vectorial de protones hacia el espacio intermembranal específicamente a través de los complejos I, III y IV, generando un potencial electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial. La energía del reingreso de estos protones es utilizada por la F₁-F₀-ATP sintasa para la producción de ATP. Los complejos I, III y IV participan en la oxidación del NADH₂ con la subsecuente producción de tres moléculas de ATP por cada NADH oxidado; mientras que para la oxidación del FADH₂, participan los complejos II, III y IV con la producción de dos moles de ATP por cada molécula de FADH₂ (Mathews *et al.*, 2003).

El complejo I es el de mayor masa molecular de los que conforman la cadena respiratoria, comprende por lo menos 45 subunidades, 7 de las cuales son codificadas por el ADN mitocondrial (Dieteren *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 1991). Este complejo acopla la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona, vía una molécula de FADH₂ y 8 centros Fe-S con la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial (Joseph-Horne *et al.*, 2001).

1.3 Cadena transportadora de electrones de *Saccharomyces cerevisiae*

Un aspecto importante en levaduras tales como *S. cerevisiae*, *S. carlsbergii* y *Kluyveromyces lactis*, es que el complejo I está ausente y en su lugar contienen NADH:ubiquinona oxidorreductasas o NADH deshidrogenasas alternas (Joseph-Horne *et al.*, 2001).

S. cerevisiae posee tres NADH deshidrogenasas alternas, las cuales suplen la función del complejo I de la CTE. Dos NADH deshidrogenasas externas cuyo sitio activo se encuentra orientado hacia el espacio intermembranal, las cuales están codificadas por los genes *NDE1/2*; mientras que la NADH deshidrogenasa interna se orienta hacia la matriz mitocondrial y es codificada por el gen *NDI1* (Fig. 3).

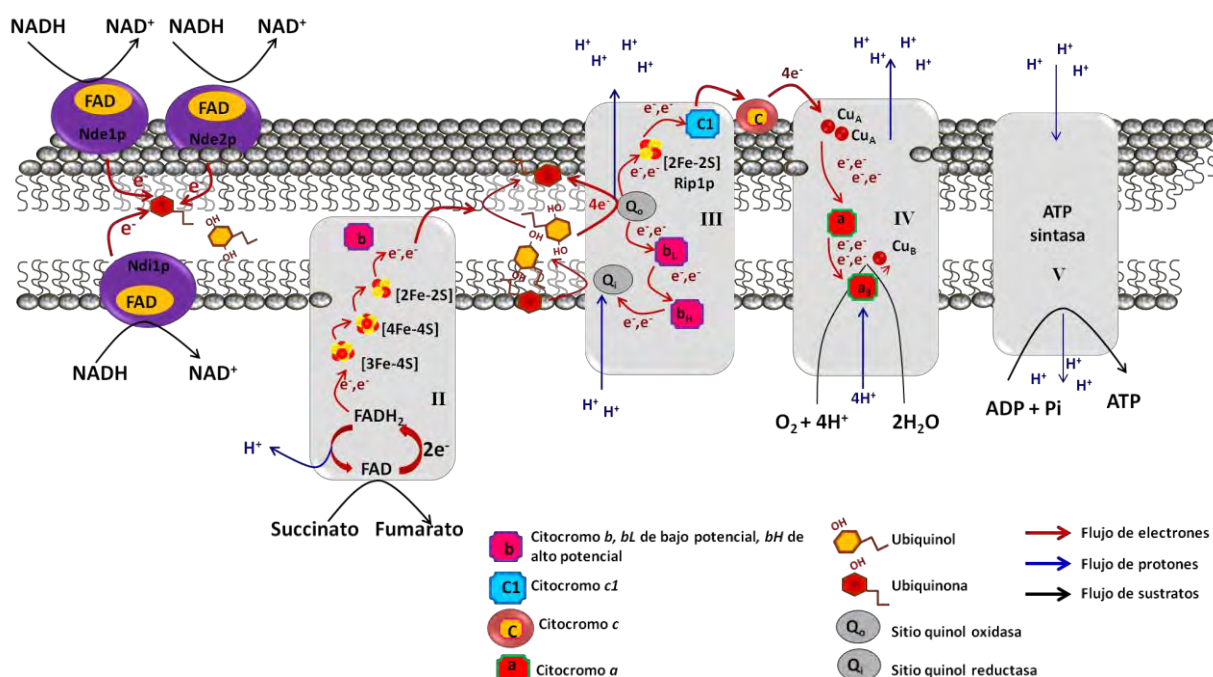


Figura 3.- Esquema de la cadena transportadora de electrones de *Saccharomyces cerevisiae*. II, III, IV y V representan los complejos respiratorios; Nde1/2p, NADH:ubiquinona oxidorreductasas externas; Ndi1p, NADH:ubiquinona oxidorreductasa interna; c, citocromo c. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones.

Las proteínas codificadas en estos genes tienen una masa molecular entre 50-60 kDa y contienen solo al FAD como cofactor. A pesar de las grandes diferencias estructurales, la función biológica de las NADH deshidrogenasas y el complejo I de la CTE son equiparables, ambas contribuyen con la oxidación del NADH, con la diferencia de que las NADH deshidrogenasas alternas no translocan protones hacia el espacio intermembranal durante el transporte de electrones y son insensibles a los inhibidores del complejo I (de Vries y Grivell, 1988; Marres *et al.*, 1991).

Debido a que el NADH es impermeable a la membrana interna mitocondrial, el NADH producido en el citosol de mamíferos se re-oxida en el complejo I por un mecanismo de lanzadera malato-aspartato. En *S. cerevisiae*, esto es llevado a cabo por las NADH deshidrogenasas externas (Nde1p o Nde2p) y/o una lanzadera de glicerol-3-fosfato que consiste en dos glicerol-3-fosfato deshidrogenasas solubles (Gpd1p o Gpd2p) y una tercera unida a la membrana interna mitocondrial (Gut2p) (Fig. 4). La presencia de las NADH deshidrogenasas externas en las mitocondrias de *S. cerevisiae* se correlaciona con la ausencia de una lanzadera de malato-aspartato funcional (de Vries y Marres, 1987; Larsson *et al.*, 1998; Overkamp *et al.*, 2000). Mientras tanto, que en la matriz mitocondrial la NADH deshidrogenasa interna (Ndi1p) oxida el NADH producido por el ciclo de Krebs y/o la alcohol deshidrogenasa mitocondrial, supliendo la función del complejo I de mamíferos (de Vries y Marres 1987; Overkamp *et al.* 2000). Sin embargo, *NDI1* no es esencial para el crecimiento respiratorio con etanol, ya que existe la lanzadera etanol-acetaldehído, la cual consiste de las isoenzimas citosólicas alcohol deshidrogenasas (Adh1p y Adh2p) y la mitocondrial Adh3p (Bakker *et al.*, 2000). Puesto que el alcohol y el acetaldehído pueden difundir libremente a través de las membranas, el resultado neto de la lanzadera es $\text{NADH} + \text{H}^+$ por NAD^+ (Fig. 4). La existencia de varios sistemas para la oxidación del NADH citosólico en *S. cerevisiae* ha hecho que esta levadura esté adaptada a una alta producción de NADH citosólico. Aun bajo condiciones totalmente aeróbicas *S. cerevisiae* presenta una mezcla de metabolismos (respiratorio-fermentativo) cuando la concentración de azúcar en el medio excede 0.8 mM (Verduyn *et al.*, 1984) o cuando la velocidad de crecimiento específica es alta (Petrik *et al.*, 1983; Postman *et al.*, 1989).

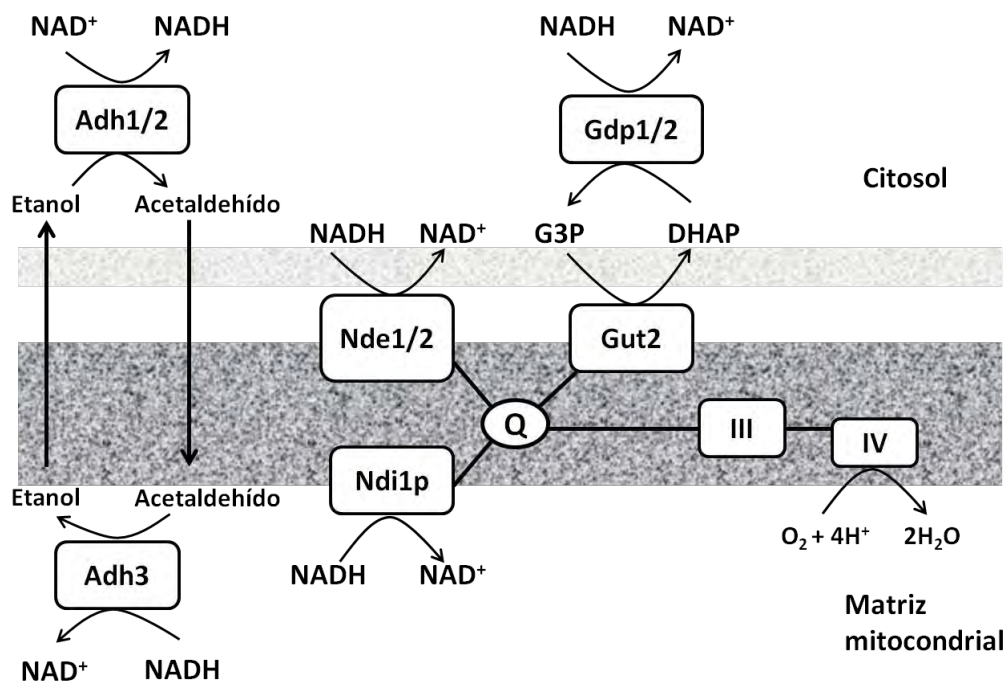


Figura 4.- Sistema del balance redox en *Saccharomyces cerevisiae*. Existen varios mecanismos para la reoxidación del NADH citosólico por las mitocondrias de *S. cerevisiae*. Primero éste puede ser reoxidado por las NADH deshidrogenasa externas, que de manera similar a la NADH interna acopla la reoxidación del NADH a la CTE. Otros mecanismos son la lanzadera del glicerol-3-fosfato y la del etanol-acetaldehído. Adh3, alcohol deshidrogenasa; Nde, NADH deshidrogenasa externa; Ndi, NADH deshidrogenasa interna; Q, ubiquinona; Gdp, glicerol deshidrogenasa soluble; Gut2 glicerol deshidrogenasa unida a membrana; G3P, glicerol-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato (Tomado y modificado de Bakker *et al.*, 2000).

Por lo tanto la fermentación alcohólica más que la respiración es el metabolismo predominante de *S. cerevisiae*. La existencia de fermentación alcohólica en aerobiosis es un fenómeno conocido como efecto Crabtree (Deken, 1966).

1.4 Efectos asociados al metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Dependiendo del metabolismo del azúcar, las levaduras pueden ser clasificadas en: no fermentativas, fermentativas facultativas o fermentativas obligadas (van Dijken y Scheffers 1986). Las levaduras no fermentativas tienen exclusivamente un metabolismo

respiratorio y no son capaces de llevar a cabo la fermentación alcohólica a partir de glucosa (e.g., *Rhodotorula glutinis*), mientras que las levaduras fermentativas obligadas "Mutantes respiratorias naturales" sólo son capaces de metabolizar la glucosa a través de fermentación alcohólica (p. ej. *Candida slooffii*). La mayoría de las levaduras son fermentativas facultativas y dependiendo de las condiciones de crecimiento, el tipo y la concentración de azúcares y/o la disponibilidad de oxígeno pueden mostrar un metabolismo totalmente respiratorio o fermentativo o incluso una mezcla de ambos, es decir, un metabolismo respiratorio-fermentativo (e.g., *S. cerevisiae*). De hecho existen cuatro efectos asociados con el tipo de proceso de generación de energía involucrando el metabolismo del azúcar y/o disponibilidad de oxígeno: Efecto Pasteur, Crabtree, Custer y Kluyver, siendo *S. cerevisiae* Custer y Kluyver negativa.

1.4.1 Efecto Pasteur

El efecto Pasteur se define como la inhibición del consumo de azúcar por aerobiosis (Lagunas, 1986). Este efecto fue nombrado después de las investigaciones de Pasteur en 1861, donde observó que *S. cerevisiae* consumía mucho más glucosa en ausencia de oxígeno y que ésta dejaba de crecer al ser aireada. Sin embargo, Lagunas (1986) demostró que estas observaciones fueron un artefacto debido a la carencia de ácidos grasos insaturados y esteroides necesarios para el crecimiento de *S. cerevisiae* bajo anaerobiosis. Lagunas plantea que este fenómeno ocurre porque la fermentación no puede competir con la respiración, en términos de la producción de ATP, lo que conduce a una baja velocidad de fermentación en condiciones aeróbicas. Sin embargo, en *S. cerevisiae*, el efecto Pasteur solo se observa bajo condiciones experimentales especiales, en particular, a baja velocidad de crecimiento (Verduyn *et al.*, 1984).

1.4.2 Efecto Crabtree

El efecto Crabtree como ya se mencionó se refiere a la presencia de la fermentación alcohólica en condiciones aeróbicas (Crabtree, 1929; de Deken, 1966). Y se puede

clasificar entre efecto Crabtree a corto y a largo plazo. El efecto a corto plazo se define como la capacidad de desencadenar la fermentación alcohólica al agregar un exceso de glucosa (Verduyn *et al.*, 1984). El efecto a largo plazo es la existencia de la fermentación alcohólica aeróbica en condiciones de estado-estacionario a una alta velocidad de crecimiento, lo cual ha sido explicado como una limitada capacidad respiratoria (Fiechter *et al.*, 1981; Kappeli, 1986) y un efecto de desacoplamiento de acetato, formado a una alta velocidad de crecimiento (Postma *et al.*, 1989).

Probablemente el efecto Crabtree se debe a una multiplicidad de factores, incluyendo el modo de transporte de la glucosa y la regulación de la actividad de las enzimas que participan en la respiración y la fermentación alcohólica (van Dijken *et al.*, 1993), siendo claves las enzimas involucradas en el metabolismo del piruvato.

1.5 Alternativas metabólicas del piruvato y regulación de la fermentación y respiración en *Saccharomyces cerevisiae*

La glicólisis es llevada a cabo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y el destino del piruvato, un punto de bifurcación, determinará el tipo de metabolismo energético que se realizará. Como ya se mencionó, el piruvato puede ser oxidado a CO₂ vía el ciclo de Krebs. Sin embargo, si el piruvato no puede ser completamente degradado por esta vía, entrará a la fermentación alcohólica.

Uno de los mecanismos de regulación del flujo del piruvato hacia las diferentes vías es mediante la regulación de las enzimas que intervienen así como sus propiedades cinéticas (Pronk *et al.*, 1996). En comparación con la piruvato descarboxilasa citosólica (PDC), el complejo PDH mitocondrial tiene una mayor afinidad por el piruvato y por lo tanto a una baja velocidad glicolítica, una mayor cantidad de piruvato se metabolizará vía el complejo PDH. Sin embargo, al aumentar la concentración de glucosa se producirá mayor cantidad de piruvato, saturando la vía PDH-alterna y cambiando el flujo hacia la fermentación alcohólica (Fig. 2). Es decir, el destino o cambio entre respiración y fermentación es determinado por los niveles de glucosa. El incremento en la entrada de glucosa hacia la célula provoca un aumento en la producción de NADH, el cual no puede ser completamente oxidado mediante la CTE, de tal forma que la producción de etanol por

fermentación es una necesidad para reoxidar el exceso de NADH (Kappeli, 1986; Kolberg *et al.*, 2004).

En levaduras Crabtree positivas como *S. cerevisiae*, los sistemas de transporte de difusión facilitada para la glucosa tienen valores de K_m mucho más altos que los sistemas de las levaduras Crabtree negativas (Van Dijken *et al.*, 1993).

Las actividades enzimáticas también desempeñan un papel en la regulación del flujo del piruvato. En *S. cerevisiae*, altas concentraciones de glucosa inducen un aumento de 3-4 veces en la actividad de la PDC y la alcohol deshidrogenasa (ADH), favoreciendo la fermentación alcohólica (Van den Brink *et al.*, 2008). En levaduras Crabtree negativas la actividad de la PDC es baja y ésta no incrementa después de agregar glucosa. Sin embargo, en estas cepas existe una mayor actividad de la acetaldehído deshidrogenasa (ALD) y de acetil-CoA sintetasa (ACS) provocando que la producción de etanol sea insignificante. Por otro lado, desde un punto de vista energético, la vía PDH-alterna es menos eficiente debido al consumo de una molécula de ATP que se transforma en AMP por la ACS (Steensma, 1997). No obstante esta vía es importante para el suministro de acetil-CoA citosólico para la síntesis de lípidos (Flikweert *et al.*, 1996), así como para la oxidación del etanol, ya que éste puede ser metabolizado por la mayoría de las levaduras.

1.6 Metabolismo del etanol en *Saccharomyces cerevisiae*

Aunque el etanol puede ser utilizado como fuente de carbono y energía por la mayoría de las levaduras, el etanol producido durante el crecimiento con glucosa es más importante para *S. cerevisiae* que para otras levaduras, debido a su predominancia hacia la fermentación alcohólica. Después del agotamiento de la glucosa, el etanol acumulado puede ser oxidado si el oxígeno está presente. Este cambio de metabolismo se conoce como “cambio diaúxico” (Piskur, *et al.*, 2006). Sin embargo, *S. cerevisiae* es capaz de utilizar glucosa y etanol simultáneamente presentando un metabolismo respiro-fermentativo, donde el etanol es usado preferentemente como un substrato disimilatorio (De Jong-Gubbels *et al.*, 1996).

Durante la fermentación (aeróbica o anaeróbica) *S. cerevisiae* reoxida el NADH con la conversión de acetaldehído a etanol y si el oxígeno subsecuentemente está disponible, el

etanol acumulado es convertido de nuevo a acetaldehído. Esta conversión reversible es clave para la producción y utilización del etanol y es realizada por la alcohol deshidrogenasa (ADH). En principio la ADH puede catalizar la reacción en ambas direcciones, aunque con diferente eficiencia catalítica (Piskur *et al.*, 2006). *S. cerevisiae* tiene por lo menos dos isoenzimas citosólicas de alcohol deshidrogenasa, codificadas por *ADH1* y *ADH2*, y una isoenzima mitocondrial, codificada por *ADH3* (Heick *et al.*, 1969; Van loop y Young, 1986). La Adh1p es constitutiva y su expresión incrementa durante la fermentación alcohólica, siendo inducida por glucosa. La Adh1p tiene un valor de K_m alto para el etanol (17,000–20,000 mmol L⁻¹), siendo su principal función la reducción de etanol a acetaldehído (Thomson *et al.*, 2005). La Adh2p tiene una K_m baja para etanol (600-800 mmol L⁻¹) y principalmente está involucrada en la oxidación del etanol a acetaldehído (Thomson *et al.*, 2005). El acetaldehído puede ser metabolizado por el ciclo de Krebs o actuar como un metabolito intermediario en la gluconeogénesis (Beier *et al.*, 1985; Young y Pilgrim, 1985). La isoenzima mitocondrial Adh3p forma parte de la lanzadera etanol-acetaldehído, la cual es esencial bajo condiciones anaerobias manteniendo el balance redox mitocondrial (Bakker *et al.*, 2000). En un estudio reciente, de Smidt *et al.* (2012) observaron que los niveles de expresión de *ADH1* incrementan, mientras que los niveles de su ARNm disminuyen 33 veces al inicio de la fase diaúxica. Sin embargo, sus niveles volvieron a aumentar gradualmente durante el crecimiento con etanol. Por el contrario los niveles de *ADH2* aumentan 380 veces cuando se agota la glucosa y permaneciendo altos durante la utilización de etanol, sin embargo, sus niveles disminuyen al bajar la concentración de etanol. La transcripción de *ADH3* parece ser constitutiva, permaneciendo con altos niveles tanto en la fase de producción como en la de utilización del etanol (Smidt *et al.*, 2012). En el mismo estudio también se observó que una cepa que expresaba solo a *ADH3* crece y asimila el etanol a la misma velocidad que *ADH2*, indicando que Adh3p cumple la misma función de Adh2p. Esto confirma que tanto la producción como la oxidación de etanol son realizadas dentro de la mitocondria.

En la naturaleza, en un contexto evolutivo, la capacidad de acumular rápidamente etanol y por ende tolerarlo, pudo ser explotado por primera vez por levaduras *Saccharomyces* para inhibir el crecimiento de organismos competidores y monopolizar azúcares. Posteriormente el etanol acumulado podría ser 'asimilado', creando la estrategia

de “producir-acumular-consumir” (Piskur *et al.*, 2006). Esta flexibilidad metabólica de *S. cerevisiae* también es una importante característica para sus múltiples aplicaciones industriales.

Aunque *S. cerevisiae* posee una inherente tolerancia al etanol, su acumulación durante el proceso de fermentación ha sido descrito como el principal responsable de los efectos tóxicos sobre la viabilidad de la levadura y su capacidad fermentativa.

1.7 Efectos tóxicos del etanol en *Saccharomyces cerevisiae*

Como ya se mencionó, *S. cerevisiae* es una levadura ampliamente utilizada en la industria de la fermentación para la elaboración de bebidas alcohólicas, además del reciente interés en su uso durante la producción de biocombustibles. Durante estos procesos las células de levadura son expuestas a varios tipos de estrés, siendo el estrés por etanol uno de los de mayor importancia (Ma y Liu, 2010; Stanley *et al.*, 2010).

El etanol inhibe el crecimiento y viabilidad celular de *S. cerevisiae* (van Under, 1985). La estructura y función de la membrana parecen ser el blanco predominante del etanol, ya que provoca un aumento en la fluidez de la membrana que conduce a la disipación del potencial electroquímico transmembranal y posteriormente una acidificación intracelular con una consecuente disminución en la integridad de la misma (Mishra y Prasad 1989; Alexandre *et al.*, 1994; Rosa and Sá-Correia 1996; Teixeira *et al.* 2009). Altas concentraciones de etanol afectan la captación de glucosa, maltosa, amonio y aminoácidos (Piper, 1995), provocan una disminución en la disponibilidad de agua y una inhibición de la actividad de enzimas claves de la glicólisis (Hallsworth *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2007). Se ha sugerido a la mitocondria como uno de los blancos del etanol (Aguilera y Benítez, 1985), ya que su toxicidad se correlaciona con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la mitocondria (Costa *et al.*, 1997), así como daño al ADN mitocondrial (Ibea y Jiménez, 1997). Además el etanol produce muerte celular con características de apoptosis (Kitagaki *et al.*, 2007). Estos efectos tóxicos limitan el proceso de fermentación y reducen el rendimiento de producción de etanol. Por lo tanto, es esencial para la levadura tener la capacidad de responder y adaptarse rápidamente a cada condición de estrés para sobrevivir. Por lo que las levaduras han desarrollado mecanismos para contrarrestar los daños causados

por el etanol. De hecho, la selección de cepas de levadura con una mayor tolerancia hacia los diferentes factores de estrés durante la fermentación es uno de los objetivos buscados por la industria de la producción de etanol.

1.7.1 Mecanismos para contrarrestar los efectos tóxicos del etanol en *Saccharomyces cerevisiae*

Ciertos organismos como *S. cerevisiae* tienen la capacidad de sobrevivir a concentraciones de etanol que son letales para la mayoría de los microorganismos. Estas concentraciones (dependientes de la cepa) van desde el rango de 5-10% de etanol (v/v) (Dinh *et al.*, 2008). Es importante para *S. cerevisiae* sobrevivir en altas concentraciones de etanol, ya que una de las rutas principales de producción de energía es la fermentación alcohólica, y para esto ha adquirido ciertos mecanismos como: cambios en los niveles y composición de ergosterol y fosfolípidos de la membrana (Jimenez y Benitez, 1987; Alexandre *et al.*, 1994; Chi *et al.*, 1999; You *et al.*, 2003; Aguilera *et al.*, 2006; Dinh *et al.*, 2008), incremento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (Leao y van Under, 1983; Rosa y Sa'-Correia, 1991) y aumento en la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, principalmente mitocondriales (Costa *et al.*, 1993, 1997). Además se ha propuesto la estabilidad mitocondrial como un mecanismo clave en la tolerancia a etanol, ya que en presencia de mitocondrias activas disminuyen los niveles de inhibición sobre el crecimiento y la fermentación (Aguilera y Benítez, 1985). Otro mecanismo descrito involucra el incremento en biomoléculas protectoras, tales como la trehalosa (Mansure *et al.*, 1994; Lucero *et al.*, 2000), proteínas de choque térmico como la Hsp104 (Sánchez *et al.*, 1992; Piper, 1995), las cuales estabilizan o reparan proteínas desnaturalizadas. Análisis de genómica, proteómica y bioquímica funcional se han realizado para estudiar los mecanismos de tolerancia, toxicidad del etanol y el estrés inducidos por otros metabolitos relacionados con la fermentación alcohólica (Endo *et al.*, 2008; Marks *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2010).

A pesar de todas las investigaciones, los mecanismos moleculares la toxicidad o tolerancia al etanol son conocidos con poca profundidad. Por otro lado, resultados de

nuestro laboratorio sugieren que los componentes de la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] podrían estar involucrados con la tolerancia a etanol (Campos-García *et al.*, 2000).

1.8 Centros [Fe-S]

El hierro y el azufre son dos de los elementos más importantes y versátiles en nuestro planeta. Se ha propuesto que las primeras formas de vida pudieron haberse formado en la superficie de minerales de sulfuro de hierro (Wachtershauser, 1992), ya que la primitiva atmósfera anaeróbica proporcionaba un ambiente reducido donde los elementos de hierro y azufre eran rápidamente disponibles y podían ser usados por los primeros organismos para desempeñar sus funciones biológicas. El descubrimiento a inicios de los años 1960's de proteínas hierro-azufre, las cuales contenían un centro [Fe-S] como cofactor vino a reforzar la idea del importante papel de estos elementos para la vida (Beinert *et al.*, 1997; Beinert, 2000).

La estructura básica de los centros [Fe-S] consiste de átomos de hierro unidos a átomos de azufre principalmente de la cisteína, así como de átomos de azufres libres cuyas proporciones son variadas (Beinert *et al.*, 1997). Las formas más comunes son la rómbica [2Fe-2S] y la cúbica [4Fe-4S], la cual puede ser ensamblada a partir de dos unidades rómbicas (Fig. 5); sin embargo, también existen las formas [3Fe-4S], así como estructuras más complejas encontradas en las nitrogenasas como la [8Fe-7S] en donde otros metales pesados como molibdeno, vanadio o níquel pueden remplazar algún ión de hierro (Rees, 2002). La unión del grupo/centro [Fe-S] a la cadena polipeptídica es a través de la coordinación de los iones de hierro cargados positivamente con donadores de electrones proporcionados por la cadena lateral de varios aminoácidos. El más común es el azufre del residuo de la cisteína, sin embargo, también puede participar el nitrógeno de residuos de histidina como en la subunidad de Rieske del complejo III de la CTE (Beinert, *et al.*, 2004).

El ensamble de centros [Fe-S] en las apoproteínas puede llevarse a cabo *in vitro* bajo condiciones anaerobias agregando el ión ferroso (Fe^{+2}) y sulfuro (S^{-2}), lo que sugiere que este proceso podría realizarse espontáneamente y posiblemente esto pudo haber ocurrido a principios de la vida cuando las condiciones de la tierra eran anaeróbicas y donde estos elementos estaban disponibles. Sin embargo, en las células, la biogénesis de

centros [Fe-S] y su posterior incorporación a apoproteínas requiere de un complejo sistema de ensamble (Johnson *et al.*, 2005; Balk y Lobreaux, 2005; Lill y Mühlenhoff, 2006; Vickery y Cupp-Vickey, 2007; Lill y Mühlenhoff, 2008; Fontecave y Ollagnier-de-Choudens, 2008). Lo anterior podría responder a la necesidad de tener un sistema altamente controlado en condiciones aeróbicas para disminuir el daño por oxígeno en los centros [Fe-S] así como la toxicidad de los iones Fe^{+2} .

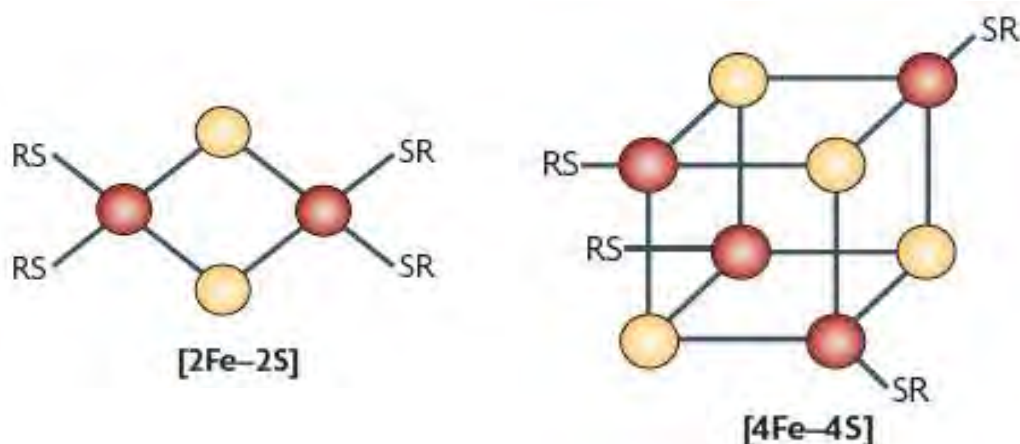


Figura 5.- Estructura de centros [Fe-S]. El hierro (esferas rojas) de los centros [Fe-S] se encuentra unido a átomos de azufre de residuos de cisteínas de la cadena polipeptídica (SR) y a azufres inorgánicos del grupo prostético (esferas amarillas). Residuos de histidinas, arginina, aspartato y serina también pueden ser ligandos del hierro (Tomada y modificada de Py y Barras, 2010).

Los centros [Fe-S] son entonces probablemente los cofactores más antiguos y ubicuos, cuyo sistema de biogénesis se encuentra altamente conservado en los organismos. Como grupo prostético de proteínas, estas estructuras fueron descubiertas y caracterizadas por métodos espectroscópicos y química analítica a principios de 1960 (Arnon *et al.*, 1957; Mortenson *et al.*, 1962; Beinert *et al.*, 1997, 2004; Rees y Howard, 2003). Hasta la fecha se conocen numerosas proteínas con centros [Fe-S] dentro de los tres reinos de la vida (Eubacteria, Archaea y Eukarya). En la Tabla 1 se enlistan algunas de las proteínas [Fe-S] que se conocen en eucariontes (excepto plantas).

1.9 Función de las proteínas con centros [Fe-S]

Las funciones biológicas de las proteínas que poseen como cofactor centros [Fe-S] comprenden la transferencia de electrones, la catálisis enzimática y regulación de la expresión génica (Tabla 1). Además, participan en la generación de radicales como los formados durante las reacciones de enzimas dependientes de S-adenosil metionina (SAM) así como en la estabilización estructural de proteínas (Beinert *et al.*, 1997).

1.9.1 Tránsito de electrones

La función mejor conocida de las proteínas [Fe-S] es la transferencia de electrones, esta función es debida a la capacidad del hierro de sufrir transiciones de estado reducido (ión ferroso, Fe^{2+}) a oxidado (ión férrico, Fe^{3+}). Por lo tanto, el centro [Fe-S] tiene la capacidad de aceptar fácilmente electrones y donarlos (Beinert *et al.*, 1997). La mayoría de los acarreadores electrónicos tales como el NAD, las flavinas, las quinonas y los grupos hemo poseen un alto potencial de reducción. Por el contrario, los centros [Fe-S] tienen un bajo potencial de reducción, haciéndolos indispensables para las reacciones de acoplamiento de bajo potencial llevadas a cabo por enzimas como hidrogenasas, nitrogenasas y ferredoxinas (Lauhon *et al.*, 2004). El rango de potencial redox de los centros [Fe-S] va desde -500 mV a +300 mV; sin embargo, el rango del potencial redox depende del ambiente en el que se encuentre el centro [Fe-S] (Meyer, 2008). Por ejemplo, el alto potencial redox de la proteína de Rieske es causado por los dos ligandos de histidinas coordinados sobre uno de los dos iones de hierro, cuyo resultado es que este hierro puede ser reducido a un mayor potencial que los otros iones de hierro que están unidos a cisteínas. Los centros [Fe-S] que participan en transferencia de electrones se encuentran en el complejo I (ausente en *S. cerevisiae*), el complejo II y el complejo III de bacterias y de la CTE, así como en ferredoxinas en plantas, entre otras (Lill *et al.*, 2006).

Tabla 1.- Proteínas con centros [Fe-S] en eucariotes.

Proteínas [Fe-S]	Nombre en levadura	Localización	Función	Tipo de centro
Proteínas [Fe-S] involucradas en transporte de electrones				
Complejo I	--	MIM	Respiración (NADH:ubiquinona oxidoreductasa)	8 centros de 2F,3F y 4F
Complejo II	Sdh2	MIM	Respiración (succinato deshidrogenasa)	2F,3F y 4F
Complejo III	Rip1	MIM	Respiración (ubiquinona:citocromo c oxidoreductasa, proteína Rieske)	2F
Ferredoxina (adrenodoxina)	Yah1	MM	Biogénesis de centros Fe-S, de hemo α , biosíntesis de esteroides en mamíferos	2F
EFTQO	Yor356w	M	Catabolismo de aminoácidos y colina, beta oxidación de ácidos grasos	4F
Proteínas [Fe-S] involucradas en metabolismo				
Aconitasa	Aco1	MM	Ciclo de Krebs	4F
Homoaconitasa	Lys4	MM	Biosíntesis de lisina (como-aconitasa)	4F
Dihidroxiácido hidratasa	Iiv3	MM	Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada	4F
Lipoato sintasa	Lip5	MM	Biosíntesis de ácido lipoico	2F, 4F
Biotina sintasa	Bio2	MM	Biosíntesis de biotina	2F,4F
Ferroquelatasa	Hem15	MIM	Biosíntesis de grupos hemo (Centro ausente en <i>S. cerevisiae</i>)	2F
MOCS1A	--	MM	Biosíntesis de Moco (cofactor de molibdeno)	3F?,4F
Isopropilmalato isomerasa	Leu1	C	Biosíntesis de leucina (como-aconitasa)	4F
Sulfito reductasa	Ecm17	C	Biosíntesis de metionina	4F
Glutamato deshidrogenasa	Glt1	C	Biosíntesis de glutamato	4F
Acido CMP-N-acetil	--	C	Biosíntesis de ácido N-glicol	2F
Neuraminico hidroxilasa	--	C	neuraminico (como-Rieske)	
Dihidro-pirimidina deshidrogenasa	--	C	Degradación de nucleótidos de pirimidina	4x4F
Xantina deshidrogenasa	--	C	Degradación de xantina a ureato	2x2F
DNA glicosilasa	Ntg2	N	Reparación de DNA (Glicosilasa 2 como endonucleasa III)	4F
Proteínas [Fe-S] involucradas en regulación y ensamble				
Proteína de regulación del hierro (IRP1)	--	C	Regulación post-transcripcional de la captación, utilización y almacenamiento del hierro en mamíferos (aconitasa citosólica)	4F
Proteína ABC Rli1 (ABCE1)	Rli1	C y N	Biogénesis de ribosomas, procesamiento de rRNA, iniciación de la traducción, ensamble de complejos de RNA	2x4F
Glutarredoxina 2 (mamíferos)	Grx2	M	Oxidoreductasa dependiente de Grx2 (Centro ausente en <i>S. cerevisiae</i>)	2F
Elp3	Elp3	N	Histona acetiltransferasa subunidad del complejo de elongación, centro unido a S-adenosil-metionina	4F
Sprouti (mamíferos)	--	C	Regulador negativo del receptor de tirosina cinasa	2F
Proteínas [Fe-S] involucradas en la biogénesis de centros [Fe-S]				
Ferredoxina	Yah1	MM	Maduración de proteínas [Fe-S] mitocondriales, posiblemente en la reducción del azufre	2F
ATPasa P-loop	Nbp35	C y N	Maduración de proteínas [Fe-S] citosólicas y nucleares, forma un complejo con Cfd1	4F?
Deshidrogenasa de hierro (como-Nar1)	Nar1	C y N	Maduración de proteínas [Fe-S] citosólicas y nucleares, se une a Nbp35 y a Cia1	2 centros complejos

M: mitocondria, MM: matriz mitocondrial, MIM: membrana interna mitocondrial, C: citosol, N: núcleo. La mayoría de proteínas [Fe-S] contienen centros de tipo [2F-2S] (2F), [3Fe-4S] (3F) o [4Fe-4S] (4F). La estructura química de algunos centros son desconocidos (?).

Tomado y modificado de Lill *et al.*, 2006

1.9.2 Catálisis enzimática

Dentro de las proteínas [Fe-S] involucradas en catálisis se encuentran la aconitasa, la homo-aconitasa (Lys4p en levadura) y la isopropilmalato deshidrogenasa (Leu1p en levadura), involucradas en la biosíntesis de lisina y leucina, respectivamente. En estas enzimas el centro [Fe-S] se encuentra en el sitio catalítico en donde uno de los iones de hierro participa como ácido de Lewis para unir al sustrato y estabilizar el estado de transición de la reacción ya que también participa en la remoción y adición de una molécula de agua dando como resultado la isomerización del sustrato (Lill *et al.*, 2006).

Otras enzimas [Fe-S] son la biotina sintasa y la lipoato sintasa, las cuales poseen dos centros [Fe-S] en donde uno de ellos probablemente funciona como fuente de azufre para ser insertado dentro de los precursores des-tiobiotina y ácido octanóico (Booker *et al.*, 2007). Existe una variedad de proteínas involucradas en catálisis que poseen centros [Fe-S], las cuales participan en la biosíntesis tanto de aminoácidos como de grupos hemo (Dailey, 2002), así como en la reparación del ADN (Lukianova y David, 2005).

1.9.3 Regulación

Se ha observado también la participación de los centros [Fe-S] en la regulación de procesos biológicos. La sensibilidad de los centros [Fe-S] hacia el estrés oxidativo y su labilidad química son propiedades que hacen a estos centros útiles para sensar las condiciones intracelulares o ambientales para la regulación de la expresión génica tanto en procariotas como en eucariotas. Ejemplos de esta función son los factores transcripcionales bacterianos: FNR, ISCR y SoxR, que sensan los niveles de oxígeno, centros Fe-S y superóxido/óxido nítrico, respectivamente. El estado de activación o represión depende de la presencia o ausencia del centro Fe-S en FNR y ISCR o el estado redox del centro [2Fe-2S] presente en SoxR (Imlay, 2008). En mamíferos, la proteína de respuesta a hierro (iron regulatory protein, IRP, también conocida como ACO1 citosólica), es un ejemplo donde el centro [4Fe-4S] unido a la proteína funciona como regulador post-transcripcional. Bajo condiciones de suficiencia de hierro, IPR1 actúa como aconitasa manteniendo su centro [4Fe-4S]. En condiciones de insuficiencia de hierro, el centro pierde un hierro y se une a

promotores de genes que codifican ciertas proteínas involucradas en la homeóstasis de hierro (Walden *et al.*, 2006).

1.10 Biogénesis de proteínas con centros [Fe-S]

Existen tres distintas maquinarias bacterianas para la biosíntesis de proteínas con centros [Fe-S]: NIF, ISC y SUF (Tabla 2).

La primera evidencia de la existencia de una maquinaria para la biogénesis de centros [Fe-S] fue encontrada en la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* (Jacobson *et al.*, 1989), la cual tiene la capacidad de reducir N₂ a amonio vía un complejo proteico denominado nitrogenasa conformado por una proteína homodimérica nombrada proteína Fe y una proteína heterodimérica designada MoFe. La proteína Fe contiene un centro [Fe-S], el cual transporta los electrones a la proteína MoFe que contiene un centro [8Fe-7S] y el cofactor FeMo [7Fe-Mo-9S-homocitrato-X] que reduce el N₂. Zheng *et al.*, (1993) observaron que al mutar el operón que identificaron como *nif* (nitrogen fixation) alteraban la maduración de la nitrogenasa. Un miembro del operón denominado NifS (codificado por *nifS*) mostró ser una cisteína desulfurasa la cual requiere piridoxal-5-fosfato para su actividad (Zheng *et al.*, 1993, 1994; Zheng y Dean, 1994). NifS cataliza la reacción de desulfuración de la L-cisteína produciendo L- alanina y sulfuro, este sulfuro es usado para el ensamblaje de centros [Fe-S] hacia apoproteínas receptoras.

Otro miembro del operón, designado NifU, actúa como la proteína de andamiaje para los centros [Fe-S] (Yuvaniyama *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2004). Sin embargo también observaron que la mutación *nifU nifS*⁻ era viable y que la inactivación de la nitrogenasa solo era parcial. Esto sugirió que otra maquinaria de ensamble de [Fe-S] debería existir en *A. vinelandii* (Jacobson *et al.*, 1989), descubriéndose posteriormente el sistema parálogo ISC (Zheng *et al.*, 1998). El sistema ISC (*iron sulfur cluster*, por sus siglas en inglés) es el principal sistema para la biosíntesis de proteínas con centros [Fe-S] de mantenimiento celular durante el crecimiento normal (housekeeping) en bacterias (Zheng *et al.*, 1998; Takahashi y Nakamura, M. 1999). Este sistema está codificado por siete genes dentro de un operón: *iscRSUA-hscBA-fdx*. El gen *iscR* es autorregulador para la transcripción de *iscSUA* (Schwartz *et al.*, 2001). La holoproteína IscR contiene un centro

[2Fe-2S] y actúa como represor, disminuyendo la expresión del operón *iscSUA*. Sin embargo, cuando hay una disminución de centros [Fe-S] entonces IscR se encuentra en forma de apoproteína causando la des-represión de operón *iscSUA* (Outten *et al.*, 2004). El gen *iscS* codifica para la desulfurasa, IscS. La mutación en *iscS* causa alteraciones en el crecimiento así como una disminución en la actividad de proteínas con centros [Fe-S] como la aconitasa, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la glutamato sintasa, la fumarasa y la NADH deshidrogenasa (Schwartz *et al.*, 2000), lo que indica que IscS es la principal fuente de azufre para la biogénesis de centros [Fe-S] bajo condiciones normales. IscS posee una alta similitud con la proteína NifS sin embargo, se observó que el fenotipo en una mutante de *A. vinelandii* *iscS* no se restaura por la expresión de *nifS*. Esto sugiere que NifS es específica para la maduración de la nitrogenasa, mientras que IscS es la cisteína desulfurasa general para el ensamble *de novo* de proteínas con centros [Fe-S] (Zheng *et al.*, 1998).

Tabla 2.- Componentes involucrados en la biogénesis de centros [Fe-S].

Función	Sistema NIF Bacteriano	Sistema SUF Bacteriano	Sistema ISC Bacteriano	Sistema ISC Mitocondrial	Sistema CIA Eucarionte
Cisteína desulfurasa (donador de azufre)	NifS	SufS-SufE	IscS	Nfs1p-Isd11p	Nfs1p-Isd11p Mitocondrial
Proteína de andamiaje Tipo-U	NifU	SufU	IscU	Isu1p	--
Proteína de andamiaje Tipo-A	IscA ^{Nif}	SufA	IscA, ErpA	Isc1p-Isc2p- Iba57p	--
Proteína de andamiaje	--	SufB	--	--	--
Proteína de andamiaje NTPasa P-loop	--	--	--	Ind1p?	Cdf1-Nbp35
Transferencia de Electrones	NifU	--	Fdx	Yah1p-Arh1p	--
Donador de hierro	--	--	CyaY	Yfh1p	--
Transferencia del [Fe-S] desde la proteína de andamiaje a la proteína blanco	--	SufC	HscA,HscB	Ssq1p,Jac1p, Mge1p, Grx5	Nar1,Cia1
Tomado y modificado de Lill, 2009.					

