

Segura-Mejías, Alicia (1), Guerrero-Gómez, David (1), Colino-Lage, Hildegard (1), Valenzuela-Villatoro, Marina (1) y Miranda-Vizuet, Antonio (1,*)
Grupo Homeostasis Redox, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

Tutor académico: Tejedo, Juan R. Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

1 Introducción

La muerte celular es una característica esencial en el desarrollo de organismos pluricelulares. Este proceso está involucrado en diversas enfermedades degenerativas y distintos tipos de cáncer, por lo que comprender este mecanismo es importante para conocer y tratar enfermedades de alto impacto en la sociedad actual. Hace unos años, se describió una nueva forma de muerte celular programada dependiente de hierro involucrada en dichas enfermedades. Esta muerte celular, llamada ferroptosis, se caracteriza por un aumento masivo de los niveles de hidroperóxidos lipídicos debido a la reacción de fenton, que provoca alteraciones letales de la membrana.

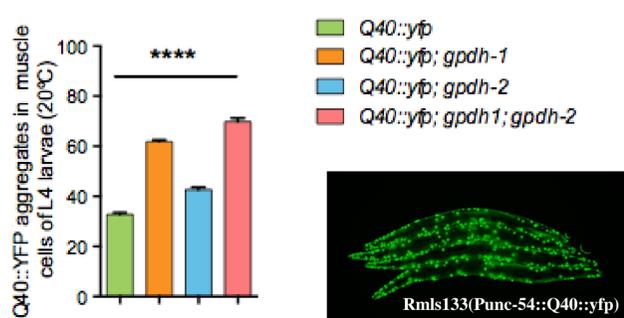
Actualmente, el proceso de ferroptosis no se conoce con exactitud y hay muchas preguntas sin resolver, entre ellas, la búsqueda de mecanismos protectores frente a la ferroptosis. En células de mamíferos se conoce dos: uno de ellos es dependiente de la glutatión peroxidasa 4 (GPX4) que detoxifica los hidroperóxidos lipídicos tóxicos (L-OOH). Esta peroxidasa necesita glutatión como donador de electrones, cuya síntesis depende de la disponibilidad de cisteína en la célula, por lo que la cisteína puede ser un factor esencial en la protección a ferroptosis.

El otro mecanismo protector frente a ferroptosis en el que nos centraremos en este estudio es osmorregulación celular. En este sentido, cabe resaltar la investigación de Riegman *et al.* (2020) donde establecen que la ferroptosis puede ser un proceso osmótico, ya que puede ser bloqueada por compuestos osmoprotectores.

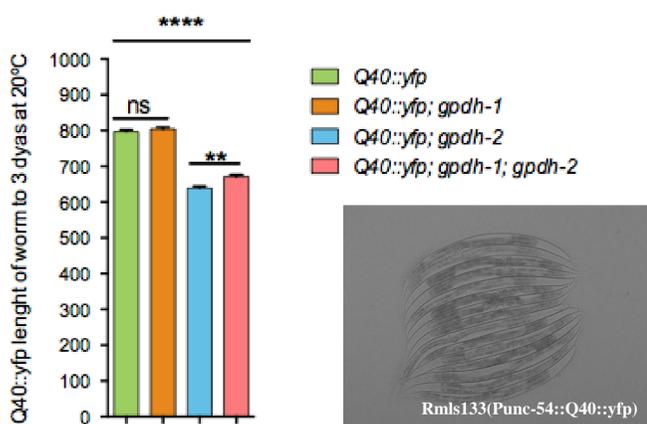
2 Objetivos

- Caracterizar el proceso de ferroptosis en *Caenorhabditis elegans* mediante el bloqueo de las distintas rutas de síntesis de cisteína presentes en el nematodo: ruta de transulfuración, vía de asimilación del cianuro y reducción de cistina.
- Determinar si la ferroptosis en *C. elegans* se ve modificada por un aumento de la presión osmótica en un modelo de la enfermedad de Huntington.

4 Resultados



Cuantificación de agregados poliQ. Hay diferencias significativas entre las estirpes con un nivel de significancia $p < 0.01$. Las estirpes con la mutación *gpdh-1* presentan el doble de agregados proteicos que el control Q40, mientras que la mutación *gpdh-2* aumenta el número de agregados en menor medida.



Determinación de longitud. Hay diferencias significativas entre las estirpes que portan la mutación *gpdh-2* con un nivel de significancia $p < 0.01$, pero no hay diferencias significativas entre *Q40::yfp* y *Q40::yfp; gpdh-1*. Los animales con *gpdh-2* presentan un menor crecimiento.

Ensayos ARNi.

No vemos diferencias significativas en los ensayos de ARNi de *cbs-1* sobre las estirpes *cysl-1*, *trp-14* y *cysl-1; trp-14*. Sin embargo, el ARNi de *cysl-1* y ARNi de *trp-14* sobre la estirpe *cbs-1* nos mostró que la estirpe *cbs-1* crece mejor utilizando *E. coli* HT115 como fuente de alimento.