Interesantemente, la mutación en *iscS* o *iscU* en *A. vinelandii* es letal. IscU muestra similitud con en el dominio N-terminal de NifU y también es capaz de unir un centro [2Fe-2S] (Fu *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 1999) y/o [4Fe-4S] transitorio (Agar *et al.*, 2000; Chandramouli *et al.*, 2007). El centro [Fe-S] puede ser transferido desde holo-IscU a la apo-ferredoxina, lo cual sugiere que IscU funciona como una proteína de andamiaje (Wu *et al.*, 2002; Mühlenhoff *et al.*, 2003). Se ha sugerido que IscA podría funcionar como proteína de andamiaje alterna ya que se ha observado que puede unir centros [2Fe-2S]/[4Fe-4S] (Ollagier-de-Choudens *et al.*, 2004; Morimoto *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2007). Sin embargo, también se ha demostrado su unión a hierro mononuclear (Ding *et al.*, 2004, 2005, 2007). El hierro podría ser usado para la biosíntesis *de novo* de centros [Fe-S] sobre IscU, sugiriendo que IscA funciona como chaperona de hierro.

Otros miembros que también participan en este proceso son las chaperonas moleculares HscA y HscB (Tabla 2) pertenecientes a las familias hsp70 y hsp40, respectivamente (Zheng *et al.*, 1998; Silberg *et al.*, 1998). Se ha observado que la mutación en *hscA* afecta la actividad de proteínas [Fe-S] tanto como la mutación en *iscS*, poniendo de manifiesto el importante papel de HscA en la biogénesis de centros [Fe-S]. HscA/HscB tienen la función de estimular la liberación y transferencia del centro [Fe-S] desde IscU a la proteína receptora hidrolizando ATP (Hoff *et al.*, 2000; Silberg *et al.*, 2001; Cupp-Vickery *et al.*, 2004). El último miembro del sistema ISC es la ferredoxina (Fdx), la cual contiene un centro [2Fe-2S] (Djaman *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la función de Fdx es proporcionar los electrones necesarios para la reducción del azufre a sulfuro (S^{-2}).

Como ya se mencionó, en *A. vinelandii* la mutación en *iscS* o *iscU* resulta en un fenotipo letal (Fu *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1999). Sin embargo, en *E. coli* la doble mutante *iscS-iscU* permanece viable, lo cual permitió el estudio e identificación de un tercer sistema para la biogénesis de centros [Fe-S] codificado por el operón *suf* (sulfur utalization factor) (Muller *et al.*, 1998; Patzer y Hantke, 1999). Con esto se comprobó que la sobreexpresión del operón *suf* (*sufABCDSE*) complementa la mayoría de los defectos producidos por la mutación de genes *isc* (Takahashi y Tokumoto, 2002).

El sistema SUF juega un papel similar al del ISC en muchas bacterias, pero éste opera solo bajo condiciones de limitación de hierro y estrés oxidativo (Takahashi *et al.*, 2002; Fontecave *et al.*, 2005). La regulación de *suf* durante la respuesta a estrés oxidativo

es mediada por OxyR e IHF, mientras que la proteína reguladora Fur controla el sistema por inducción en condiciones limitantes de hierro (Outten *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). La presencia de reguladores globales de estrés oxidativo o limitación de hierro sugiere que la función del operón *suf* es necesaria para proteger, reparar o remplazar proteínas dañadas con centros [Fe-S] (Takahashi y Tokumoto, 2002; Outten *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Por lo anterior se ha sugerido que este sistema probablemente se originó como resultado de la necesidad de mantener un sistema más eficiente en la biogénesis y/o reparación de los centros [Fe-S] al surgir los primeros microorganismos fotosintéticos y con ellos el oxígeno molecular.

Estudios filogenéticos han revelado que el sistema ISC se encuentra distribuido en la mayoría de las proteobacterias y en las mitocondrias de los eucariontes (Tokumoto *et al.*, 2004). El sistema SUF está presente en una gran diversidad de organismos incluyendo la mayoría de eubacterias, archaeas, plantas y parásitos (Tokumoto *et al.*, 2004). El conocimiento de los sistemas para la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] en bacterias propició el estudio de este proceso en eucariontes.

1.10.1 Biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] en *Saccharomyces cerevisiae*

Diversos grupos de investigación han mostrado evidencia de que la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] mitocondrial depende de proteínas del sistema ISC (Kispal *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Schilke *et al.*, 1999). El sistema ISC mitocondrial es similar al de bacterias, por lo que ha hipotetizado que fue heredado desde la bacteria endo-simbionte que dió origen a la mitocondria (Johnson *et al.*, 2005; Van der Giezen y Tovar, 2005). También se ha identificado el requerimiento de un transportador ABC en la membrana interna mitocondrial para una eficiente maduración de proteínas con centros [Fe-S] externas a la mitocondria, lo que indica la existencia de un sistema de exportación para la generación de proteínas con centros [Fe-S] en el citosol y en el núcleo. Por lo tanto las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S], ya que son responsables no sólo de la maduración de proteínas con centros [Fe-S] dentro sino también fuera del orgánulo (Kispal *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2000). Posteriormente se descubrieron los primeros componentes del sistema de ensamble de proteínas [Fe-S]

citoplasmático (CIA) (Roy *et al.*, 2003). Por lo tanto, gracias a los estudios realizados en el organismo modelo *S. cerevisiae*, se sabe que el proceso de biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] en eucariotas involucra la interacción de tres sistemas complejos proteicos denominados: ISC, exportación ISC y CIA.

1.10.2 El sistema ISC mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae*

En *S. cerevisiae* el sistema ISC comprende 17 proteínas conocidas con diversas funciones (Fig. 6). La similitud con su contraparte bacteriana sugiere un mecanismo altamente conservado entre organismos procariontes y eucariontes (Johnson *et al.*, 2005).

En la mitocondria, la cisteína desulfurasa comprende un complejo formado por las proteínas IscS, Nfs1p e Isd11p (proteína de 11 kDa). A pesar de que se ha observado que Nfs1 posee actividad *in vitro* de cisteína desulfurasa, el complejo funcional Nfs1p-Isd11p es el responsable de la transferencia *in vivo* del azufre desde Nfs1p a la proteína de andamiaje Isu1p, cuya reacción es asistida por la interacción entre Nfs1p e Isu1p (IscS/SufS y IscU/SufU en bacteria y plástidos). Al igual que sus homólogos Nfs1p pertenecen a un subconjunto de la familia de las aminotransferasas dependientes de piridoxal 5-fosfato (PLP), las cuales catalizan la conversión de cisteína en alanina y azufre elemental a través de la formación de un grupo persulfuro en un residuo conservado de cisteína en Nfs1 (Zheng *et al.*, 1993; Mühlenhoff *et al.*, 2004; Kessler, 2006).

Otros miembros del sistema ISC mitocondrial y componentes centrales de este proceso son las proteínas de andamiaje, las cuales son las responsables de tomar el azufre y el hierro y ensamblar los centros [Fe-S] antes de la transferencia a la apoproteína receptora. En *S. cerevisiae* se ha identificado la existencia de dos proteínas de andamiaje: Isu1p e Isu2p. Estas proteínas comparten más del 80% de identidad dentro de su secuencia de aminoácidos y más del 60% con su homóloga bacteriana IscU. Un aspecto importante de este tipo de proteínas es que contienen tres residuos de cisteínas altamente conservados, los cuales son cruciales para unir hierro (Garland *et al.*, 1999). El hierro es transportado a la mitocondria en forma reducida mediante las proteínas acarreadoras Mrs3p y Mrs4p en un proceso dependiente del potencial transmembranal (Foury *et al.*, 2002; Muehlenhoff, *et al.*, 2003b; Li *et al.*, 2004). El hierro es captado por la proteína frataxina Yfh1p, y lo transfiere

a Isu1p (Yoon *et al.*, 2003; Aloria *et al.*, 2004; Nair *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Benzce *et al.*, 2006). Estudios recientes han mostrado que la interacción de Yfh1p con Isu1p-Nfs1p es llevada a cabo principalmente por un residuo de triptófano conservado en Yfh1p (Trp 131) (Leidgens *et al.*, 2010). Además la interacción de Yfh1p con el complejo Isu1p-Nfs1p es dependiente de hierro y crucial para el ensamble del [Fe-S] (Schmucke *et al.*, 2011).

El ensamble de los centros [Fe-S] también depende de la ferredoxina Yah1p, la cual es una proteína con un centro [2Fe-2S] que se encarga de transportar electrones desde el NADH a través de la ferredoxina reductasa mitocondrial Arh1p (Mühlenhoff *et al.*, 2003). Se ha sugerido que este requerimiento de electrones es para reducir el azufre (S^0) de la cisteína al sulfuro (S^{-2}) presente en el centro [Fe-S]. Después del ensamble de centro [Fe-S] sobre Isu1p, el siguiente paso es la transferencia e incorporación del centro [Fe-S] a su apoproteína blanco, lo cual es realizado por un sistema específico de chaperonas integrado por Ssq1p, que perteneciente a la familia Hsp70, la co-chaperona Jac1p que perteneciente a la familia Hsp40 o tipo J (HscA y HscB son sus homólogos en bacteria) y el factor intercambiador de nucleótidos Mge1p (Schilke *et al.*, 1999; Lutz *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Voisine *et al.*, 2001; Craig y Marszalek, 2002; Dutkiewicz *et al.*, 2003). Ssq1p posee una actividad intrínseca de ATPasa, la cual es estimulada por su co-chaperona Jac1p y sinérgicamente por la combinación de Jac1p e Isu1p, sustrato de Ssq1p (Hoff *et al.*, 2000, Dutkiewicz *et al.*, 2003). Ssq1p se une a Isu1p formando un complejo binario mediante un motivo conservado en Isu1p/IsuU (LPPVK), dependiente de la hidrólisis de ATP (Hoff *et al.*, 2003; Dutkiewicz *et al.*, 2004). La unión es facilitada por Jac1p, la cual también se une directamente a Isu1p vía su dominio C-terminal (Andrew, *et al.*, 2006). Como otras chaperonas Hsp70, el ciclo de interacción de Ssq1p-Isu1p es similar. La unión de Isu1p con Ssq1p-ATP es débil, presentando una baja afinidad y una rápida interconversión entre ssq1-ATP-Isu1p y ssq1p-ATP e Isu1P, mientras que la forma Ssq1p-ADP estabiliza la unión a Isu1p con una alta afinidad, participando Jac1p en dicha estabilización. Para su funcionamiento, Ssq1p requiere esencialmente del factor intercambiador de nucleótidos de adenina Mge1p (Schilke *et al.*, 2006; Vickery y Cupp-Vickery, 2007).

Durante la transferencia del centro [Fe-S] también participa una monotioglutarredoxina mitocondrial Grx5p, (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002; Mühlenhoff *et al.*, 2003a). El mecanismo o función puntual de Grx5p en este proceso es desconocido. Sin

embargo, se ha observado que no es esencial ya que solo se presentan defectos menores en el crecimiento cuando su gen es mutado (Rodríguez-Manzanque *et al.*, 2002).

Algunos estudios han demostrado que las proteínas Isa1p, Isa2p e Iba57p forman un complejo funcional (Fig. 6) que es requerido para la maduración de proteínas mitocondriales con centros [4Fe-4S] (estructura cúbica). (Gelling *et al.*, 2008; Mühlenhoff *et al.*, 2011) Se ha observado que Isa1p e Isa2p *in vivo* son capaces de unir hierro, sin embargo, no actúan como donadoras de hierro en centros ensamblados *de novo* por las proteínas de andamiaje Isu1p/Isu2p (Mühlenhoff *et al.*, 2011). Además, la mutación del gen *IBA57* provoca acumulación de hierro en Isa1p-Isa2p, sugiriendo que la unión de hierro es requerida para la biosíntesis *de novo* de centros [4Fe-4S] en mitocondrias cuya inserción a su apoproteína blanco es mediada por Iba57p (Mühlenhoff *et al.*, 2011).

Esta capacidad de unión a hierro así como su papel en la maduración de proteínas con centros [4Fe-4S] se ha observado también en las proteínas tipo-A de ISC y SUF, IscA y SufA, respectivamente (Ding y Clark, 2004). Existe un tercer parólogo, *erpA* (essential respiratory protein A), el cual no se encuentra en los operones *isc* y *suf*, pero forma parte de una región cromosomal en la que se encuentran genes relacionados con la captación de hierro (Loiseau *et al.*, 2007). EprA ha sido caracterizada como una proteína de andamiaje de centros [Fe-S] requerida para enzimas claves en la vía de biosíntesis de isoprenoides, siendo esencial para el metabolismo respiratorio en *E. coli* (Loiseau *et al.*, 2007). Se ha observado que *sufA* puede complementar la mutación de *iscA* en *E. coli*. Sin embargo, la doble mutación resulta en graves defectos del crecimiento, los cuales se agravan bajo condiciones de estrés oxidativo (Tan *et al.*, 2009). Esto sugiere que las proteínas tipo-A son importantes bajo condiciones de estrés oxidativo. La oxidación del [Fe-S] promueve la liberación de hierro y en relación a esto, el sistema ISC también participa en la homeostasis celular del hierro.

1.11 Metabolismo de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre e históricamente este elemento ha sido muy importante, de hecho un periodo de la historia recibe el nombre de la Edad del Hierro.

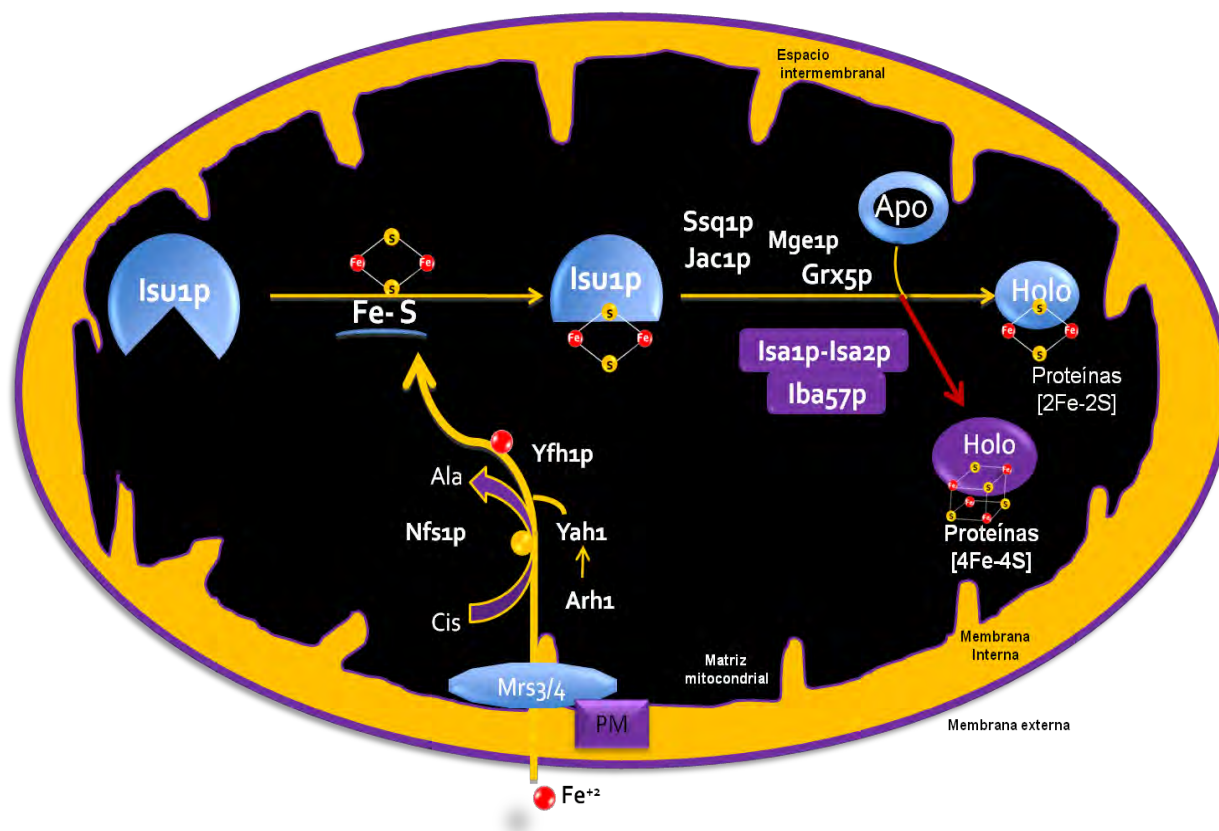


Figura 6.- Modelo de la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae*. El mecanismo se explica a detalle en el texto (Tomado y modificado de Lill, 2009).

El hierro se encuentra prácticamente en todos los seres vivos, cumpliendo numerosas y variadas funciones, siendo el metal de transición más importante y versátil para los sistemas biológicos. En condiciones fisiológicas, el hierro se encuentra predominantemente en dos estados redox: forma oxidada como ión férrico (Fe^{3+}) y su forma reducida como ión ferroso (Fe^{2+}). La capacidad del hierro para aceptar o donar un electrón modula la transición de Fe^{3+} a Fe^{2+} o viceversa. Además, ambos estados (férrico y ferroso), pueden adoptar también diferente estado de spin (alto o bajo) dependiendo de su ligando (Andrews *et al.*, 2003). Estas propiedades hacen al hierro un componente prostético extremadamente versátil en proteínas con funciones de biocatalizador o transporte electrónico.

Se ha considerado que su abundancia en la tierra fue un factor que contribuyó para ser el metal de transición que se incorporó dentro de las proteínas durante la evolución de las primeras formas de vida (Beinert, 1997; 2000). En relación a esto, el hierro participa en procesos biológicos esenciales tales como la fotosíntesis, la metanogénesis, la fijación del nitrógeno, la respiración, el ciclo de Krebs, el transporte de oxígeno y la síntesis de ADN (Andrews *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar del papel esencial de este elemento, la disponibilidad del hierro debe de estar altamente controlada, ya que a concentraciones superiores a las requeridas por la célula, el hierro es potencialmente tóxico debido a su habilidad de generar ERO, lo anterior mediante las reacciones de Fenton (Fe^{2+}) y de Haber-Weiss (Fe^{3+}) (Haber y Weiss, 1932). Por consiguiente, al mismo tiempo que el hierro se acumula en cantidad suficiente para el metabolismo, los organismos deben asegurar que la concentración intracelular de hierro libre no alcance niveles tóxicos. Además, el hierro se encuentra principalmente en forma oxidada (Fe^{3+}), formando parte de sales e hidróxidos de muy baja solubilidad (10^{-18} M a pH 7). Esto se debe a que con la aparición de los primeros organismos fotosintéticos la atmósfera pasó de ser reductora a oxidante, lo que ocasionó que el hierro en estado reducido (Fe^{2+}) que es relativamente soluble (0.1 M a pH 7) pero también bastante inestable, pasara al estado férrico. Esto hace que el Fe^{2+} sea biológicamente inaccesible para los seres vivos por mecanismos simples de asimilación.

Debido a la toxicidad inherente del hierro y a la limitada biodisponibilidad de su forma predominante en el medio ambiente, su metabolismo está altamente regulado desde los eucariotas más simples (como *S. cerevisiae*) hasta los seres humanos. Esta regulación es llevada a cabo fundamentalmente a nivel de absorción, almacenaje y distribución, ya que los eucariotas no poseen mecanismos regulados de excreción de este metal (Kaplan y Kaplan, 2009).

S. cerevisiae emplea dos distintos sistemas de transporte de hierro, que dependen de su biodisponibilidad. Cuando el hierro es abundante en el medio, un sistema de transporte de baja afinidad (K_m 30 μM) se utiliza para la adquisición de hierro (Dix *et al.*, 1994). Cuando el hierro del medio es limitado, un sistema de alta afinidad es inducido (K_m 0.15 μM).

En la actualidad, se sigue elucidando en *S. cerevisiae* el complejo mecanismo de control tanto a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona para mantener

niveles adecuados de este nutriente esencial en diferentes condiciones ambientales. La respuesta a la deficiencia de hierro en *S. cerevisiae* se controla principalmente por el activador transcripcional de sensado de hierro Atf1p y su parálogo Aft2p. Dentro de los genes que son regulados por estos factores de transcripción están incluidos los que codifican para proteínas requeridas para el transporte en la membrana plasmática tanto de hierro iónico como unido a sideróforos, transporte de hierro vacuolar, así como proteínas para el metabolismo del hierro mitocondrial. El resultado de la activación de estos genes es la movilización de hierro tanto de fuentes extracelulares como de las pozas almacenadas intracelularmente. Aunque se conocen los genes activados por Atf1/2p así como los mecanismos de absorción y almacenaje del hierro en *S. cerevisiae*, se sabe muy poco acerca de los mecanismos moleculares para controlar la actividad de Atf1/2p y la señal específica de hierro con la cual estos factores responden (Outten y Albetel, 2013). Sin embargo, en estudios recientes se han descubierto aspectos muy importantes sobre los mecanismos en *S. cerevisiae* de regulación para responder a niveles variables de hierro.

La localización nuclear de Atf1p (y posiblemente Aft2p) es determinada por el estado de oxidación del hierro; en células deficientes en hierro, Aft1p se acumula en el núcleo, mientras que en células con suficiencia de hierro, Aft1p se transloca al citosol por la exportina nuclear Msn5p (Ueta *et al.*, 2007, 2012). La glutarredoxinas Grx3p y Grx4p forman un complejo al unirse con un centro [2Fe-2S] que junto a las proteínas Fra1p/Fra2p citosólicas transmiten una señal inhibitoria a Atf1p/Aft2p (Ueta *et al.*, 2012) que es dependiente de la biogénesis mitocondrial de proteínas con centros [Fe-S] (Rutherford *et al.*, 2005; Mühlenhoff *et al.*, 2010). La interacción de Grx3/4-Aft1 dependiente del sistema ISC promueve la disociación de Aft1p de sus promotores blanco bajo condiciones de suficiencia de hierro, reforzando la idea de la unión de un centro [Fe-S] a Grx3p/Grx4p como un requisito para la inhibición de Atf1p. Sin embargo, el efecto específico de esta señal sobre Aft1p/Aft2p no es claro.

Previamente, se ha demostrado que el hierro unido a Grx3p/Grx4p requiere del sistema ISC pero no del sistema CIA (Mühlenhoff *et al.*, 2010). En relación a esto, Yamaguchi-Iwai *et al.* (2002) demostraron que el transportador mitocondrial Atm1p también es requerido para la unión del hierro a Grx3p/Grx4p y para la disociación de Aft1p del ADN durante suficiencia de hierro. Se ha propuesto que Atm1p exporta un componente

mitocondrial desconocido, el cual es necesario para el ensamble y/o inserción de centros Fe-S dentro de proteínas citosólicas (Lill *et al.*, 2012).

El sistema ISC también es clave en la señalización durante la regulación a altos niveles de hierro, mediante el factor transcripcional Yap5p (Kaplan y Kaplan, 2009). Por lo tanto, el control en la regulación génica dependiente de hierro de los factores Yap5p y Aft1/2 es independiente de los cambios en los niveles de hierro citosólico, vacuolar o mitocondrial; en su lugar, ambas respuestas transcripcionales son coordinadas por el sistema ISC. Es importante resaltar que mientras Grx3p/Grx4p son requeridas para desencadenar la señal de disponibilidad de centros [Fe-S] hacia Aft1p/Aft2p, estas proteínas de unión a [Fe-S] no son necesarias para la actividad de Yap5p (Lill *et al.*, 2012). Esto demuestra el papel crucial que desempeña la mitocondria en el mantenimiento de la homeóstasis celular del hierro.

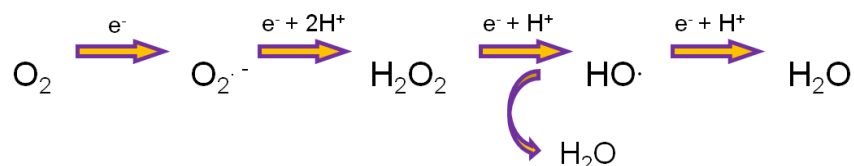
La mitocondria es ampliamente conocida por su papel esencial en la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, también es el orgánulo donde se lleva a cabo la biogénesis de centros [Fe-S] y grupos hemo, siendo el sitio de mayor utilización y reservorio de este metal. Es evidente que las alteraciones en la utilización del hierro mitocondrial alteran toda su homeóstasis celular. Alteraciones en el ISC provocan un incremento en la concentración de hierro mitocondrial lo que puede generar daño oxidativo en la célula (Schilke *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

1.12 Estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*

ERO es el término utilizado para referirse a una variedad de especies reactivas así como a radicales libres derivados del oxígeno molecular. Los radicales libres son átomos o moléculas que poseen un electrón desapareado en un orbital externo. Un compuesto puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón (Cadenas, 1989). Asimismo, los radicales libres también pueden formarse cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece con un átomo (fisión homolítica). Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas y tienen, por tanto, una vida media corta y su concentración en el estado estacionario es baja (Cadenas 1989, Pryor 1986, Webster y Nunn 1988). El electrón

desapareado en el último orbital es el que proporciona la alta reactividad química a estas moléculas. Este electrón tiene una fuerte tendencia a interaccionar con los electrones de otras moléculas para así ganar una configuración electrónica estable, convirtiéndose a su vez la molécula atacada en un radical libre, produciendo entonces una reacción en cadena.

El oxígeno molecular fundamental es un bi-radical, ya que tiene dos electrones desapareados en el orbital externo. Debido a que estos dos electrones tienen el mismo *espin*, el oxígeno sólo puede reaccionar con un electrón a la vez y por lo tanto no es muy reactivo con los dos electrones de un enlace químico. Para que el oxígeno pudiese oxidar un átomo o molécula que no fuese radical libre aceptando un par de electrones, éstos deberían ser de *espines* paralelos (Cadenas, 1989). Según el principio de exclusión de Pauli, los electrones de un orbital atómico o molecular nunca tienen direcciones paralelas, por tanto, para que el oxígeno molecular aumentase su reactividad habría de invertirse el *espin* de uno de los electrones de sus orbitales externos produciéndose el oxígeno singulete, cuya reactividad es superior. También el oxígeno puede sufrir una reducción secuencial y univalente produciendo radicales libres de oxígeno (Reacción 1).

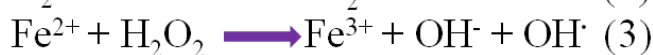
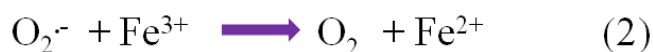


Reacción 1.- Reducción secuencial y univalente del oxígeno molecular.

Las ERO son formadas durante el metabolismo aeróbico así como en el medio ambiente por la reducción del oxígeno por un electrón a la vez (reacción 1). La reducción del oxígeno por un electrón produce el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el cual es una de las principales ERO y precursor de la mayoría de las ERO (Fridovich, 1983). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ a su vez puede ser dismutado espontáneamente por catálisis mediante enzimas denominadas superóxido dismutasas, convirtiéndolo a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede ser reducido a agua por la catalasa o el sistema del glutatión. Sin embargo, el H_2O_2 puede ser reducido parcialmente en presencia de metales de transición produciendo el radical hidroxilo ($\text{HO}^{\cdot}$), una de las ERO más reactivas, el cual puede generar daño a casi cualquier

molécula biológica. Una fuente importante de radicales hidroxilo es el ciclo de Habber-Weiss, en el cual está involucrada la reacción de Fenton (reacciones 1-3) donde el hierro actúa como un potencial pro-oxidante (Halliwell y Gutteridge 1984, 1989).

Por lo tanto, como ya se ha mencionado anteriormente, la concentración de hierro en estado libre debe estar finamente regulada mediante su unión a moléculas quelantes de bajo peso molecular, tales como el citrato, la histidina o el ATP. Sin embargo, en ciertas condiciones los iones de hierro pueden ser liberados de metaloproteínas como las que contienen centros [Fe-S], resultando en la generación del radical $\text{HO}^\bullet$ y con ello, un daño por estrés oxidativo (Gardner y Fridovich, 1992). El estrés oxidativo es el término que describe un desequilibrio entre las ERO y las defensas antioxidantes ya sea por un incremento en la generación de ERO o una disminución en las defensas antioxidantes.



Reacción de Fenton (2-3) y de Habber-Weiss (4).

El $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede ser producido enzimáticamente por las NADPH oxidasas (NOX), la oxigenasas dependientes del citocromo P450, así como la conversión proteolítica de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa. La producción no enzimática de $\text{O}_2^{\cdot-}$ ocurre cuando un electrón se transfiere directamente al oxígeno por coenzimas reducidas o grupos prostéticos (como los centros [Fe-S] o flavinas), siendo la principal fuente de $\text{O}_2^{\cdot-}$ la CTE. En *S. cerevisiae* solo se ha reportado una NADPH oxidasa en el retículo endoplásmico (Rinnerthaler *et al.*, 2012), mientras que no se ha reportado un gen que codifique una xantina deshidrogenasa por lo que en *S. cerevisiae*, la principal fuente de $\text{O}_2^{\cdot-}$ es la CTE.

1.12.1 Cadena respiratoria y producción de ERO en la mitocondria

El transporte de electrones a través de la no ocurre de manera 100% eficiente, ya que los electrones se pueden fugar reduciendo al oxígeno y produciendo el anión $\text{O}_2^{\cdot-}$ en

una proporción correspondiente al 2-4% del oxígeno consumido en el complejo IV. Además, el ambiente intramitocondrial es altamente reducido por lo que la gran variedad de centros redox tales como los centros [Fe-S], las flavoproteínas y la semiubiquinona son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno, produciendo O_2^- tanto en la matriz mitocondrial como en el espacio intermembranal. La velocidad de producción del O_2^- por la cadena respiratoria puede incrementar cuando el flujo de electrones disminuye, lo que produce un aumento de equivalentes reductores (Turrens *et al.*, 1982), o si existe un incremento de estos equivalentes reductores, como en el caso de *S. cerevisiae* cuando en crece con altas concentraciones de glucosa y/o etanol.

Se ha sugerido que el principal sitio de generación de ERO en la CTE es el complejo III, durante la operación el ciclo Q. El ciclo Q es el mecanismo mediante el cual el complejo III acopla la transferencia de electrones entre el ubiquinol (UQH_2) y el citocromo *c*. con la translocación vectorial de H^+ . La transferencia de electrones ocurre en dos pasos: primero, el ubiquinol es oxidado en un electrón por la proteína de Rieske que a su vez es oxidada por el citocromo *c_I* el cual transfiere el electrón al citocromo *c*. Esto ocurre de manera simultánea con la translocación de dos H^+ hacia el espacio transmembranal. Estas reacciones ocurren en el sitio quinol oxidasa (Qo) del complejo, el cual está constituido por dominios del citocromo *b* y la subunidad de Rieske. El segundo electrón del QH_2 es transferido al grupo hemo de bajo potencial redox (b_L) que a su vez es oxidado secuencialmente por el hemo de alto potencial redox (b_H), el cual reduce a una molécula de QH a radical ubisemiquinona ($UQH^\cdot$) en un segundo sitio del complejo denominado sitio quinol reductasa sitio (Qi) (Fig. 7). En una segunda vuelta del ciclo se oxida una segunda molécula de UQ, se reduce otra molécula de citocromo *c_I* y se genera otra molécula de UQH_2 con la adición de dos H^+ provenientes de la matriz mitocondrial (Hunte *et al.*, 2003). La interrupción en la transferencia de los electrones entre los centros redox del complejo III puede provocar reacciones colaterales a las del ciclo Q que favorecen la producción de ERO. Por ejemplo, la unión de antimicina A, un inhibidor del sitio Qi, impide la oxidación del hemo b_H , lo cual favorece la acumulación del radical $UQH^\cdot$, dando lugar a la reducción en un electrón del oxígeno para producir anión superóxido. de si la transferencia de electrones no es rápida y continua puede aumentar la

vida media del radical semiubiquinona el cual como todo radical puede transferir un electrón al oxígeno produciendo el anión superóxido (Muller *et al.*, 2002)

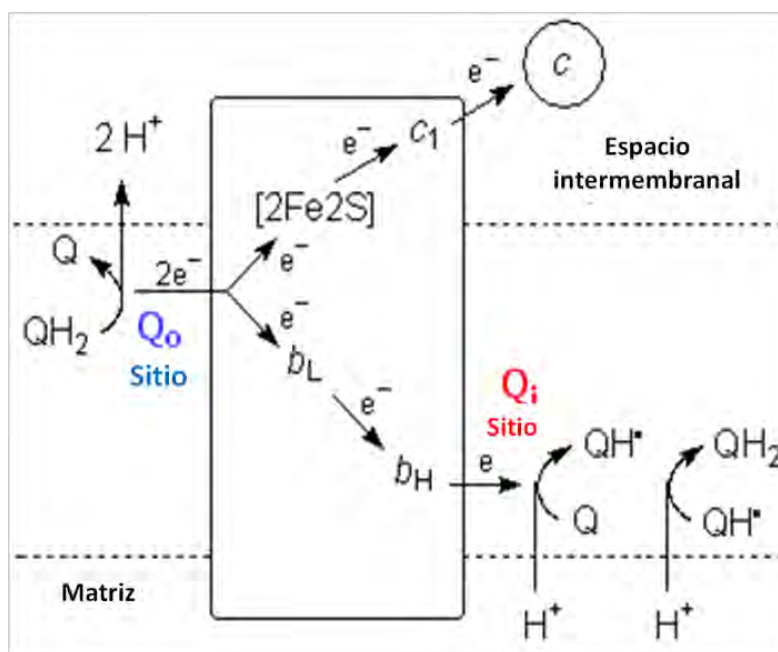


Figura 7.- Mecanismo del ciclo Q. La Explicación se encuentra en el texto (Tomado y modificado de Hunte *et al.*, 2003).

1.12.2 Daño a biomoléculas por las ERO

Las ERO son capaces de provocar daño a prácticamente cualquier biomolécula, siendo las proteínas, los lípidos poliinsaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos los principales blancos. Las ERO reaccionan con las biomoléculas, oxidándolas al sustraerles un electrón, lo que causa cambios estructurales en las moléculas y por lo tanto la pérdida de su función.

Los carbohidratos son oxidados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical $\text{OH}^\bullet$ para producir sustancias reactivas (Blake *et al.*, 1987). Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres fragmentándose a unidades más sencillas.

Con respecto al ADN, las ERO pueden oxidar las purinas y pirimidinas así como los azúcares de los ácidos nucleicos rompiendo o entrecruzando las hebras del ADN (Sies,

1993). Si estas modificaciones en el ADN no son reparadas pueden provocar mutaciones y desencadenar procesos cancerígenos. El daño oxidativo en el ADN mitocondrial (ADNmt) es unas 15 veces superior al del ADN nuclear. Esto se debe a la cercanía de dicho ADN a la CTE (Fraga *et al.*, 1990). En relación a lo anterior, se ha sugerido que el etanol incrementa la oxidación del ADNmt en *S. cerevisiae* y que además, la aconitasa puede proteger el ADNm de la degradación oxidativa (Chen *et al.*, 2007).

En el caso de los lípidos se sabe que todas las membranas celulares, y especialmente las mitocondriales, son vulnerables a la oxidación debido a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Estos tienen sus dobles enlaces separados por grupos metileno, lo que hace que las uniones C-H sean extremadamente sensibles a la agresión por las ERO (Halliwell y Gutteridge, 1984). Sin embargo, un aspecto peculiar es que la levadura *S. cerevisiae* es resistente a la lipoperoxidación, ya que en su membrana celular posee una mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados (70-80 %) (Cortés-Rojo *et al.*, 2009)

Las ERO también atacan a las proteínas, lo que da lugar a graves trastornos sobre el metabolismo y la arquitectura celular (Comporti, 1985; Stadtman, 1992). Las proteínas se oxidan preferentemente en los aminoácidos cisteína, fenilalanina, triptófano, tirosina, histidina y metionina. Una vez oxidadas, las proteínas pueden entrecruzarse y fragmentarse produciendo grupos carbonilo (Cabiscol *et al.*, 2000). Sin embargo, cabe destacar que las proteínas más susceptibles al daño por ERO son las que poseen centros [Fe-S] como grupos prostéticos.

1.12.2.1 Daño a proteínas con centros [Fe-S] por ERO

Las proteínas con centros [4Fe-4S] como la aconitasa, en donde un átomo de hierro se encuentra expuesto mientras que los otros átomos de hierro están unidos covalentemente a la cadena polipeptídica son especialmente susceptibles al daño oxidativo. El hierro catiónico que no se une covalentemente es el que une el sustrato en el centro catalítico de la enzima y también cataliza la reacción de deshidratación al recuperar un grupo hidroxilo aniónico del sustrato, actuando como un ácido de Lewis. (Beinert *et al.*, 1997). La razón por la cual los centros [4Fe-4S] son altamente susceptibles a las ERO radica en que el hierro

en estado libre que no está unido al sustrato puede interactuar con moléculas de H_2O o iones HO^- , por lo cual, el H_2O puede ser remplazado fácilmente por el anión O_2^- . Al comportarse como un ácido de Lewis y por ende mostrarse como un ión de hierro electrofílico, puede reaccionar fácilmente con el O_2^- el cual es de naturaleza nucleofílica.

La constante de velocidad de la reacción del O_2^- con el centro $[\text{4Fe-4S}]$ es de 10^6 - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por lo tanto, se ha sugerido que el O_2^- ataca al hierro expuesto del centro $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ provocando la oxidación del centro y generando el centro $[\text{3Fe-4S}]^+$ y la liberación del ión ferroso (Fe^{2+}) (Flint *et al.*, 1993; Vásquez-Vivar *et al.*, 2000). Este hierro en estado libre, como ya se mencionó, actúa como un pro-oxidante mediante la reacción de Fenton, produciendo el radical $\text{HO}^\bullet$. Por lo tanto, las proteínas con centros $[\text{4Fe-4S}]$ son blancos así como fuentes de ERO.

Para la célula es importante proteger los centros $[\text{Fe-S}]$ de estas proteínas o mantener un eficiente sistema de reparación de las mismas, para conservar su actividad así como la concentración de hierro libre en niveles bajos. A este respecto se ha sugerido que ciertos componentes de la biogénesis de centros $[\text{Fe-S}]$ de bacterias, tales como las proteínas IscA, ErpA y SufA están involucradas en la reparación de estos centros bajo condiciones de estrés oxidativo (Tan *et al.*, 2009). Por lo tanto, la biogénesis de centros $[\text{Fe-S}]$ podría jugar un papel importante durante procesos en los que se producen estrés oxidativo.

1.12.3 Defensas antioxidantes

Como consecuencia de la producción continua de ERO y de sus efectos deletéreos, los organismos requieren de una amplia serie de sistemas de defensas antioxidantes. Estos pueden clasificarse básicamente en: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. La función de los antioxidantes enzimáticos es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies del oxígeno parcialmente reducidas (O_2^- y H_2O_2), así como la reparación de moléculas oxidadas (Winston, 1990).

Las superóxido dismutasas (SOD) son un grupo de enzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido para formar oxígeno y peróxido de hidrógeno (Weiss, 1986). En *S. cerevisiae* existen dos isoformas, la citosólica, que contiene cobre y zinc (el

átomo de cobre es el que realiza directamente la dismutación) y la mitocondrial, que contiene manganeso.

También se encuentran la glutatión peroxidasa (GPx), la cual contiene cuatro cofactores de selenio que catalizan la ruptura del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos transformándolos en presencia de glutatión reducido (GSH) en agua y en glutatión oxidado (GSSG). Y la glutatión reductasa (GR), una flavoenzima dependiente del dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) (Lash, 2006). Estas enzimas juegan un importante papel en la defensa antioxidante y permiten a la célula mantener niveles adecuados de GSH celular.

Otra de las enzimas antioxidantes es la catalasa, la cual cataliza la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 . En *S. cerevisiae* existen dos isoformas, la citosólica, denominada Ctt1p, y la Cta1p presente en peroxisomas y mitocondrias (Petrova *et al.*, 2004). Las catalasas junto con las superóxido dismutasas y otras peroxidases constituyen la principal y más importante línea de defensa antioxidante (Sies, 1993). Adicional a los mecanismos enzimáticos anteriormente mencionados, la célula dispone de un conjunto de mecanismos no enzimáticos que permiten contrarrestar el daño oxidativa causado por ERO.

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos están constituidos principalmente por vitaminas y micronutrientes (Sies y Stahl, 1995), siendo el más importante el glutatión. El glutatión es un tripéptido ubicuo, γ -glutamil-cisteinil-glicina, descubierto por Hopkins en 1921. Es el tiol no proteico, soluble, más abundante en la célula y juega un papel central en la defensa antioxidante. La molécula de glutatión puede encontrarse en dos estados de oxidación distintos: en forma reducida, como tiol (GSH) y en forma oxidada, compuesta por 2 moléculas unidas por un puente disulfuro (GSSG) (De Leve y Kaplowitz, 1991). Las células eucariontes poseen tres reservorios principales del GSH. Alrededor del 80-90% del GSH celular está contenido en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplásmico (Meredith y Reed, 1982; Meister, 1988; Hwang *et al.*, 1992). Mientras que en este último compartimento la proporción GSH/GSSG es de 3:1, en el citoplasma y la mitocondria este cociente sobrepasa la proporción 10:1 (Meredith y Reed, 1982; Meister, 1988). Sin embargo, en *S. cerevisiae* se ha encontrado que el mayor

reservorio de GSH se encuentra en la mitocondria, indicando la importancia de este tripéptido en el mantenimiento redox dentro de este orgánulo.

Por otra parte, estudios tanto en humanos como en levaduras han sugerido que el etanol promueve un incremento de ERO, sin embargo, el mecanismo no está totalmente dilucidado. Aunado a esto se ha observado que el etanol incrementa la poza de hierro libre en hepatocitos (Kohgo *et al.*, 2008), lo cual probablemente juega un papel clave en el incremento de ERO.

2.- HIPOTESIS

El mecanismo de toxicidad del etanol en *Saccharomyces cerevisiae* involucra la generación de estrés oxidativo, el cual se exagera por una disfunción en la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S].

3.- OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudiar en *Saccharomyces cerevisiae* el mecanismo de la tolerancia a etanol, su relación con el estrés oxidativo y con la biogénesis de proteínas con centros Fe-S.

3.2 Objetivos específicos

1.- Evaluar en *S. cerevisiae* la participación del sistema ISC sobre la tolerancia a etanol y la generación de ERO.

2.- Determinar en *S. cerevisiae* el efecto del etanol y la participación del sistema ISC sobre la poza de Fe^{2+} libre y la generación de ERO.

3.- Explorar de *S. cerevisiae* el efecto del etanol y del sistema ISC sobre la funcionalidad de la cadena respiratoria.

4.- RESULTADOS

4.1.-CAPITULO 1

Reactive oxygen species production induced by etanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondril iron.sulfur cluster assembly system



RESEARCH ARTICLE

Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system

Rocio V. Pérez-Gallardo¹, Luis S. Briones¹, Alma L. Díaz-Pérez¹, Sergio Gutiérrez², José S. Rodríguez-Zavala³ & Jesús Campos-García¹

¹Lab de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Morelia, Michoacán, México; ²Facultad de Ciencias Médicas Dr. Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México; and ³Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México, D.F., México

Correspondence: Jesús Campos-García, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B-3, Ciudad Universitaria, CP 58030, Morelia, Michoacán, México. Tel./fax: +52 443 3265788; e-mail: jcgarcia@umich.mx

Received 8 March 2013; revised 27 August 2013; accepted 3 September 2013.

DOI: 10.1111/1567-1364.12090

Editor: Ian Dawes

Keywords

Saccharomyces cerevisiae; ethanol toxicity; reactive oxygen species (ROS); iron-sulfur cluster (ISC); Fe-S biogenesis.

Abstract

Ethanol accumulation during fermentation contributes to the toxic effects in *Saccharomyces cerevisiae*, impairing its viability and fermentative capabilities. The iron-sulfur (Fe-S) cluster biogenesis is encoded by the ISC genes. Reactive oxygen species (ROS) generation is associated with iron release from Fe-S-containing enzymes. We evaluated ethanol toxicity, ROS generation, antioxidant response and mitochondrial integrity in *S. cerevisiae* ISC mutants. These mutants showed an impaired tolerance to ethanol. ROS generation increased substantially when ethanol accumulated at toxic concentrations under the fermentation process. At the cellular and mitochondrial levels, ROS were increased in yeast treated with ethanol and increased to a higher level in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ* and *grx5Δ* mutants – hydrogen peroxide and superoxide were the main molecules detected. Additionally, ethanol treatment decreased GSH/GSSG ratio and increased catalase activity in the ISC mutants. Examination of cytochrome *c* integrity indicated that mitochondrial apoptosis was triggered following ethanol treatment. The findings indicate that the mechanism of ethanol toxicity occurs via ROS generation dependent on ISC assembly system functionality. In addition, mutations in the ISC genes in *S. cerevisiae* contribute to the increase in ROS concentration at the mitochondrial and cellular level, leading to depletion of the antioxidant responses and finally to mitochondrial apoptosis.

Introduction

Saccharomyces cerevisiae is the most common yeast used in the ethanol-fermentation processes and, more recently, in biofuel production. Successful conversion of glucose to ethanol during fermentation depends mainly on the yeast's ability to counteract the stress factors during the process. Osmotic pressure caused by the initial sugar load, pH, and temperature and stress induced by fermentation products (such as acetaldehyde, acetic acid, methanol, ethanol, and phenolic compounds) constitute the main stressors in the fermentation medium. Although *S. cerevisiae* possesses inherent ethanol tolerance, ethanol accumulation during the fermentation processes has been described as the main producer of toxic effects (stressor) on yeast viability and fermentative capabilities. These toxic effects

halt the fermentation process and reduce ethanol yield. Thus, the selection of yeast strains that tolerate different fermentation stresses is the next goal of the ethanol-production industry (Endo *et al.*, 2008; Marks *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2010). Genomic, proteomic, and functional studies have been conducted to study the ethanol tolerance mechanisms, ethanol toxicity, and stress induced by other ethanol-fermentation-related metabolites. The main ethanol tolerance mechanisms involve changes in the composition of the membrane and cell wall (Chí & Arneborg, 1999; Ma & Liu, 2010), enhanced stress defenses, and general processes associated with the production and storage of protective compounds. Other adaptive changes involve the following: intracellular reorganization, biogenesis, transport processes occurring in vacuoles, peroxisomes,

endosomes, cytoskeleton, and transcriptional machinery (Endo *et al.*, 2008; Marks *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2010; Ma & Liu, 2010; Stanley *et al.*, 2010). However, the molecular mechanisms underlying these observations are poorly understood.

The iron-sulfur cluster (Fe-S) is a prosthetic group in many prokaryotes and eukaryote enzymes with redox, catalytic, and regulatory functions (Lill & Muhlenhoff, 2006; Lill, 2009; Lill *et al.*, 2012). In bacteria, the Fe-S cluster is mainly synthesized by proteins encoded in the *isc* gene cluster (iron-sulfur cluster, ISC), although in some bacterial species the *SUF* and *NIF* systems are also involved in Fe-S cluster assembly under fixed metabolic conditions (Muhlenhoff *et al.*, 2011). The ISC system has been extensively studied and is involved in the assembly of the Fe-S cluster into apoproteins in both bacteria and yeast (Schilke *et al.*, 1999; Hoff *et al.*, 2000; Dutkiewicz *et al.*, 2003; Conte & Zara, 2011). In eukaryotes, two main systems of Fe-S-protein biogenesis have been described, the cytosol/nucleus (CIA) and mitochondrial (ISC) machineries, functionally the CIA depends on the mitochondrial ISC machinery (Lill & Muhlenhoff, 2006; Lill, 2009). In *S. cerevisiae*, the homologous genes to the bacterial *iscSUA-hscBA-fts* cluster consist of the *NFS1*, *ISU1*, *ISU2*, *ISA1*, *ISA2*, *JAC1*, *SSQ1*, *YAH1*, *GRX5*, and *IBA57* genes, which are dispersed in the yeast genome (Schilke *et al.*, 2006; Lill *et al.*, 2012). The ISC assembly machinery for maturation of all cellular Fe-S proteins (mitochondrial, cytosolic, and nuclear) is also involved in iron homeostasis in prokaryotes and eukaryotes (Lill, 2009; Lill *et al.*, 2012). In yeast, the *Ssq1p* chaperone and the *Jac1p* J-protein (cochaperone) function together to assist in the biogenesis of Fe-S centers of Fe-S-dependent proteins. The Fe-S cluster assembly in mitochondria is initiated by cysteine desulfurase (*Nfs1sd11*), which obtains a sulfur group from a cysteine transferred to the scaffold protein *Isc1p* and its redundant *Isc2p* protein assisted by *Yah1p*. This interaction also involves *frataxin* (*Yfh1p*), which acts as an iron donor or activity regulator. The *Ssq1p* chaperone has ATPase activity that is stimulated by the J-type cochaperone, *Jac1p*, during interaction with the scaffold protein *Isc1p/Isc2p* (Lill & Muhlenhoff, 2006; Lill, 2009; Lill *et al.*, 2012). *Isc1p* is a substrate for both *Ssq1p/Jac1p*, and *Jac1p* and *Isc1p* cooperatively stimulate the ATPase activity of *Ssq1p* (Dutkiewicz *et al.*, 2003). The subsequent cluster transfer to recipient apoproteins is mediated by the molecular chaperone *Ssq1p* and its cochaperone *Jac1p* and is assisted by glutaredoxin *Grx5p* (Rodríguez-Manzanque *et al.*, 2002). Recently, the participation of two novel proteins, *Isa1p* and *Isa2p*, was described in the yeast mitochondrial ISC assembly machinery; these proteins are involved in the maturation of mitochondrial apoproteins dependent on [4Fe-4S]

clusters, and this activity is mediated by the assembly-protein, *Iba57p* (Muhlenhoff *et al.*, 2011; Lill *et al.*, 2012). Previous studies have suggested that the components of the ISC system could be related to ethanol tolerance in bacteria (Campos-García *et al.*, 2000) and yeast (Yoshikawa *et al.*, 2009; Ma & Liu, 2010). In *S. cerevisiae*, ethanol toxicity indicates that oxidative stress directly contributes to mitochondrial dysfunction (Costa *et al.*, 1997; Drakulic *et al.*, 2005); however, the underlying mechanisms remain to be elucidated. Therefore, the objective of the present study is to clarify the mechanism of ethanol toxicity and the involvement of the ISC assembly system in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation.

Materials and methods

Yeast strains, growth conditions, and survival tests

The haploid *S. cerevisiae* BY4741 (Mat a, *his3Δ*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*) and its *KanMX4* interruption gene mutants, *ssq1Δ*, *isu1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ*, and *grx5Δ* used as representatives of the ISC genes and the *sdh2Δ*, *cox2Δ*, and *aco1Δ* used as control mutants were obtained from Open Biosystem. Tubes or flasks were prepared with 10 or 50 mL of yeast extract/peptone/dextrose (YPD) culture medium and stressor (ethanol) was added at the indicated concentrations. Culture medium was inoculated with overnight yeast cultures that had reached an optical density of 0.1 at 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) and incubated at 30 °C with low-speed shaking (50 r.p.m.). Yeast growth (biomass) was monitored by measuring $OD_{600\text{ nm}}$. Yeast survival test was carried out in yeast cultures grown on liquid YPD medium, collected in the late exponential growth phase and after adding ethanol 10% (v/v), incubating at 30 °C with low-speed shaking (50 r.p.m.). Cell survival was determined by trypan blue (Sigma) staining, and yeast counts were performed using a Neubauer chamber (Strober, 1997). For ethanol sensitivity or antioxidant protection, ascorbic acid or GSH was added to YPD media plates. Agar YPD plates with ethanol at indicated concentrations were inoculated with yeast cultures at several dilutions, sealed with Parafilm M and incubated at 30 °C.

Batch fermentation test

Fermentations were carried out in modified YPD medium, using glucose at 200 g L⁻¹ (20%). Culture media (50 mL) were inoculated with overnight precultures grown in matching media to initial $OD_{600\text{ nm}}$ of 0.1; these were covered with cotton caps and incubated at

30 °C with lightly agitation. The samples collected at respective times were submitted to biomass determination by OD_{600 nm}, and ROS determination by flow cytometry using the cell-permeant fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA; Molecular Probes, Invitrogen) as described later. Ethanol production and sugar consumption in the samples were determined by liquid chromatographic analysis as described (López-Alvarez *et al.*, 2012). The fermented samples were filtered and then separated with an Aminex HPC-87Ca column (Bio-Rad). The operating conditions were as follows: column temperature, 80 °C; deionized water as mobile phase at 0.7 mL min⁻¹ by 20 min running; injection volume, 25 µL. Quantitation was carried out by refraction index detector based on calibration plots using glucose and ethanol as standard compounds (Sigma-Aldrich), obtaining a linear coefficient of determination (R^2) of 0.99 for each.

Real-time quantification of ROS in *S. cerevisiae* cultures and suspensions

Intracellular reactive oxygen species (cell-ROS) in yeast cultures or cell suspensions were determined using the oxidant-sensitive, cell-permeant fluorescent probe H₂DCFDA (Molecular Probes, Invitrogen) (Du & Takagi, 2007; Kitagaki *et al.*, 2007). H₂DCFDA was used at 10 µg mL⁻¹ in cell suspensions; the fluorescent cells and fluorescence intensity were quantified by flow cytometry as described below. For mitochondrial total ROS determination (mit-ROS), yeast suspensions were incubated with 5 µg mL⁻¹ of dihydrorhodamine 123 (DHR123; Sigma) and fluorescence was quantified by flow cytometry. Dihydroethidium (Molecular Probes, Invitrogen) was used for the mitochondrial superoxide (O₂⁻) determination, with a fluorescence excitation of 400 nm and an emission of 590 nm, which provided optimal discrimination of superoxide from other ROS. The probe was used at 5 µg mL⁻¹ for flow cytometry as described (Madedo *et al.*, 1999).

Cell cultures were grown to late exponential phase, samples (100 µL) were loaded with the respective fluorescent probe (H₂DCFDA, DHR123, or dihydroethidium) and incubated at 30 °C for 2 h in the dark. Then, yeast cell samples were taken to 1 mL with PBS buffer (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄·2 H₂O 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, at pH 7.4) and the ROS were immediately quantified by flow cytometry. For ethanol treatments, yeast cultures grown on YPD medium (10 mL) were added with ethanol (10% v/v), and at the respective times, samples (100 µL) were harvested, washed, and suspended in PBS adjusting the volume to 1 mL or 1 × 10⁷ cells mL⁻¹. The cells were loaded with the fluorescent probes by incubating for 2 h. Finally, the fluorescence

was determined by flow cytometry using a BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences). The populations of cells for each of the treatments were gated in the forward scatter and side scatter (SSC) dot plots to eliminate dead cells and cell debris. Populations corresponding to auto- or basal fluorescence were located in the left quadrant and cells with emission of fluorescence increased at least one log unit value were located in the right quadrant from the dot plots. In addition, the percentage of fluorescent cells (PFC) and the median fluorescence intensity (FI) were determined in the monoparametric histograms of fluorescence emission obtained from the dot plots and labeled as percentage of cells and as relative units of fluorescence. The equipment was calibrated using Spherotech 8 peak (FL1-FL3) and 6 peak (FL-4) validation beads (BD Accuri). Fluorescence of H₂DCFDA and DHR123 probes was monitored in the emission fluorescence channel FL1 (533/30 nm) and for dihydroethidium probe in the FL2 (587/40 nm). A minimum of 20 000 cellular events were analyzed in each determination point.

Isolation of mitochondria

Mitochondria of the *S. cerevisiae* yeast and mutant strains were isolated from cultures grown in liquid medium YPD at 30 °C with shaking. Cells were harvested in late exponential growth phase by centrifugation at 2750 g for 15 min at 4 °C (Centrifuge Eppendorf 5810R, rotor F-34-6-38) and washed thrice using distilled water and suspended in buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5). Yeast spheroplasts were obtained as described before (Auchere *et al.*, 2008), using a digestion solution (sorbitol 1.2 M, EGTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, DTT 10 mM, at pH 7.5) and adding Lyticase from *Arthrobacter luteus* (Sigma) at 2 mg g⁻¹ cells by fresh weight. Yeast suspensions were incubated by 60 min at 30 °C. Spheroplasts were washed twice with spheroplast wash buffer (sorbitol 1.2 M, Tris-HCl 50 mM, at pH 7.5). Spheroplasts were suspended in a homogenizing buffer (sorbitol 0.6 M, HEPES-KOH 20 mM, at pH 7.4) and lysed in a potter tube homogenizer and washed thrice with the same buffer. The unruptured cells were removed by centrifugation at 2500 g for 10 min at 4 °C, and yeast mitochondria were harvested from the supernatant by centrifugation at 9600 g for 10 min to 4 °C.

Determination of glutathione content in complete cells and mitochondria

Yeast cells cultured in YPD to late exponential growth phase were used for GSH/GSSG determination and for mitochondria isolation. Cell pellets (1 mg) were suspended in buffer (K₂HPO₄ 500 mM, EDTA 5 mM, sulfo-

salicylic acid 5%, pH 7.0). Cells suspensions were frozen with liquid nitrogen and broken in a mortar. Cell extracts were centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4 °C, and supernatants obtained were used for GSH/GSSG determinations. Mitochondria (1 mg) were suspended in homogenizing buffer (sorbitol 0.6 M, HEPES-KOH 20 mM, at pH 7.4) and added sulfosalicylic acid 5% (1 : 3 proportion). Mitochondria were broken by vortexing with frozen and thawing cycles. Extracts were centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4 °C, and the supernatants obtained were used for GSH/GSSG determinations. The reduced GSH and oxidized GSSG species were quantified using the glutathione assay kit (Sigma-Aldrich), based on the established enzymatic recycling method previously described using DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) in reaction buffer (K_2HPO_4 500 mM, EDTA 5 mM, DTNB 3 mM, glutathione reductase 0.1 U mL⁻¹, NADPH 2 mM, pH 7.0) to produce the yellow colored compound 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) (Shaik & Mehvar, 2006). Quantification of TNB was carried out measuring the absorbance at 412 nm. For GSSG determination, the extracts were incubated 1 h with 4-vinylpyridine (2%) previous to the quantification as described earlier.

Determination of catalase activity

Catalase activity was quantified by oxygen production rate using H₂O₂ (10 µM) as substrate, cells (25 mg) from *S. cerevisiae* were placed in 2.5 mL of MES-TEA buffer (pH 6.0) in a sealed glass chamber with constant stirring, quantifying oxygen generation rate with a Clark-type oxygen electrode coupled to a biological oxygen monitor (Zigman et al., 1998).

Determination of cytochrome c integrity

Cytochrome *c* integrity was determined by detecting the release of cytochrome *c* from mitochondria using immunocytochemistry in *S. cerevisiae* spheroplasts obtained as described with minor modifications (Ng et al., 2012). Spheroplast suspensions (1×10^6 cells) were incubated in permeabilization buffer (100 mM KCl, digitonin 50 µg, sorbitol 1.2 M, Tris-HCl 50 mM, at pH 7.5) for 5 min at room temperature and fixed with 3.5% formaldehyde in buffer (sorbitol 1.2 M, Tris-HCl 50 mM, at pH 7.5) for 30 min at room temperature. Excess formaldehyde was removed by washing with PBS buffer and centrifugation. Permeabilized spheroplasts were incubated in 100 µL of blocking media (3% BSA and 0.05% Tween 20 in PBS) for 30 min at room temperature, washed, and incubated with primary anticytochrome *c* antibody (mouse monoclonal anti-7H8, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) at a 1 : 200 dilution in blocking medium at 4 °C overnight.

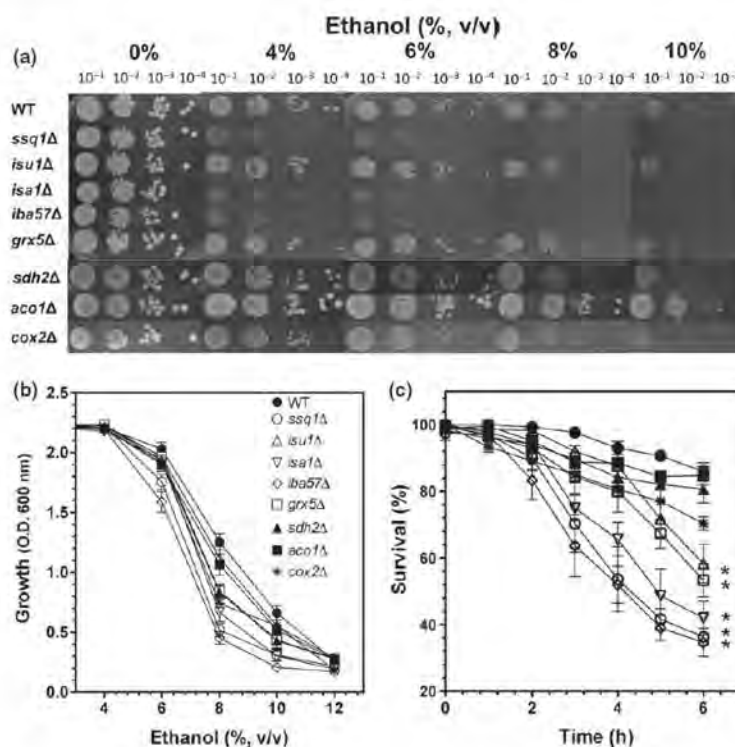
Spheroplasts suspensions were washed twice with PBS and incubated with the secondary antibody, a monoclonal anti-mouse coupled to rhodamine goat anti-mouse IgG (Invitrogen) in blocking medium at a 1 : 200 dilution for 2 h, at room temperature. Finally, spheroplasts were washed twice with PBS and suspended in PBS for flow cytometry analysis. Cytochrome *c* integrity was quantified by measuring the fluorescence produced in a flow cytometer (BD Accuri C6; BD-Bioscience). The populations of cells were gated in the forward SSC, the fluorescence was quantified in FL1 channel (530 nm) dot plots, and PFC determination into monoparametric fluorescence histograms was carried out as described previously.

Results

Ethanol toxicity in *S. cerevisiae* yeast is increased by mutations in ISC genes

We used haploid yeast *S. cerevisiae* ISC mutants to study the involvement of the ISC gene-cluster products on ethanol tolerance. Plates with solid YPD medium were incubated with ethanol in the range of 0–10% (v/v) and used to test the ethanol tolerance in *S. cerevisiae* ISC mutants (*SSQ1*, *ISU1*, *ISA1*, *IBA57*, and *GRX5* genes). In addition, three mutants not involving the ISC system were used as controls, the mutant *sdh2Δ* (affected in succinate dehydrogenase that forms the complex II from the electron transporter chain, ETC), the *cox2Δ* (affected in cytochrome *c* oxidase subunit II of the complex IV from the ETC), and *aco1Δ* (affected in *cis*-aconitase, which is involved in the tricarboxylic acid cycle, TCA cycle). The yeast mutants *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* showed impaired growth in YPD with ethanol compared with wild type (WT), while the *isu1Δ* and *grx5Δ* mutants, as well as the control mutants *sdh2Δ*, *cox2Δ*, and *aco1Δ* showed a similar behavior to the WT (Fig. 1a). With ethanol treatment, using dose-response growth analysis in liquid YPD medium, similar results of ethanol toxicity were observed (Fig. 1b). Under these conditions, the half-maximal inhibitory concentration for ethanol (IC_{50EtOH}) was calculated for each strain. IC_{50EtOH} values were as follows: WT, 8.4 ± 0.3%; *isu1Δ*, 7.9 ± 0.1%; *ssq1Δ*, 6.8 ± 0.1%; *isa1Δ*, 7.1 ± 0.1%; *iba57Δ*, 6.7 ± 0.2%; and *grx5Δ*, 7.4 ± 0.2%; and the control mutants, *sdh2Δ*, *cox2Δ*, and *aco1Δ*, showed (IC_{50EtOH}) values of 8.1 ± 0.2%, 7.6 ± 0.2%; and 8.2 ± 0.2%, respectively. The results indicate that the mutants *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* were more sensitive to ethanol (c. 15–20%) than the WT strain or the control mutants. This phenotype was confirmed with survival assays of yeast cultures obtained in the late exponential phase, when cells were treated with a toxic ethanol concentration (10%). WT yeast was able to efficiently tolerate

Fig. 1. Studies of growth in plates, liquid dose-response, and survival analyses in *Saccharomyces cerevisiae* ISC mutants in the presence of ethanol. (a) Dilutions of yeast suspensions were cultured on YPD agar plates with ethanol at the indicated concentrations at 30 °C for 48 h. (b) Yeast cultures grown on liquid YPD medium with different concentrations of ethanol (v/v) were incubated at 30 °C for 12 h with slow shaking. Growth was determined by optical density at 600 nm. (c) Yeast cultures in the late exponential growth phase were treated with ethanol 10% (v/v) and incubated at 30 °C with light shaking. Viable yeast cells were counted using trypan blue stain and a Neubauer chamber. Each value represents the mean and standard errors of the mean (SEM) are indicated as bars ($n = 3$) for (c), two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni *post hoc* test was used for comparison of mutants vs. control, and significant differences for the last 4 points ($P < 0.05$) are indicated (*).



10% (v/v) ethanol for 6 h similarly to the control mutants *sdh2Δ* and *aco1Δ*, showing up to 80% cell survival, lesser extent the *cox2Δ* with 70% cell survival, while the *ssq1Δ*, *isu1Δ*, *isa1Δ*, *grx5Δ*, and *iba57Δ* mutants displayed a drastic decrease in cell survival, which was below 50%. These differences in survival were statistically significant ($P < 0.05$) with respect to WT yeast. Under these assay conditions, the lethal time 50 at 10% (v/v) ethanol concentration [$LT_{50EtOH(10\%)}$] obtained for the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants were 42–55% lower than WT, with the following values: WT, 11.0 ± 1.5 h; *aco1Δ*, 10.5 ± 1.5 h; *sdh2Δ*, 9.5 ± 1.5 h; *cox2Δ*, 9.5 ± 1.2 h; *isu1Δ*, 7.1 ± 1.8 h; *grx5Δ*, 6.6 ± 1.8 h; *isa1Δ*, 4.8 ± 1.7 h; *ssq1Δ*, 4.1 ± 1.6 h; and *iba57Δ*, 3.7 ± 1.4 h. Thus, the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutant yeast strains were the most susceptible to ethanol. Additional tolerance assays were conducted to explore the growth rate in the presence of toxic ethanol concentrations (Fig. 2). The growth kinetic results indicated that for all the ISC mutants tested, the growth was impaired at 8% ethanol, resulting in the following velocity parameters (μ): WT, 0.075 ± 0.008 ; *sdh2Δ*, 0.076 ± 0.006 ; *cox2Δ*, 0.074 ± 0.006 ; *aco1Δ*, 0.076 ± 0.008 ; *isu1Δ*, 0.068 ± 0.009 ; *grx5Δ*, 0.055 ± 0.01 ; *isa1Δ*, 0.053 ± 0.01 ; *iba57Δ*, 0.047 ± 0.01 ; and *ssq1Δ*, 0.043 ± 0.01 . At a concentration of 10% ethanol, all the ISC mutants and *cox2Δ* showed a major impaired

growth than the *sdh2Δ* or *aco1Δ* mutants and the WT (Fig. 2b and c). The ethanol tolerance, survival, and growth rate parameters for the yeast strains under ethanol treatment indicated that the *ssq1Δ*, *isa1Δ* and *iba57Δ*, and to a lesser degree the *grx5Δ* and *isu1Δ* mutants, were more susceptible to ethanol than WT or the control strains, *aco1Δ* and *sdh2Δ*. These data indicate that mutations in the ISC genes result in an impaired ethanol tolerance in *S. cerevisiae*, although this effect was less dramatic in the *isu1Δ* mutant likely due to complementation of the homologous *ISU2* gene. It is worth noting that the assays to test this hypothesis could not be carried out due to the lack of a viable phenotype for the haploid *jac1Δ* mutant.

Increase in ROS generation, induced by ethanol, in *S. cerevisiae* is exacerbated by ISC genes mutations

The toxic effects caused by ethanol in *S. cerevisiae* have been associated with an increase in oxidative stress, inactivation of related enzymes, and dysfunctional mitochondrial metabolism (Costa *et al.*, 1997; Kitagaki *et al.*, 2007). However, little is known about the mechanism involved in ROS generation, location/accumulation of ROS, and the kind of species generated by the presence of ethanol. We hypothesized that the protein components

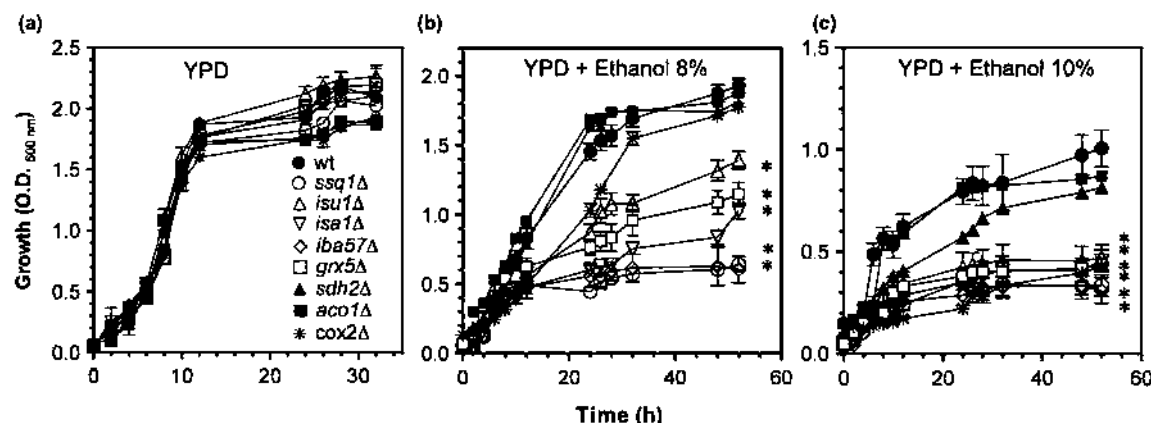


Fig. 2. Kinetics of growth of *Saccharomyces cerevisiae* ISC mutants in the presence of ethanol. Yeast cultures were grown in liquid YPD medium without ethanol (a), 8% (v/v) ethanol (b), and 10% (v/v) ethanol (c). Cultures were incubated at 30 °C with light shaking and growth (biomass) was determined by measuring OD at 600 nm. Each value represents the mean and SEM values are indicated as bars ($n = 3$), one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used to compare mutants vs. control, significant differences ($P < 0.05$) are indicated (*).

involved in Fe-S assembly and the production of ROS induced by ethanol could be related.

To elucidate whether the increased susceptibility to ethanol in *S. cerevisiae* is related to an increased ROS generation and whether this is associated with the ISC assembly system, real-time quantification of ROS by flow cytometry was carried out using fluorescent ROS indicators. Three fluorescent ROS indicators were used: H₂DCFDA for general intracellular ROS, the DHR123 probe for mitochondrial ROS (this compound reacts mainly with H₂O₂ produced by mitochondrial metabolism), and dihydroethidium to identify mainly intracellular superoxide radicals (O₂^{•−}). As described previously, all yeast strains were able to tolerate 10% (v/v) ethanol for at least 6 h with up to 50% cell survival (Fig. 1c). Therefore, real-time ROS quantification was carried out at 10% ethanol during the period of 6 h.

First, we determined ROS generation in the yeast population (PFC) and the fluorescence intensity (FI) in cultures treated with or without 10% ethanol. Using the H₂DCFDA and DHR123 probes, a similar ROS production behavior was observed, the PFC values in yeast suspensions without ethanol treatment were around 10–40%, while with ethanol treatment the fluorescent yeast population increased to 60–90%, showing significant differences in all the ISC mutant strains tested, with respect to the untreated ethanol suspensions (Fig. 3b and c); this effect was more apparent when dihydroethidium probe was used (Fig. 3d), indicating that in the yeast population treated with ethanol, the generation of ROS occurred. Interestingly, the highest PFC values were observed in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ*, and *grx5Δ* mutants (Fig. 3a–d). The unrelated ISC mutants, *aco1Δ* and *sdh2Δ*, showed a

behavior similar to the WT yeast, while that the *cox2Δ* strain showed a similar behavior to *grx5Δ* mutant, except for the dihydroethidium probe which was similar to WT.

Additionally, we determined the fluorescence intensity in yeast suspensions treated with ethanol; this parameter may be directly related to the amount of ROS produced in cell suspensions. Our results clearly indicate that the ISC mutations caused an increase in ROS generation with respect to WT yeast (Supporting Information, Fig. S1). Interestingly, the ethanol treatment caused exacerbated ROS generation in all the ISC mutants (Figs 3d and S1). Using the H₂DCFDA probe in the ISC mutants (*ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ*, and *grx5Δ*), we found that the FI values were statistically increased, except for the *isu1Δ* mutant, compared to control strains (WT, *sdh2Δ*, and *aco1Δ*). Importantly, the FI values in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ*, and *grx5Δ* yeast suspensions were c. 10–20-fold higher with ethanol treatment (Fig. S1). In addition, the IF values observed using the DHR123 and dihydroethidium indicators showed behaviors similar to those of the H₂DCFDA probe and the differences were statistically significant for the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ*, and *grx5Δ* mutants, with ethanol addition (Figs 3 and S1). These results indicated that ethanol treatment causes an increase in ROS generation in *S. cerevisiae* and that this effect is enhanced in ISC gene mutants, confirming that the mechanism of ethanol toxicity involves ROS generation. In addition, the results show that the main ROS generated during ethanol treatment were hydrogen peroxide and superoxide, which increased significantly in the *SSQ1*, *ISA1*, *IBA57*, and *GRX5* gene mutations – but increased to a lesser degree or not at all in the *isu1Δ* mutant. To validate the ROS generation experiments, three control mutants were

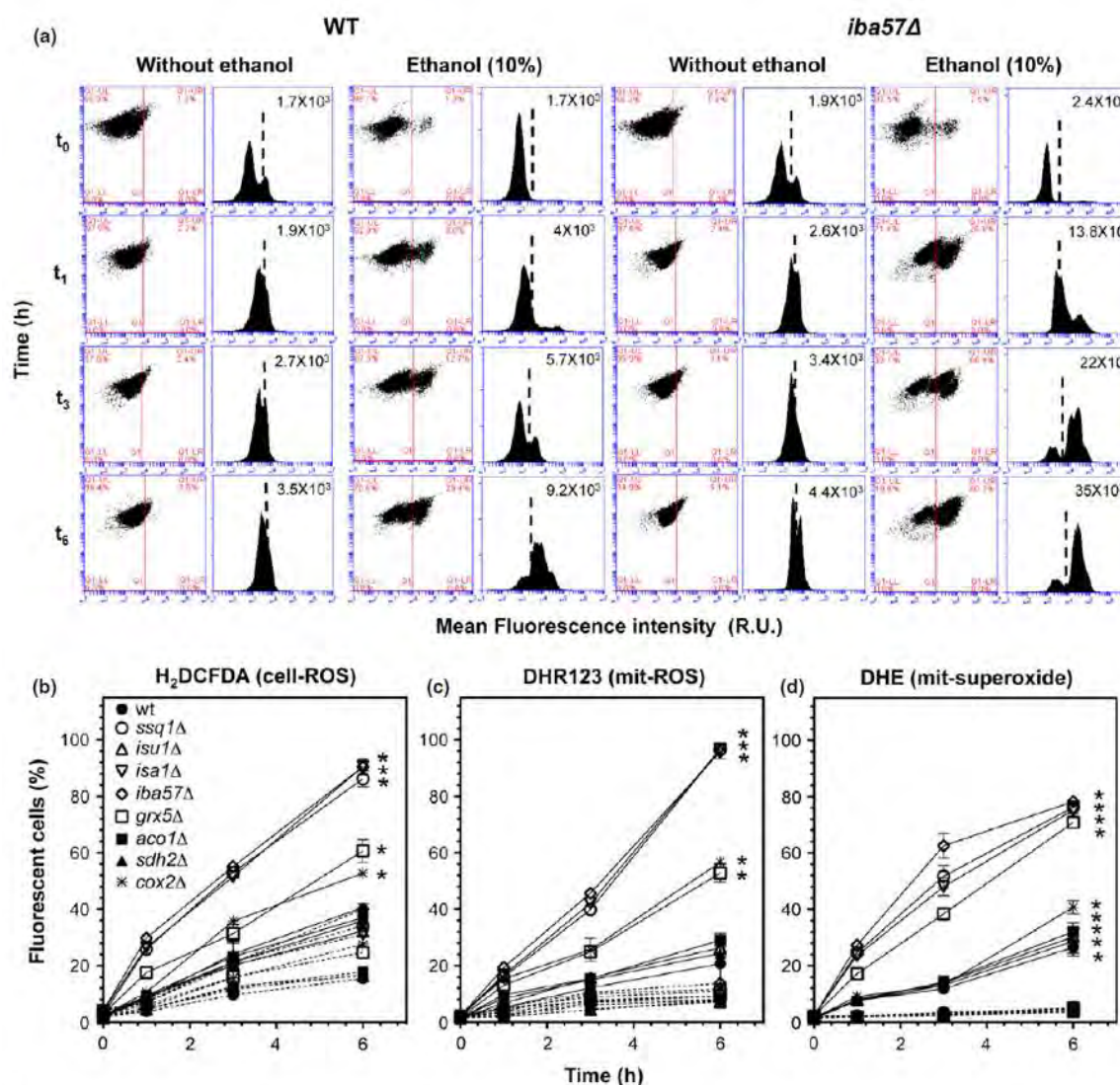


Fig. 3. Kinetics of ROS generation in suspensions of *Saccharomyces cerevisiae* ISC mutants treated with ethanol. Yeast cultures were grown in liquid YPD medium without ethanol and harvested in late exponential growth phase. Yeast YPD-grown cultures were incubated for 2 h with the respective ROS probe; then, the suspensions were treated with and without ethanol, incubated at 30 °C with light shaking, and at respective times, samples (100 μ L) were suspended in PBS buffer and the ROS levels determined by flow cytometry. (a) Schematic diagrams of a dot plot (left) and histogram (right), showing the quadrant division for ROS determination using the dihydroethidium probe. The populations of cells for each of the treatments are gated in the forward SSC dot plots to eliminate dead cells and cell debris. Populations corresponding to auto- or basal fluorescence are located in the left quadrant. Cells with increased fluorescence emission of at least 1 log unit value are located in the right quadrant (dashed lines in histograms). Dot plot analyses corresponding to WT and the *iba57Δ* mutant treated with the fluorescent dihydroethidium probe at 0, 1, 3, and 6 h are shown as example. PFC is indicated in dot plots, and the fluorescence intensity (relative units) is indicated in the histograms. Fluorescent cells were identified by real-time analysis by flow cytometry using fluorescent probes for ROS detection. (b–d) Results represent the percentage of cells that showed positive fluorescence. ROS determinations were carried out as in (a), yeast suspensions without ethanol (dashed lines) and with ethanol 10% (v/v) treatment (continuous lines). The ROS fluorescent probe H₂DCFDA is a general cellular ROS indicator, while DHR123 and dihydroethidium are mitochondrial general ROS and superoxide radical indicators, respectively. Values are the mean of three independent experiments with 20 000 cells counted by flow cytometry per each point. SEM values are indicated as bars ($n = 3$), two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* was used to compare mutants vs. control, significant differences ($P < 0.05$) are indicated (*).

incorporated in the study, the first one corresponds to the *cis*-aconitase mutant (*aco1Δ*) and was used as a negative control. As mentioned earlier, it is part of the TCA cycle and should not be related to ROS generation. The mutants *sdh2Δ* and *cox2Δ* have a deletion of succinate dehydrogenase of the complex II and cytochrome *c* oxidase of the complex IV of the ETC, respectively. The results obtained with these yeast strains indicated that the *aco1Δ* and *sdh2Δ* mutants did not show significant differences in the ROS levels with respect to the WT yeast (Figs 3 and S1), while the ROS production of the *cox2Δ* mutant was similar to that of *grx5Δ* mutant when H₂DCFDA and DHR123 probes were used, but not with dihydroethidium, where the ROS contents were similar to those observed for the WT and the mutants *aco1Δ* and *sdh2Δ*. The findings obtained with the fluorescent ROS indicators, DHR123 and dihydroethidium, suggest that ROS are mainly generated and accumulate in mitochondria after the treatment with toxic ethanol concentrations, and an additive effect of ROS generation was observed in the ISC gene mutants.

Increases in ROS correlate with maximal ethanol accumulation during the fermentation process and is exacerbated by ISC genes mutations

As mentioned, the addition of ethanol at toxic concentrations provoked a ROS burst mainly generated at the mitochondria level and this burst is exacerbated by dysfunction of the ISC assembly system. However, it has also been proposed that the ethanol yield during the fermentation process is correlated with the ethanol tolerance level of the yeast used. Therefore, real-time ROS determination was carried out in yeast culture during the fermentation assay, using a sugar concentration sufficient to generate a toxic amount of ethanol in the fermentation medium. Fermentative capabilities of the ISC mutants were tested in YPD liquid medium containing 200 g L⁻¹ of glucose (theoretically, this glucose amount produces c. 13% ethanol v/v, under a 100% yield). We have observed that at 240–280 g L⁻¹ sugar concentrations, an arrest of ethanol production occurs at c. 10–11% in the *S. cerevisiae* BY4741 strain, and the rest of the glucose remains in the fermentation medium. These observations led us to hypothesize that in the *S. cerevisiae* BY4741 strain, the limit of ethanol yield may be related to its level of ethanol tolerance. Thus, we proposed that 10% ethanol might cause inhibition of yeast fermentative capability, likely due to generalized damage caused by the ROS increase. Therefore, ROS generation was determined in yeast cells harvested throughout the fermentation process (Fig. 4). Our findings indicated that all the yeast strains tested

were able to grow efficiently in YPD supplemented with 200 g L⁻¹ of glucose with a similar biomass determined at OD_{600 nm} (Fig. 4a). Additionally, the glucose consumption rate and ethanol yield indicated that all the yeast used in this study were able to transform glucose into ethanol with similar yield rates (Fig. 4b). Interestingly, the major glucose consumption and ethanol-production rates among the strains occurred in the first 90 h of fermentation, whereas at 168 h of fermentation, the glucose was totally consumed in all the strains and the maximum ethanol yield was reached and corresponded to a concentration of c. 10–11% (v/v) (Fig. 4b). Thus, in this genetic background (*S. cerevisiae* BY4741 strain), no significant differences in ethanol yield between the tested strains were found at the end of the test, suggesting that fermentative capabilities were not affected significantly in the ISC mutants, at least not when 200 g L⁻¹ of glucose was utilized.

When the ROS levels were determined using the general ROS-probe H₂DCFDA in cells harvested during the fermentation assay, the results indicate that in the first 24–72 h of fermentation, when the ethanol concentration was c. 2–7%, the ROS level in the ISC mutant strains were less or similar to WT yeast, showing a moderate fluorescence intensity (500–2000 relative units of fluorescence, RU). In some ISC mutants, the intensity was even lower (Fig. 4c, 24–72 h). Importantly, at 96 h of fermentation, when ethanol accumulated to c. 9%, ROS generation was increased significantly in only the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *aco1Δ* mutants, but at 120 h, this behavior was also observed in the *iba57Δ* mutant. Interestingly, at 144 h of fermentation, the ROS levels increased c. 5-fold (when the concentration of ethanol was c. 10%); ROS generation increased showing a maximal value of fluorescence at c. 15 000–20 000 RU in the *ssq1Δ* and *iba57Δ* mutants, being significantly higher than the WT, except for the *isu1Δ* and *grx5Δ* mutants. These results showed that the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants produced higher ROS levels during fermentation, while *isu1Δ* and *grx5Δ* showed a similar behavior to the WT strain (Fig. 4c). As expected, the control mutants of unrelated genes, *sdh2Δ*, *aco1Δ*, and *cox2Δ*, showed ROS levels similar to WT. Additionally, we observed that at 120–144 h of fermentation (at an ethanol concentration of 9–10%), the WT strain maintained stabilized ROS levels (4000–5000 RU of fluorescence), while in the ISC mutants, ROS levels were increased 2–4-folds (Fig. 4c). These results support the hypothesis that ethanol accumulation during the fermentation process provokes a significant increase in ROS levels, and that this increase is further pronounced by the ISC gene mutations. The ROS increase in cells, when ethanol in the medium accumulated to 9–10%, suggests that ROS are responsible for the fermentation halt,

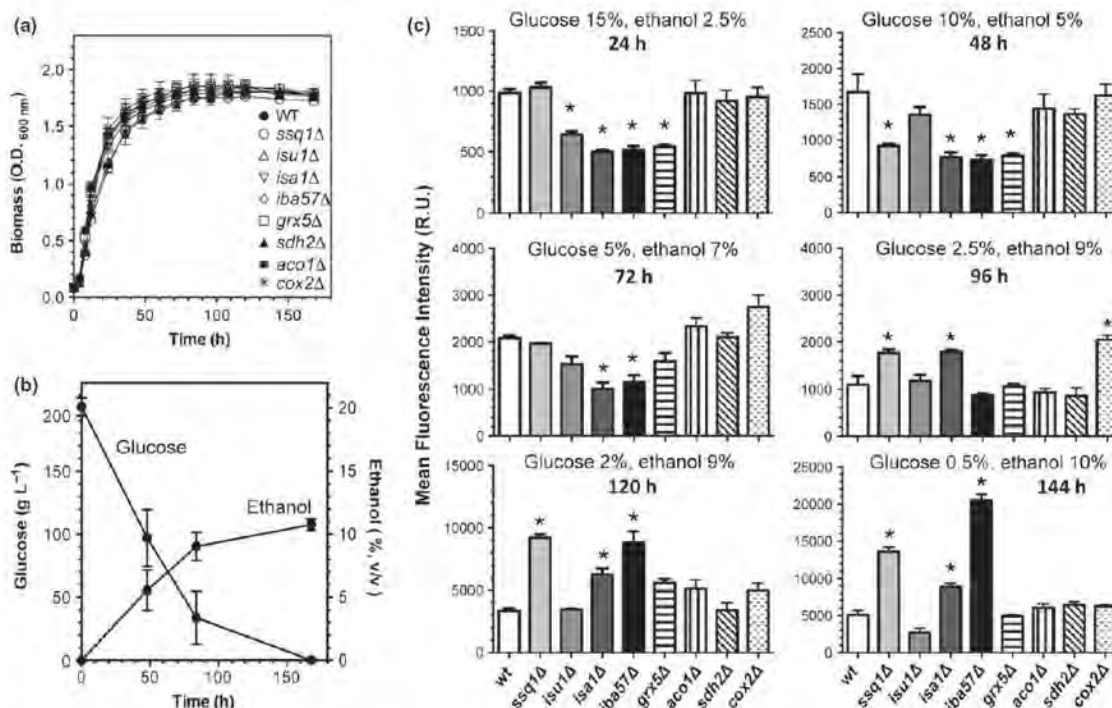


Fig. 4. ROS generation in *Saccharomyces cerevisiae* ISC mutants during a batch fermentation process. Liquid YPD medium (50 mL) supplemented with 200 g L⁻¹ of glucose was inoculated with preculture grown (by 12 h in the same medium), with the initial yeast population being 10×10^6 cells mL⁻¹. Batch fermentations were carried at 30 °C for 168 h. Sugar consumption and ethanol yield were determined by HPLC, and ROS determination by flow cytometry using the H₂DCFDA probe as described in Materials and methods. Results are means of duplicate experiments from two different assays. (a) Biomass was determined by optical density at 600 nm in the yeast cultures. (b) Glucose consumption and ethanol yield were determined in batch fermentations for each yeast strain. Bars correspond to values for the different ISC mutants and only the mean is shown. (c) ROS determination in the batch fermentation medium for each yeast strain. Mean glucose and ethanol content during fermentation time are indicated in each plot. Median intensity of fluorescence is shown as relative units of fluorescence. SEM values are indicated as bars ($n = 3$), two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* was used to compare mutants vs. control, significant differences ($P < 0.05$) with respect to WT are indicated (*).

confirming that the maximal ethanol yield obtained in the fermentation process is dependent on the level of ethanol tolerance of the yeast strain. The findings also suggest that although the ISC assembly system in *S. cerevisiae* is related indirectly to ROS generation also contributes to ethanol yield and susceptibility.