3 Metodología

Se usaron diferentes mutantes por delección de la ruta de síntesis de cisteína en *C. elegans*: *cbs-1* en la ruta de transulfuración, *cysl-1* en la ruta de asimilación del cianuro y *trp-14*, una cistina reductasa que es capaz de reducir L-cistina a cisteína. También se utilizaron dos mutantes por delección de dos glicerol-3-fosfato deshidrogenasas, los mutantes *gpdh-1* y *gpdh-2*. Las estirpes se cruzaron 6 veces con animales silvestres N2 para eliminar mutaciones adicionales generadas en el proceso de mutagénesis y posteriormente se cruzaron con la estirpe Q40, modelo de la enfermedad de Huntington que presenta agregados proteicos, marcados con YFP, en las células musculares. Las estirpes se cultivaron a 20°C en placas de medio NGM con *Escherichia coli* como fuente de alimento.

Se cuantificó el crecimiento de las estirpes *Q40::yfp; gpdh-1*, *Q40::yfp; gpdh-2* y *Q40::yfp; gpdh-1; gpdh-2* con un microscopio acoplado a una cámara que permite fotografiar los animales y posteriormente analizar su longitud con el software ImageJ. Además, se cuantificaron los agregados proteicos de estas estirpes con un microscopio de fluorescencia. Los datos estadísticos se analizaron con el software GraphPad Prism 9.

Por último se realizaron ensayos de ARN de interferencia, donde se clonó la secuencia específica de los genes de interés en el plásmido pL4440, que se introdujo en la estirpe *E. coli* HT115.

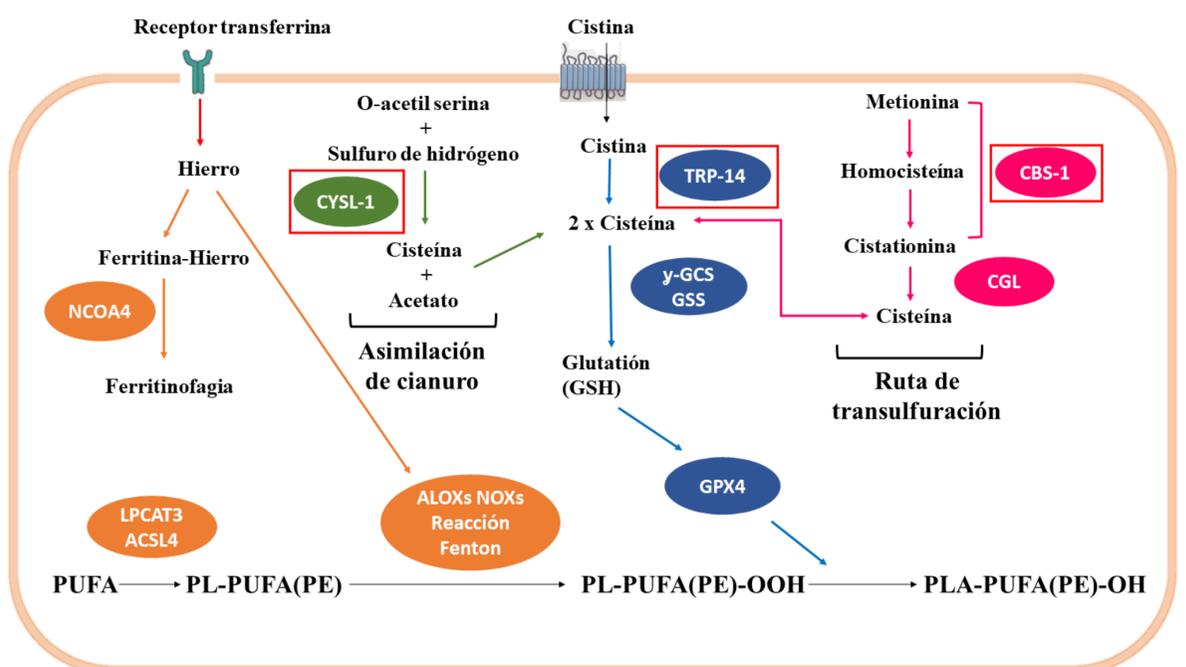


Figura 1: Rutas de síntesis de cisteína en *Caenorhabditis elegans*, aminoácido necesario para la síntesis de glutatión, esencial en la ruta de recuperación de ferroptosis. Las enzimas CBS-1, TRP-14 y CYSL-1 corresponden a los 3 mutantes elegido de la ruta de biosíntesis de cisteína.

Conclusiones:

- Los dobles mutantes *Q40::yfp; cysl-1*, *Q40::yfp; cbs-1* y *cysl-1; cbs-1* no se construyeron debido a que las mutaciones se encuentran en el cromosoma X, muy cerca unas de otras.
- *cbs-1* presenta un desarrollo ralentizado debido a la acumulación de homocisteína, un compuesto tóxico para el animal. En humanos la acumulación de homocisteína causa la enfermedad homocistinuria. Sin embargo, la estirpe *E. coli* HT115 mejora el crecimiento debido a que contiene altos niveles de vitamina B12, cofactor necesario para la enzima metionina sintasa, encargada de convertir la homocisteína en metionina.
- El gen *gpdh-1* aumenta la cantidad de agregados *poliQ* en las células del músculo, independientemente de *gpdh-2*. El mutante *gpdh-1* es más sensible a la proteostasis, pero su crecimiento no se ve afectado.
- El gen *gpdh-2* no afecta en gran medida a los agregados *poliQ*, pero sí ralentiza el desarrollo de los animales, independientemente de *gpdh-1*.