GSH/GSSG balance is disrupted by ethanol treatment

To determine whether the increased ROS generation caused by ethanol treatment or accumulation in the fermentation medium is related to the mechanism of toxicity, two markers of antioxidant defense were measured; the cellular GSH/GSSG ratio and catalase activity. Our results indicated that in cells of the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *grx5Δ*, and *iba57Δ* mutants, without ethanol treatment, GSSG was significantly increased, while the GSH content was

considerably diminished. The GSH/GSSG ratio clearly indicated that these mutants had a glutathione imbalance (Fig. 5). When the yeast cells were treated with ethanol, a similar result was observed for the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *grx5Δ*, and *iba57Δ* mutants; a slight increase in GSSG was observed in cells treated with ethanol (Fig. 5). As it has been reported that the mitochondria is a glutathione reservoir that contributes to cell-ROS scavenging, we determined the GSSG and GSH contents in mitochondria isolated from yeast cells. Our results with isolated mitochondria from yeast cultures grown without ethanol did not show any significant differences in GSSG content, but a decrease in the content of GSH was observed in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants. These data showed that the GSH/GSSG ratio was significantly decreased in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants (Fig. 5). When mitochondria were isolated from yeast cultures treated with ethanol (10% for 3 h) and used for GSH/GSSG

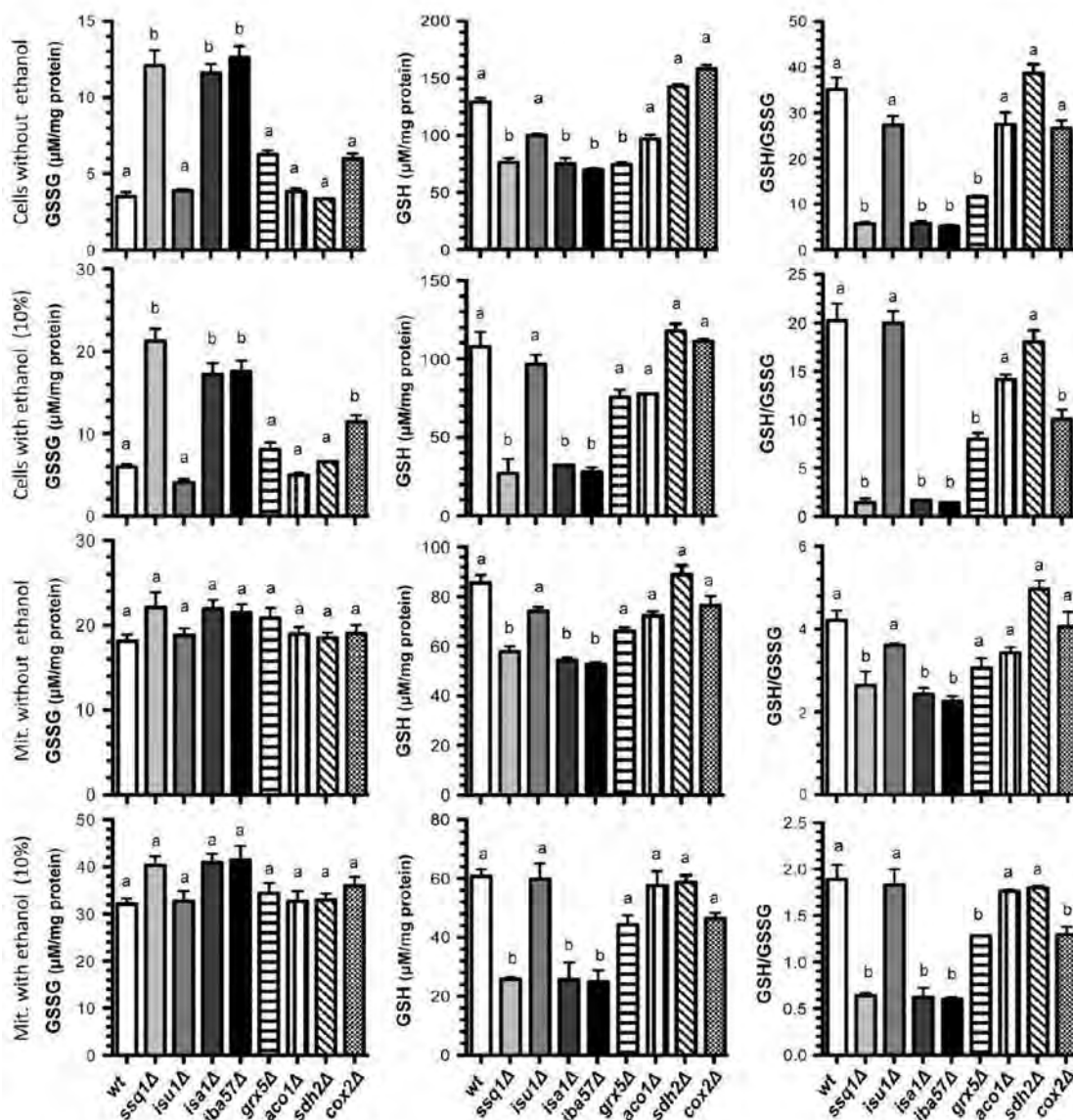


Fig. 5. Glutathione content in the *Saccharomyces cerevisiae* ISC mutants. Yeast cultures were grown in liquid YPD medium without ethanol and harvested in the late exponential growth phase. The GSH/GSSG content was determined in whole cells treated with or without ethanol (10%) at 1 h. Additionally, the cultures treated with or without ethanol (10%) after indicated times (0, 1, 3, and 6 h) of incubation were used for mitochondrial isolation, and finally, the mitochondrial GSH/GSSG ratio was determined as described in Materials and Methods (data corresponds at 3 h treatment are shown). Oxidized glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH), and GSH/GSSG ratio. SEM values are indicated as bars ($n = 3$), one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test was used for comparison, significant differences ($P < 0.05$) with respect to WT are indicated by different letters.

determination, the behavior was similar to mitochondria isolated from cells without ethanol treatment, but the differences observed were higher and significant in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *grx5Δ*, and *iba57Δ* mutants (Fig. 5). Inter-

estingly and as expected, the control mutants *aco1Δ*, *sdh2Δ*, and *cox2Δ* showed similar GSH/GSSG ratios than WT, except for *cox2Δ* under ethanol treatment, these values were similar to those of the *grx5Δ* mutant.

Catalase constitutes one of the main antioxidant defenses in cells; therefore, the activity of this enzyme was measured in yeast cells subjected to ethanol treatment. Our results showed that catalase activity increased significantly in the control mutants *sdh2Δ* and *cox2Δ*, also as in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *grx5Δ*, and *iba57Δ* mutants – except for the *isu1Δ* mutant – with respect to WT yeast or the control strain *aco1Δ* (Fig. 6a). While exposure to ethanol induced a significant increase in catalase activity only in the WT yeast and the *aco1Δ* mutant, catalase activity remained at similar levels in the other ISC mutants, except for the *isu1Δ* mutant (Fig. 6a).

To protect yeast cells against the toxic effects of ethanol (10%), ROS scavengers such as ascorbic acid and GSH were added to the medium. Our findings indicated that these antioxidants were able to protect the WT and the ISC mutants against the toxic effects of ethanol (Fig. 6b). These data also indicated that ethanol exposure is indeed responsible for ROS generation and that this effect is mainly exacerbated in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutations. These results also suggest that ROS production, induced by ethanol, is occurring mainly in the mitochondria, more likely at the ETC level, and that this effect is increased in an additive manner in mutants with a dysfunctional ETC. These results confirm that the mechanism of toxicity of ethanol involves a burst of ROS production, and that this effect may be due to an imbalance of the GSH/GSSG ratio brought about by ethanol treatment. Importantly, the induction of catalase, as well as other cellular antioxidant defenses, was significantly

induced in the WT yeast treated with ethanol, while in the ISC mutants, catalase expression increased in the absence and presence of ethanol.

Ethanol triggers mitochondrial apoptosis

We monitored mitochondrial oxidative damage by measuring cytochrome *c* (Cyt_c) release. Assays of Cyt_c integrity, in yeast monitored in the absence of ethanol, indicated that after 6 h, Cyt_c release (c. 10–20% of the yeast population) occurred in all the mutants. However, when the yeast cultures were treated with ethanol (10%), an increase in Cyt_c release was observed in all strains. Cyt_c release was higher in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants (c. 70% of the yeast population), while for the *isu1Δ* and *grx5Δ* mutants, the effect was similar to the control mutants *aco1Δ*, *sdh2Δ*, and *cox2Δ* (Fig. 7). These findings indicate that exposure of *S. cerevisiae* to toxic concentrations of ethanol triggers a mitochondrial apoptosis response and that this effect is increased in dysfunctional mitochondria, which in this instance could be caused indirectly by a dysfunctional ISC system probably associated with a defective incorporation or recycling of Fe–S clusters.

Discussion

Several genes involved in stress caused by ethanol have been described in *S. cerevisiae* (Marks *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2010).

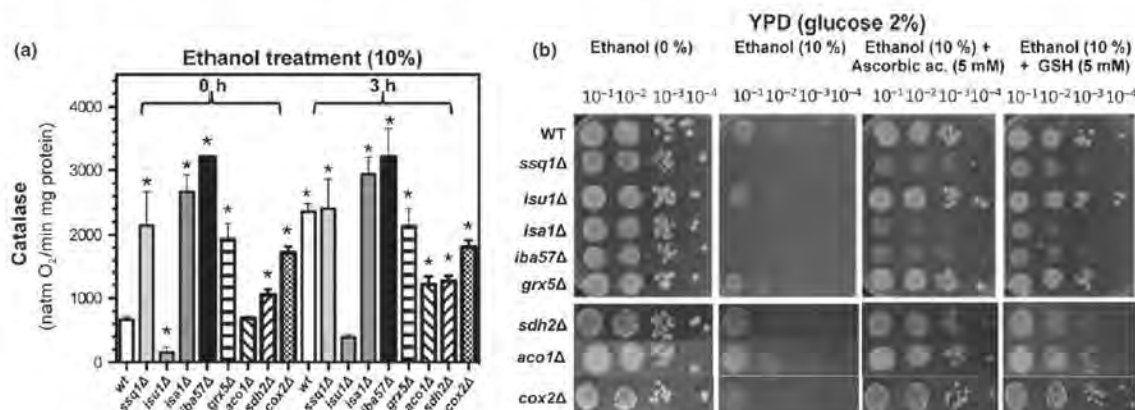


Fig. 6. Catalase activity and effects of scavengers in the *Saccharomyces cerevisiae* ISC mutants. (a) Yeast cultures were grown in liquid YPD medium without ethanol at 30 °C with light shaking, harvested in the late exponential growth phase and treated with or without ethanol (10%) in the same conditions. Yeast cells were harvested at respective times by centrifugation, and catalase activity was determined in yeast suspensions as described in Materials and methods. SEM values are indicated as bars ($n = 3$), one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used for comparison, significant differences ($P < 0.05$) are indicated by (*) with respect to WT (without ethanol treatment). (b) Scavenging effects in yeast cultures exposed to ethanol (10%). Dilutions of yeast suspensions were cultured on YPD agar plates with ethanol at indicated concentrations and the ROS scavengers, ascorbic acid or GSH were supplemented in the medium; sealed plates were incubated at 30 °C for 48 h.

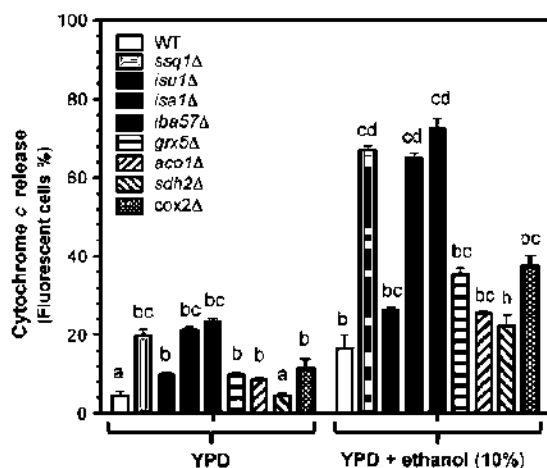


Fig. 7. Cytochrome *c* integrity in *Saccharomyces cerevisiae* ISC mutants. Cytochrome *c* integrity was determined in yeast cultures grown in liquid YPD medium in the late exponential phase treated with or without ethanol (10%). At respective times, permeabilized spheroplasts were obtained for determination of cytochrome *c* integrity as described in Materials and Methods. Fluorescence was determined by flow cytometry using primary anti-cytochrome *c* antibody and rhodamine goat anti-mouse IgG secondary antibody. Results indicate the PFC of the yeast spheroplasts suspensions following treatment with a toxic ethanol concentration of 10% (v/v) for 3 h. Values are the mean of three independent experiments with 20 000 cells counted by flow cytometry per each point. SEM values are indicated as bars, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test was used for comparison; significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters with respect to WT (without ethanol treatment).

These studies have reported changes in the expression of genes related to intracellular organization, biogenesis, and transport processes, as well as changes in vacuole function, ion homeostasis, signaling, lipid metabolism, and energy reserve. In addition, transcriptomic approaches, using wine yeast, have described the participation of several groups of molecular chaperones that are also related to global heat-shock stress responses (Marks et al., 2008). Alternatively, studies of ethanol toxicity have found that ethanol may produce ROS via generation of the radical hydroxyethyl ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}^\bullet$), but the generation of this unstable intermediate is inefficient, and therefore, the compound is expeditiously counteracted by antioxidant cellular mechanisms before it can cause cellular damage (Albano et al., 1996).

Iron metabolism has also been linked to the mechanism of ethanol toxicity. It has been suggested that the ISC system, which is essential for Fe-S cluster biogenesis and recycling, is involved in ethanol tolerance and the preservation of mitochondria functionality (Schilke et al., 1999). The ISC gene-cluster protein products in *S. cerevisiae* carry out their function in the mitochondrial matrix

and are involved in the formation/assembly or repair of Fe-S clusters of numerous apoenzymes (see Lill, 2009; Lill et al., 2012). Specifically, mutations in the bacterial gene *hscA* (Campos-García et al., 2000) or the genes *SSQ1* (Schilke et al., 1999) and *ISA1* (Yoshikawa et al., 2009) in *S. cerevisiae* have been proposed to impair ethanol tolerance and to induce a deficient growth in its presence. Similarly, the gene *GRX5* has been related to protection against oxidative damage (Rodríguez Manzanique et al., 1999). Therefore, we investigated the mechanism of toxicity caused by ethanol and the involvement of the protein components implicated in mitochondrial Fe-S assembly.

Ethanol treatment during dose-response growth and survival assays showed that the *S. cerevisiae* mutants *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* were impaired in their growth ($\text{IC}_{50\text{EtOH}}$ c. 15–20% lower) and survival (less than 50% survival) as compared to control WT yeast. However, this phenomenon was observed in lesser proportion in the *isa1Δ* or *grx5Δ* mutants (Fig. 1). These results suggest that the *SSQ1*, *ISA1*, and *IBA57* gene products may be correlated with ethanol tolerance level in *S. cerevisiae*. The minimal effects in *isa1Δ* and *grx5Δ* mutants suggest that complementation of their function may take place by their paralog genes, being not essential for the ISC assembly system.

Based on these results, and using other known ROS generators such as acetaldehyde (data not shown), it was concluded that the growth of *S. cerevisiae* ISC mutants is clearly impaired (Fig. 2). The mechanism of ethanol toxicity may be related to the ROS generation promoted by its metabolite acetaldehyde, which has been described as a strong ROS generator (Novitskiy et al., 2006). This finding suggests that the ISC gene cluster indirectly contributes to both ROS-generating compounds and ethanol toxicity. Thus, the main mechanism of ethanol toxicity may be mediated by ROS generation as proposed previously (Kitagaki et al., 2007; Farrugia & Balzan, 2012).

Using three different and selective fluorescent probes for intracellular ROS determination, we showed that ROS were increased with or without ethanol treatment in the *S. cerevisiae* ISC mutant strains. Interestingly, higher fluorescence values were observed in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *grx5Δ*, and *iba57Δ* mutants (Figs 3 and S1). These results confirm that ROS generation by the mitochondrial ECT is dependent on the functionality of the ISC assembly system, because ROS levels were exacerbated under ethanol treatment. In addition, the findings indicate that the main ROS species generated during ethanol treatment were hydrogen peroxide and superoxide (although hydroxyl ions, not specifically measured in the study, may play an important role as well). The results also indicate that ROS are generated and accumulated at the mitochondrial

level and are increased in an additive manner in the *SSQ1*, *ISA1*, *GRX5*, and *IBA57* mutants by the presence of ethanol. In addition, it has been reported that when the ETC is dysfunctional, ROS generation increases (Kitagaki *et al.*, 2007). In this context, the mutants *sdh2Δ* and *cox2Δ*, deficient in complex II and IV of the ETC, respectively, their ROS levels were lower than those observed in the *ISC* mutants. Additionally, the complex III of the ETC has been described as an important cellular component in superoxide generation by electron leakage. In the mutant *cox2Δ*, blocked in the complex IV, an increase in superoxide generation would be expected. Interestingly, in the *ISC* mutants, the superoxide generation was superior to that observed in the *cox2Δ* mutant, contrary to what was anticipated. Our results demonstrated that when the ETC is blocked (petite mutations), an increment in ROS levels occurred, which was more exacerbated in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants, than in the *sdh2Δ* and *cox2Δ* strains. These results indicate that in the *ISC* mutants, dysfunction in the ETC produces an increase in ROS which is exacerbated by ethanol accumulation, and this phenomena may be caused by defective incorporation of [2Fe-2S] or [4Fe-4S] clusters in the mutants, rather than by ETC blocking. The failure of the cellular antioxidant responses to efficiently neutralize the ROS generated may be lethal for the yeast cell.

Successful conversion of glucose to ethanol during fermentation depends mainly on the yeast's ability to counteract the stress factors during the process. Ethanol accumulation during fermentation has been described as one of the main stressors, affecting the viability and fermentative capabilities of yeast, provoking a halt of the fermentation process and a reduction in ethanol yield. Although *S. cerevisiae* has inherent ethanol tolerance, the selection of yeast strains with superior ethanol tolerance levels is an important goal of the ethanol-production industry (Endo *et al.*, 2008; Marks *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2010). The findings of this study indicate that the addition or accumulation of a toxic ethanol concentration (10%) provokes a ROS burst mainly at the mitochondria level and this increase in ROS is exacerbated by dysfunction of the ISC assembly system. Therefore, the generation of ROS during the fermentation process and the effects of the mutations in the *ISC* genes on the generation of ROS were evaluated. We carried out real time ROS determination in yeast cultures during fermentation assays, using a concentration of sugar sufficient to generate a toxic level of ethanol (over 10% v/v). We have previously determined that sugar concentrations in the range 240–280 g L⁻¹ cause an arrest in ethanol production at c. 10–11% in the *S. cerevisiae* strain BY4741 and thus hypothesized that for the *S. cerevisiae* BY4741 strain, the

limit of ethanol yield may be limited by the level of ethanol tolerance of the strain. Our findings indicate that all the yeast strains tested were able to grow efficiently in YPD supplemented with 200 g L⁻¹ of glucose, and that the rate of glucose consumption and ethanol yield was similar in the mutants. Interestingly, at 168 h of fermentation, the glucose was totally consumed in all strains and the maximal ethanol yield was reached, corresponding to c. 10–11% (v/v) (Fig. 4a–b), suggesting that the fermentative capabilities of the *ISC* mutants were not significantly affected. The ROS levels determined during the fermentation assay, using the general ROS probe H₂DCFDA, indicate that in the first 24–72 h of fermentation, when the ethanol concentration was c. 2–7%, the ROS levels in the *ISC* mutants were lower or similar to WT, suggesting that the ROS generated are counteracted by the antioxidant cellular responses (Fig. 4c). Interestingly, at 96–144 h of fermentation, when ethanol was c. 9–10%, ROS generation was significantly increased in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants. At 144 h of fermentation (ethanol yield 10–11%), the maximal ROS generation was reached in the yeast cultures, the ROS levels were significantly higher in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants, and as expected, the control mutants *aro1Δ*, *sdh2Δ*, and *cox2Δ* had ROS levels similar to WT. We observed that between 24–144 h of fermentation, the WT yeast and control mutants maintain low levels of ROS (1000–4000 RU of fluorescence), but in the *ssq1Δ* and *iba57Δ* mutants, the ROS levels were around 5 fold higher than those of the WT (Fig. 4c). These results support the hypothesis that ethanol accumulation during the fermentation process provokes a significant increase in ROS levels, which is more pronounced in the *ISC* gene mutants. The ROS increase in the fermentation medium, when ethanol accumulated to 9–10%, suggests that it is responsible for the fermentation halt, confirming that the maximal ethanol yield obtained in the fermentation process is dependent on the level of ethanol tolerance of the yeast strain. The findings also suggest that although the ISC assembly system in *S. cerevisiae* is indirectly related with ROS generation, it also indirectly contributes with ethanol yield and susceptibility.

Glutathione is considered one of the most important cell antioxidants and exists in reduced (GSH) or oxidized (GSSG) states (Farrugia & Balzan, 2012). Glutathione has an important role in detoxifying reactions such as scavenging cellular hydrogen peroxide. Glutathione is predominantly reduced under normal physiologic conditions due to the action of NADPH-dependent GSSG reductase. However, under some conditions, a moderate level of oxidative stress occurs, causing a decrease in GSH and an increase in GSSG, modifying the GSH/GSSG ratio (Drakulic *et al.*, 2005). Under severe oxidative stress, the

ability of the cell to reduce GSSG to GSH may be overloaded, leading to an accumulation of GSSG. Therefore, mitochondrial GSH depletion leads to increased levels of ROS and mitochondrial dysfunction (Farrugia & Balzan, 2012). The results obtained from our glutathione content measurements indicated that the GSSG content was significantly increased, while that GSH decreased, and that the GSH/GSSG ratio decreased at both the cellular and mitochondrial levels in the ISC mutants (*ssq1Δ*, *isa1Δ*, *grx5Δ*, and *iba57Δ*), which is consistent with the oxidative stress observed under ethanol treatment (Fig. 5).

In yeast cells, the excess of ROS is removed to restore the redox balance. ROS induce both mitochondrial and cytosolic superoxide dismutase, which scavenges superoxide to convert it to H_2O_2 , which can be detoxified by cytosolic and peroxisomal catalases (Drakulic *et al.*, 2005; Farrugia & Balzan, 2012). Catalase activity is up-regulated during oxidative stress as an antioxidant response to counteract the hydrogen peroxide increase. The activity of the antioxidant enzyme catalase in yeast was measured to confirm the cellular oxidative stress status. The activity assays showed that catalase activity was increased in WT yeast when treated with ethanol (Fig. 6a). Interestingly, ISC mutants showed increased catalase activity both with and without ethanol treatment. This result suggests that deletion of the ISC genes promotes a sustained increase in ROS generation, which in turn induces catalase expression, confirming that H_2O_2 is produced by the toxicity mechanism of ethanol. Importantly, according to our data, after prolonged exposure to ethanol (6 h at 10% ethanol, data not shown), the increase in oxidative stress and depletion of antioxidants may cause the inactivation of catalase (indicating that this enzyme is susceptible to ROS) and affects the yeast mitochondrial target proteins, α -ketoglutarate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, and the iron-sulfur [4Fe-4S] enzymes aconitase and succinate dehydrogenase (Farrugia & Balzan, 2012). Additionally, the toxicity in yeast cultures exposed to ethanol was counteracted by the addition of ROS scavengers such as ascorbic acid and GSH, confirming that the toxicity of ethanol was due to ROS generation and that the ROS level is dependent on the ISC system integrity and the antioxidant response.

The depletion of GSH in the mitochondria may lead to mitochondrial dysfunction and this organelle has also been described as an important trigger of the apoptotic pathway (Drakulic *et al.*, 2005; Farrugia & Balzan, 2012). During conditions of mitochondrial dysfunction, the fragmentation and release of mitochondrial factors are widely accepted as the initiating events in the apoptotic pathway. Factors activating caspase-dependent pathways include the cytochrome *c* of the electron transport chain, which plays an essential role in mitochondria-dependent

apoptotic death. The release of cytochrome *c* has been described in *S. cerevisiae* as an indication that the ROS produced by ethanol treatment induce mitochondrial-dependent apoptosis; however, those experiments were assayed under extremely high ethanol concentrations (21% and 23%) (Kitagaki *et al.*, 2007). In agreement with those results, in the present study, the cytochrome *c* release occurred at 10% ethanol after 3–6 h of treatment (conditions that commonly occur during fermentation processes). The release of cytochrome *c* was exacerbated in the ISC mutants, indicating that an apoptotic response occurs following ethanol and ROS accumulation, affecting the viability and survival of the yeast.

In conclusion, our results indicate that the mechanism of ethanol toxicity includes a generalized increase in oxidative stress, in agreement with ethanol accumulation during batch fermentation, and that hydrogen peroxide and superoxide are the main ROS generated. Consequently, this oxidative burst disrupts the antioxidant defense of glutathione at the cellular and mitochondrial levels and promotes an increase in catalase activity. Due to the overwhelmed antioxidant system of the cell, the oxidative stress causes inactivation/denaturation of proteins such as cytochrome *c*, triggering a mitochondrial apoptotic response. Interestingly, the ROS increase in mitochondria was dependent on the functionality of the ISC system, rather than on the ETC blocking, which in this instance could be associated with a defective incorporation or recycling of Fe-S clusters in recipient apoproteins, which in consequence affects the ethanol susceptibility in *S. cerevisiae*. These findings presented in this study contribute to the understanding of the mechanisms of ethanol toxicity and demonstrate the important role of proteins involved in Fe-S prosthetic group assembly in the mechanisms of ROS generation and consequently in ethanol tolerance. Future studies will focus on the contribution of Fe released from Fe-S-containing proteins and Fe recycling dependent on the ISC system on ROS generation via the Fenton reaction and the effects on mitochondrial integrity and functionality.

Acknowledgements

We thank Drs G. Del Rio and L. Ongay from Instituto de Fisiología Celular/UNAM for yeast strains donation. This research was funded by CONACYT (106567), FOMIX-C01-117130, and C.I.C. 2.14/UMSNH grants.

References

- Albano E, Clot P, Morimoto M, Tomasi A, Ingelman-Sundberg M & French SW (1996) Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl

- free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology* **23**: 155–163.
- Auchere F, Santos R, Plarante S, Lesuisse E & Camadro JM (2008) Glutathione-dependent redox status of frataxin-deficient cells in a yeast model of Friedreich's ataxia. *Human Mol Gen* **17**: 2790–2802.
- Campos-García J, Ordóñez LG & Soberón-Chávez G (2000) The *Pseudomonas aeruginosa hscA* gene encodes Hsc66, a DnaK homologue. *Microbiology* **146**: 1429–1435.
- Chi Z & Arneborg N (1999) Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* **86**: 1047–1052.
- Corte L & Zara V (2011) The Rieske Iron-Sulfur Protein: import and assembly into the Cytochrome bc(1) complex of yeast mitochondria. *Bioinorg Chem Appl* **2011**: 363941. DOI: 10.1155/2011/363941.
- Costa V, Amorim MA, Reis E, Quintanilha A & Moradas-Ferreira P (1997) Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143**: 1649–1656.
- Drakulic T, Temple MD, Guido R, Jarolim S, Breitenbach M, Attfield PV & Dawes IW (2005) Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* **278**: 1215–1228.
- Du X & Takagi H (2007) N-Acetyltransferase Mpt1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**: 1343–1351.
- Dutkiewicz R, Schilke B, Kniesner H, Walter W, Craig EA & Marszałek J (2003) Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J Biol Chem* **278**: 29719–29727.
- Endo A, Nakamura T, Ando A, Tokuyasu K & Shima J (2008) Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* **1**: 3.
- Parrugia G & Balzan R (2012) Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol* **2**: 64.
- Hoff KG, Silberg JJ & Vickery LB (2000) Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *P Natl Acad Sci USA* **97**: 7790–7795.
- Kitagaki H, Araki Y, Funato K & Shimoi H (2007) Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett* **581**: 2935–2942.
- Lewis JA, Elkon IM, McGee MA, Higbee AJ & Gasch AP (2010) Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. *Genetics* **186**: 1197–1205.
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831–838.
- Lill R & Muhlenhoff U (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 457–486.
- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Weber H, Wilbrecht C & Muhlenhoff U (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1491–1508.
- López-Alvarez A, Díaz-Pérez AI, Sosa-Aguirre C, Macías-Rodríguez L & Campos-García J (2012) Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *J Biosci Bioeng* **113**: 614–618.
- Ma M & Liu ZL (2010) Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 829–845.
- Madeo F, Fröhlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH & Fröhlich KU (1999) Oxygen Stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **145**: 757–767.
- Marks VD, Ho Sui SI, Erasmus D, van der Merwe GK, Brumm J, Wasserman WW, Bryan J & van Vuuren HJ (2008) Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Res* **8**: 35–52.
- Muhlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ & Lill R (2011) Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol Chem* **286**: 41205–41216.
- Ng H, Smith DJ & Nagley P (2012) Application of flow cytometry to determine differential redistribution of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria during cell death signaling. *PLoS ONE* **7**: e42298.
- Novitskiy G, Traore K, Wang L, Trush MA & Mezey E (2006) Effects of ethanol and acetaldehyde on reactive oxygen species production in rat hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* **30**: 1429–1435.
- Rodríguez-Manzanique MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A & Herrero E (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8180–8190.
- Rodríguez-Manzanique MT, Tamarit J, Belli G, Ros J & Herrero E (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**: 1109–1121.
- Schilke B, Voisine C, Beinert H & Craig E (1999) Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *P Natl Acad Sci USA* **96**: 10206–10211.
- Schilke B, Williams B, Kniesner H, Puksza S, D'Silva P, Craig EA & Marszałek J (2006) Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. *Curr Biol* **16**: 1660–1665.
- Shalk IH & Mehvar R (2006) Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking

- reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. *Anal Bioanal Chem* 385: 105–113.
- Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ & Stanley GA (2010) The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 109: 13–24.
- Strober W (1997) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 21: A.3B.1–A.3B.2.
- Teixeira MC, Raposo LR, Mira NP, Lourenço AB & Sá-Correia I (2009) Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol* 75: 5761–5772.
- Yoshikawa K, Tanaka T, Furusawa C, Nagahisa K, Hirasawa T & Shimizu H (2009) Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 9: 32–44.
- Zigman S, Schultz JB & Schultz M (1998) Measurement of oxygen production by *in vitro* human and animal lenses with an oxygen electrode. *Curr Eye Res* 17: 115–119.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. ROS generation in the *S. cerevisiae* ISC mutants in the presence of ethanol.

4.2.- CAPITULO 2

Manuscrito enviado a la revista PLOS ONE

Malfunctioning assembly of the iron–sulfur cluster machinery in *Saccharomyces cerevisiae* impedes respiratory function and increases sensitivity to ethanol and reactive oxygen species by an iron-dependent mechanism

Malfunctioning assembly of the iron–sulfur cluster machinery in *Saccharomyces cerevisiae* impedes respiratory function and increases sensitivity to ethanol and reactive oxygen species by an iron-dependent mechanism

Rocío V. Pérez-Gallardo¹, Mauricio Gomez¹, Luis A. Sánchez¹, Alma L. Díaz-Pérez¹, Victor Meza Carmen¹, Alfredo Saavedra-Molina², Christian Cortes-Rojo², Javier Lara-Romero³, Sergio Jiménez-Sandoval⁴, José S. Rodríguez-Zavala⁵, and Jesús Campos-García^{1*}.

¹Lab. de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, ²Lab. Bioquímica, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, ³Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México. ⁴Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Querétaro, Qro., México. ⁵Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México, D.F., México.

Short title: The *ISC* mutation effect over respiratory chain function

*Corresponding author: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B-3, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México. Phone/Fax: (52) 443 3265788. E-mail: jcgarcia@umich.mx.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondria, iron–sulfur cluster, oxidative stress, iron homeostasis, respiratory chain.

Abstract

Biogenesis and recycling of the iron–sulfur (Fe–S) clusters plays an important role in iron homeostasis mechanisms involved in mitochondrial function. In *Saccharomyces cerevisiae*, the Fe–S clusters are assembled into Fe–S-containing proteins by the iron–sulfur cluster machinery (ISC). The present study aimed to determine the effects of mutations in the ISC

genes and iron release under oxidative stress on mitochondrial functionality in *S. cerevisiae*. Reactive oxygen species (ROS) generation caused by ethanol, H₂O₂, or menadione was associated with a loss of iron homeostasis and exacerbated by ISC system dysfunction. *ISC* mutants showed increased free Fe²⁺ content, exacerbated by ROS-generator compounds, causing an increase in ROS, which was decreased by the addition of iron chelator phenanthroline. In addition, the activity of complexes II and IV from the electron transport chain (ETC) was impaired or totally abolished in the *ISC* mutants; however, increased oxygen generation was observed. Our study suggests that the free Fe²⁺ content originates mainly from mitochondrial Fe-S cluster apoproteins, under conditions of oxidative stress. Interestingly, in mitochondria from *ISA1* and *IBA57* mutants, the content of [4Fe-4S] and [2Fe-2S] centers was decreased, as was respiratory supercomplex III₂IV₂ formation. These results suggest that the *Isa1/Iba57* proteins, which are considered [4Fe-4S]-cluster donators, are also involved in assembly of the supercomplexes III₂IV₂ and III₂IV₁, thus affecting the functionality of complexes II and IV of the respiratory chain.

Introduction

The iron-sulfur centers (Fe-S) are prosthetic groups in many prokaryote and eukaryote enzymes with redox, catalytic, and regulatory functions. These centers are assembled by the iron-sulfur cluster assembly system (ISC), which has been extensively studied and is known to be involved in the incorporation of the Fe-S centers into apoproteins in both bacteria and eukaryotes [1-5]. In eukaryotes, two main systems of Fe-S-protein biogenesis have been described, the cytosol/nucleus (CIA) and mitochondrial (ISC) machineries. Functionally, the CIA machinery depends on the mitochondrial ISC machinery [6-7]. The ISC assembly machinery for maturation of all cellular Fe-S dependent-proteins (mitochondrial, cytosolic, and nuclear) is also involved in iron homeostasis in prokaryotes and eukaryotes [5,7]. In *Saccharomyces cerevisiae*, the mitochondrial ISC machinery is encoded by the genes *NFS1*, *ISU1*, *ISU2*, *ISA1*, *ISA2*, *JAC1*, *SSQ1*, *YAH1*, *GRX5*, and *IBA57* [5,8]. In yeast, the Ssq1 chaperone and the Jac1 J-protein (co-chaperone) function together to assist in the biogenesis of Fe-S centers of Fe-S-dependent proteins. The Fe-S cluster assembly in mitochondria is initiated by cysteine desulfurase (Nfs-Isd11), which

obtains a sulfur group from a cysteine and transfers it to the scaffold proteins Isu1 and its redundant Isu2 protein, assisted by Yah1. This interaction also involves frataxin (Yfh1), which acts as an iron donor or activity regulator. ATPase activity in the Ssq1 chaperone is stimulated by the J-type co-chaperone, Jac1, during the interaction with the scaffold protein Isu1/Isu2 [5-7]. The protein Isu1 is a substrate for both Ssq1 and Jac1, and Jac1 and Isu1 cooperatively stimulate the ATPase activity of Ssq1 [3]. The subsequent cluster transference to recipient apoproteins is assisted by glutaredoxin (Grx5) [5,9].

Recently, the participation of the proteins Isa1 and Isa2 in the maturation of mitochondrial apoproteins containing 4Fe-4S clusters such as aconitase, homoaconitase, and lipoic acid synthase was described in *S. cerevisiae*; this activity is mediated by physical interaction with the Iba57 assembly-protein [5,10-12]. In contrast, Isa1/Isa2 proteins are dispensable for the generation of mitochondrial [2Fe-2S] and cytosolic [4Fe-4S] proteins because, although the Isa1 and Isa2 proteins are able to bind iron, these are not used as donors for *de novo* assembly of the [2Fe-2S] cluster on the general Fe-S scaffold proteins, Isu1/Isu2 [5]. Upon depletion of the ISC assembly factor Iba57, which specifically interacts with Isa1 and Isa2, or in the absence of the major mitochondrial [4Fe-4S] protein aconitase, iron is accumulated on the Isa proteins. These results suggest that the iron bound to the Isa proteins is required for the *de novo* synthesis of [4Fe-4S] clusters in mitochondria and for their insertion into apoproteins in a reaction mediated by Iba57. Taken together, these findings define Isa1/Isa2 and Iba57 as a specialized, late-acting ISC assembly subsystem that is specifically dedicated to the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins [12].

Iron handling by mitochondria during ISC biogenesis must be tightly controlled to avoid a deleterious increase in the concentration of free iron. Ferrous (Fe^{2+}) and ferric (Fe^{3+}) iron catalyzes the formation of the highly reactive hydroxyl radical ($\text{OH}^{\bullet}$) in the presence of H_2O_2 and $\text{O}_2^{\bullet -}$ species through the Haber-Weiss cycle. In mitochondria, these ROS are physiologically produced as by-products of electron transport chain (ETC) activity. Thus, uncontrolled mitochondrial iron homeostasis causes oxidative damage in DNA, lipids, and proteins via the generation of ROS, which in turn further impairs the function of the ETC and leads to cell death [13].

During the dysfunction of the ISC biogenesis system, accumulation of toxic amounts of iron in the mitochondrial matrix occurs due to upregulation of iron transport systems via the activation of the Aft1 transcription factor [14]. The relevance of impaired ISC biogenesis in mitochondrial iron overload and ETC dysfunction is reflected in human diseases like Friedreich's ataxia, sideroblastic anemia, and ISCU myopathy, whose development has been associated with defects in human genes coding for proteins involved in ISC biogenesis, such as Frataxin, Glrx5, and Iscu, respectively [15]. In this regard, yeast has been a powerful tool to elucidate key molecular aspects of the pathogenesis of these diseases because several steps of ISC biogenesis and recycling are conserved between yeast and higher eukaryotes [16].

However, we have recently demonstrated that the deletion of genetic components of the mitochondrial ISC assembly machinery in *S. cerevisiae* exacerbates ethanol toxicity via increased ROS generation, provoking depletion of the antioxidant response and leading to apoptosis [17]. Given the central role of mitochondria in iron handling, the role of free iron from Fe-S-containing proteins in ROS production, and the fact that ethanol increases mitochondrial ROS generation, it can be hypothesized that excessive free iron exacerbates the toxicity of ethanol in mitochondria by disrupting the functionality of the ETC. To test this hypothesis, we have analyzed the relationship between the amount of mitochondrial free iron and the levels of ROS generated by stressors and their effect on respiratory chain functionality in a battery of ISC mutants.

Materials and Methods

Yeast strains, growth conditions, and survival tests

The haploid *S. cerevisiae* BY4741 (Mat a, *his3* Δ , *leu2* Δ 0, *met15* Δ 0, *ura3* Δ 0) and its *KanMX4* interruption gene mutants, *ssq1* Δ , *grx5* Δ , *isa1* Δ , *iba57* Δ , and *rip1* Δ were obtained from Open Biosystems. Tubes or flasks were prepared with 10 or 50 mL of yeast extract peptone dextrose (YPD) culture medium and stressor (H₂O₂, menadione, or ethanol from Sigma) was added at the indicated concentrations. Culture medium was inoculated with overnight yeast cultures that had reached an optical density of 0.1 at 600 nm (OD_{600 nm}) and

incubated at 30°C with low-speed shaking (50 rpm). Yeast growth (biomass) was monitored at OD_{600 nm}.

A yeast survival test was carried out in yeast cultures grown on liquid YPD medium, collected in the late exponential growth phase and after adding ethanol 10% (v/v) and 1, 10-phenanthroline 20 mM (Sigma), incubating at 30°C with low-speed shaking (50 rpm). Cell survival was determined by counting colony-forming units (CFU) in YPD plates, incubated at 30°C.

Real-time quantification of ROS in *S. cerevisiae* cultures

Intracellular ROS in yeast cultures or cell suspensions were determined using oxidant-sensitive, cell-permeant fluorescent probes and fluorescence was quantified by flow cytometry [17]. For mitochondrial total ROS determination (mit-ROS), yeast suspensions were incubated with 5 µg mL⁻¹ of dihydrorhodamine 123 (DHR123; Sigma) and for superoxide (O₂^{•-}) determination, yeast were incubated with 5 µg mL⁻¹ dihydroethidium (DHE, Molecular Probes, Invitrogen). Cell cultures were grown to the late exponential phase, samples (100 µL) were loaded with the appropriate fluorescent probe (DHR123 or DHE) and incubated at 30°C for 2 h in the dark. Then, yeast cell samples were taken to 1 mL with PBS buffer (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄·2 H₂O 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, at pH 7.4) and the fluorescence was immediately quantified by flow cytometry using a BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences). The populations of cells for each of the treatments were gated in the forward scatter and side scatter dot plots to eliminate dead cells and cell debris. Populations corresponding to auto- or basal-fluorescence were located in the left quadrant and cells with emission of fluorescence increased at least one log unit value were located in the right quadrant of the dot plots. In addition, the percentage of fluorescent cells (PFC) and the median fluorescence intensity (FI) were determined in the monoparametric histograms of fluorescence emission obtained from the dot plots and labeled as percentage of cells and as relative units of fluorescence. The equipment was calibrated using Spherotech 8-peak (FL1-FL3) and 6-peak (FL-4) validation beads (BD Accuri). Fluorescence of the DHR123 probe was monitored in the emission fluorescence

channel FL1 (533/30 nm), and for the DHE probe, in the FL2 channel (587/40 nm). A minimum of 20,000 cellular events were analyzed for each determination point. For stressor treatments and Fe^{2+} dose-response assays, yeast cultures grown on YPD medium (10 mL) were added with the respective concentrations of ROS-generator compounds or Fe^{2+} solution [$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)$ with an equimolar amount of citric acid, Sigma] and at the respective times, samples (100 μL) were harvested, washed and suspended in PBS, adjusting the volume to 1 mL or 1×10^7 cells mL^{-1} . The cells were loaded with the fluorescent probes by incubating for 2 h, and fluorescence was determined by flow cytometry.

Real-time quantification of Fe^{2+}

Iron in the yeast suspensions was determined using the fluorescent, cell-permeable indicator for heavy metals Phen green FL (PGFL; Molecular Probes, Invitrogen), which can be used to detect a broad range of ions, including Cu^{2+} , Cu^+ , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , and Ni^{2+} . Fluorescence intensity of PGFL disappears after it binds with labile Fe^{2+} . Therefore, once cells were charged with the probe, labile Fe^{2+} was detected by the addition of 1 mM of the chelator 1,10-Phenanthroline (Invitrogen). This treatment leads to PGFL-Fe chelate dissociation, thus producing fluorescence [18]. Yeast cells suspensions (1×10^7 cells/mL) were charged with PGFL (5 $\mu\text{g/mL}$) and incubated at 30°C for 2 h in darkness. Yeast cells were harvested, washed once, and re-suspended in PBS. Fe^{2+} quantification in yeast suspensions was determined without and with ROS-generator treatment by fluorescence generation quantified by flow cytometry monitoring of the emission fluorescence channel FL1 (533/30 nm).

Mitochondria isolation

For activity determination of mitochondrial complexes, mitochondria of *S. cerevisiae* were isolated from cultures grown in liquid medium YPD at 30°C in a shaking incubator, using a previously described method [19], with the exception that Lyticase from *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich) was used instead of zymolyase. For the Raman assay, cells were harvested in late exponential growth phase by centrifugation at $2,750 \times g$ for 15 min at 4°C

and washed thrice using distilled water and suspended in digestion solution (sorbitol 1.2 M, EGTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, DTT 10 mM, at pH 7.5); Lyticase was added at 2 mg g⁻¹ cells by fresh weight for spheroplast generation. Yeast suspensions were incubated for 60 min at 30°C. Spheroplasts were washed twice with spheroplast washing buffer (sorbitol 1.2 M, EGTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, DTT 10 mM, at pH 7.5). Spheroplasts were suspended in a homogenizing buffer (sorbitol 0.6 M, HEPES-KOH 20 mM, DTT 10 mM, at pH 7.4) and lysed in a Potter-Elvehjem pestle and glass tube and washed thrice with the same buffer. The unruptured cells were removed by centrifugation at $2,500 \times g$ for 10 min at 4°C, and yeast mitochondria were harvested from the supernatant by centrifugation at $9,600 \times g$ for 10 min at 4°C and suspended in homogenizing buffer.

Determination of *in situ* mitochondrial oxygen consumption rate

Cells (25 mg wet weight) of *S. cerevisiae* were placed in 2.5 mL of MES-TEA buffer (pH 6.0) in a sealed glass chamber with constant stirring. The oxygen consumption rate (OCR) was measured with a Clark-type oxygen electrode coupled to a biological oxygen monitor (YSI 5300). Basal oxygen consumption (state 4) was induced by adding 20 mM glucose as a substrate, and 3 min later, 5 μ M of the uncoupling agent carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) was added to stimulate maximal OCR (uncoupled (U) state). To discriminate the mitochondrial oxygen consumption from unspecific-cytosolic oxygen utilization, the mitochondrial ETC was inhibited with 1 μ g antimycin A and a further addition of 0.5 mM KCN [20].

Activity determination of the ETC complexes

Mitochondria detergent-solubilization for determination of ETC activities was carried out by mixing 250 μ L of intact mitochondrion (10 mg of protein) plus 750 μ L of hypotonic buffer (KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, Tris-base 10 mM, pH 7.5, and triton X-100 10 μ L) with vigorous shaking in a vortex for 15 sec. This solution was centrifuged at $18,600 \times g$ for 15 min at 4°C. Supernatants were discarded and the pellets suspended in buffer composed of KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.6, and protein was quantified by the Biuret method.

These permeabilized mitochondria suspensions were used to determine the activity of the ETC complexes, as described below.

Determination of complex II activity: The activity of complex II was evaluated by measuring the succinate-DCIP oxidoreductase activity of solubilized mitochondria [19]. The reaction mix contained 0.1 mg/mL permeabilized mitochondria, 1 μ g antimycin A and 0.75 mM KCN in a final volume of 1 mL KH_2PO_4 buffer (pH 7.6). After 5 min of incubation with ETC inhibitors, the determination was started by adding 80 μ M 2,6 dichlorophenolindophenol (DCIP) and basal absorbance at 600 nm was determined for 1 min. Then, the reaction was started by adding 10 mM sodium succinate and the changes in absorbance were further followed for 5 min. The rate of DCIP reduction was calculated from the slopes of the absorbance plots using a molar extinction coefficient for DCIP of 21 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Determination of complex III activity: This activity was estimated by measuring the activity of antimycin A-sensitive succinate-cytochrome *c* oxidoreductase, which is representative of complex III activity, using endogenous ubiquinol-6 as substrate. Solubilized mitochondria (0.1 mg/mL) were resuspended in 50 mM KH_2PO_4 buffer (pH 7.6) and incubated for 5 min with 0.75 μ M KCN. Then, 1.5 mg oxidized cytochrome *c* was added and basal absorbance was recorded at 550 nm. After 1 min, 10 mM succinate was added, and the reduction of cytochrome *c* was recorded for 3 min. The reaction was stopped by adding antimycin A (1 μ g). The rate of cytochrome *c* reduction was determined from the slopes of the absorbance plots, using a molar extinction coefficient for cytochrome *c* of 19.1 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [19]. Alternatively, complex III activity was measured with 10 mM glycerol, instead of succinate, to bypass electron transfer at complex II and eliminate the possibility that impaired electron transfer at complex II would mask defects in electron transfer at complex III.

Determination of the complex IV activity: Cytochrome *c* oxidase activity was measured in 0.1 mg/mL solubilized mitochondria suspended in 50 mM KH_2PO_4 buffer (pH 7.6), incubated for 5 min with 1 μ g antimycin A. The reaction was started by adding dithionite-reduced cytochrome *c* (250 μ g) and the changes in the absorbance at 550 nm were

followed during 1 min. The reaction was stopped with 0.75 mM KCN. The rate of cytochrome *c* oxidation was determined from the slope of the absorbance plots using a molar extinction coefficient for cytochrome *c* of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [19].

Determination of lactate-cytochrome c oxidoreductase: This activity was measured in 1 mg/mL freeze-thawed mitochondria resuspended in 50 mM KH_2PO_4 buffer and incubated for 5 min with 0.75 μM KCN. Basal absorbance during 1 min was registered, and then the reaction was started by adding 10 mM D-lactic acid and changes in the absorbance were followed for 5 min. The rate of cytochrome *c* reduction was determined from the slopes of the absorbance plots using a molar extinction coefficient for cytochrome *c* of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determination of *cis*-aconitase activity in yeast cells

Aconitase activity was determined as described by Henson and Cleland (1967) [21]; 100 μg of mitochondrial protein was resuspended in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, triton X-100 0.02% mM, pH 7.4) with vigorous shaking and incubated for 5 min. Extracts were centrifuged at $9,900 \times g$ for 5 min at 4°C , and supernatants obtained were used for *cis*-aconitase determinations. Eighty micrograms of protein from the supernatants was used for enzymatic determination in reaction buffer (Tris-HCl 90 mM, isocitrate 20 mM, pH 7.4) with light agitation; the absorbance at 240 nm was immediately recorded.

Raman spectroscopy of mitochondria

Suspensions of intact mitochondria (250 μg) from yeast cultures grown on YPD were subjected to Raman spectroscopy using a micro-Raman spectrometer (Dilor model LabRam) equipped with a confocal microscope, using Ar^+ laser emitting at 514.5 nm, and a 256×1024 pixel charge-coupled device (CCD) used as a photon detector. The spectra correspond to the average of spectra overlapped by 30 sec of recording; measurements were carried out at room temperature with sample preparation as described elsewhere [22].

Blue Native Gel Electrophoresis

Mitochondrial proteins were separated by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on 8% Bis-tris gels (BN-PAGE) and SDS-PAGE was carried out under denaturing conditions, as described previously [23-25].

RESULTS

ROS susceptibility in *S. cerevisiae* is impaired by mutations in the *ISC* genes

In order to verify whether the dysfunction in the ISC system is related to parallel increases in their sensitivity to oxidative damage, we tested the susceptibility of *ISC* mutants to several ROS generators. At any concentration of H₂O₂, the mutants *ssq1Δ*, *grx5Δ*, *isalΔ*, and *iba57Δ* showed significant impairment in their growth rate with respect to WT, displaying severely compromised growth at 12.5 and 25 mM H₂O₂; the *grx5Δ* was the least sensitive mutant at any H₂O₂ concentration (Fig. 1b–d). The susceptibility to menadione (a superoxide generator) followed a similar pattern to that observed with H₂O₂ treatments: under 80 μM menadione, the *ISC* mutants showed a moderate but significant inhibition in their growth kinetics with respect to the WT strain (Fig. 1e), while at 150 μM menadione, the growth of all mutants was drastically affected (Fig. 1f); *grx5Δ* was again the least sensitive mutant to the stressor. These results indicate that a dysfunctional ISC assembly system produces an increased sensitivity to ROS generators. Concordantly, ethanol, another ROS generator, has also been shown to produce oxidative stress in *ISC* mutants in a concentration-dependent manner [17]. As a positive control, the hyper-ROS-producer mutant *rip1Δ* (a strain disrupted in the Rieske protein from complex III of the ETC) was used. These findings indicate that the *rip1Δ* mutant is more susceptible to H₂O₂ and menadione than the *ISC* mutants are, suggesting that ROS generation in the *ISC* mutants could be associated with a dysfunctional ETC, probably by a disruption in electron transfer at Fe–S-containing proteins.

Increase in ROS generation is correlated with a dysfunctional ISC assembly system

To elucidate whether the enhanced sensitivity to ROS generators is correlated with increased mitochondrial ROS generation due to *ISC* mutations, quantification of ROS was carried out by flow cytometry using the fluorescent ROS indicators DHE and DHRH123, to detect mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 , respectively. All mutants displayed a significant increment in the percentage of fluorescent cells generating $O_2^{\bullet-}$ or H_2O_2 when ethanol, H_2O_2 , or menadione were used for ROS induction (Fig. 2, continuous lines). In contrast, the WT strain only showed a significant increment after long ethanol exposure (≥ 3 h), whereas, in concordance with its lowest sensitivity to oxidants among all the mutants, *grx5* Δ cells produced the lowest amounts of ROS (Fig 1). In addition, in the *rip1* Δ mutant, ROS levels were higher than in all the *ISC* mutants, even without oxidant treatment (dotted lines), which is in concordance with its higher sensitivity to stressors (Fig. 1). These findings confirm that ethanol is a ROS generator as strong as H_2O_2 or menadione and indicate that ROS generation by oxidant compounds was exacerbated by the *ISC* mutations, suggesting that ROS imbalance is provoked by a dysfunctional ISC system. Importantly, the phenotype of the *rip1* Δ mutant suggests that iron destined for the Rieske protein, and the probable inability of that mutant to transfer electrons through the ETC, may, in combination, be related to its exacerbated ROS production.

Increase in ROS generation is correlated with Fe^{2+} release, and is increased in *ISC* mutants

Biogenesis of Fe-S centers in *S. cerevisiae* occurs mainly in mitochondria, and the assembly mechanism depends on the functionality of the *ISC* gene products. Iron is an essential component of this process, and its cellular content is dependent on transport systems, chelating proteins, and storage. It is well-known that iron can be released from Fe-S proteins by $O_2^{\bullet-}$ or H_2O_2 [1,5,12,26], which in turn can lead to the generation of the strongly oxidant $OH^{\bullet}$ radical via Fenton's chemistry. To evaluate the correlation between the increment in ROS by treatment with oxidant agents and the functionality of the ISC

assembly with the level of the free iron pool, *in vivo*, real-time Fe^{2+} quantification was carried out by flow cytometry using the PGFL fluorescent probe.

Cells suspensions of the mutants *ssq1Δ*, *grx5Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* showed a significant increment in the levels of free Fe^{2+} in a time-dependent fashion with respect to the WT strain, regardless of the presence of oxidants (Fig. 3). As expected, yeast suspensions treated with toxic concentrations of ethanol (10%), H_2O_2 (12.5 mM), or menadione (80 mM), exhibited a strong iron-dependent fluorescence with respect to untreated yeast strains. Importantly, the mutants *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* showed higher levels of Fe^{2+} than the *grx5Δ* mutant (Fig. 3). In addition, the Fe^{2+} content increased in control *rip1Δ* mutants when they were treated with oxidant agents. Interestingly, according to confocal microscopy observations, cellular localization of the free Fe^{2+} was mainly into the mitochondria, similar to superoxide accumulation (Fig. 4). These results indicate that the dysfunction of the ISC system causes an increment in the release of mitochondrial free iron, which was enhanced by treatment with the ROS generators and ethanol.

To elucidate whether the enhanced ROS generation is correlated with the free Fe^{2+} content, quantification of ROS by real-time flow cytometry was carried out under dose-response tests for Fe^{2+} (Fig. 5). All ISC mutants, except *grx5Δ*, displayed a significant, dose-dependent increment in levels of fluorescence (indicating $\text{O}_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 generation) when treated with increased concentrations of Fe^{2+} . In contrast, the WT strain showed a moderate dose-dependent increase of ROS with approximately 4-fold less fluorescence than the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants. Interestingly, these results indicate that at concentrations of Fe^{2+} lower than 10 μM , $\text{O}_2^{\bullet-}$ was the main species produced, while at concentrations of Fe^{2+} between 10–20 μM , an increment of H_2O_2 was observed (Fig. 5a–b). In addition, ROS generation at the mitochondrial level, determined in YPD-grown cultures, showed that the increased ROS generation in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants was significantly diminished by addition of the metal chelator phenanthroline (Fig. 5c).

The role of iron in ROS generation by ethanol in the ISC mutants was confirmed by determination of cell survival in cultures treated with a toxic concentration of ethanol (10%) and the addition of phenanthroline (10 μM). The ISC mutants showed a decrease in their

survival percentage after ethanol treatment, with *isa1Δ* and *iba57Δ* being the more sensitive mutants. However, when the Fe^{2+} chelator was added to the cultures, survival was significantly increased in all *ISC* mutants (Fig. 5d). These results confirm that the toxic effects produced by ethanol are related to an increase in the free Fe^{2+} pool, and that this phenomenon is exacerbated by dysfunction of the ISC system. These findings also suggest that the accumulation of preassembled Fe–S clusters, due to insertion failure caused by disruption of the *ISC* genes or the absence of the target apoproteins (i.e., mitochondrial Fe–S-containing proteins) leads to an increment in the free Fe^{2+} pool, provoking an oxidative stress event. This may lead to denaturing/dissociation of already assembled Fe–S proteins or hemoproteins, whose prosthetic groups could also be one of the iron sources that causes iron imbalance, leading to a vicious circle of ROS generation.

Mitochondrial ETC functionality is affected by *ISC* mutations

To ascertain the extent to which each *ISC* mutation impairs the overall functionality of the ETC in *S. cerevisiae*, the *in situ* mitochondrial oxygen consumption rates (OCR) of the *ISC* mutants were compared. Results showed that respiration was fully abolished in both coupled and uncoupled states in the mutants *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ*, whereas in the *grx5Δ* mutant only a partial decrease in the OCR was observed in comparison with the WT strain (Fig. 6a–b). Remarkably, the ethanol treatment caused oxygen release in the assay chamber (i.e. negative values for OCR, Fig. 6d–e) instead of oxygen consumption in all *ISC* mutants, except *grx5Δ*. This is suggestive of ROS production, since superoxide dismutase catalyzes the conversion of $\text{O}_2^{\cdot -}$ into O_2 and H_2O_2 and catalase converts the later species into H_2O and O_2 . In *S. cerevisiae* mitochondria, complex III is the only site of ROS generation in the ETC since it lacks a rotenone-sensitive complex I, the other site of ROS production in the ETC of superior eukaryotes [13,27]. We exposed the cells to antimycin A, an inhibitor of complex III, to further explore a possible role for complex III in ROS generation. In the absence of ethanol, a small amount of O_2 generation was detected in all mutants except *grx5Δ*, whereas in the presence of ethanol, higher rates of O_2 generation were detected in these mutants, and O_2 consumption was fully inhibited in *grx5Δ* cells (Fig. 6c and 6f). Conversely, antimycin A-insensitive oxygen consumption was observed in WT

and *grx5* Δ cells in the absence of ethanol, and only in WT cells in the presence of ethanol. Consistent with the phenotypes of the *ISC* mutants, the *rip1* Δ mutant showed similar behaviors.

However, in concordance with their inability to respire, the *ssq1* Δ , *isa1* Δ , and *iba57* Δ mutants did not exhibit membrane potential (Δp) (Fig. 7a). In addition, OCR corresponded with the magnitude of membrane potential in WT and *grx5* Δ cells, as membrane potential was twofold higher in WT than in the *grx5* Δ mutant, and OCR in a coupled state follows a similar pattern.

Partial reactions of the ETC were analyzed, in order to determine what segment of the ETC was responsible for the effects described above. It was observed that succinate-DCIP oxidoreductase activity (representative of complex II activity) was fully impaired in the *ssq1* Δ , *isa1* Δ , and *iba57* Δ mutants, as well as in the control mutant *rip1* Δ , whereas the *grx5* Δ mutant displayed less than 40% of the activity observed in WT cells (Fig. 7b).

The same trend was observed in both antimycin A-sensitive succinate-cytochrome *c* oxidoreductase (representative of the activity of complex III, using the endogenous ubiquinone-9 pool as a substrate) and cytochrome *c* oxidase (representative of complex IV activity) activities, whereas in the *grx5* Δ mutant, activity of ~50% of that of WT cells was detected (Fig. 7f).

Antimycin A-sensitive succinate-cytochrome *c* oxidoreductase activity is dependent on electron transfer between complex II and complex III. Thus, to eliminate the possibility that impaired succinate-cytochrome *c* oxidoreductase activity is the result of impaired complex II activity, and not of direct damage to complex III, we tested the activity of complex III by reducing the mitochondrial quinone pool with glycerol via the concerted action of porin-associated glycerol kinase and mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase [28,29]. No differences in this activity with respect to mitochondria from WT cells were observed in *grx5* Δ , *isa1* Δ , and *iba57* Δ mutants, while mitochondria from *ssq1* Δ exhibited a 3-fold diminution. As expected, activity was strongly inhibited in the *rip1* Δ mutant (Fig. 7d). Another respiratory enzyme that utilizes cytochrome *c* as its electron acceptor is L-lactate-

cytochrome *c* oxidoreductase, or cytochrome *b₂* [30]. As depicted in Fig. 7e, this activity was strongly inhibited in the *ssq1Δ*, *iba57Δ*, and *rip1Δ* mutants, and low levels of activity was observed in the *grx5Δ* and *isa1Δ* mutants. Together, these results indicate that the respiratory incompetence of *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants was mainly due to defective oxidation of substrates in complex II and impaired delivery of electrons to oxygen in the terminal oxidase, which in turns may limit the ability of the ETC to translocate H⁺ towards the intermembrane space for establishment of membrane potential and may contribute to the higher ROS generation seen in these mutants.

The increase in free iron proceeds via iron release from mitochondrial Fe–S-containing proteins

These results led us to suppose that the increment in free iron levels may proceed by the release of this metal from proteins that contain Fe–S centers, such as complexes II and III of the ETC, because of oxidative stress caused by exposure to ethanol or ROS-generators and the dysfunctionality of the ISC system. Raman spectroscopy analysis for determination of the Fe–S content was carried out in mitochondria isolated from *ISC* mutants grown in YPD. The results indicated that signal intensity near 300–500 cm⁻¹ at 514 nm in the Raman spectra, corresponding to photonic emission characteristic of the [2Fe–2S] and [4Fe–4S] centers [22], was clearly diminished in the *isa1Δ* and *iba57Δ* mutants, whereas in the *ssq1Δ*, *grx5Δ*, and *rip1Δ* mutants, an intermediate intensity was observed, relative to WT spectra (Fig. 8a). These results indicate that mitochondrial Fe–S centers were diminished in *isa1Δ* and *iba57Δ* mutants, confirming that the Fe–S proteins are susceptible targets of ROS and ethanol stresses, and are probably the main source of free iron during an oxidative stress event.

To further confirm this assumption, we conducted a functional analysis of the 4Fe–4S protein *cis*-aconitase, which has been described as sensitive to ROS and an iron donator for the Fenton reaction; while for the [2Fe–2S] clusters, the Rieske protein from complex III of the ETC is a main source of superoxide generation in mitochondria [5,26]. *Cis*-aconitase activity was almost totally abolished in *isa1Δ* and *iba57Δ* strains, compared with WT (Fig.

8b), confirming that in the ISC assembly system, the Isa1/Iba57 proteins are involved in assembly of [4Fe-4S] clusters into target proteins. Moreover, aconitase activity was partially inhibited in the *grx5Δ*, *ssq1Δ*, and *rip1Δ* mutants, which suggests that although this protein does not participate directly in 4Fe-4S cluster assembly, its disruption may lead to indirect damage of these prosthetic groups via increased ROS generation and iron release, as suggested by the Raman spectroscopy results. Thus, as mentioned above, complex II activity was lost in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants, probably due to defective assembly of its [4Fe-4S], [3Fe-4S], and [2Fe-2S] clusters. These findings suggest that the stress generated by ROS in the mitochondria provokes a decrease in Fe-S protein content, resulting in Fe²⁺ release from Fe-S centers.

However, respiratory complex assembly studies have indicated that the [2Fe-2S]-Rieske protein of complex III is essential for correct formation of ETC supercomplexes constituted of complex III (ubiquinol-cytochrome *c* reductase or *bc₁* complex) and complex IV (cytochrome *c* oxidase) [4,31]. Therefore, the assembly of ETC supercomplexes was analyzed using BN-PAGE gels [23-25]. BN-PAGE gels show that in mitochondria obtained from *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants, bands corresponding to III₂IV₂ supercomplexes were not observed, but a band corresponding to III₂IV₁ supercomplexes was detected at low levels in all ISC mutants (Fig. 9). Interestingly, in the *rip1Δ* mutant (Rieske deficient), the III₂IV₂ and III₂IV₁ supercomplexes, although their intensity was less than in the WT, were not affected as strongly as in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants (Fig. 9). As expected, densitometric analysis indicates that the dimeric complex V and its monomer, as well as complex II, remained unaffected in all strains. In contrast, the fact that the band corresponding to monomeric complex II remained unaltered in the [4Fe-4S] ISC machinery mutants (i.e. *iba57Δ* and *isa1Δ*), suggests that its presence is not essential for the assembly of the apoprotein, although this yields an inactive complex, as suggested by Fig. 7b. Interestingly, these results suggest that the assembly of the III₂IV₂ and III₂IV₁ supercomplexes may be assisted by the Isa1/Iba57 proteins.

DISCUSSION

The toxic effects of ethanol on mitochondrial function have been attributed to a variety of factors, ranging from altered activities of ETC complexes [32], loss of heme groups from cytochromes [33], mtDNA oxidative degradation and depletion [34], diminished number of active ribosomes [35], and decreased glutathione pool and lipid peroxidation [36]. Although many of these events are related to increased ROS generation, none of those reports have addressed the possibility that disturbances in mitochondrial free iron from Fe–S clusters may be related to ethanol toxicity. However, early reports have identified an involvement of iron overload during ethanol toxicity and a link has been suggested between ROS overproduction and iron overload in the toxic effects of ethanol, as iron chelation attenuates some disturbances in antioxidant defenses caused by ethanol consumption [37,38], and we have observed recently in yeast cells that ROS generation during ethanol stress was exacerbated by mutations in the *ISC* genes participating in the various steps of Fe–S biogenesis [17]. The results obtained in the present study indicate that a dysfunctional ISC assembly system increases the susceptibility to ethanol and ROS generators, such as H₂O₂ and menadione, via disruption of the functionality of complexes II and IV of the ETC and increased mitochondrial ROS generation. These effects seem to be linked to an increment in the free iron pool as iron chelation has a protective effect in ISC mutants exposed to ethanol, suggesting a close relationship between levels of free iron and ROS generation, where Fe–S-containing proteins constitute an important source of iron contributing to excessive iron release.

The sensitivity of the mutants to ethanol and ROS generators, as well as their levels of free iron and ROS production, seems to be highly dependent on the functionality of the mitochondrial ETC, since strains with better respiratory rates, higher ETC complex activity, and higher mitochondrial membrane potential (i.e. WT and *grx5Δ* cells) exhibited the lowest sensitivity to ethanol and ROS generators, lower levels of Fe²⁺, and decreased ROS production than mutants with null membrane potential and fully impaired ETCs (i.e. *ssq1Δ*, *iba57Δ*, and *isa1Δ*). Further evidence about the dominant role of ETC functionality in ethanol and ROS tolerance arises from the observation that *rip1Δ*, a mutant in which

complex III activity is fully impaired without disruption in the steps of ISC biogenesis, is the most sensitive mutant to stressors, showing the highest levels of ROS and released iron.

With regard to the effect of the disruption of ISC biogenesis in the activity of respiratory complexes, we expected impairment of only of complexes containing Fe–S clusters. This expectation was in agreement with the abolishment of complex II activity in *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ*, as this complex contains [2Fe–2S], [3Fe–4S], and [4Fe–4S] clusters in the catalytic dimer of the enzyme that play a central role in its catalysis, as they receive the electrons from FADH₂ for transfer to the membrane domain where quinone reduction is carried out [39,40].

Interestingly, the activities of complexes II and III in the *grx5Δ* mutant, although decreased, were not totally abolished as in the other *ISC* mutants (Fig. 7). In the case of complex II, this result seems to contradict the essential role of Grx5p in the activity of this complex, reported by Rodríguez-Manzanque et al. (2002) [9]. However, this discrepancy may be attributed to the different technique used to measure complex II activity in that study, which involved following the formation of formazan resulting from the reduction of a tetrazolium salt by complex II [41], although formazan can also be formed by the reduction of tetrazolium salts by ROS [42]. Therefore, we avoided this issue by monitoring the reduction of DCIP. It has been proposed that Grx5p participates in ISC cluster biogenesis by assisting in the transfer of Fe–S clusters from the scaffold to target proteins [43] and/or by repairing mixed disulfides between glutathione and ISC assembly factors [44], although its exact role remains yet to be elucidated. Thus, it appears that the function of Grx5p in the assembly of Fe–S clusters from complexes II and III may be partially replaced by other glutaredoxins.

Interestingly, although they lack Fe–S clusters, both complex IV and cytochrome *b*₂ (i.e. heme-containing proteins) were also affected in all *ISC* mutants, except *grx5Δ* (Fig 7). This was not at all surprising since in yeast, decreased heme biosynthesis and cytochrome deficiency are general phenotypic features of cells with an impaired mitochondrial ISC system [6]. It has been observed that *ISAI* and *SSQI* yeast mutants contain decreased

amounts of hemes $c+c_1$ and b and residual activity of cytochrome c oxidase [45]. Concerning the null complex IV activity of *iba57Δ* cells, the same phenotype was reported by Gelling et al. (2008) [10]. Furthermore, the same study reported that Iba57p is essential for the maintenance of mtDNA. Therefore, it is feasible to hypothesize that the maintenance of mtDNA could be crucial for ROS and ethanol tolerance after prolonged exposure, which would be in agreement with the fact that mtDNA oxidative degradation and depletion have been identified as important factors contributing to the deleterious effects of oxidant agents on mitochondria [34]. Another possible reason for impaired complex IV activity in these mutants is the inability to form supercomplexes with complex III, as it has been demonstrated that when complex III has an incorrect conformation, the activity of complex IV may be strongly affected [4,23]; this is in full agreement with the impaired formation of III_2IV_2 and III_2IV_1 supercomplexes, as shown in Figure 9.

Mitochondrial respiration was eliminated in *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* in every respiratory state. This effect seems to be mainly attributable to defective electron transfer to O_2 at complex IV, since this activity was fully inhibited in these cells (Fig. 6). Another factor contributing to the respiratory incompetence of these mutants is their inability to oxidize substrates at complex II, as demonstrated by their observed null succinate-DCIP oxidoreductase and succinate-cytochrome c oxidoreductase activities. The impairment in the latter activity was not attributed to defective electron transfer at complex III, since we detected cytochrome c reduction in *isa1Δ* in the presence of glycerol at the same level as in WT, and at moderately lower levels in *iba57Δ* (Fig 7). This is concordant with the fact that Iba57p and Isa1p do not participate in the assembly of the 2Fe–2S centers, which is the type of ISC present in the Rieske subunit of the complex III [5]. However, Raman spectra indicate that a decrease in Fe–S protein content occurs in *isa1Δ* and *iba57Δ* mutants, although is not discarded that also mitochondrial proteins containing heme groups are involved. The last observation is in accord with formation of supercomplexes in the ETC that depend on Fe–S proteins, as seen in the *isa1Δ* and *iba57Δ* mutants in native gels, suggesting that these proteins could also be involved in heme assembly in mitochondrial respiratory complexes.

Regarding the role of the functionality of the ETC in ethanol tolerance, it must be taken into account that in yeast, mitochondria participate in the maintenance of the redox balance during metabolism of sugars by oxidizing the NADH generated during both glycolysis and ethanol oxidation by the cytosolic and mitochondrial isoforms of alcohol dehydrogenase [46]. This process is very important to avoid deleterious production of mitochondrial ROS, since high NADH/NAD⁺ ratios favor higher rates of ROS production in the ETC [47]. In yeast, the NADH dehydrogenases Nde1, Nde2, and Ndi1 shuttle electrons from NADH to the quinone pool [48], and the ubiquinol generated is oxidized by the quinol-oxidase site of complex III. Although the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants exhibited partial or full complex III activity (Fig. 7), it is probable that the null activities of complexes II and IV may be interfering indirectly with NADH oxidation and ethanol metabolism by preventing the re-oxidation of electron acceptors in complex III, which in turn may lead to an increase in the generation of semiquinone radicals favoring the generation of O₂^{•-}. Moreover, it has been demonstrated that the inhibition of complex II or complex IV may enhance mitochondrial ROS production [49,50]. This idea is further supported by the fact that the addition of antimycin A leads to ROS generation, as reflected by oxygen release from mitochondrial suspensions at a similar level to the *rip1Δ* mutant. This also indicates that ubiquinol is being oxidized at the quinol oxidase (Qo) site of complex III for bifurcated reduction of cytochrome *b* and posterior O₂^{•-} formation by inhibited re-oxidation of cytochrome *b*₅₆₂ in the quinone reductase site (Qi) induced by antimycin A [51]. Otherwise, the generation of O₂ by antimycin A would not be possible. Furthermore, the exacerbation of O₂ release by antimycin A with ethanol treatment (Figure 6 d, e) is suggestive of further impairment of the Q cycle in complex III, corroborating the hypothesis that ethanol toxicity is mediated by altered electron transfer in the ETC, leading to enhanced ROS generation. It must be stressed again that O₂ generation is an indicator of ROS production because O₂ is a product of the degradation of O₂^{•-} and H₂O₂, catalyzed by superoxide dismutase and catalase, respectively. Importantly, we have also found that these mutants have increased catalase activity [17], which may be an adaptive response to enhanced ROS generation due to impaired ETC function.

The fact that excessive iron in *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants causes additive increased ROS generation (Fig. 5a, b) is in agreement with the increase in O₂ generation observed in these mutants in the presence of glucose plus 10% ethanol [16]. Because the release of free Fe²⁺ was enhanced in these mutants, OH[•] radicals may also be formed due to the reaction of ROS generated in the ETC with iron through the Haber-Weiss cycle, which would lead to worsening of the redox state with catastrophic consequences for the cell due to the high reactivity of OH[•] with virtually any class of biomolecule. In summary, it can be suggested that the iron-mediated mechanism of ethanol toxicity in the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants may be the result of high NADH/NAD⁺ ratios during ethanol oxidation due to impaired electron transfer at complexes II and IV, which in turn leads to the reduction of electron transporters in complex III and further generation and ROS, enabling these species to release more iron from the prosthetic groups of Fe–S or heme proteins, contributing in this way to a feedback mechanism of ROS generation via an increment in the free iron pool. At the same time, this may be related to an apoptotic phenotype in *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants observed in the presence of 10% ethanol [17]. These suggestions are supported by the fact that *grx5Δ*, the mutant with lower levels of released Fe²⁺ in the presence of ethanol, still displayed OCR and partial activity of all ETC complexes, as well as null oxygen release, (Figs. 6, 7).

An important finding was that in the phenotypes of the *isa1Δ* and *iba57Δ* mutants were similar to the *rip1Δ* mutant (i.e. ROS susceptibility, ROS generation, Fe²⁺ release, OCR, activity of the ETC complexes). We speculate that the free iron released may come from Fe–S-containing proteins such as complexes II and III of the ETC, as the *isa1Δ* and *iba57Δ*, as well as the control strain *rip1Δ* mutant, were the major producers of ROS species, both with and without ROS generators, suggesting that Fe–S-dependent recipient proteins are involved. These facts combine to suggest that Isa1 and Iba57 proteins could be involved in *de novo* Fe–S assembly or recycling of Fe-containing proteins from ETC complexes II and III, since Isa1p and Iba57p have been described as iron reservoirs [12].

With the objective of elucidating the last hypothesis concerning the roles of Isa1/Iba57 in Fe–S assembly and iron recycling, two possible kinds of recipient proteins were evaluated.

The *cis*-aconitase that contains a [4Fe–4S] cluster has been described as highly sensitive to ROS and an iron donator for the Fenton reaction. In [2Fe–2S] clusters, the Rieske protein from complex III of the ETC is a main source of superoxide generation in mitochondria [12], along with succinate dehydrogenase from complex II, which contains [2Fe–2S], [3Fe–4S], and [4Fe–4S] clusters [48]. Our results indicated that *cis*-aconitase activity was affected in the *ISC* mutants (*ssq1Δ* and *grx5Δ*), and was almost totally abolished in mutants *isa1Δ* and *iba57Δ*, but not in the *rip1Δ* mutant (Fig. 8b). These findings confirm that in [4Fe–4S] clusters, assembly into target proteins such as *cis*-aconitase is dependent on the Isa1 and Iba57 proteins, as described previously [12]. Interestingly, the *grx5Δ* mutant showed a diminishing of activity in complexes II and III (~65%), suggesting that the assembly of the Fe–S clusters of complexes II and III be also assisted by Grx5 protein. Abolishment of succinate dehydrogenase activity (null activity of complex II; Fig. 7b) in the *isa1Δ* and *iba57Δ* strains strongly suggests its involvement in assembly of Fe–S clusters in the Sdh protein of complex II. Interestingly, Raman spectrophotometry determinations indicated that the [2Fe–2S] and [4Fe–4S] cluster content in isolated mitochondria was strongly diminished in the *isa1Δ* and *iba57Δ* mutants, and to a lesser degree in the *grx5Δ* and *ssq1Δ* mutants, compared with the WT, corroborating that the Isa1/Iba57 proteins are involved in assembly of Fe–S clusters (Fig. 8a). Additionally, it has been reported that the assembly of ETC supercomplexes formed by cytochrome *bc₁* complex and cytochrome *c* oxidase (complex III and IV of the ETC) is dependent on the integration of Rieske protein into the *bc₁* complex [4]; this finding is contrary to other studies suggesting that complex III does not affect complex IV formation [23]. In this context, formation of ETC supercomplexes III/IV in the *S. cerevisiae* *ISC* mutants were analyzed using native-blue gels [23–25]. We found that supercomplex III₂/IV₂ was virtually undetectable in the mitochondria isolated from the *ssq1Δ*, *isa1Δ*, and *iba57Δ* mutants, but supercomplex III₂/IV₁ was diminished in all *ISC* mutants, as well as in the *rip1Δ* mutant (Fig. 9). Therefore, these findings may suggest that the Isa1 and Iba57 proteins are also involved in the assembly of the Fe–S clusters into the apoproteins of complex III. Alternatively, it could also suggest that these proteins may be related to heme biogenesis or assembly in ETC cytochrome-containing proteins such as complex IV or cytochrome *b₅*, by modulating

the bioavailability/recycling of Fe. However, more studies are needed to corroborate in detail these hypotheses.

To summarize, exacerbation of ROS generation in *S. cerevisiae* caused by treatment with stressors such as ethanol, H₂O₂, and menadione occurs via Fe²⁺ release, which is favored by an iron-dependent ROS generation cycle. Our findings indicate that the free Fe²⁺ is released from Fe-S-containing proteins. The oxidative stress and effects of the Fe-S-containing proteins leads to mitochondrial dysfunction. Raman spectroscopy and supercomplex formation of mitochondria isolated from *ISC* mutants indicate that disruption of the Isa1 and Iba57 proteins provokes a decrease in [2Fe-2S] and [4Fe-4S] cluster content that is reflected in cytochrome *bc₁* supercomplex formation, producing a dysfunctional ETC that leads to apoptotic mitochondrial events.

ACKNOWLEDGMENTS

We thanks to Drs. G. Del Rio and L. Ongay from Instituto de Fisiologia Celular/UNAM by yeast strains donation. This research was funded by CONACYT (106567), FOMIX-C01-117130, and C.I.C. 2.14/UMSNH grants. RVP-G, MG, and LAS received a scholarship by CONACYT.

REFERENCES

1. Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E. (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10206-10211.
2. Hoff KG, Silberg JJ, Vickery LE. (2000). Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7790-7795.
3. Dutkiewicz R, Schilke B, Knieszner H, Walter W, Craig EA, Marszalek J. (2003). Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis.

- Similarities to and differences from its bacterial counterpart. J Biol Chem 278: 29719-29727.
4. Conte, L, Zara V. (2011). The Rieske Iron-Sulfur Protein: Import and Assembly into the Cytochrome bc(1) Complex of Yeast Mitochondria. Bioinorg Chem 363:941.
 5. Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Mühlenhoff U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. Biochim Biophys Acta. 1823:1491-1508.
 6. Lill, R, Mühlenhoff U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. Annu Rev Cell Dev Biol 22: 457-486.
 7. Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. Nature. 460:831-838.
 8. Schilke B, Williams B, Knieszner H, Puksza S, D'Silva P, Craig EA, Marszalek J. (2006). Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. Curr Biol. 16:1660-1665.
 9. Rodríguez-Manzanque MT, Tamarit J, Bellí G, Ros J, Herrero E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. Mol Biol Cell. 13:1109-1121.
 10. Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, Lill R, Mühlenhoff U. (2008). Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. Mol Cell Biol. 28:1851-1861.
 11. Sheftel D, Wilbrecht C, Stehling O, Niggemeyer B, Elsässer P, Mühlenhoff U, Lill. (2012). The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. Mol Biol Cell. 23:1157-1166.
 12. Mühlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ, Lill R. (2011). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. J Biol Chem. 286:41205-41216.
 13. Pérez-Gallardo RV, Sánchez-Briones L, Díaz-Pérez AL, Gutiérrez S, Rodríguez-Zavala JS, and Campos-García J. 2013. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a

- dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. FEMS Yeast Res. 13:804-819.
14. Turrens JF. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 15:335-344.
15. Hoffmann B, Uzarska, MA, Berndt C, Godoy JR, Haunhorst P, Lillig, Christopher H, Lill R. Mühlenhoff U. (2011). The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. Antioxidants & redox signaling. 15:19-30.
16. Rouault TA, Tong WH. (2008). Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. Trends Genet. 24: 398-407.
17. De Freitas J, Wintz H, Kim JH, Poynton H, Fox T, Vulpe C. (2003). Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. Biometals. 16:185-197.
18. Petrat F, Rauen U, de Groot H. (1999). Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. Hepatology. 29:1171-1179.
19. Cortes-Royo C, Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Estrada-Villagómez M, Manzo-Avalos S, Mejía-Zepeda R, Boldogh I, Saavedra-Molina A. (2009) Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. J Bioener Biomem. 41:15-28.
20. Henson CP, Cleland WW. (1967). Purification and kinetic studies of beef liver cytoplasmic aconitase. J Biol Chem. 242:3833-3838.
21. Zhang B, Crack JC, Subramanian S, Green J, Thomson AJ, Le Brun NE, Johnson MK. (2012). Reversible cycling between cysteine persulfide-ligated [2Fe-2S] and cysteine-ligated [4Fe-4S] clusters in the FNR regulatory protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 109:15734-15739.
22. Schägger H (2006). Tricine-SDS-PAGE. Nature protocols. 1:16-22.
23. Musatov A, Robinson NC. (2012). Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage: focus on cytochrome c oxidase. Free Radical Research. 46:1313-1326.

24. Bakker BM, Bro C, Kötter P, Luttik MA, van Dijken JP, Pronk JT. (2000). The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 182:4730-4737.
25. Cui, TZ, Smith PM, Fox JL, Khalimonchuk O, Winge DR. (2012). Late-stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the AAA ATPase Bcs1. Mol Cell Biol. 32:4400-4409.
26. Venkatraman A, Landar A, Davis AJ, Chamlee L, Sanderson T, Kim H, Page G, Pompilius M, Ballinger S, Darley-Usmar V, Bailey SM. (2004). Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of ethanol-dependent hepatotoxicity. J Biol Chem. 279:22092-22101.
27. Thayer WS, Rubin E. (1981). Molecular alterations in the respiratory chain of rat liver after chronic ethanol consumption. J Biol Chem. 256:6090-6097.
28. Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. (2001). Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. J Pharmacol Exp Ther. 298:737-743.
29. Coleman WB, Cunningham CC. (1991). Effect of chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial transcription and translation. Biochim Biophys Acta. 1058:178-186.
30. Hirano T, Kaplowitz N, Tsukamoto H, Kamimura S, Fernandez-Checa JC. (1992). Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. Hepatology. 16:1423-1427.
31. Nordmann R, Ribière C, Rouach H. (1987). Involvement of iron and iron-catalyzed free radical production in ethanol metabolism and toxicity. Enzyme, 37:57-69.
32. Stål P, Hultcrantz R. (1993). Iron increases ethanol toxicity in rat liver. J Hepatol. 17:108-115.
33. Iverson, T.M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. y Rees, D.C. (1999). Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. Science 284:1961-1966.
34. Lemire, B.D. y Oyedotun, K.S. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. Biochim. Biophys. Acta. 1553: 102-116.

35. Lill R, Muhlenhoff U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem.* 77:669-700.
36. Herrero E, de la Torre-Ruiz MA. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci.* 64:1518-1530.
37. Schagger H, and Pfeiffer K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19:1777-1783.
38. Lange H, Mühlenhoff U, Denzel M, Kispal G, Lill R. (2004). The heme synthesis defect of mutants impaired in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis is caused by reversible inhibition of ferrochelatase. *J Biol Chem.* 279:29101-29108.
39. Young ET, and Pilgrim D. (1985). Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 5:3024-3034.
40. Melo AM, Bandejas TM, Teixeira M. (2004). New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:603-616.
41. Muller F, Crofts AR, Kramer DM. (2002). Multiple Q-cycle bypass reactions at the Qo site of the cytochrome bc1 complex. *Biochemistry.* 41:7866-7874.
42. Murphy MP. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 417:1-13.
43. Stames EM, O'Toole JF. (2013). Mitochondrial aminopeptidase deletion increases chronological lifespan and oxidative stress resistance while decreasing respiratory metabolism in *S. cerevisiae*. *PLOS ONE.* 10:e77234.
44. Brand MD, Nicholls DG. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 435:297-312.
45. Matsuno-Yagi A, Hatefi Y. (1996). Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. The redox reactions of the bis-heme cytochrome *b* in ubiquinone-sufficient and ubiquinone-deficient systems. *J Biol Chem.* 271:6164-6171.
46. Adams V, Griffin L, Towbin J, Gelb B, Worley K, McCabe ER. (1991). Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase: metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial membrane. *Biochem Med Metab Biol.* 45:271-291.
47. Pålman IL, Larsson C, Averét N, Bunoust O, Boubekur S, Gustafsson L, Rigoulet M. (2002). Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate

- dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 277:27991-27995.
48. Guiard B. (1985). Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome *c* oxidoreductase (cytochrome *b2*). EMBO J. 4:3265-3272.
49. Esfandiari N, Sharma RK, Saleh RA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. (2003). Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. J Androl. 24:862-870.
50. Munujos P, Coll-Cantí J, González-Sastre F, Gella FJ. (1993). Assay of succinate dehydrogenase activity by a colorimetric-continuous method using iodonitrotetrazolium chloride as electron acceptor. Anal Biochem. 212:506-509.
51. Ferguson M, Mockett RJ, Shen Y, Orr WC, Sohal RS. (2005). Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*. Biochem J. 390:501-511.
52. Dröse S. (2013). Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. Biochim Biophys Acta. 1827:578-587.

Figure legends

Figure 1. Growth kinetics of the *S. cerevisiae* *ISC* mutants in presence of ROS generators. A) Yeast cultures were growth on liquid medium YPD as following: A) none, B) H₂O₂ 6.25 mM, C) H₂O₂ 12.5 mM, D) H₂O₂ 25 mM, E) menadione 80 µM, and F) menadione 150 µM. Cultures were incubated at 30 °C with light shaking and growth (biomass) was determined by measuring O.D. at 600 nm. Each value represents the mean and standard errors of the mean (SEM) are indicated as bars (n = 3), one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-hoc test was used to compare mutants versus control WT strain, significant differences (p < 0.05) are indicated (*).

Figure 2. Kinetics of ROS generation in suspensions of *S. cerevisiae* *ISC* mutants treated with stressors. Yeast cultures were grown in liquid YPD medium without stressor and

harvested in late exponential growth phase. Yeast YPD-grown cultures were incubated for 2 h with the respective ROS probe; then, the suspensions were treated with and without stressor (ethanol 10%, H₂O₂ 12 mM, and menadione 80 mM), incubated at 30°C with light shaking, and at respective times samples (100 µL) were suspended in PBS buffer and the ROS levels determined into the cells by real-time analysis by flow cytometry. A–F) Results represent the percentage of cells that showed positive fluorescence. Yeast suspensions without stressor (dashed lines) and with stressor treatment (continuous lines). The ROS fluorescent probes DHE and DHR123 are O₂^{•-} indicators, and mitochondrial general ROS (mainly H₂O₂), respectively. A–C) Fluorescence determination using DHE probe, D–F) using DHR123 probe. Values are the mean of three independent experiments with 20,000 cells counted by flow cytometry per each point. SEM values are indicated as bars (n = 3), one-way NOV with Bonferroni's post-hoc test was used to compare mutants versus control, significant differences ($p < 0.05$) are indicated (*).

Figure 3. Determination of Fe²⁺ release in the *S. cerevisiae* ISC mutants. Yeast cultures were grown in liquid YPD medium, harvested and suspended in YPD at 1×10^7 cell/mL and charged with the fluorescent probe Phen green FL and incubated by 2 h at 30°C with light shaking in darkness. Then, yeast suspensions were treated with and without stressor (ethanol 10%, H₂O₂ 12 mM, and menadione 80 mM) incubating at 30°C with light shaking, and at respective times samples (100 µL) were suspended in PBS buffer and the fluorescence levels into the cells were quantified by real-time analysis by flow cytometry by at least 6 h. Free Fe²⁺ determination in yeast suspensions without stressor (dashed lines) and with stressor treatment (continuous lines). Results represent the fluorescence intensity of yeast cells. Values are the mean of three independent experiments with 20,000 cells counted by flow cytometry per each point. SEM values are indicated as bars (n = 3), one-way NOV with Bonferroni's post-hoc test was used to compare mutants versus control, significant differences ($p < 0.05$) are indicated (*).

Figure 4. Images of superoxide and Fe²⁺ content in cells of *S. cerevisiae* treated with oxidant agents. Yeast YPD-grown cultures were harvested and suspended in PBS at 1×10^7 cell/mL and charged with the fluorescent probe DHE or Phen green FL and incubated for 2

h at 30°C with light shaking in darkness. Suspensions were treated with and without ethanol (10%), incubated for 30 min at 30°C and observed under a confocal microscope (Olympus FV1000). Images were taken in fluorescence field for the WT and *iba57Δ* mutant yeasts, without ethanol (glucose 2%) using the DHE probe for superoxide determination (A–B) or using the Phen green FL probe for free Fe^{2+} determination (C–D); and with ethanol (10%) treatment using DHE probe (E–F) or Phen green FL probe (G–H). Images of *iba57Δ* mutant yeast treated with ethanol using the DHE and Phen green FL probes for both superoxide and free Fe^{2+} determination at same time (I and J). Images of the *iba57Δ* mutant using DHE (K) and Phen green FL (L) probes. –H) 10× amplification, I–J) 40× amplification, and K–M) 90× amplification of yeast cells. Superoxide generation is shown as red cells and as red granules within the cells; free Fe^{2+} is shown as green cells and green granules within the cells. M) Turning color image to localize Fe^{2+} accumulation within the cell (red granules).

Figure 5. Effect of Fe^{2+} treatment on *S. cerevisiae* ISC mutants. YPD-grown yeast cultures were harvested and suspended in YPD at 1×10^7 cell/mL, charged with ROS-determination probes, and subjected to Fe^{2+} [$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)$] dose-response assays. Fluorescence intensity was determined by flow cytometry using a DHE probe (A), and DHR123 (B). Yeast suspensions were treated with Fe^{2+} [$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)$] (10 μM) with and without the metal chelator 1,10-phenanthroline (1 mM), and the percentage of fluorescent cells was determined using the ROS determination probe DHR123 by flow cytometry (C). Yeast suspensions were treated with and without ethanol (10%) and with 1,10-phenanthroline (1 mM), and the percentage of surviving cells was determined using Trypan Blue staining; yeast counts were performed using a Neubauer chamber [17]. Values are the mean of three independent experiments with 20,000 cells counted by flow cytometry for each point. SEM values are indicated as bars ($n = 3$), and a one-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc correction was used to compare mutants with the control (A–C), significant differences ($p < 0.05$) are indicated by (*); or Tukey's post-hoc for (D), significant differences ($p < 0.05$) with respect to the WT control are indicated with different lowercase letters.

Figure 6. Respirometry test of mitochondrion from the *S. cerevisiae* ISC mutants. Mitochondrial functionality was evaluated in yeast suspensions obtained from cultures grown in liquid YPD medium, cells were harvested in the late exponential growth phase and re-suspended in MES-TEA buffer with glucose or with ethanol and incubating at 30°C with light shaking. Cells were used for oxygen consumption rate (OCR) measurement with a Clark-type oxygen electrode coupled to a biological oxygen monitor as described in materials and methods. A–C) Basal OCR with glucose as substrate, D–F) with ethanol treatment. A and D) OCR under coupled state, B and E) OCR under uncoupled state using CCCP as uncoupling, C and F) OCR under complex III blocking using Antimycin A as inhibitor. Values are mean of three independent experiments. SE values are indicated as bars (n = 3), one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test was used to compare yeast strains, significant differences ($p < 0.05$) are indicated with different lowercase letters.

Figure 7. Analyses of mitochondrial complex functionality in *S. cerevisiae* ISC mutants. Mitochondrial functionality was evaluated in mitochondrial suspensions obtained from cultures grown in liquid YPD medium, cells were harvested in the late exponential growth phase, mitochondria were isolated and re-suspended in the appropriate buffer, and mitochondrial activities were measured as described in the Materials and Methods. A) membrane potential, B) activity of succinate-DCIP oxidoreductase, C) activity of succinate-cytochrome *c* oxidoreductase, D) activity of glycerol-cytochrome *c* oxidoreductase, E) activity of L-lactate-cytochrome *c* oxidoreductase, and F) activity of cytochrome *c* oxidase. Values are the mean of three independent experiments. SE values are indicated as bars (n = 3), a one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test was used to compare yeast strains, and significant differences ($p < 0.05$) are indicated with different lowercase letters. In (D–E) significant differences ($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$) are indicated with ***, **, and *, respectively.

Figure 8. Analysis of mitochondrial Fe–S-containing proteins in *S. cerevisiae* ISC mutants. Cell extracts of yeast cultures grown in YPD to the late exponential growth phase were used to isolate mitochondria, as described in the Materials and Methods. A) Raman scattering spectra of the mitochondria isolated from *S. cerevisiae* ISC mutants. Raman

spectra were recorded at 21 K with 140 mW of 457.9 nm laser excitation. Each spectrum is the average of scans recorded over 30 sec, using photon counting at 0.5 cm⁻¹ increment spectral resolution. Bands corresponding to the [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters are indicated with arrows (270–320, 345–360, 395–420, and 490–520 cm⁻¹) [22]. B) Enzymatic activity of *cis*-aconitase was determined in mitochondrial suspensions as described in the Materials and Methods. Values are the mean of three independent experiments. SE values are indicated as bars (n = 3), a one-way N OV with Tukey's post-hoc test was used to compare yeast strains, and significant differences ($p < 0.05$) are indicated with different lowercase letters.

Figure 9. Analyses of supercomplex formation in the mitochondrial ETC of *S. cerevisiae* ISC mutants. To analyze ETC supercomplex formation, mitochondrial suspensions isolated from yeast grown on glucose at the late exponential growth phase were solubilized and separated using blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), as described in the Materials and Methods [23-25]. The ETC mitochondrial supercomplexes and their molecular mass in kilodaltons are indicated to the right of the gel (A) as described elsewhere [23,25]. (B) Quantification of band intensities of the supercomplexes observed in (A). Data corresponds to three independent assays determining the band intensity by densitometry analysis using Image J software. Values are the mean of three independent mitochondrial suspension isolation assays. SE values are indicated as bars (n = 3), a one-way N OV with Tukey's post-hoc test was used to compare yeast strains, and significant differences ($p < 0.05$) with respect to the WT control are indicated with an (*).

Figure 10. Model proposed for the mechanism of mitochondrial generation of ROS dependent on free Fe²⁺ from Fe-S-containing proteins in *S. cerevisiae*. The [2Fe-2S] commonly carried by the multi-protein complex (Ssq1-Jac1-Mge1-Grx5) can also be assembled into recipient apoproteins, such the Rieske protein of cytochrome *bc1* from respiratory complex III. The Isa1 and Iba57 proteins may function as iron reservoirs, from which the metal can subsequently be transferred to [2Fe-2S] centers or heme prosthetic groups from cytochrome *bc1*. When the superoxide (O₂^{•-}) is generated by electron leaking in the ETC, and other ROS generated by oxidative metabolism or by oxidant agents, the

[4Fe-4S], [3Fe-4S], or [2Fe-2S] clusters contained in the Fe-S proteins are disrupted, provoking a generalized uncoupling/denaturing of proteins (probably also of the ETC), causing release and increment in the iron labile pool (Fe^{2+}), which by Fenton and Haber Weiss reaction mechanisms, increases mitochondrial ROS levels. If the ISC assembly system is dysfunctional, supercomplex (III_2IV_2) formation is affected, provoking ETC dysfunction, and thence ROS generation levels are increased in an additive manner by a vicious circle of Fe-S-containing proteins, causing an imbalanced ROS content (such as H_2O_2 and superoxide species), that provokes mitochondrial dysfunction and may ultimately lead to apoptotic events.

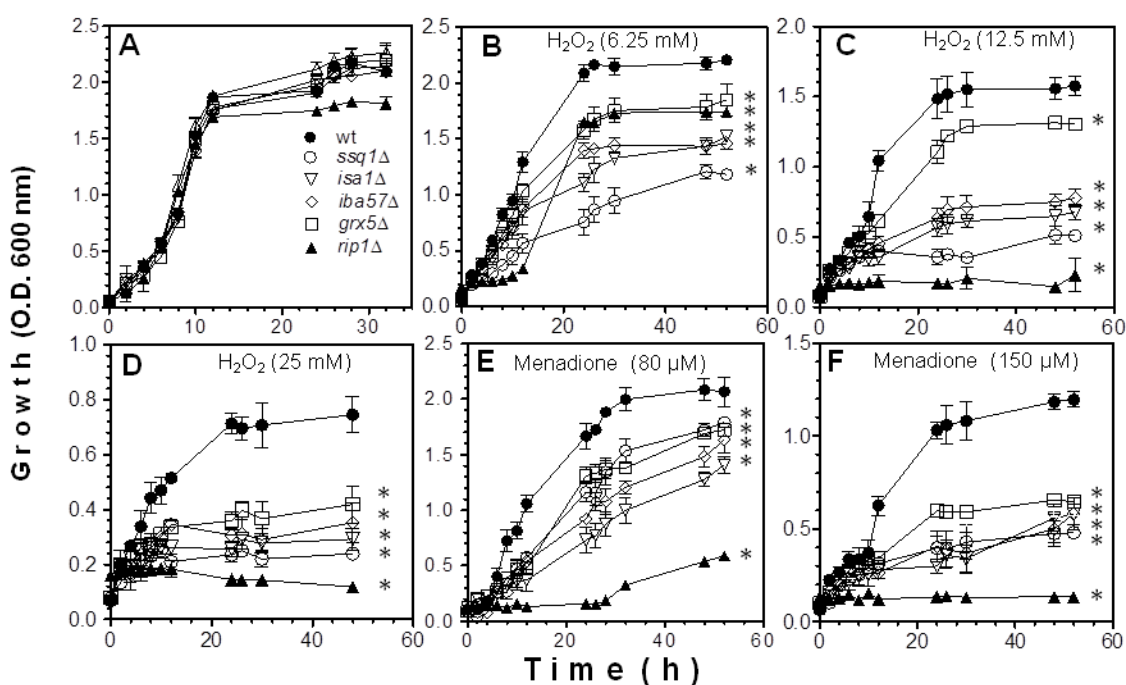


Figure 1

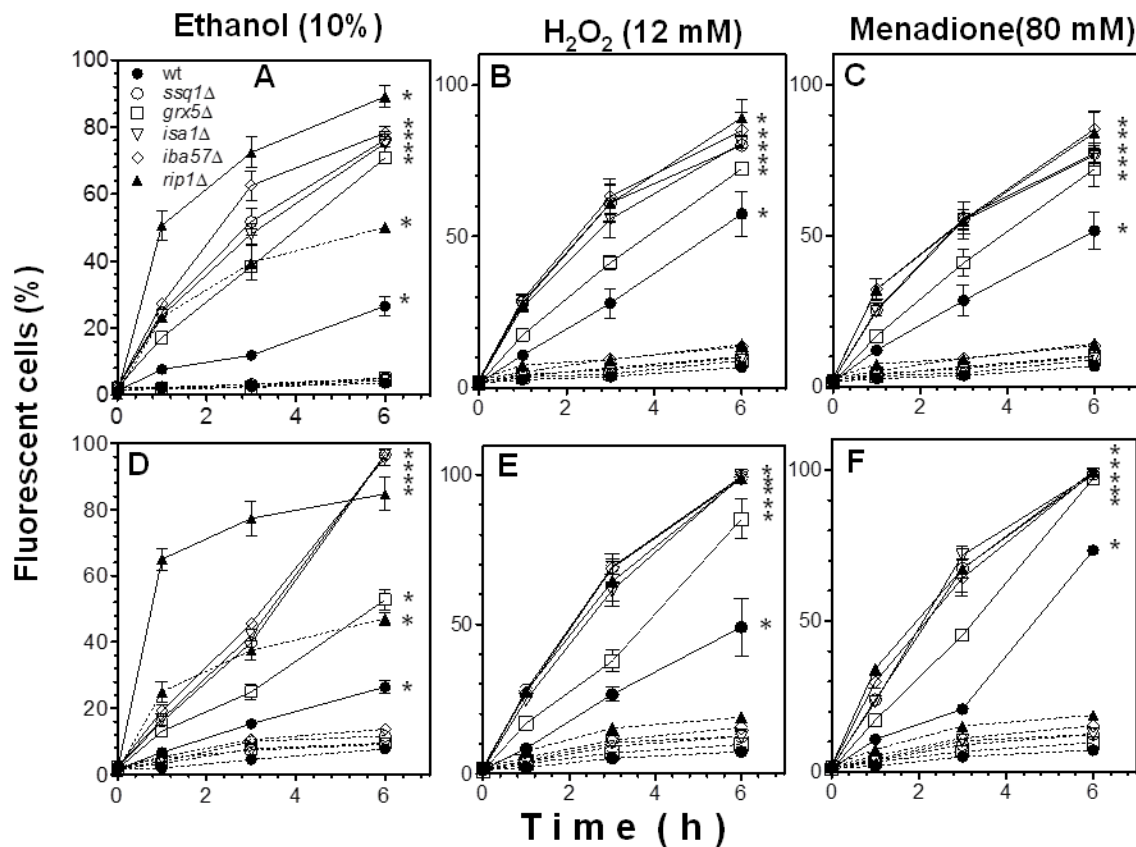


Figure 2

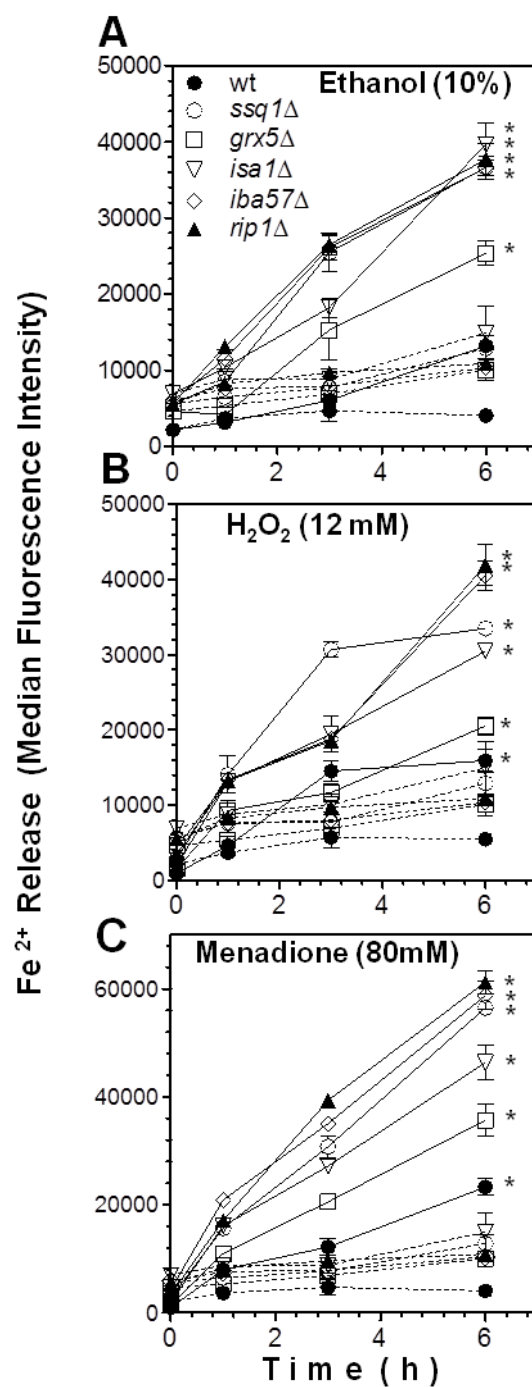


Figure 3

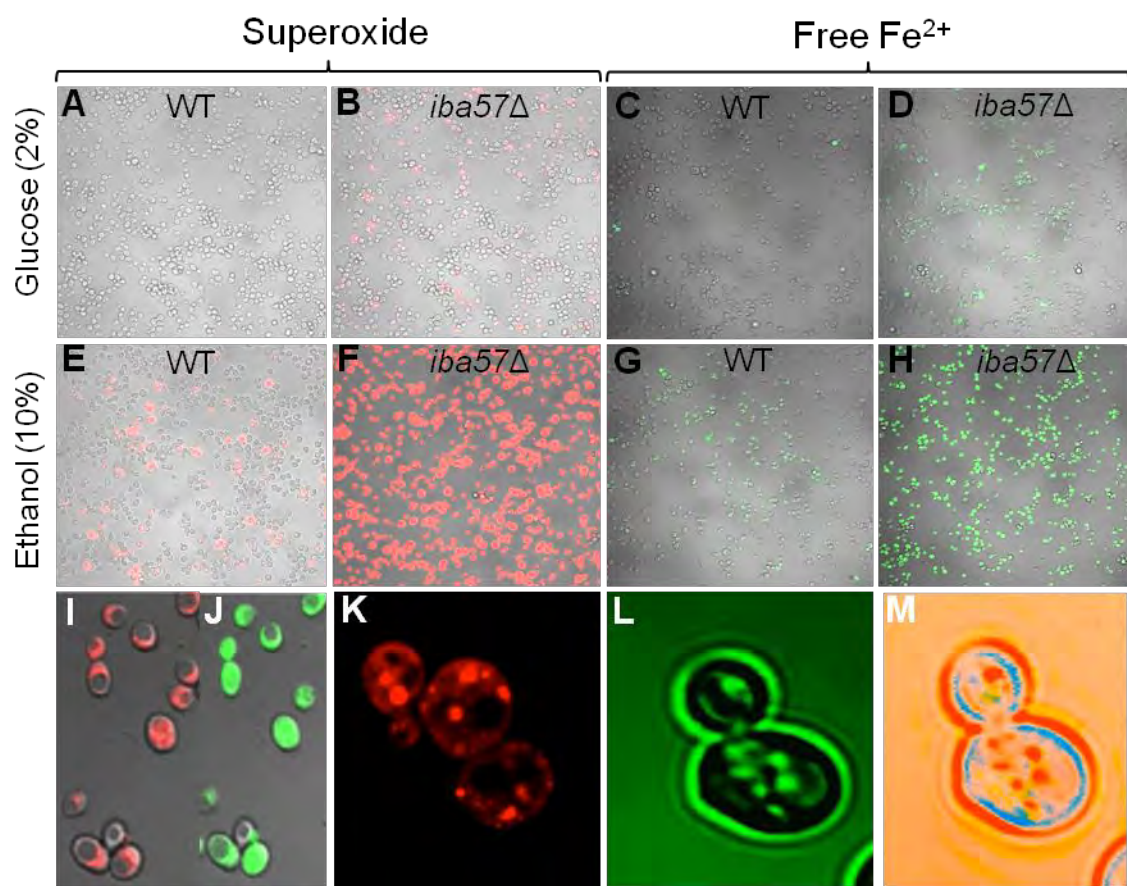


Figure 4

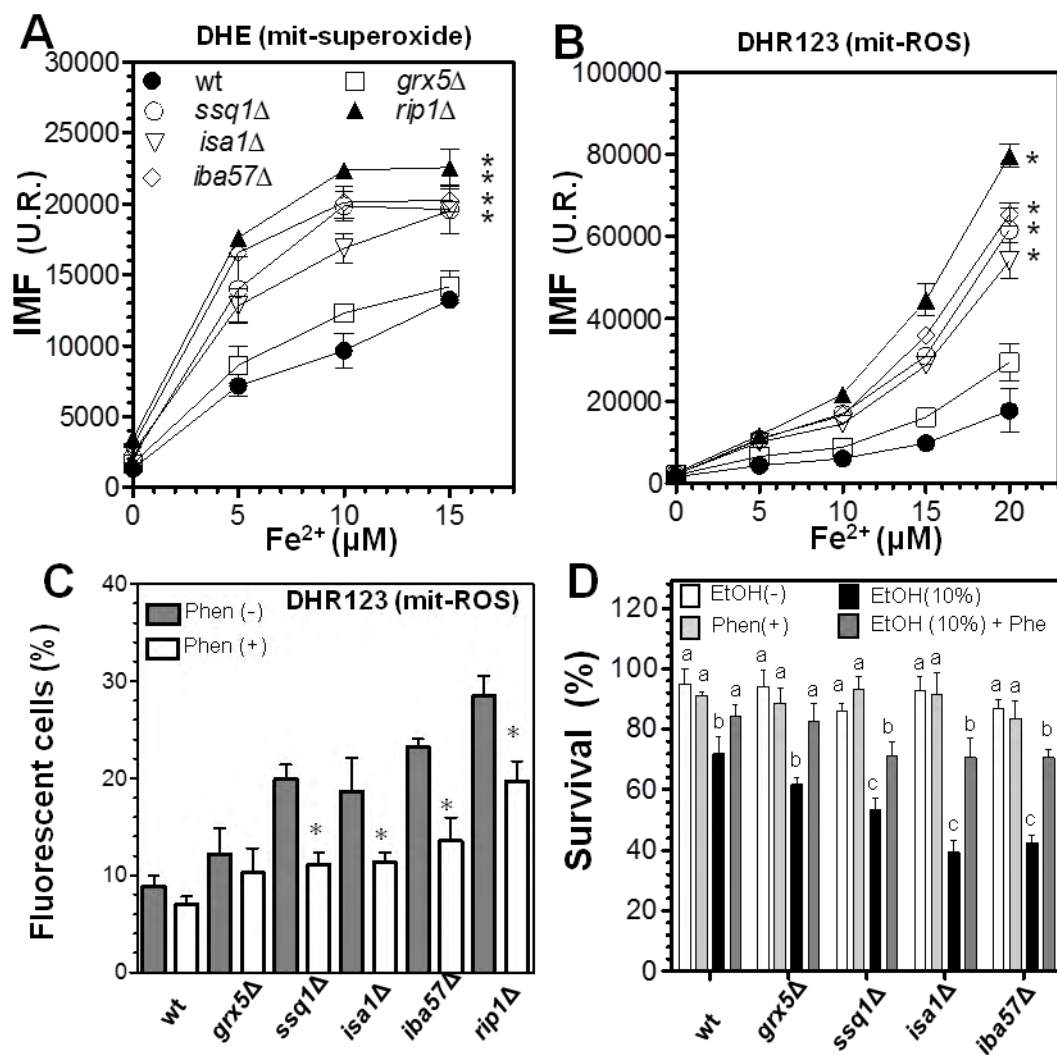


Figure 5

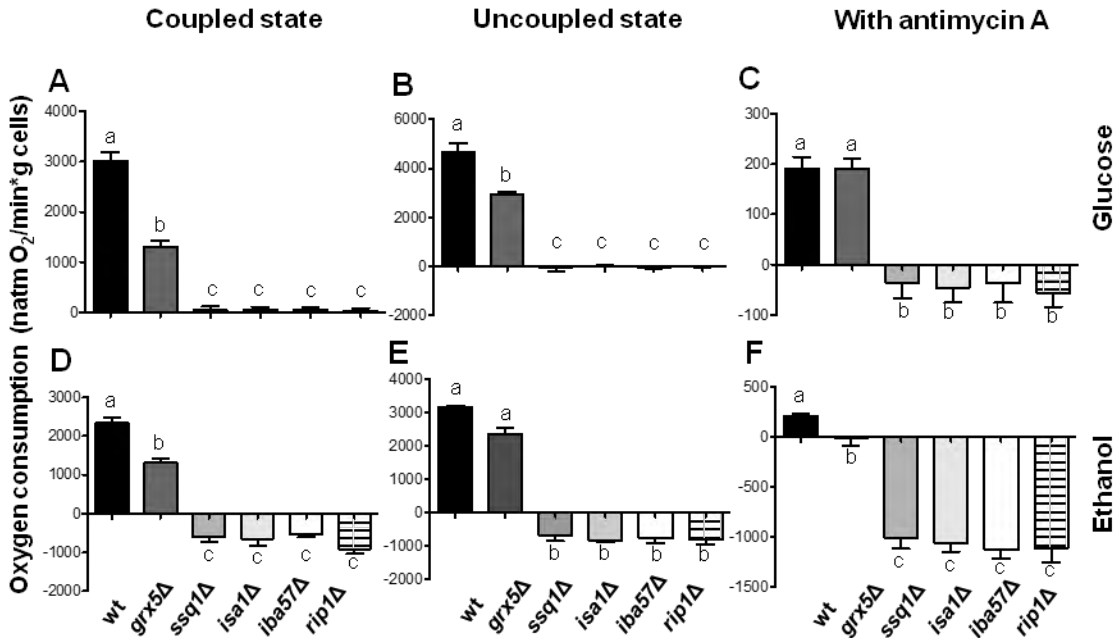


Figure 6

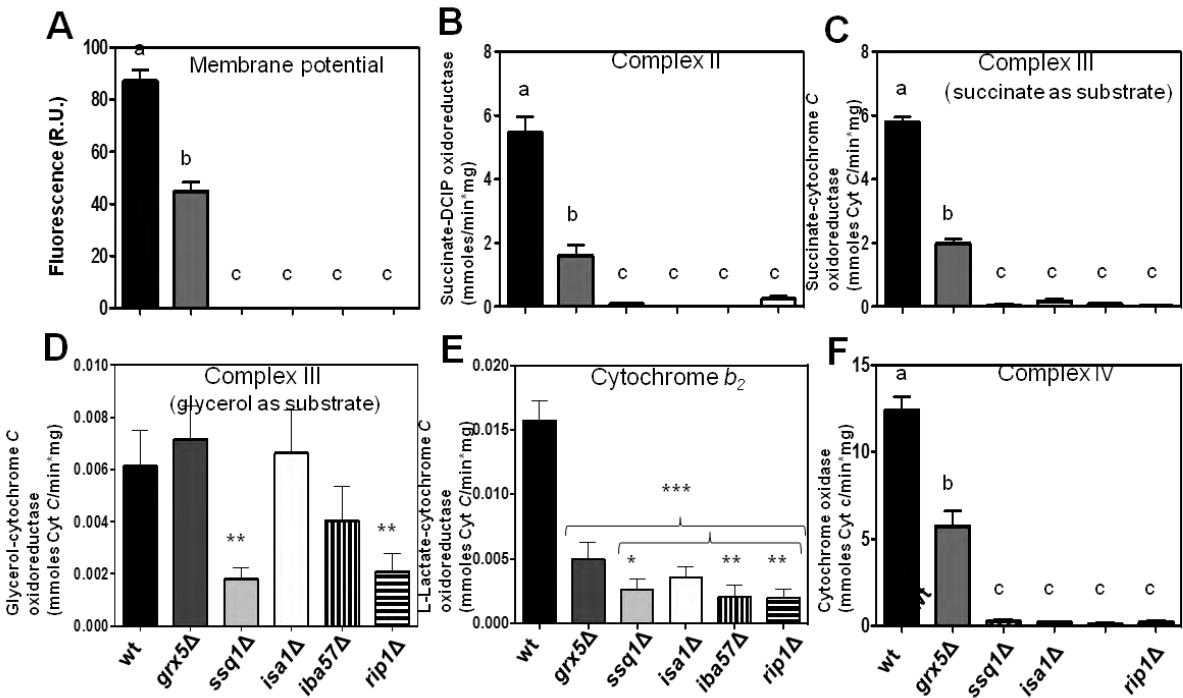


Figure 7

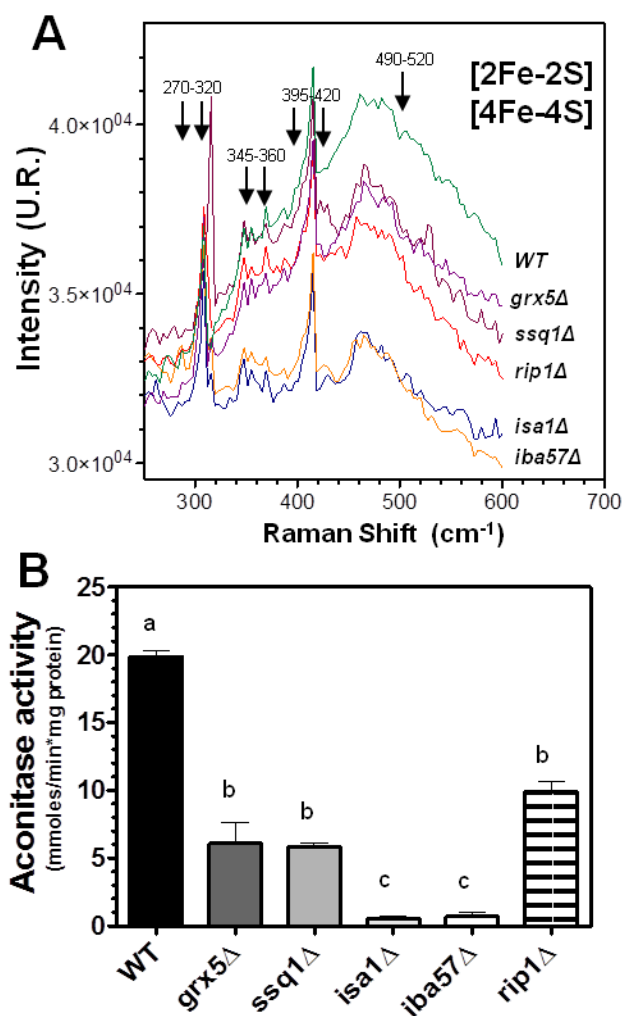


Figure 8

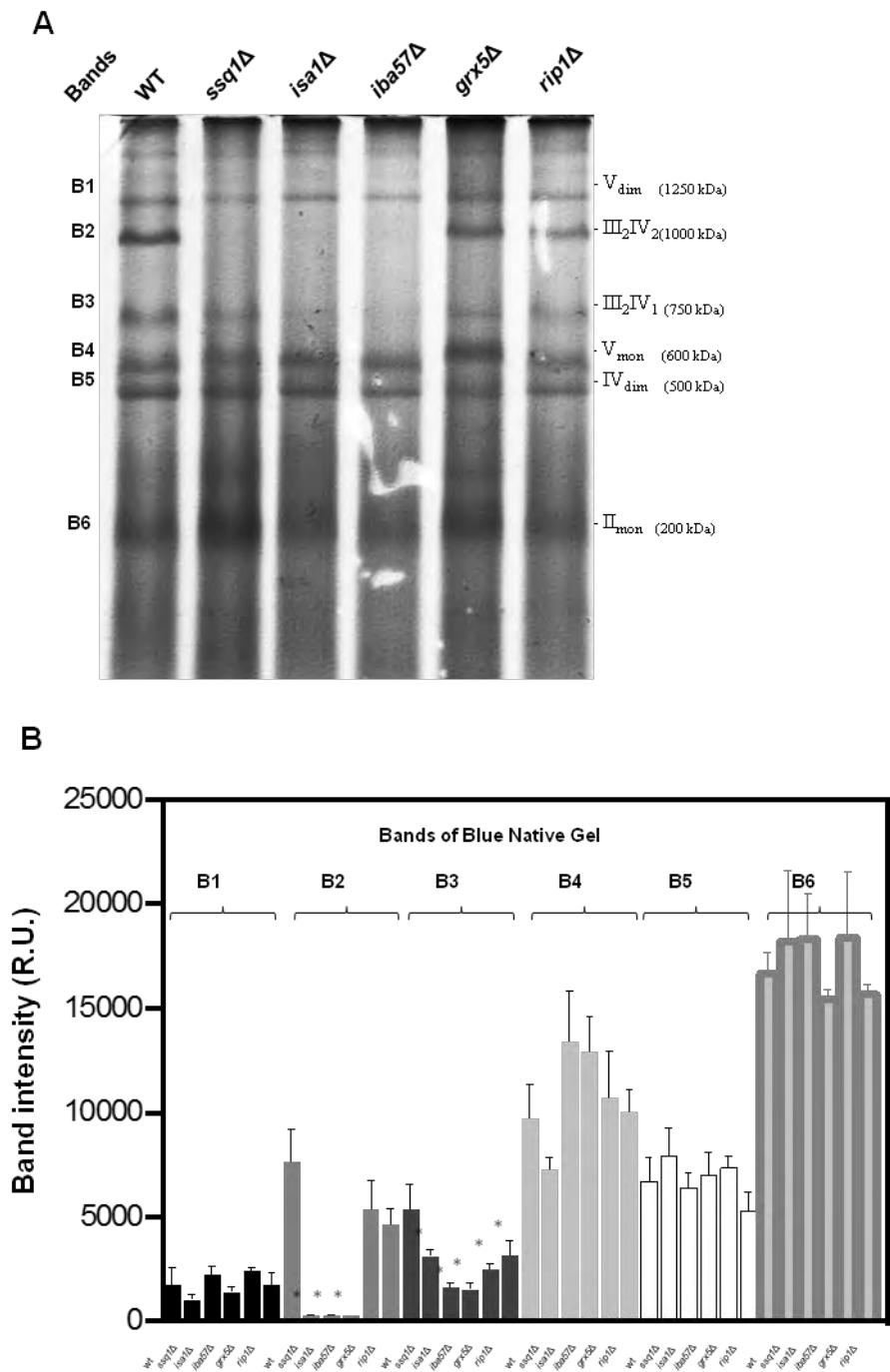


Figure 9

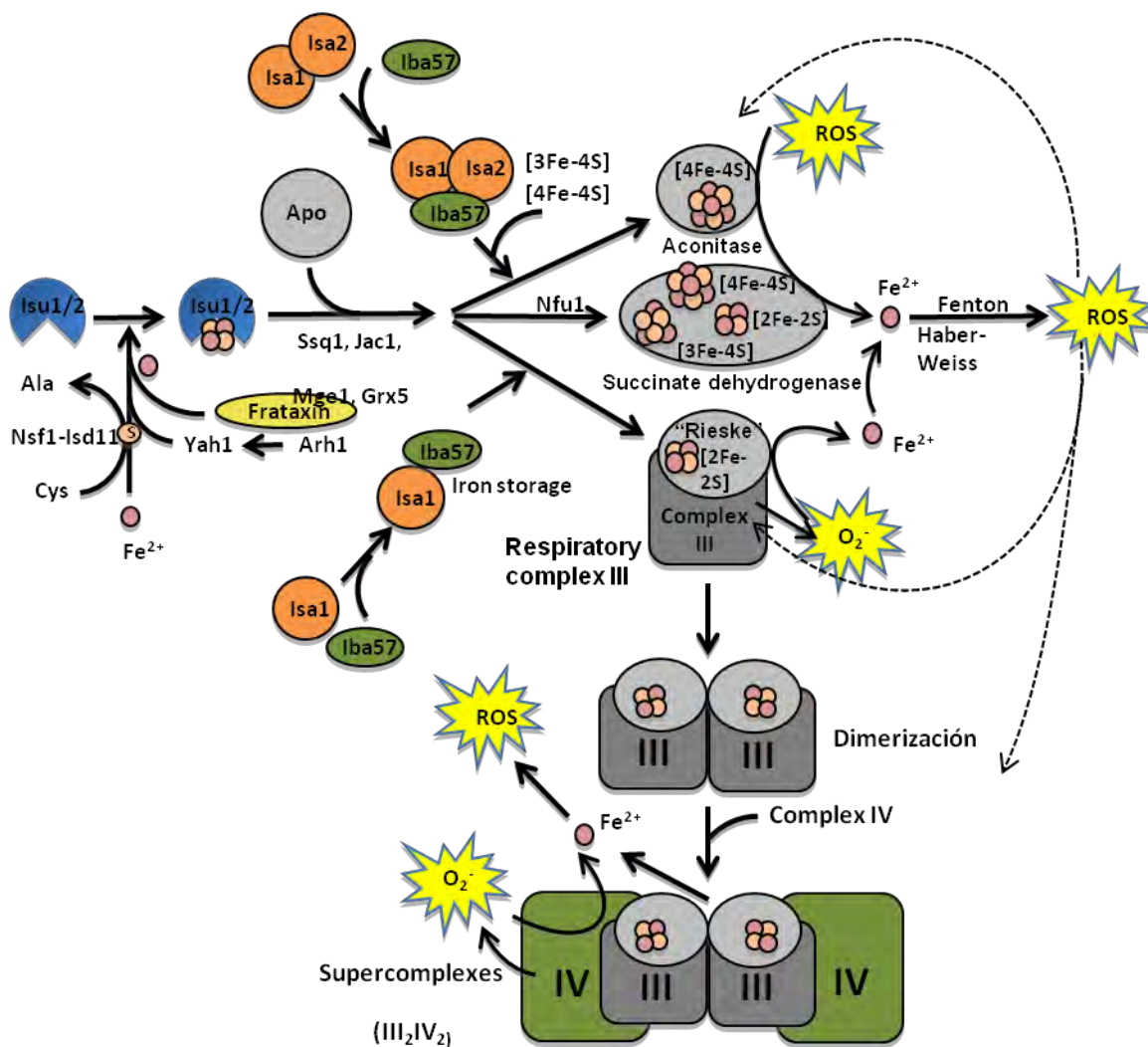


Figure 10

5.- RESULTADOS ADICIONALES

5.1 La tolerancia a estrés oxidativo es afectada por mutaciones en el sistema ISC de *S. cerevisiae*

Se sabe que uno de los efectos tóxicos del etanol en *S. cerevisiae* es la generación de ERO, por lo tanto este agente debería de tener efectos similares a sustancias generadoras de ERO. Para evaluar la participación de proteínas pertenecientes al sistema ISC de *S. cerevisiae* sobre la tolerancia a estrés oxidativo, se efectuaron pruebas de susceptibilidad a los generadores de ERO H_2O_2 y menadiona realizando curvas dosis-respuesta así como diluciones en caja. Las cepas mutantes *ssq1Δ*, *isa1Δ* y *iba1Δ* presentan menor crecimiento en presencia de H_2O_2 y menadiona comparadas con la silvestre, mientras que las cepas mutantes *isu1Δ*, *grx5Δ*, así como las cepas controles (*acol1Δ* y *sdh2Δ*) muestran un comportamiento similar a la silvestre (Fig.1a). Fenotipos similares fueron encontrados en los ensayos de dosis-respuesta (Fig. 1b-c). En estos ensayos no se presentan los resultados de las cepas controles, sin embargo, datos previamente obtenidos en nuestro grupo de trabajo muestran que estas cepas presentan un comportamiento similar a la silvestre.

Para obtener datos numéricos de este efecto se calculó la concentración inhibitoria media (C_{150}) para cada sustancia a partir de los datos obtenidos de las curvas dosis-respuesta. Encontrando que para H_2O_2 (en mM) fue de: *Δssq1* (7.1 ± 0.96), *Δisu1* (19.1 ± 0.81), *Δisa1* (10.1 ± 0.18) y *Δiba57* (8.8 ± 0.27), mientras que en la silvestre ésta fue de 20.1 ± 0.91 mM de H_2O_2 . Resultados similares fueron observados con menadiona, encontrando la C_{150} de *Δssq1* (99.6 ± 0.12), *Δisu1* (148.7 ± 0.21), *Δisa1* (88.1 ± 0.11) y *Δiba57* (76 ± 0.27) μ M de menadiona y para la silvestre de 158.1 ± 0.17 μ M menadiona. Lo que indica que la tolerancia de *S. cerevisiae* a los generadores de ERO se encuentra claramente disminuida en las mutantes en los genes *SSQ1*, *ISA1* e *IBA57*. Además, la similitud en los efectos sobre el crecimiento del etanol y los generadores de ERO de las cepas mutantes señalan que la toxicidad del etanol vía estrés oxidativo está relacionado con el sistema ISC.

Se ha considerado al acetaldehído, un metabolito del etanol, como el principal causante de la toxicidad del etanol. Se sabe que este metabolito es generador de estrés

oxidativo (Fridovich, 1989; Novitskiy *et al.*, 2006), por lo tanto, la posible generación de ERO por etanol podría ser vía acetaldehído. Para analizar el efecto del acetaldehído sobre el crecimiento de nuestras cepas se realizó una curva dosis-respuesta en presencia del acetaldehído. Se observó que el acetaldehído a una baja concentración provoca una disminución sobre el crecimiento en todas las cepas, siendo este efecto superior en las mutantes *ssq1Δ*, *isaΔ* y *ibaΔ*; observando un fenotipo similar al obtenido con etanol, H_2O_2 y menadiona.

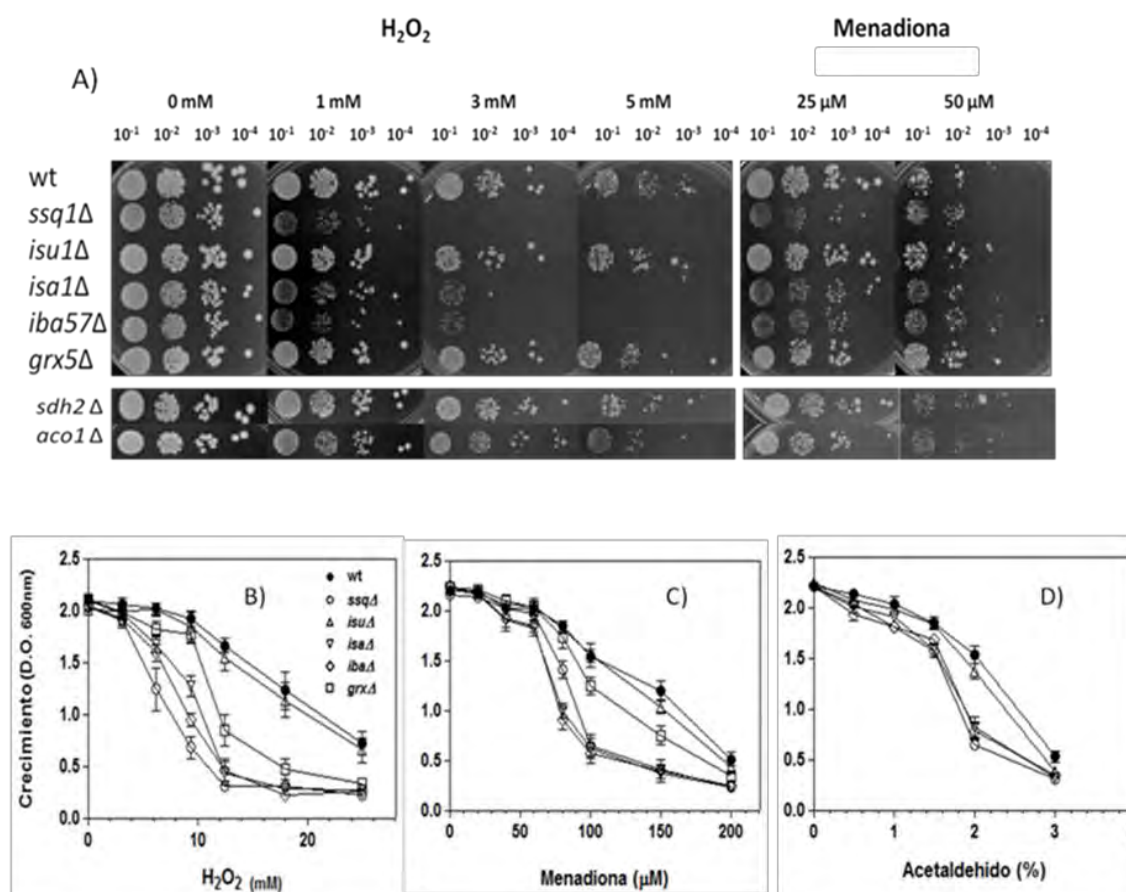


Figura 1.- Efecto generadores de ERO en mutantes del sistema ISC de *S. cerevisiae*.

Cultivos crecidos en fase exponencial fueron lavados y resuspendidos en PBS (10^6 células/ml), 10 μ L de la suspensión de cada cepa y diluciones seriadas (10^1 - 10^4) fueron inoculadas en cajas con YPD sólido con diferentes concentraciones de H_2O_2 y menadiona A) las cuales fueron incubadas a 30 °C por 72 h. Cultivos de levadura fueron crecidos en medio YPD líquido con diferentes concentraciones de H_2O_2 B), menadiona C), y acetaldehído D) incubadas a 30°C por 12 h con agitación constante. Posteriormente el crecimiento fue registrado por densidad óptica (D.O. ₆₀₀). Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes (por triplicado), las barras indican el error estándar. 2-Anova Bonferroni * $p < 0.05$ vs wt.

5.2 Las defensas antioxidantes son alteradas por mutaciones en el sistema ISC y etanol en *S. cerevisiae*

Durante el estrés oxidativo existe un incremento de ERO y/o disminución en las defensas antioxidantes. Para evaluar si el estrés oxidativo provocado por etanol altera los sistemas antioxidantes se analizaron algunas defensas antioxidantes. El glutatión es el compuesto tiólico más abundante dentro de las células, siendo el sistema antioxidante más importante. En *S. cerevisiae* el glutatión se encuentra principalmente en la mitocondria. Cabe mencionar que en la fig. 5 del capítulo 1 se muestran resultados del glutatión, sin embargo, para comparar con tiempos superiores (6 h) se muestran los tiempos de 0 y 3 h. Ensayos realizados en mitocondrias muestran que la mutación en los genes *SSQ1*, *ISA1* e *IBA57* provocan una disminución significativa tanto en el contenido total de glutatión como en el contenido de GSH con respecto a la cepa silvestre (Fig. 2a), siendo este efecto superior en presencia de etanol incubado durante 3 y 6 h (Fig. 2b-c). Mientras que la mutación en los genes *SDH2*, *ACO1* y *COX2* no muestran diferencias significativas (Fig. 2a-c). Con respecto a la relación GSH/GSSG, la cual es el mejor indicador de daño oxidativo, la mutación en los genes *SSQ1*, *ISA1* e *IBA57* promueven una disminución en la relación GSH/GSSG (Fig. 2d). En presencia de etanol (3 h) esta disminución es significativamente alterada (Fig. 2e), mostrando además que en tiempos prolongados (6 h) la relación GSH/GSSG se encuentra dramáticamente disminuida, indicando que el etanol provoca daño oxidativo el cual es exacerbado por un sistema ISC disfuncional. Dentro de los antioxidantes enzimáticos, la catalasa junto con la superóxido dismutasa conforman la primera línea de defensa, además, el peróxido de hidrógeno sustrato de la catalasa en presencia de hierro libre producen el radical hidroxilo. En este estudio se analizó la actividad de la catalasa. Todas las mutantes, a excepción de *aco1Δ*, muestran un incremento en la actividad de la catalasa comparadas con la silvestre, mientras que la mutante *isu1Δ* muestra una menor actividad (capítulo 1, fig. 6a; Fig. 2g). Sin embargo, en presencia de etanol (10%, 3 h) la cepa silvestre y la mutante *aco1Δ* muestran un incremento en la actividad, lo que indica que el etanol promueve la actividad de la catalasa como respuesta a la producción de ERO generadas. Mientras que en las mutantes no se observó diferencia a este tiempo de incubación, probablemente por encontrarse inducida desde el inicio.

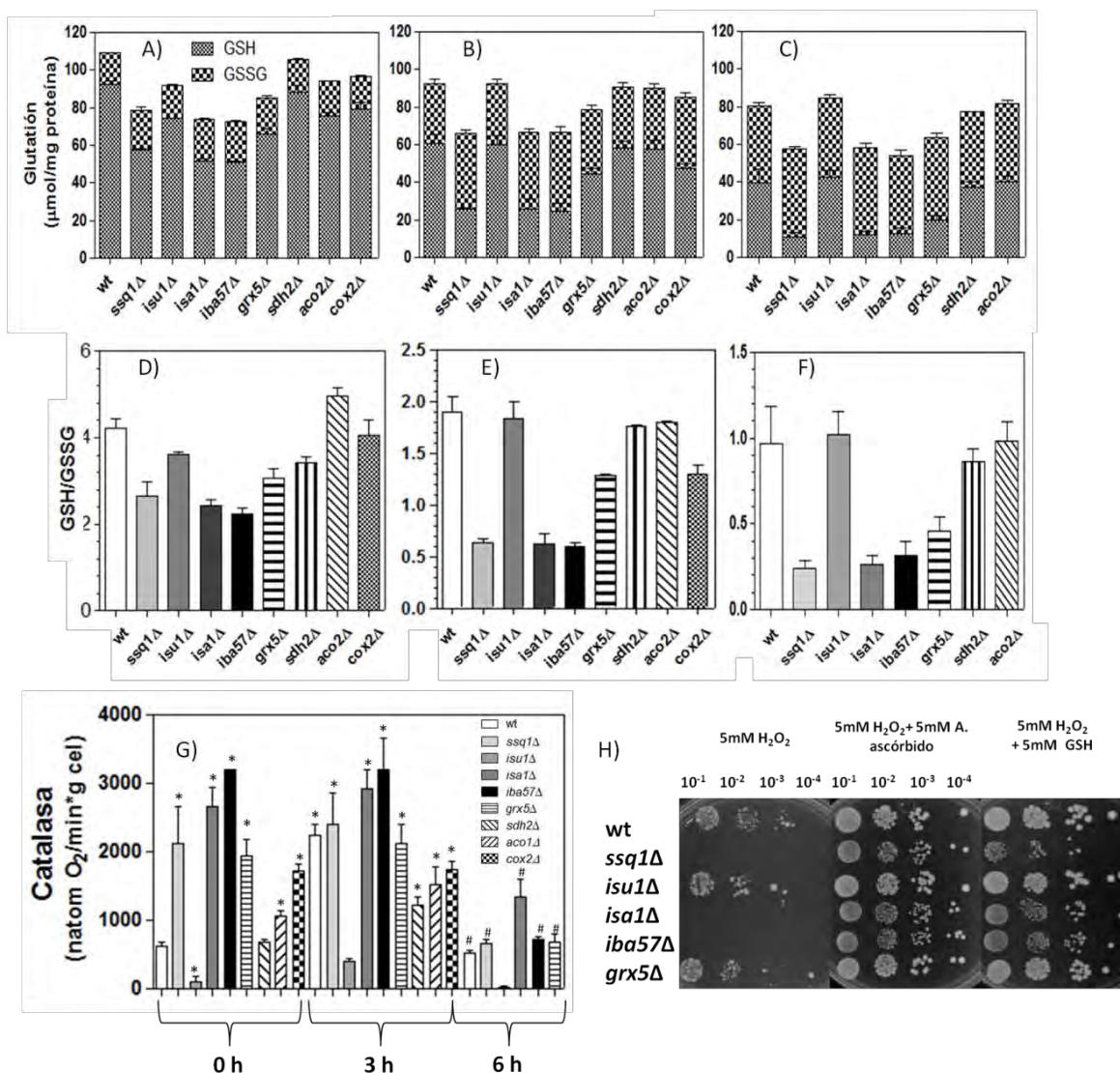


Figura 2.- Cuantificación de glutatión, actividad de catalasa y efecto de antioxidantes en mutantes de *S. cerevisiae* en el sistema ISC. Contenido de glutatión y relación GSH/GSSG en mitocondrias aisladas de cultivos con etanol (10%) incubadas 0 h (A y D); 3 h (B y E) y 6 h (C y F), respectivamente. Células crecidas en fase exponencial fueron tratadas con y sin etanol (10%) y la actividad de la catalasa fue analizada a diferentes tiempos de incubación (g). Cultivos crecido en fase exponencial fueron lavados y suspendidos en PBS (10⁶ células/ml), 10 μL de la suspensión de cada cepa y diluciones seriadas (10⁻¹-10⁻⁴) fueron colocadas en cajas con YPD sólido con diferentes concentraciones de H₂O₂ más 5mM de ácido ascórbico o GSH, posteriormente fueron incubadas a 30 °C por 48h h). Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes las barras indican el error estándar. 1-Anova Bonferroni * p < 0.05 vs wt y # vs incubación 3 h.

Sin embargo, a tiempos de incubación superiores (6 h) la actividad disminuyó significativamente en todas las cepas comparadas con la incubación a 3 h. Lo cual indica que la catalasa es afectada por el elevado incremento de ERO observadas a este tiempo (Fig. 2g). Como se muestra en la fig. 6b del capítulo 1 la adición de compuestos antioxidantes como ácido ascórbico y GSH revertieron en mayor o menor medida la toxicidad del etanol (10%). También observamos el mismo fenotipo al adicionar estos antioxidantes en presencia de H₂O₂ (Fig. 2h); indicado que la toxicidad del etanol es vía estrés oxidativo y que la adición de agentes antioxidantes produce un efecto protector.

6.- DISCUSIÓN

Saccharomyces cerevisiae es la levadura asociada a la fermentación alcohólica y está íntimamente relacionada al progreso y bienestar de la humanidad. Recientemente, su importancia ha incrementado por su utilización en la obtención de biocombustibles. La producción rentable de etanol depende, entre otros factores, de la rapidez y el alto rendimiento en la conversión de los azúcares a etanol, lo que a su vez depende de la capacidad de las levaduras para sobrevivir bajo las condiciones encontradas en los procesos industriales (Snowden *et al.*, 2009). A pesar de la inherente capacidad que posee *S. cerevisiae* para producir y tolerar etanol, este puede llegar a ser letal a concentraciones altas. El conocimiento del impacto de la toxicidad del etanol en la célula y como ésta responde, puede contribuir a encontrar estrategias para mejorar la tolerancia a etanol (Stanley *et al.*, 2010). Se han descrito una gran variedad de genes involucrados en la tolerancia a etanol, estos genes abarcan una gran diversidad de funciones biológicas que van desde biosíntesis de ácidos grasos hasta metabolismo y respuesta a estrés general (Ma y Liu, 2010). Sin embargo, los mecanismos de la tolerancia a etanol aún no son totalmente comprendidos.

Además de su trascendental uso industrial, *S. cerevisiae* ha sido el modelo eucariota elegido por excelencia en la investigación científica debido a sus múltiples ventajas; se reproduce fácilmente es manipulable genéticamente en el laboratorio, lo cual ha contribuido importantemente a elucidar procesos básicos de la fisiología celular y de patogenesis en eucariotas superiores (Chang y Burgess, 2002). En relación a esto, el estudio del efecto del etanol en los seres humanos ha tomado gran relevancia debido a las consecuencias patológicas de su consumo. Estudios tanto en mamíferos (Hoek *et al.*, 2002) como en

levadura (Costa *et al.*, 1993; Kitagaki *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012), sugieren que la toxicidad del etanol esta relacionada con el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial; sin embargo, a pesar de las intensas investigaciones realizadas los mecanismos aún no son claros.

Por otro lado, estudios previos sugieren que el sistema ISC podría estar relacionado con la tolerancia a etanol tanto en bacterias (Campos-García *et al.*, 2001) como en la levadura (Yoshikawa *et al.*, 2009). Este sistema localizado en la mitocondria es esencial para el ensamble y/o reparación de centros [Fe-S] de la célula y está compuesto por aproximadamente 17 proteínas codificadas por genes nucleares entre los que se encuentran: *NFS1*, *ISU1*, *ISU2*, *ISAI*, *ISA2*, *JAC1*, *SSQ1*, *YAH1*, *GRX5*, y *IBA57* (Lill *et al.*, 2012). Este sistema también participa en la homeóstasis del hierro, el cual en estado libre provoca estrés oxidativo. Con base en todo lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue estudiar el mecanismo de tolerancia a etanol, su relación con el estrés oxidativo y la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] usando como modelo de estudio la levadura de *S. cerevisiae*.

Se ha sugerido que el producto de del gen *ISAI* de la levadura es importante para la tolerancia a etanol (Yoshikawa *et al.*, 2009). Sin embargo, no existen estudios más detallados y directos acerca de la relación entre el sistema ISC y la tolerancia a etanol en *S. cerevisiae*. La función del sistema ISC es complejo, sin embargo, se pueden indentificar dos procesos principales: el centro [Fe-S] se ensambla inicial y transitoriamente ensamblado en la proteína Isu1p y posteriormente, se libera, transporta e incorpora a la apo-proteína receptora con la participación de Ssq1p, Jac1p y Grx5p (Lill *et al.*, 2012). Para la incorporación de los centros [4Fe-4S] cúbicos de proteínas mitocondriales son requeridas las proteínas Isa1/2p e Iba57p (Mühlenhoff *et al.*, 2012).

En este estudio se analizó la participación del sistema ISC en el mecanismo de tolerancia a etanol en *S. cerevisiae* usando cepas mutantes en los genes *ISU1*, *SSQ1*, *ISAI*, *IBA57* y *GRX5*, los cuales participan en distintos pasos de la biogénesis de proteínas con centro [Fe-S]. Los resultados indican que la mutación de los genes *SSQ1*, *ISAI* e *IBA57* disminuyen significativamente la tolerancia a etanol, lo cual se vio reflejado como una mayor inhibición del crecimiento, mostrando una concentración inhibitoria 50 (CI_{50EtOH}) para estas cepas de 15-20 % más baja comparadas con la silvestre, así como una

disminución significativa en la sobrevivencia en presencia de concentraciones tóxicas de etanol (10%) mostrando menos del 50% de sobrevivencia a tiempos de incubación elevados (6 h) y un tiempo letal 50 ($TL_{50(EtOH\ 10\%)}$) de 3-4 h, mientras que en la cepa silvestre fue de 11 ± 1.5 h (Fig. 1 y 2, capítulo 1). Estos datos por lo tanto corroboran la idea de Yoshikawa *et al.* (2009) de que los productos de los genes *ISC* pueden estar involucrados en la tolerancia a etanol en *S. cerevisiae*. El efecto del etanol sobre el crecimiento y la sobrevivencia fue menor en las mutantes *isu1Δ* y *grx5Δ*, lo que indica que la mutación de estos genes afecta en menor medida la tolerancia a etanol. En el caso de mutante *isu1Δ*, la menor toxicidad al etanol podría estar relacionada con la existencia de un gen homólogo de *ISU1*, el gen *ISU2*, lo cual sugiere una complementación de dicha función. En relación al fenotipo observado en la cepa *grx5Δ*, se podría hipotetizar que esta función no es esencial y probablemente otra/s proteína/s podrían suplir su función.

El interés principal de este trabajo fue conocer de qué manera el sistema ISC puede estar participando en el mecanismo de tolerancia a etanol. No obstante que la hipótesis planteada de inicio fue que el sistema ISC participa en el mecanismo de tolerancia a etanol, cabe la posibilidad de que también alguna o algunas proteínas con centros [Fe-S] sintetizadas por este sistema estén involucradas en el mecanismo de tolerancia a etanol. Existe una gran variedad de proteínas con centros [Fe-S] las cuales cumplen diversas funciones biológicas (Tabla 1); sin embargo, el hecho de que el fenotipo de sensibilidad al etanol fue claramente marcado en las cepas mutantes en los genes *SSQ1*, *ISA1* e *IBA57* disminuye el número de proteínas a solo aquellas proteínas mitocondriales con centros [4Fe-4S]. Las proteínas mitocondriales específicamente con este cofactor son la aconitasa (Aco1p), la homoaconitasa (Lys4p), la biotina sintasa (Bio2p), la lipoato sintasa (Lip5p) y la subunidad 2 (Sdh2p) del complejo succinato deshidrogenasa (Mühlenhoff *et al.*, 2012).

La aconitasa es la enzima que participa en la segunda reacción del ciclo de Krebs y cataliza la isomerización estereo-específica de citrato a isocitrato vía la formación de *cis*-aconitato, donde el centro [4Fe-4S] se encuentra en el sitio catalítico y es el responsable de la unión al sustrato. La aconitasa posee una función dual al participar como nucleóide protegiendo al ADNmt del daño oxidativo (Chen *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que mientras el centro [4Fe-4S] es esencial para la actividad catalítica de la

aconitasa, no lo es para su actividad protectora del ADNmt. Sin embargo, un estudios realizados por Gelling *et al.* (2008) han mostrado que la mutante *iba57Δ* provoca un aumento en la apoproteína insoluble de Aco1p insoluble en la membrana mitocondrial interna. Esto indica que a pesar de los altos niveles de apo-Aco1p no son suficientes para la protección del ADNmt. Por lo tanto, esta función podría ser mas importante en la tolerancia a etanol que su actividad en el ciclo de Krebs ya que se ha sugerido que la degradación oxidativa del ADNmt es un factor importante que contribuye a la toxicidad del etanol en la mitocondria (Ibeas y Jiménez, 1997; Mansouri *et al.*, 2001). Sdh2p es otra proteína mitocondrial con tres centros [Fe-S], dentro de los cuales uno es del tipo [4Fe-4S], cuya función es transportar los electrones de la oxidación del succinato hacia la (CTE). A pesar de que previamente se había reconocido que el complejo II no contribuye significativamente a la producción de ERO, algunos datos recientes muestran que existe una considerable generación de ERO por este complejo en modelos de roedores (Quinlan *et al.*, 2012). Otras proteínas con centros [4Fe-4S] son la lipoato sintasa y la biotina sintasa; estas proteínas catalizan uno de los pasos de la vía de la síntesis de los cofactores ácido lipóico y biotina, respectivamente. El ácido lipóico participa en el complejo PDH, además puede actuar como antioxidante en su forma reducida (Packer *et al.*, 1995; Gurer *et al.*, 1999; Shay *et al.*, 2009) y como quelante de metales pesados (Rooney, 2007). Estudios previos de análisis sistemáticos con mutantes de *S. cerevisiae* han sugerido que Lip5p es importante en la tolerancia a etanol (Yoshikawa *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2009), así como en el mantenimiento del ADNmt (Sulo y Martin, 1993). La biotina ha sido ampliamente reconocida por su participación como coenzima unida covalentemente a carboxilasas (Knowles, 1989). Estudios recientes muestran que la biotina también tiene un papel único en señalización celular, la regulación epigenética y en la estructura de la cromatina (Zempleni, 2005). Sin embargo, su deficiencia no ha sido relacionada con sensibilidad al etanol. Con estos antecedentes se analizó en este estudio se analizó la participación de las proteínas Aco1p y Sdh2p en la tolerancia a etanol usando cepas de *S. cerevisiae* mutantes en estos genes. Sin embargo, aunque la cepa *sdh2Δ* mostró una ligera disminución en el crecimiento a 8 % de etanol (Fig. 1b, capítulo 1) la mutación en estos genes no influyó de manera significativa en la tolerancia a etanol, mostrando fenotipos similares a la cepa silvestre (Fig. 1 y 2, capítulo 1).

Análisis previos de nuestro grupo de trabajo mostraron que la mutación de *LIP5* no afecta tampoco la tolerancia a etanol (datos no mostrados). Esto indica que las proteínas blanco de Isa1p/Iba57p no son las responsables del fenotipo observado en las mutantes *isa1Δ* y *iba57Δ*, o por lo menos no en ausencia de una de estas proteínas blanco. Por otra parte los datos obtenidos con la cepa *aco1Δ* pueden explicarse en función de la existencia de una posible isoenzima codificada por el gene parálogo *ACO2* (Van den Berg *et al.*, 1998). Cabe señalar que aunque las alteraciones en el sistema ISC provocan una deficiencia respiratoria, el fenotipo de susceptibilidad a etanol podría estar relacionado con una incapacidad para metabolizarlo. Por lo tanto, cualquier alteración en la CTE podría mostrar el mismo fenotipo. Por esta razón, se analizó la mutante de la subunidad *cox2Δ* del complejo IV, la cual no contiene centros [Fe-S], en la cual se encontró una ligera disminución en el crecimiento en presencia de etanol a concentraciones de 8% (Fig. 1a, capítulo 1), no obstante, el efecto del etanol fue menor que en las mutantes *ssq1Δ*, *isa1Δ* y *iba57Δ*. También, se observó que la mutación en *COX2* provoca una disminución en la velocidad de crecimiento en presencia de altas concentraciones de etanol (10%) (Fig. 2c, capítulo 1). Sin embargo, a esas concentraciones no se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia respecto a la silvestre (Fig. 1c, capítulo 1). Lo que sugiriría que un sistema ISC disfuncional tiene un mayor efecto en la tolerancia a etanol más que un bloque o disfunción en la CTE. Sin embargo, análisis de nuestro grupo de trabajo mostraron que la mutación en la subunidad *RIP1* del complejo III, el cual contiene un centro [2Fe-2S] tiene un efecto similar que la mutación en *IBA57* en presencia de etanol (datos no mostrados). Lo que indica la importancia de esta proteína en la tolerancia a etanol.

Con el objetivo de dilucidar el posible mecanismo que relaciona la tolerancia a etanol en *S. cerevisiae* y su relación con la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] se analizó el papel del sistema ISC en la regulación del hierro y su inherente toxicidad. Se ha demostrado que el sistema ISC también es crucial para mantener la homeóstasis del hierro no sólo mitocondrial (Schilke *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999), sino también de toda la célula (Chen *et al.*, 2004; Rutherford *et al.*, 2005). Se sabe que una alteración en el sistema ISC promueve la entrada de hierro a la célula vía Atf1p. Se ha reportado que la activación de Atf1 no es dependiente del hierro citosólico, sino de la disponibilidad de hierro mitocondrial mediante un producto generado por el del sistema ISC y exportado por Atm1p

(Rutherford *et al.*, 2005). Así, la depleción de Nfs1p (cisteína desulfurasa) incrementa hasta 30 veces los niveles de hierro mitocondrial en comparación con la silvestre (Kogan *et al.*, 1999). La mitocondria es el sitio donde se llevan a cabo los dos procesos de mayor utilización del hierro: la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S] y biosíntesis de grupos hemo, por lo que resulta claro el papel crucial que desempeña la mitocondria en la regulación global de numerosos procesos celulares relacionados con la homeóstasis de hierro (Hausmann *et al.*, 2008). El manejo del hierro por la mitocondria debe de estar altamente regulado para evitar el incremento en la concentración del dañino hierro libre. Los iones Fe^{+2} y Fe^{3+} catalizan la formación del altamente reactivo radical hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$) en la presencia del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y H_2O_2 a través del ciclo Haber-Weiss y la reacción del Fenton. La mitocondria es la principal fuente de estas ERO producidas fisiológicamente a través de la CTE; sin embargo, diversos factores promueven un incremento en la generación de ERO, tal es el caso de la toxicidad generada por etanol en *S. cerevisiae* (Costa *et al.*, 1993; Kitagaki *et al.*, 2007).

Para evaluar la participación del sistema ISC sobre la tolerancia a estrés oxidativo y su posible correlación con la tolerancia a etanol, en el presente estudio se analizó la susceptibilidad a sustancias generadores de estrés oxidativo como el H_2O_2 y la menadiona (un generador de $\text{O}_2^{\bullet-}$) en las diferentes cepas mutantes. A este respecto, se observó un comportamiento similar al obtenido con etanol; las mutantes en *SSQ1*, *ISAI* e *IBA57* muestran claramente un incremento significativo en la susceptibilidad a sustancias oxidantes, ya que se observó que la CI_{50} para H_2O_2 disminuyó (35-50%) para las éstas cepas comparadas con la silvestre, mientras que para la menadiona la disminución fue del 45-50% (Fig. 1, capítulo 2; Fig. 1a-c, resultados adicionales). Sin embargo, la cepa mutante en *GRX5* también muestra una disminución en el crecimiento en presencia de los generadores de ERO en la curva dosis respuesta no siendo así en las diluciones en caja (Fig. 1a-b, resultados adicionales). Esto podría explicarse por una menor superficie de contacto del compuesto y la levadura en medio sólido, lo cual se refleja en un menor estrés generado. Adicionalmente, se observa que la mutación en los genes *ACO1* y *SDH2* no afecta la tolerancia a los generadores de ERO (Fig. 1a-c, resultados adicionales). Sin embargo, se observó que tanto el H_2O_2 como la menadiona provocan una mayor disminución en la velocidad de crecimiento en la mutante *rip1Δ* (Fig. 1, capítulo 2). Estos datos indican que la

tolerancia de *S. cerevisiae* a sustancias generadores de ERO fue claramente disminuida en las cepas *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ* y *rip1Δ*. La similitud de la participación del sistema ISC sobre la tolerancia a etanol y los generadores de ERO sugieren que la toxicidad del etanol puede estar relacionada por la generación de ERO. En relación a esto se sabe que el acetaldehído, un metabolito del etanol es un potente generador de ERO, por lo tanto, una vía de generación de ERO podría ser promovida por el acetaldehído (Fridovich, 1989; Novitskiy *et al.*, 2006). En concordancia con lo anterior, las mutantes ISC que poseen mayor sensibilidad al etanol y compuestos generadores de ERO también lo son para el acetaldehído (Fig. 1d, resultados adicionales).

Para comprobar que el etanol efectivamente promueve un incremento en la generación de ERO y que esto es exacerbado por la disfunción en el sistema ISC, se analizaron mediante citometría de flujo los niveles intracelulares de ERO usando tres sondas fluorescentes sensibles a ERO. En ausencia o en presencia de etanol (10%) existe un incremento tanto en el porcentaje de células fluorescentes (PCF) como en la intensidad media de fluorescencia (IMF) en las mutantes ISC. El crecimiento de las mutantes ISC no fue disminuido o deteriorado en condiciones fermentativas (Fig. 1a (0%) y 2a, capítulo 1), por lo que se sugiere que los niveles de ERO encontrados en las mutantes no son suficientemente tóxicos o los mecanismos de neutralización fueron capaces de contrarrestar sus efectos. Sin embargo, la mutante *rip1Δ* muestra niveles de ERO mayores comparados con las mutantes ISC aun sin etanol (Fig. 2, capítulo 2), lo cual concuerda con la mayor sensibilidad de ésta cepa a los generadores de estrés oxidativo (Fig. 1, capítulo 2), lo que indica la importancia de esta proteína en mantener bajos niveles de ERO. Interesantemente, en presencia de etanol el mayor incremento tanto en la IMF como en el PCF fue observado en las cepas *ssq1Δ*, *isa1Δ* y *iba5Δ* así como en la *grx1Δ*, aunque en menor grado comparadas con la cepa *isu1Δ* y la silvestre (Fig.3 y S1, capítulo 1). Además, la mutante *rip1Δ* muestra niveles superiores de ERO (Fig. 2a y 2d, capítulo 2). En *S. cerevisiae* la mayor fuentes de ERO es la CTE y puesto que los niveles de ERO fueron exacerbados en presencia de etanol, estos datos confirman que la generación de ERO (O_2^- y H_2O_2) por el complejo III de la CTE es dependiente de la funcionalidad del sistema ISC bajo tratamiento con etanol.

Además, para corroborar que tanto el O_2^- como el H_2O_2 producidos por la adición del etanol son responsables del fenotipo observado, se decidió analizar los niveles de ERO

en presencia de H_2O_2 y de menadiona. Bajo estas condiciones se detectó un comportamiento similar al obtenido con etanol (Fig. 2b-c y e-f, capítulo 2). Sin embargo, es ampliamente conocido que una disfunción mitocondrial provoca incremento en los niveles de ERO. Con el objetivo de excluir que el fenotipo de estrés oxidativo era un efecto secundario, se analizó la cepa mutante *cox2Δ* además de las mutantes *aco1Δ* y *sdh2Δ*. Los resultados indican que aunque la mutación en los genes *COX2* y *SDH2* provoca un aumento en los niveles de ERO en presencia de etanol comparados con la silvestre, éstos fueron menores que los observados en la mutantes *ISC* (Fig. 3, capítulo 1). Esto corrobora la participación del sistema ISC en la generación de ERO inducidas por etanol principalmente en el complejo III de la CTE.

Además de evaluar el efecto del etanol (10%) sobre los niveles de ERO al adicionarlo al medio de cultivo (mimetizando las concentraciones obtenidas durante la fermentación), también se evaluó el efecto de la acumulación del etanol durante el proceso de fermentación. Durante la fermentación una rápida conversión de glucosa a etanol es un factor clave para un proceso eficiente, lo cual a su vez depende de la capacidad que tenga la levadura de contrarrestar la toxicidad generada durante la acumulación de etanol. Para analizar este efecto de igual manera se analizó la producción de ERO de las diferentes cepas durante un ensayo de fermentación usando una concentración de glucosa capaz de producir suficiente etanol en concentraciones tóxicas (10%). Todas las cepas fueron capaces de crecer en medio YPD con 200 gL^{-1} de glucosa, observándose velocidades similares de consumo de glucosa y producción de etanol, lo que significa que las mutantes *ISC* no fueron afectadas significativamente en su capacidad fermentativa (Fig. 4a-b). A pesar de que a tiempos medios (24-72 h) los niveles de ERO en las mutantes *ISC* fueron similares o inferiores comparados con la silvestre, a tiempos prolongados (120-144 h), cuando las concentraciones de etanol fueron altas (9-10 %) se observó un incremento significativo de ERO en las cepas mutantes *ssq1Δ*, *isa1Δ* y *iba57Δ*, mientras que en las cepas *aco1Δ*, *sdh2Δ* y *cox2Δ* los niveles de ERO fueron similares a la silvestre (Fig. 4c, capítulo 1). Estos datos sugieren que aunque el sistema ISC no contribuya en la capacidad fermentativa sí influye en la susceptibilidad hacia el etanol, ya que la acumulación de etanol durante el proceso de fermentación promueve un incremento significativo en los niveles ERO, los cuales fueron más elevados en las mutantes *ISC*. Además, durante las

primeras horas donde los niveles de ERO fueron inferiores a la silvestre se sugiere la participación de los mecanismos antioxidantes que contrarrestan las ERO que se están generando. Sin embargo, a tiempos superiores, los niveles de ERO son elevados de tal manera que los mecanismos antioxidantes no son suficientes para controlar el desbalance, lo que genera como consecuencia eventos de estrés oxidativo.

Dentro de los sistemas antioxidantes el glutatión es el más importante, siendo el tiol más abundante dentro de la célula de prácticamente todos los organismos (Meister y Anderson, 1983). Este tripéptido se encuentra en dos estados, reducido o activo (GSH) y oxidado e inactivo (GSSG). En la célula el estado reducido, es su estado esencialmente predominante (90 %); de hecho la relación GSH/GSSG es el mejor y más sensible indicador de estrés oxidativo (Farrugia y Balzan, 2012). En este estudio se evaluaron los niveles de glutatión tanto mitocondrial como celular a diferentes tiempos de incubación con etanol. Se observó que la mitocondria es el principal reservorio de GSH, lo cual concuerda con las investigaciones realizadas por Zechmann *et al.*, (2011), indicando la importancia de este antioxidante en el mantenimiento redox mitocondrial. En las mutantes *ssq1Δ*, *isalΔ* y *iba57Δ* se observaron niveles significativamente menores de este antioxidante, concentrándose principalmente en la mitocondria y existiendo además un incremento significativo en los niveles de GSSG (Fig. 5, capítulo 1). Lo que indica que el sistema ISC está relacionado con la homeóstasis de este importante tiol, lo cual correlaciona con los datos obtenidos por Auchere *et al.*, (2008), quien observó patrones similares en cepas mutantes en la frataxina *yfh1Δ*. La Yfh1p se sugiere que es la proteína donadora del hierro durante la biogénesis de proteínas con centros [Fe-S]; esta proteína es uno de los componentes más estudiados del sistema ISC. La deficiencia de Yfh1p causa la enfermedad neurodegenerativa recesiva más común, la ataxia de Friedreich, caracterizada por disturbios en la homeóstasis del hierro, disfunción de la CTE, sensibilidad al estrés oxidativo (Santos *et al.*, 2010) y recientemente ha sido relacionada con fragmentación mitocondrial (Lefevre *et al.*, 2012). Auchere *et al.*, (2008) sugieren que la disminución en el contenido del glutatión es una respuesta adaptativa de la célula a las altas concentraciones de hierro, lo cual está asociada a un incremento en la actividad de la glutatión peroxidasa (Gpx), enzima que consume GSH produciendo GSSG durante su actividad en la neutralización de H₂O₂. Además en el mismo estudio observaron que la actividad de la glucosa-6-fosfato

deshidrogenasa (G6PD) también se encuentra elevada comparada con la silvestre. La G6PD cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas-fosfato, suministrando a la célula poder reductor en forma de NADPH, coenzima importante en la prevención del estrés oxidativo que es utilizada la glutatión reductasa (GR) para mantener una adecuada relación GSH/GSSG al reducir al GSSG. Además la tiorredoxina oxidada es reducida directamente por NADPH. Las mutantes ISC no muestran alteraciones significativas en su crecimiento y/o en viabilidad, la activación de la Gpx y G6PD podrían estar relacionada con mantener su viabilidad.

Resultados de nuestro estudio muestran que adicional al efecto de la mutación sobre la homeóstasis del glutatión, en presencia de etanol este efecto es superior (Fig. 5, capítulo 2). Además, nuestros resultados sugieren que la mutación en los genes *SSQ1*, *ISAI* e *IBA57* durante la exposición prolongada de etanol (6 h, etanol 10%) provocan una alteración dramática en la relación GSH/GSSG, predominando la forma GSSG tanto a nivel celular como mitocondrial poniendo de manifiesto un enorme daño oxidativo (Fig. 2a, resultados adicionales). Esto correlaciona con la menor sobrevivencia y los altos niveles de ERO observados en las mismas mutantes (Fig. 1c-3, capítulo 1). Las proteínas Isa1p/Iba57p son requeridas para la síntesis de glutamato, aminoácido que su vez participa en la síntesis del glutatión, lo cual podría explicar en parte los menores niveles encontrados en las mutantes *ISAI* e *IBA57*. Además, es notorio que el etanol provoca una disminución en el transporte del glutatión hacia la mitocondria. En relación a esto se ha observado que en modelos de roedores, el etanol provoca una disminución en el transporte de GSH hacia la mitocondria mediado por una disminución en la fluidez de la membrana mitocondrial interna, lo cual es prevenido por S-Adenosil-L-Metionina (SAM) (Coell *et al.*, 1997). La SAM es un precursor del glutatión y se ha observado que sus niveles disminuyen bajo condiciones de estrés por etanol en mitocondrias de roedores (Fernandez-Checa *et al.*, 2007). Existen varias proteínas [Fe-S] pertenecientes a la familia de radicales de SAM, (entre las que se encuentran Lip5p y Bio2p) en donde el centro [Fe-S] une reductivamente a SAM para producir un radical 5'-desoxiadensyl 5'-radical como intermediarios durante su actividad catalítica (Booker y Grove, 2010). Por lo que en condiciones de acumulación de etanol ocurre una disminución de este co-sustrato (SAM) lo que produciría una disminución

en la actividad de Lip5p y Bio2p. Adicional a esto, se ha sugerido en roedores que el acetaldehído provoca una disminución en la disponibilidad del glutatión (Anni *et al.*, 2003).

Por otro lado, en nuestro estudio se demostró que el etanol incrementa los niveles de H_2O_2 mitocondrial (Fig. 3c, SI-b, capítulo 1), el H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} es altamente perjudicial debido a su papel en la generación del ión $OH^{\bullet}$. La catalasa, enzima antioxidante que cataliza la descomposición del H_2O_2 es importante en la protección contra el estrés oxidativo. El etanol provoca un incremento en la actividad de la catalasa en la cepa silvestre (Fig. 6a, capítulo 1), confirmando que la toxicidad del etanol está relacionada con la generación de H_2O_2 . De manera interesante en mutantes *ISC* existe un incremento significativo en la actividad de la catalasa sin y con etanol (Fig. 6a, capítulo 1), probablemente como una respuesta de adaptación, lo cual también podría explicar el hecho de que en las mutantes *ISC* no se observe una disminución en su crecimiento a pesar de poseer menores niveles de glutatión. Sin embargo a mayores tiempos de exposición con etanol (6 h, etanol 10%) el incremento en ERO y la disminución de antioxidantes como el glutatión podría provocar una disminución en la actividad de la catalasa (Fig. 2b, resultados adicionales). Además la toxicidad del etanol fue contrarrestada por la adición de ácido ascórbico ó GSH, confirmando que la toxicidad del etanol es vía el estrés oxidativo (Fig. 6b, capítulo 1). Resultados similares fueron observados con agentes generadores de ERO (Fig. 2c, resultados adicionales), confirmando que el incremento en los niveles de ERO es dependiente de un sistema ISC funcional.

Se sabe que el incremento en la generación de ERO, así como la disminución del glutatión y/o un incremento en los niveles de GSSG son factores que promueven una disfunción mitocondrial, desencadenando fenómenos de apoptosis. De hecho el GSSG es una importante señal para inducir un evento apoptótico (Circu y Aw, 2008). Por lo tanto, los datos obtenidos en este estudio indican un evento de apoptosis inducido por etanol. La mitocondria es un componente clave en este proceso, diferentes estímulos apoptóticos pueden mediar la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo *c* (cit *c*). El cit *c* es una proteína pequeña de la CTE, la cual juega un papel esencial al iniciar la vía de señalización que permite la activación de caspasas iniciadoras de la apoptosis dependiente de la mitocondria. Los resultados de nuestro estudio muestran que el tratamiento con etanol (10%) a tiempos

superiores a las 3-6 h promueve la liberación del cit *c* y que el nivel de liberación fue exacerbado en las mutantes *ISC*, indicando que existe una respuesta de apoptosis cuando los niveles de ERO generados por etanol son elevados produciendo disfunción mitocondrial y pérdida de la viabilidad celular (Fig. 7, capítulo 1).

Hasta aquí los nuestros resultados indican que efectivamente el sistema ISC está relacionado con la tolerancia a etanol vía el estrés oxidativo. El complejo III es el principal sitio de generación de ERO, siendo el centro [2Fe-2S] de la proteínas Rip1p importante tanto para su actividad como para su ensamblaje. Una disfunción en el ensamble del centro [2Fe-2S] del complejo III puede ser responsable del incremento de ERO observado. Estos datos sugieren que la generación de ERO en las mutantes *ISC* podría estar asociada a una disfunción en la CTE, específicamente en el complejo III, el sitio más importante de generación de anión superóxido.

Las mutantes *ISC* más sensibles a etanol fueron *Isa1p* e *Iba57p*, las cuales se ha encontrado que son requeridas para la incorporación de centros tipo [4Fe-4S] pero no para los centros [2Fe-2S]. Sin embargo, los datos obtenidos en nuestro estudio sugieren que *Isa1p* e *Iba57p* podrían estar participando en la incorporación y/o reparación del centro [2Fe-2S] de la proteína Rieske. Las proteínas bacteriana de tipo A homólogas a las proteínas *Isa1* de *S. cerevisiae* se les ha relacionado con la incorporación de hierro en los centros [4Fe-4S] bajo condiciones aerobias (Tan *et al.*, 2009), funcionando como chaperonas de hierro para los centros [4Fe-4S] bajo condiciones aerobias (Wang *et al.*, 2010) y evitando así condiciones de altas concentraciones de hierro libre y/o reparando los centros [4Fe-4S] altamente susceptibles a ERO.

Tal como se ha mencionado, el hierro libre juega un papel crucial en la generación de estrés oxidativo y dado que el sistema ISC participa en el mantenimiento y regulación los niveles de hierro celular y mitocondrial, además de que la principal fuente de hierro lábil puede provenir del daño oxidativo causado a proteínas con centros [Fe-S], este estudio sugiere que el hierro es el protagonista en los eventos observados. Por tal motivo para analizar si el incremento en los niveles de ERO producidos por etanol esta correlacionado con un incremento en la liberación de hierro de los centros [Fe-S] en este estudio se analizaron los niveles de hierro lábil usando una sonda fluorescente mediante citometría de flujo. Las cepas mutantes *ISC* presentaron una mayor IMF comparadas con la silvestre,

indicando que existen mayores niveles de hierro libre en éstas (Fig. 3, capítulo 2), lo cual concuerda con estudios previos descritos usando otros sistemas de determinación de hierro (Shilke *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Kispal *et al.*, 1999). El crecimiento de las mutantes *ISC* no fue afectado significativamente aún cuando los niveles de hierro libre encontrados fueron mayores (Fig. 1a (0%) y 2a, capítulo 1), lo que sugiere que estos niveles no son perjudiciales pero si provocan mayor estrés oxidativo. Las cepas *ssq1Δ*, *isalΔ*, y *iba57Δ* fueron las mutantes con la mayor concentración de hierro libre (Fig. 3a, capítulo 2) y la mayor sensibilidad de estas cepas a ERO y a etanol (Fig. 1, capítulo 1; Fig. 1, capítulo 2; Fig. 1, resultados adicionales), lo que sugiere una relación entre los niveles de hierro libre y la susceptibilidad a ERO y etanol, lo cual es confirmado por la mayor tolerancia de la cepa silvestre a ERO y su bajos niveles de hierro libre (Fig 1, capítulo 1; Fig. 1, resultados adicionales). Con respecto a la mutante *rip1Δ*, también podemos observar que existe una relación entre los niveles de hierro libre y la susceptibilidad de ésta a ERO (Fig. 3a, capítulo 2). Interessantemente, en presencia de etanol la IMF incrementó significativamente en todas las cepas, indicando que las ERO producidas por etanol (10%) provocan un incremento de hierro libre, probablemente debido a la liberación de hierro de proteínas con centros [Fe-S], lo que a su vez provoca una mayor generación de ERO. Sin embargo, el incremento en los niveles de hierro libre fue significativamente superior en las mutantes *ISC* a excepción de *isu1Δ* (Fig. 3a, capítulo 2), lo cual concuerda con los niveles de ERO generadas por el tratamiento con etanol en estas mutantes (Fig. 3, capítulo 1). Para corroborar la relación entre los niveles de hierro libre y los niveles de ERO se evaluó la liberación de hierro libre en presencia de generadores de ERO (H_2O_2 12.5 mM y menadiona 80 μ M). Mostrando fenotipos similares a los observados con el tratamiento con etanol (Fig. 3b-c, capítulo 2), indicando que efectivamente existe una correlación entre los niveles de hierro libre y las ERO producidas por etanol, lo cual es exacerbado por la disfunción en el sistema ISC de *S. cerevisiae*.

Se sabe que el etanol por sí mismo puede reaccionar con Fe^{2+} o con el radical $HO^{\bullet}$ produciendo el radical de etanol, hidroxietilo ($CH_3-CH_2-OH^{\bullet}$). A pesar de que se ha observado que su generación no es significativa en experimentos realizados administrando etanol a ratas (Albano *et al.*, 1996), un sistema ISC disfuncional produce un incremento en los niveles de hierro, el hidroxietilo puede ser importante en el fenotipo observado en este

estudio en *S. cerevisiae*. Estudios previos (Zhang *et al.*, 1987) indican que el acetaldehído provoca un incremento en los niveles de hierro libre, lo cual también podría contribuir en su papel como generador de ERO. Además estudios realizados en ratas por Kohgo *et al.*, (2005, 2008) sugieren que existe un incremento en la actividad en la proteína IRP lo que produce un incremento en la poza de hierro libre. También sugieren que la activación de IRP es debido al estrés oxidativo generado por el metabolismo del etanol. IRP es una proteína con un centro [4Fe-4S], por lo que se le ha reconocido como una aconitasa citosólica (Walden *et al.*, 2006; Rouault, 2006). En los seres humanos, se ha observado un aumento en la sensibilidad al daño de células hepáticas durante el consumo de etanol en pacientes que sufren sobrecarga de hierro, también se ha sugerido que el etanol podría perturbar el manejo de hierro, incluso en ausencia de una sobrecarga de hierro (Nordmann *et al.*, 1987). En hígado de la rata, la administración de hierro aumenta el daño hepático inducido por la administración de etanol (Stål *et al.*, 1993), mientras que en otro estudio, la quelación de hierro atenúa algunas alteraciones en las defensas antioxidantes causadas por el consumo de etanol (Nordmann *et al.*, 1987). Lo que indica una participación importante del hierro en la toxicidad generada por etanol.

Para confirmar que el incremento de ERO está correlacionado con altos niveles de hierro libre se agregó una fuente del ión ferroso Fe^{2+} ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en presencia de ácido cítrico en cantidades equimolares y se cuantificaron los niveles de ERO mitocondriales (Fig. 5a, capítulo 2) y $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Fig. 5b, capítulo 2). Como era de suponerse, se encontró un incremento en la generación de ERO en todas las cepas, interesantemente existe un comportamiento similar al observado con la adición de etanol (Fig. 5a-b, capítulo 2). Esto reafirma que el incremento de hierro libre causado por etanol es la principal causa del daño oxidativo observado, lo cual indica que la toxicidad del etanol está claramente relacionada con el hierro libre. Por lo tanto una disminución en los niveles de hierro libre debería proteger o atenuar la toxicidad generada por etanol en *S. cerevisiae*. Esta idea correlaciona con los estudios realizados por Nordmann *et al.*, (1987) antes mencionados. Para confirmar que la toxicidad del etanol es dependiente de los niveles de hierro libre se evaluó la sobrevivencia de las cepas tratadas con concentraciones tóxicas de etanol (10%) en presencia de un quelante de hierro (1,10-fenantrolina, 20 μM) (Fig. 5d, capítulo 2). La adición del quelante en presencia de etanol (10%) tuvo un efecto benéfico sobre la

sobrevivencia de las levaduras, siendo este efecto significativo en las mutantes *isa1Δ* e *iba57Δ* (Fig. 5d, capítulo 2). Además, la presencia del quelante también disminuyó significativamente la producción de ERO en las mutantes *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ* y *rip1Δ* (Fig. 5c, capítulo 2). Esto confrima que la liberación de hierro causada por etanol es un factor importante en su toxicidad y que el sistema ISC está fuertemente relacionado con este efecto. Probablemente la importancia del sistema ISC radique en el re-ensamblaje o reparación de los centros Fe-S dañados por las ERO, evitando así el incremento del hierro libre y la inactivación de proteínas que contienen centros [Fe-S] como las de la CTE.

La mitocondria contiene el mayor número de centros redox, siendo fuente y blanco de las ERO. Se sabe que una CTE disfuncional es la mayor fuente de ERO y debido a que el sistema ISC participa en el ensamblaje de los centros [Fe-S] de proteínas de la CTE, se decidió evaluar la funcionalidad de la CTE en las diferentes cepas mutantes con el objetivo de determinar una posible relación con el fenotipo observado. Los resultados muestran que la mutación en los genes *SSQ1*, *ISAI*, *IBA57* y *RIP1* provocaron en *S. cerevisiae* la pérdida en la capacidad respiratoria tanto en estado basal, acoplado y desacoplado (Fig. 6a-b, capítulo 2), lo cual se corroboró por la ausencia del potencial de membrana (Fig. 7a, capítulo 2); mientras que la mutación en el gen *GRX5* no afectó la funcionalidad de la CTE (Fig. 6, capítulo 2). Un aspecto interesante fue que en presencia de etanol las mutantes *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ* y *rip1Δ* mostraron producción de oxígeno en lugar de consumo de éste (Fig. 6d-e, capítulo 2), lo cual sugiere producción de ERO a nivel del complejo III (siendo este el principal sitio de generación de ERO) y por consecuencia una participación de las enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa ya que ambas enzimas producen como producto al O₂. Esto fue corroborado por la adición de antimicina A, un inhibidor del complejo III. Se observó una ligera producción de oxígeno en las mutantes *ssq1Δ*, *isa1Δ*, *iba57Δ* y *rip1Δ* con glucosa como sustrato; mientras que con etanol esta producción fue superior (Fig. 6c y f, capítulo 2). Con la finalidad de determinar exactamente el daño en la CTE responsable de la pérdida de la función respiratoria se analizó la actividad de los complejos respiratorios, donde se observó una drástica disminución en la actividad de los complejos respiratorios II, III y IV en las mutantes *SSQ1*, *ISAI*, *IBA57* y *RIP1* mientras que en la mutante en *GRX5* la disminución fue del 40-50% comparada con la silvestre (Fig. 7b-d, capítulo 2). La pérdida de la actividad de los

complejos respiratorios II y III en mayor o menor medida era de esperarse, debido a la participación de los grupos [Fe-S] en las proteínas que conforman los complejos de la CTE. El complejo II contiene 3 centros ([2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]), las proteínas *ssq1p* y *grx5p* participan en la transferencia e incorporación de los diferentes tipos de centros [Fe-S]; recientemente se ha demostrado que los productos de los genes *ISA1/2* e *IBA57* están encargados de la incorporación del centro tipo cúbico [4Fe-4S] de las proteínas mitocondriales, por lo tanto la pérdida o disminución en la actividad en el complejo II resulta evidente en las mutantes. En lo que respecta a la actividad del complejo III, el cual contiene un centro tipo Rieske [2Fe-2S], la pérdida o disminución en la actividad observada en las cepas mutantes *ssq1Δ* y *grx5Δ*, es congruente con su función, sin embargo en las cepas mutantes *isa1Δ* y *iba57Δ* fue sorpresivo, ya que éstas cepas no incorporan este tipo de centros [Fe-S]. No obstante se ha demostrado que el complejo III y IV forman un supercomplejo, por lo tanto una alteración de uno u otro podría afectar la actividad de ambos, hecho que podría explicarse al observarse una pérdida de la actividad del complejo IV. Adicionalmente, se ha sugerido que alteraciones en el sistema ISC provocan una disminución en la biogénesis de grupos hemo y una deficiencia en la concentración de citocromos (Lill y Mühlhoff, 2006), lo anterior podría explicar el hecho de la pérdida en la actividad del complejo IV, ya que este complejo es rico en grupos hemo.

Los resultados obtenidos sugieren que un sistema ISC funcional es requerido para mantener una CTE activa y funcional, disminuyendo así los efectos tóxicos generados por agentes oxidantes como el etanol. En relación a esto, en *S. cerevisiae* la existencia de mitocondrias activas es importante para el desarrollo de la levadura cuando está en presencia de etanol (Aguilera y Benitez, 1985). La mitocondria se encarga de la oxidación de los equivalentes reductores generados durante el metabolismo de azúcares y etanol, desempeñando un papel importante en el mantenimiento del balance redox, y evitando un incremento en la generación de ERO. Un incremento en la relación NADH/NAD^+ provoca una mayor producción de ERO en la CTE (Murphy, 2009). Por lo tanto, los datos sugieren que los efectos sinérgicos del hierro libre y el etanol en la producción de ERO pueden ser el resultado de un aumento en la relación NADH/NAD^+ , lo anterior debido a la oxidación del etanol por las alcohol deshidrogenasas (isoformas citosólicas y mitocondrial), así como al aumento de ERO producidas en el complejo III y las reacciones de las ERO sobre las

proteínas que contienen centros [Fe-S]. Los eventos anteriores por consiguiente pueden provocar una mayor liberación de hierro libre y generando el radical $\text{OH}^\bullet$, que a su vez podría estar relacionado con el fenotipo apoptótico mostrado en las mutantes *ssq1Δ*, *isa1Δ* y *iba57Δ*.

Un resultado interesante fue la similitud entre los fenotipos de las cepas *isa1Δ* y *iba57Δ* con la mutante *rip1Δ*, por lo que se sugiere que las proteínas Isa1p e Iba57p podrían estar involucradas en el ensamblaje o incorporación de hierro en el centro [2Fe-2S] de la proteína Rieske. Estudios realizados por espectrofotometría de Ramman en mitocondrias aisladas indican que existe una disminución en la cantidad de centros [2Fe-2S] y [4Fe-4S] en las mutantes *isa1Δ* y *iba57Δ* sugiriendo que éstas proteínas están involucradas en el ensamblaje de éstos tipos de centros Fe-S (Fig. 8a, capítulo 2). Estos datos concuerdan con los obtenidos en ensayos realizados con geles nativos, donde se observa que la mutación en los genes *ISA1* e *IBA57* disminuye el contenido del supercomplejo $\text{III}_2\text{-IV}_2$ (Fig. 9, capítulo 2).

7.- REFERENCIAS

1. Aguilera, A. y Benítez, T. 1985. Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **142**: 389-92.
2. Aguilera, F., Peinado, R. A., Millán, C., Ortega, J. M. y Mauricio, J. C. 2006. Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol.* **110**: 34-42
3. Albano, E., Clot, P., Morimoto, M., Tomasi, A., Ingelman-Sundberg, M. y French, S. W. 1996. Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology* **23**: 155-163.
4. Alexandre, H., Rousseaux, I. y Charpentier, C. 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Lett.* **124**: g17-22
5. Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A. y Craig, E.A. 2004. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep.* **5**: 1096-1101.
6. Arnon, D. I., Whatley, F. R. y Allen, M. B. 1957. Triphosphopyridine nucleotide as a catalyst of photosynthetic phosphorylation. *Nature* **180**: 182-185.
7. Andrew, A. J., Dutkiewicz, R., Knieszner, H., Craig, E. A., y Marszalek, J. 2006. Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p. *J. Biol. Chem.* **281**: 14580-14587.
8. Anni, H., Pristatsky, P. y Israel, Y. 2003. Binding of acetaldehyde to a glutathione metabolite: mass spectrometric characterization of an acetaldehyde-cysteinylglycine conjugate. *Alcohol Clin Exp Res* **27**: 1613-1621.
9. Auchere, F., Santos, R., Planamente, S., Lesuisse, E. y Camadro, J. M. 2008. Glutathione-dependent redox status of frataxin-deficient cells in a yeast model of Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* **17**: 2790-2802.
10. Ayala-Castro, C., Saini, A. y Outten, F. W. 2008. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 110-125.

11. Bakker, B. M., Bro, C., Kotter, P., Luttik, M. A. H., Van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. 2000. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **182**: 4730–4737
12. Balk, J. y Lobreaux, S. 2005. Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci.* **10**: 324-331.
13. Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K. y Johnson, M. K. 2008. Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **36**: 111-1119.
14. Barras, F., Loiseau, L., y Py, B. 2005. How *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* build Fe/S proteins. *Adv. Microb. Physiol.* **50**: 41-101-
15. Beier, D. R., Sledziewski, A. y Young, E. T. 1985. Deletion analysis identifies a region, upstream of the ADH2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which is required for ADR1- mediated derepression. *Mol Cell Biol.* **5**: 1743–1749.
16. Beinert, H, Meyer, J, Lill, R. 2004. Iron-sulfur proteins. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*, ed. Lennarz, W. J. y Lane, M. D. pp. 482-89. New York: Academic.
17. Beinert, H. 2000 Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises, *J. Bioinorg. Chem.* **5**: 2-15.
18. Beinert, H. Iron–sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. 2000. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**: 2-15.
19. Beinert, H., Holm, R. H. y Münck, E. 1997. Iron-sulfur clusters: nature’s modular, multipurpose structures. *Science.* **277**: 653-659.
20. Bencze, K. Z. 2006. The structure and function of frataxin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 269-291.
21. Blake D. R., Rallen R. E. y Lunec J. 1987. Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.* **45**: 371-385.
22. Booker, S. J. y Grove , T. L. Mechanistic and functional versatility of radical SAM enzymes. 2010.*F1000 Biol Rep* **2**: 52.
23. Booker, S. J., Cicchillo, R. M. y Grove, T. L. 2007. Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**: 543-552.

24. Cabisco, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. y Ros, J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 27393-27398.
25. Cadenas E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, **51**: 79-110.
26. Campos-García, J., Ordoñez, L. G. y Soberón-Chávez, G. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* hscA gene encodes Hsc66, a Dnak homologue. *Microbiology*. **146**: 1429-1435.
27. Circu, M. L. y Aw, T. Y. 2008. Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res* **42**: 689-706.
28. Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Morales, A., Ballesta, A., Ookhtens, M., Rodes, J., Kaplowitz, N. y Fernandez-Checa, J. C. 1997. Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology* **26**: 699-708.
29. Comporti, M. 1985. Lipid and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest.* **53**: 599-623.
30. Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortes, E., Clemente-Guerrero, M., Estrada-Villagomez, M., Manzo-Avalos, S., Mejia-Zepeda, R., Boldogh, I. y Saavedra-Molina, A. 2009. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J. Bioenerg. Biomembr.* **41**: 15-28.
31. Costa, V., Amorim, M. A., Reis, E., Quintanilha, A. y Moradas-Ferreira, P. 1997. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology*. **143**: 1649-1656.
32. Costa, V., Reis, E., Quintanilha, A. y Moradas-Ferreira, P. 1993. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 608-614.
33. Crabtree, H. G. 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* **23**: 536-545.
34. Craig, E. A. y Marszalek, J. 2002. A specialized mitochondrial molecular chaperone system: A role in formation of Fe/S centers. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1658-1665.

35. Cupp-Vickery, J. R., Silberg, J. J., Ta, D. T. y Vickery, L. E. 2004. Crystal Structure of IscA, an Iron-sulfur Cluster Assembly Protein from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **338**: 127-37
36. Chandramouli, K. y Johnson, M. K. 2006. HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry.* **45**: 11087-11095.
37. Chandramouli, K., Unciuleac, M. C., Naik, S., Dean, D. R., Huynh, B. H y Johnson, M. K. 2007. Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry.* **46**: 6804-6811.
38. Chang, J. y Burgess, S. 2002. Yeast as model genetic organism. Encyclopedia of life sciences. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. 1-8.
39. Chen, O. S., Crisp, R. J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D. R. y Kaplan, J. 2004. Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem* **279**: 29513-29518.
40. Chen, X. J., Wang, X. y Butow, R. A. 2007. Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13738-13743.
41. Chi, Z., Arneborg, N. 1999 Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl. Microbiol.* **86**: 1047-1052.
42. Dailey, H. A. 2002. Terminal steps of haem biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 590-595.
43. De Deken R. H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen. Microbiol.* **44**: 149-156.
44. De Jong-Gubbels, P. van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. 1996. Metabolic fluxes in chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe* grown on mixtures of glucose and ethanol. *Microbiology.* **142**: 1399-1407.
45. De Leve, L. y Kaplowitz, N. 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* **52**: 287-305.

46. De Smidt, O., Du Preez, J. C. y Albertyn, J. 2012. Molecular and physiological aspects of alcohol dehydrogenases in the ethanol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **12**: 33–47.
47. De Vries, S. y Grivell, L. A. 1988. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH: Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **176**: 377-384.
48. De Vries, S. y Marres, C. A. 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **895**: 205–239.
49. Dean, D. R. y Brigle, K. E. 1985. *Azotobacter vinelandii* nifD- and nifE-encoded polypeptides share structural homology. *Proc Natl Acad Sci USA.* **82**: 5720-5723.
50. Ding, B., Smith, E. S. y Ding, H. 2005. Mobilization of the iron centre in IscA for the iron-sulphur cluster assembly in IscU. *Biochem J.* **389**: 797-802.
51. Ding, H. y Clark, R. J. 2004. Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem. J.* **379**: 433-440.
52. Ding, H., Harrison, K. y Lu, J. 2005. Thioredoxin reductase system mediates iron binding in IscA and iron delivery for the iron-sulfur cluster assembly in IscU. *J Biol Chem.* **280**: 30432-7.
53. Ding, H., Yang, J., Coleman, L. C. y Yeung, S. 2007. Distinct Iron Binding Property of Two Putative Iron Donors for the Iron-Sulfur Cluster Assembly: IscA and the bacterial frataxin orthologue CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *J Biol Chem.* **282**: 7997-8004.
54. Dinh, T. N., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C. y Shimizu, H. 2008. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS ONE* **3**: e2623.
55. Djaman, O., Outten, F. W. y Imlay, J. A. 2004. Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **279**: 44590-9.
56. Dos Santos, P. C., Smith, A. D., Frazzon, J., Cash, V. L., Johnson, M. K. y Dean, D. R. 2004. Iron-sulfur cluster assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *J Biol. Chem.* **279**: 19705-11.

57. Dujon, B. 1996. The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet* **12**: 263-270.
58. Dutkiewicz, R., Schilke B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E. y Marszalek, J. 2004. Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their *in vivo* function. *J. Biol. Chem.* **279**: 29167-29174.
59. Dutkiewicz, R., Schilke, B., Kneiszner, H., Walter, W., Craig, E. A. y Marszalek, J. 2003. Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis: similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J. Biol. Chem.* **278**: 29719-29727.
60. Endo, A., Nakamura, T., Ando, A., Tokuyasu, K. y Shima, J. 2008. Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* **1**: 3.
61. Feldmann, H. 2012. Yeast: Molecular and Cell Biology. 2^{da} edición. Wiley-Blackwell. 1-2.
62. Fernandez-Checa, J. C., Colell, A. y Garcia-Ruiz, C. 2002. S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* **27**: 179-183.
63. Fiechter, A., Fuhrmann G.F. y Kappeli O. 1981. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv Microbiol Physiol.* **22**: 123–183.
64. Flikweert, M. T., Van der Zanden, L. Janssen, W. M. T. M., Steensma, H. Y., Van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. 1996. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast.* **12**: 247–257.
65. Flint, D. H., Tuminello, J. F. y Emptage, M. H. 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**: 22369-22376.
66. Flores, C. L., Rodriguez, C., Petit, T. y Gancedo, C. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* **24**: 507–529.
67. Fontecave, M. y Ollagnier-de-Choudens, S. 2008. Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* **474**: 226-237.

68. Foury, F. y Roganti, T. 2002. Deletion of the mitochondrial carrier genes *MRS3* and *MRS4* suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient Strain. *J. Biol. Chem.* **277**: 24475-24483.
69. Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. y Purnelle, B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **440**: 325-31.
70. Fraga, C. G., Shinegaga, M. K., Park, J. W., Degan P. y Ames, B. N. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 4533- 4537.
71. Fridovich, I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 239-257.
72. Fridovich, I. 1989. Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Radic Biol Med* **7**: 557-558.
73. Fu, W., Jack, R. F., Morgan, T. V., Dean, D. R. y Johnson, M. K. 1994. nifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. *Biochemistry.* **33**: 13455-63.
74. Gardner, P. G., y Fridovich, I. 1992. Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J. Biol. Chem.* **267**: 8757-8763.
75. Garland, S. A. Hoff, K., Vickery, L. E., Culotta, V. C. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* *ISU1* and *ISU2*: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **294**: 897-907.
76. Gelling, C., Dawes, I. W., Richhardt, N., Lill, R. y Mühlenhoff, U. 2008. Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 1851-1861.
77. Gerber, J., Mühlenhoff, U. y Lill, R. 2003. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**: 906-911.
78. Gerber, J., Neumann, K., Prohl, C., Mühlenhoff, U. y Lill, R. 2004. The yeast scaffold proteins Isu1p and Isu2p are required inside mitochondria for maturation of cytosolic Fe/S proteins. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 4848-4857.

79. Green, K., Brand, M. D. y Murphy M. P. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* **53**: 110-118.
80. Gurer, H., Ozgunes, H., Oztezcan, S. y Ercal, N. 1999. Antioxidant role of alpha-lipoic acid in lead toxicity. *Free Radic Biol Med* **27**: 75-81.
81. Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (eds) (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd edn. Oxford University Press, Clarendon, Oxford.
82. Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.
83. Hallsworth, J. E., Nomura, Y. y Iwahara, M. 1998. Ethanol induced water stress and fungal growth. *J. Ferment Bioeng.* **86**: 451-456.
84. Hausmann, A., Samans, B., Lill, R. y Muhlenhoff, U. 2008. Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* **283**: 8318-8330.
85. Heick, H. M. C., Willemot, J. y Begin-heick, N. 1969. The subcellular localization of alcohol dehydrogenase activity in baker's yeast. *Biochim Biophys Acta* **191**: 493-501.
86. Hoek, J. B., Cahill, A. y Pastorino, J. G. 2002. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* **122**: 2049-2063.
87. Hoff, K. G., Cupp-Vickery, J. R. y Vickery, L. E. 2003. Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. *J. Biol. Chem.* **278**: 37582-37589.
88. Hoff, K. G., Silberg, J. J. y Vickery, L. E. 2000. Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 7790-7795.
89. Hopkins, F. G. 1921. On an autoxidisable constituent of the cell. *J. Biochem.* **15**: 286-305.
90. Hu, X. H., Wang, M. H., Tan, T., Li, J. R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R.M. y Luo, Z. W. 2007 Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**: 1479-1487.

91. Hwang, C.; Sinsky, A.J. y Lodish, H.F. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*. **257**: 1496-1502.
92. Ibeas, J. I., y Jimenez, J. 1997. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 7-12.
93. Imlay, J. A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 755-776.
94. Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E. y Dean, D. R. 1989. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet.* **219**: 49-57.
95. Jimenez, J. y Benitez, T. 1987. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1196-1198.
96. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. y Johnson, M. K. 2005. Structure, function and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 247-28.
97. Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., Wood, P. M. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* **1504**: 179-195.
98. Jung, Y. S., Gao-Sheridan, H. S., Christiansen, J., Dean, D. R. y Burgess, B. K. 1999. Purification and biophysical characterization of a new [2Fe-2S] ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a putative [Fe-S] cluster assembly/repair protein. *J. Biol. Chem.* **274**: 32402-10.
99. Kaplan, C. D. y Kaplan, J. 2009. Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chem Rev.* **109**: 4536-4552.
100. Kappeli, O. 1986. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv Microbiol Physiol* **28**: 181-209.
101. Kessler, D. 2006. Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 825-840.
102. Kiley, P. J y Beinert, H. 2003. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 181-185.

103. Kim, R., Saxena, S., Gordon, D. M., Pain, D. y Dancis, A. 2001. J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins. *J. Biol. Chem.* **276**: 17524-17532.
104. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. y Lill, R. 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are required for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**: 3981-3989.
105. Kitagaki, H., Arakia, Y., Funatob, K. y Shimoi, H. 2007. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Letters* **581**: 2935-2942.
106. Knight, S. A., Sepuri, N. B., Pain, D. y Dancis, A. 1998. Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **273**: 18389-18393.
107. Knowles, J. R. 1989. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* **58**: 195-221.
108. Kohgo, Y., Ohtake, T., Ikuta, K., Suzuki, Y., Hosoki, Y., Saito, H. y Kato, J. 2005. Iron accumulation in alcoholic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res* **29**: 189S-193S.
109. Kohgo, Y., Ohtake, T., Ikuta, K., Suzuki, Y., Torimoto, Y. y Kato, J. 2008. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* **23 Suppl 1**: S78-81.
110. Kolberg, M., Strand K. R., Graff, P. y Andersson, K. K. 2004. Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta* **1699**: 1-34.
111. Lagunas, R. 1986. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2**: 221-228.
112. Lange, H., Kispal, G., Kaut, A. y Lill, R. 2000. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of intra- and extra-mitochondrial Fe/S proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:1050-1055.
113. Larsson, C., Pahlman, I., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L. y Gustafsson, L. 1998. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 347-357.

114. Lash, L. H. 2006. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem. Biol. Interact.* **163**: 54-67.
115. Lauhon, C. T., Erwin, W. M. y Ton, G. N. 2004. Substrate specificity for 4-thiouridine modification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**: 23022-23029.
116. Layer, G. *et al.* 2007. SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **282**: 13342-13350.
117. Leao, C. y Van Uden, N. 1984. Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* **26**: 403-405.
118. Lee, J. H., Yeo, W. S. y Roe, J. H. 2004. Induction of the sufA operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor. *Mol Microbiol.* **51**: 1745-55.
119. Lefevre, S., Sliwa D., Rustin, P., Camadro, J. M. y Santos, R. 2012. Oxidative stress induces mitochondrial fragmentation in frataxin-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun* **418**: 336-341.
120. Lewis, J. A., Elkon, I. M., McGee, M. A., Higbee, A. J. y Gasch, A. P. 2010. Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. *Genetics* **186**: 1197-1205.
121. Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Keller, G., Riggs-Gelasco, P. J., Winge, D. R., Johnson, M. K. y Outten, C. E. 2001. Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for in vivo iron signaling in yeast. *J Biol Chem.* **286**: 867-876.
122. Li, J., Kogan, M. Knight, S. A. Pain, D. y Dancis, A. 1999. Yeast mitochondrial protein Nfs1p coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J. Biol. Chem.* **274**: 33025-33034.
123. Lill R. 2009. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature.* **460**: 831-838.
124. Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsasser, H. P., Hausmann, A., Netz, D. J., Pierik, A. J., Stehling, O., Urzica, E., y Muhlenhoff, U. 2006. Mechanisms of iron-sulfur

- protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**: 652-667.
125. Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Webert, H., Wilbrecht, C. y Muhlenhoff, U. 2012. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1491-1508.
126. Lill, R., y Muhlenhoff, U. 2006. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**: 457-486.
127. Lill, R., y Muhlenhoff, U. 2008. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 669-700.
128. Liu, G. *et al.* 2005. High-quality homology models derived from NMR and X-ray structures of *E. coli* proteins YgdK and Suf E suggest that all members of the YgdK/Suf E protein family are enhancers of cysteine desulfurases. *Protein Sci.* **14**, 1597-1608.
129. Liu, J. *et al.* 2005. Structural characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein IscU in a zinc-bound form. *Proteins* **59**, 875-881.
130. Loiseau, L., Gerez, C., Bekker, M., Ollagnier-de Choudens, S., Py, B., Sanakis, Y., Teixeira de Mattos, J., Fontecave, M. y Barras, F. 2007. ErpA, an iron sulfur (Fe-S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 13626-13631.
131. Lucero, P., Peñalver, E., Moreno, E. y Lagunas, R. 2000. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4456-4461.
132. Lukianova, O. A. y David, S. S. 2005. A role for iron-sulfur clusters in DNA repair. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**: 145-151.
133. Lutz, T., Westermann, B., Neupert, W. y Herrmann, J. M. 2001. The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J. Mol. Biol.* **307**: 815-825.
134. Ma, M. y Liu, Z. L. 2010. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **87**: 829-845.

135. Mansouri, A., Demeilliers, C., Amsellem, S., Pessayre, D. y Fromenty, B. 2001. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 737-743.
136. Mansure, J. J. C., Panek, A. D., Crowe, L. M. y Crowe, J. H. 1994. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim Biophys Acta*. **1191**: 309-316.
137. Marks, V. D., Ho Sui, S. J., Erasmus, D., Van der Merwe G. K., Brumm, J., Wasserman, W. W., Bryan, J. y Van Vuuren H. J. 2008 Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Res.* **8**: 35-52.
138. Marres, C. A. M., De Vries, S., y Grivell, L. A. 1991. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **195**: 857-862.
139. Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Ahern, K. G. 2003, Bioquímica. 3^{ra} edición. Addison Wesley.
140. Meister, A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* **263**: 17205-17208.
141. Meister, A. y Anderson, M. E. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**: 711-760.
142. Meredith, M. J. y Reed, D. J. 1982. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J. Biol. Chem.* **257**: 3747-3753.
143. Meyer, J. 2008. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**: 157-170.
144. Mishra, P. y Prasad, R. 1989 Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **30**: 294-298.
145. Morimoto, K., Yamashita, E., Kondou, Y., Lee, S. J., Arisaka, F., Tsukihara, T. y Nakai, M. 2006. The asymmetric IscA homodimer with an exposed [2Fe-2S]

- cluster suggests the structural basis of the Fe-S cluster biosynthetic scaffold. *J Mol Biol.* **360**: 117-32.
146. Mortenson, L. E., Valentine, R.C. y Carnahan, J. E. 1962. An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**: 448-452.
147. Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. y Lill, R. 2003. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* **22**: 4815-4825.
148. Muhlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C. y Roland Lill. 2010. Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.* **12**: 373-385.
149. Muhlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A. J. y Lill, R. 2011. Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol Chem* **286**: 41205-41216.
150. Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A. J. y Lill, R. 2011. Specialized Function of Yeast Isa1 and Isa2 Proteins in the Maturation of Mitochondrial [4Fe-4S] Proteins. *J. Biol. Chem.* **286**: 41205-41216.
151. Muller, K., Matzanke, B. F., Schunemann, V., Trautwein, A. X. y Hantke, K. 1998. FhuF, an iron-regulated protein of *Escherichia coli* with a new type of [2Fe-2S] center. *Eur J Biochem.* **258**: 1001-8.
152. Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**: 1-13.
153. Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D. y Barras, F. 2003. SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.* **22**: 427-437.
154. Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P. y Pastore, A. 2004. Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure.* **12**, 2037-2048.
155. Nordmann, R., Ribiere, C. y Rouach, H. 1987. Involvement of iron and iron-catalyzed free radical production in ethanol metabolism and toxicity. *Enzyme* **37**: 57-69.

156. Novitskiy, G., Traore, K., Wang, L., Trush, M. A. y Mezey, E. 2006 Effects of ethanol and acetaldehyde on reactive oxygen species production in rat hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* **30**: 1429-1435.
157. Ollagnier-De Choudens, S., Nachin, L., Sanakis, Y., Loiseau, L., Barras, F. y Fontecave, M. 2003. SufA from *Erwinia chrysanthemi*: Characterization of a scaffold protein required for iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem.* **278**: 17993-8001.
158. Outten, F. W., Djaman, O. y Storz, G. 2004. A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **52**: 861-72.
159. Outten, F. W., Wood, M. J., Munoz, F. M. y Storz, G. 2003. The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **278**: 45713-45719.
160. Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kotter, P., Van Tuijl, A., De Vries, S., Van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. 2000. In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Bacteriol.* **182**: 2823-2830.
161. Packer, L., Witt, E. H. y Tritschler, H. J. 1995. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* **19**: 227-250.
162. Patzer, S. I. y Hantke, K. 1999. SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 3307-9.
163. Petrik, M., Kappeli, O. y Fiechter, A. 1983. An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of shortand long-term regulation. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 43-49.
164. Petrova, V. Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V. y Schmitt, M. J. 2004. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* **380**: 39-400.
165. Piper, P. W. 1995 The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett.* **134**: 121-127.

166. Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., y Compagno, C. 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. *Trends Genet.* **22**: 183-6.
167. Postma, E., Verduyn, C. Scheffers, W. A. y Van Dijken, J. P. 1989. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 468-477.
168. Pronk, J. T., Steensma, H., Van Dijken, J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1607-1633.
169. Pryor, W. A. 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, life-times, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* **48**: 657-667.
170. Py, B. y Barras, F. 2010. Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat Rev Microbiol* **8**: 436-446.
171. Quinlan, C. L., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J. R., Ackrell, B. A. y Brand, M. D. 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem* **287**: 27255-27264.
172. Rees, D. C. 2002. Great metallocusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 221-46.
173. Rees, D. C. y Howard, J. B. 2003. The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metallocusters. *Science* **300**: 929-931.
174. Riboldi, G. P., Verli, H. y Frazzon, J. 2009. Structural studies of the *Enterococcus faecalis* SufU [Fe-S] cluster protein. *BMC Biochem.* **10**: 3.
175. Rinnerthalera, M., Büttnerb, S., Launa, P., Heerenc, G., Felderc, T. K., Klingera, H., Weinbergerd, M., Stolzee, K., Grouslf, T., Hasekf, J., Benadaf, O., Frydlovaf, I., Klockera, A., Simon-Nobbea, B., Janskoa, B., Breitenbach-Kollera, H., Eisenbergb, T., Gourlayg, C. W., Madeo, F., William, C., Burhansd, W. C. y Breitenbach, M. 2012. Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**: 8658-8663.

176. Rodrigues, F., Ludovico, P., Leao, C. 2006. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*. 101-121.
177. Rodriguez-Manzanque, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J. y Herrero, E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1109-1121.
178. Rooney, J. P. 2007. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* **234**: 145-156.
179. Rosa, M. F. y Sa-Correia, I. 1991. In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 830-835.
180. Rosa, M. F., Sá-Correia, I. 1996. Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. *FEMS Microbiol Lett.* **135**: 271-274.
181. Rouault, A. y Wing-Hang, Tong. 2005. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**: 345-351.
182. Rouault, T. A. 2006. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature Chem. Biol.* **2**: 406-414.
183. Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W. y Walden, W. E. 2003. A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *EMBO J.* **22**: 4826-4835.
184. Russell, I. 2004. Understanding yeast fundamentals. In *The Alcohol Textbook* Jacques, K.A., Lyons, T.P. y Kelsall, D.R. 2003. 4th edición. Nottingham University Press. Inglaterra 85-86.
185. Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff, U., Lill, R. y Winge D. R. 2005. Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem.* **280**: 10135-10140.
186. Sánchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K. A. y Lindquist, S. 1992. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**: 2357-2364.

187. Santos, R., Lefevre, S., Sliwa, D., Seguin, A., Camadro, J. M. y Lesuisse, E. 2010. Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **13**: 651-690.
188. Schilke, B. Voisine C., Beinert H. y Craig E. 1999. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **96**, 10206-10211.
189. Schilke, B., Williams, B., Knieszner, H., Puksza, S., D'Silva, P., Craig, E. A. y Marszalek, J. 2006. Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. *Curr. Biol.* **16**: 1660-1665.
190. Schwartz, C. J., Djaman, O., Imlay, J. A. y Kiley, P. J. 2000. The cysteine desulfurase, IscS, has a mayor role in *in vivo* Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 9009-9014.
191. Schwartz, C. J., Giel, J. L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F. J., Beinert, H. y Kiley, P. J. 2001. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14895-14900.
192. Sendra, M., Ollagnier de Choudens, S., Lascoux, D., Sanakis, Y. y Fontecave, M. 2007. The SUF iron-sulfur cluster biosynthetic machinery: sulfur transfer from the SUFS-SUFE complex to SUFA. *FEBS Lett.* **581**: 1362-1368.
193. Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R. y Hagen, T. M. 2009. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1149-1160.
194. Sies, H. 1993. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res.* **299**: 183-191.
195. Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**: 213-9.
196. Sies, H., Stahl, W. 1995. Vitamins E and C, s-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1315-1321.
197. Stadtman, E. R. 1992. Protein oxidation and aging. *Science*. **257**: 1220-1224.
198. Stal, P. y Hultcrantz, R. 1993. Iron increases ethanol toxicity in rat liver. *J Hepatol* **17**: 108-115.

199. Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J. y Stanley G. A. 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* **109**: 13–24.
200. Steensma, H. Y. 1997. From pyruvate to acetyl-CoA and oxaloacetate. In: Zimmermann FK, Entian KD (eds) Yeast sugar metabolism-biochemistry, genetics, biotechnology, and applications. Technomic, Lancaster. 339-357.
201. Sulo, P. y Martin, N. C. 1993. Isolation and characterization of LIP5. A lipoate biosynthetic locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**: 17634-17639.
202. Takahashi, Y. y Nakamura, M. 1999. Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem.* **126**: 917-26.
203. Takahashi, Y. y Tokumoto, U. 2002. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **277**: 28380-28383.
204. Tan, G., Lu, J., Bitoun, J. P., Huang, H. y Ding, H. 2009 *Biochem. J.* **420**: 463-472.
205. Tan, G., Lu, J., Bitoun, J. P., Huang, H. y Ding, H. 2009. IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions. *Biochem J* **420**: 463-472.
206. Teixeira, M. C., Raposo, L. R., Mira, N. P., Lourenco, A. B. y Sa-Correia, I. 2009. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 5761–5772.
207. Thomson, J. M., Gaucher, E. A., Burgan, M. F., De Kee, D. W., Li, T., Aris, J. P. y Benner, S. A. 2005. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet.* **37**: 630–635.
208. Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K. y Takahashi, Y. 2004. Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly system: functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*. *J. Biochem.* **136**: 199-209.

209. Turrens, J. F., Freeman, B. A., Levitt, J. G. y Crapo, J. D. 1982. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particle. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**: 401-410.
210. Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai K. y Yamaguchi-Iwai, Y. 2012. Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression. *Mol Cell Biol.* **32**: 4998-5008.
211. Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K. y Yamaguchi-Iwai, Y. 2007. Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **18**: 2980-2990.
212. Unciuleac, M. C. Chandramouli K., Naik S., Mayer S., Huynh BH., Johnson MK., Dean DR. 2007. *In vitro* activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluste-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry.* **46**: 6812-6821.
213. Van den Brink, J., Canelas, A. B., Van Gulik, W. M., Pronk, J. P., Heijnen, J.J., De Winde, J. H. y Daran-Lapujade, P. 2008. Dynamics of Glycolytic Regulation during Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Fermentative Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5710-5723.
214. Van der Giezen, M. y Tovar, J. 2005. Degenerate mitochondria, *EMBO Rep.* **6**: 525-530.
215. Van Dijken, J. P. y Scheffers, W. A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 199-224.
216. Van Dijken, J. P., Weusthuis R. A. y Pronk, J. T. 1993. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**: 343-352.
217. Van Loon, A. P. y Young, E. T. 1986. Intracellular sorting of alcohol dehydrogenase isoenzymes in yeast: a cytosolic location reflects absence of an amino-terminal targeting sequence for the mitochondrion. *EMBO J.* **5**: 161-165.
218. Van Uden, N. 1985. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Ann Rep Ferment Process* **8**: 11-58.
219. Verduyn, C. T., Zomerdijk, P. L., van Dijken, J. P. y Scheffers, W. A. 1984. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 181-185.

220. Vickery, L. E. y Cupp-Vickery, J. R. 2007. Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**: 95-111.
221. Voisine, C., Cheng, Y. C., Ohlson, M., Schilke, B., Hoff, K., Beinert, H., Marszalek, J., Craig, E. A. 2001. Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 1483-1488.
222. Volz, K. 2008. The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**:106-111.
223. Wachtershauser G. 1992. Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **58**: 85-201.
224. Walden, W. E. Selezneva, A. I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., Theil E. C., y Volz, K. 2006. Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science*. **314**: 1903-1908.
225. Wallander, M. L., Leibold, E. A. y Eisenstein, R. S. 2006. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**. 668-689.
226. Wang, W., Huang, H., Tan, G., Si, F., Liu, M., Landry, A. P., Lu, J., Ding, H. 2010. In vivo evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in *Escherichia coli*. *Biochem J* **432**: 429-436.
227. Webster, N. R. y Nunn, J. P. 1988. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.* **60**: 98-108.
228. Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. y Preis, D. 1991. The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**: 563-576.
229. Weiss, S. J. 1986. Oxygen, ischemia, inflammation. *Acta Physiol. Scand.* **548**: 9-37.
230. Winston, G. W. 1990. Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. *Plant. Biol.* **12**: 57-86.
231. Xu, X. M. y Moller, S. G. 2008. Iron-sulfur cluster biogenesis systems and their crosstalk. *ChemBiolChem.* **9**: 2355-2362.

232. Yang, J., Bitoun, J. P. y Ding, H. 2006. Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters. *J. Biol. Chem.* **281**: 27956-27963.
233. Yang, K. M., Lee, N. R., Woo, J. M., Choi, W., Zimmermann, M., Blank, L. M. y Park, J. B. 2012. Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **12**: 675-684.
234. Yoon, T. y Cowan, J. A. 2003. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 6078-6084.
235. Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T. y Shimizu, H. 2009. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**: 32-44.
236. You, K. M., Rosenfield, C. L. y Knipple, D. C. 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol.* **69**:1499–1503.
237. Young, E. T. y Pilgrim, D. 1985. Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**: 3024–3034.
238. Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K. and Dean, D.R. 2000. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 599-604.
239. Zechmann, B., Liou, L. C., Koffler, B. E., Horvat, L., Tomasic, A., Fulgosi, H. y Zhang, Z. 2011. Subcellular distribution of glutathione and its dynamic changes under oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **11**: 631-642.
240. Zemleni, J. 2005. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* **25**: 175-196.
241. Zhang, Y., Lyver, E. R., Knight, S. A., Lesuisse, E. y Dancis, A. 2005. Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis. *J. Biol. Chem.* **280**: 19794-19807.

242. Zheng, L. y Dean, D. R. 1994. Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* **269**: 18723-6.
243. Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. y Dean, D. R. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **273**: 13264–13272.
244. Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. Y Dean, D. R. 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**: 2754-8.
245. Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L. y Dean, D.R. 1994. Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry.* **33**: 4714-20.