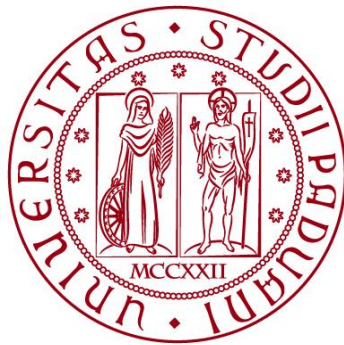


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**EFFETTI DELLA FERROSTATINA-1 SUL RECUPERO
DELLA FUNZIONE CARDIACA IN TOPI SIRT3cKO
TRAMITE UN'AZIONE SPECIFICA A LIVELLO DEI
CLUSTER FERRO-ZOLFO E DELL'ACONITASI
MITOCONDRIALI**

**Tutor: Professoressa Paola Costantini
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Laura Valente

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE GENERALE

1. Abstract.....	3
2. Stato dell'arte: la ferroptosi.....	4
2.1. La ferroptosi è diversa da tutte le altre forme di morte cellulare regolata.....	4
2.2. I <i>pathways</i> metabolici coinvolti nella ferroptosi.....	4
2.2.1. Metabolismo degli aminoacidi e del glutatione.....	4
2.2.2. Metabolismo dei lipidi.....	5
2.2.3. Metabolismo del ferro.....	6
2.3. Il ruolo della ferroptosi in patologie e neoplasie e il possibile impiego di composti modulatori.....	7
2.4. Introduzione allo studio: <i>knockout</i> di Sirtuina 3, la somministrazione di Ferrostatina-1 e un possibile <i>link</i> con l'atassia di Friedreich.....	8
3. Materiali e metodi.....	10
3.1. Il modello animale.....	10
3.2. Iniezione di Fer-1 e isolamento del muscolo cardiaco.....	10
3.3. Misurazioni ecocardiografiche.....	10
3.4. Separazione del citosol e dei mitocondri.....	11
3.5. Western blot.....	11
3.6. I saggi.....	11
3.7. Misurazioni sui mitocondri isolati.....	12
3.7.1. Misurazione della quantità di ROS mitocondriali.....	12
3.7.2. Il potenziale di membrana mitocondriale.....	12
3.7.3. Saggi sui singoli complessi della catena respiratoria.....	12
3.8. L'analisi statistica.....	13
4. Risultati.....	14
4.1. Il <i>knockout</i> di SIRT3 nei cardiomiociti causa insufficienza cardiaca nei topi.....	14
4.2. Nei topi SIRT3cKO si osserva uno stato di iperacetilazione mitocondriale, la ferroptosi e il malfunzionamento dell'aconitasi.....	15
4.3. Nei topi SIRT3cKO si evidenzia una disregolazione dell'omeostasi del ferro e un aumento della produzione di ROS mitocondriali.....	17
4.4. Fer-1 migliora gradualmente la funzione cardiaca.....	18
4.5. Fer-1 determina l'aumento dell'espressione di GPX4 nei mitocondri e ripristina il funzionamento dell'aconitasi.....	19
4.6. Fer-1 recupera parzialmente la funzione dei complessi della catena respiratoria.....	20
5. Discussione.....	21
6. Bibliografia.....	26
7. Appendice.....	28

1. Abstract.

La ferroptosi è una morte cellulare regolata ferro-dipendente, causata dall'accumulo di perossidi lipidici. Il meccanismo non è ancora ben chiarito, pur essendo noto che si trova al crocevia tra i *pathways* metabolici cellulari lipidico, aminoacidico e del ferro. Numerose sono le ricerche sul ruolo della ferroptosi nelle patologie, ma anche sul possibile impiego di suoi specifici inibitori in terapia.

Lo studio analizzato pone l'attenzione sulla cardiomiopatia: il *knockout* del gene per la Sirtuina 3 nei cardiomiociti ha permesso di osservare il tipico fenotipo dell'insufficienza cardiaca. La causa è da riconoscere nella significativa riduzione dell'espressione dell'aconitasi e della GPX4 mitocondriali, inoltre si evidenzia l'aumento di 4-HNE: SIRT3 opera specificamente nei mitocondri e la sua assenza comporta la rottura dell'equilibrio ossidativo cellulare, nonché la ferroptosi mitocondriale.

Emerge anche la riduzione dei livelli di espressione della fratassina, una proteina mitocondriale: si ipotizza una correlazione tra l'insufficienza cardiaca riscontrata nei SIRTcKO e la cardiomiopatia caratteristica dell'atassia di Friedreich, malattia neuro- e cardiodegenerativa associata proprio alla riduzione dei livelli di espressione della fratassina.

Infine, l'esperimento ha incluso l'impiego della Fer-1 sui topi SIRT3cKO: si osserva un parziale ripristino della funzione cardiaca e un aumento nell'espressione sia di GPX4, che dell'aconitasi mitocondriale, oltre che di ISCU e mitoNEET, il che suggerisce che la Ferrostatina-1 agisce a livello dei Fe-S mitocondriali. Pertanto, questo studio suggerisce che l'inibizione della ferroptosi mitocondriale potrebbe essere utilizzata a scopo terapeutico per le cardiomiopatie mitocondriali.

2. Stato dell'arte: la ferroptosi.

Nel 2012, il laboratorio di Stockwell ha individuato una forma peculiare di morte cellulare nelle piastre da coltura, che venne chiamata “ferroptosi”. In proposito, Dixon et al. scrissero che si trattava di un *pathway* piuttosto enigmatico, in quanto mancante di molti dei caratteri tipici della morte apoptotica: emerse che era indotta da composti “*RAS-Selective Lethal*”, come l'erastina ed RSL3 da loro impiegati, e che inoltre era contraddistinta da un accumulo di specie reattive dell'ossigeno, specialmente lipidiche, ma anche che agenti chelanti gli ioni ferro e l'inibizione del suo *uptake* erano in grado di prevenirla, proprio come antiossidanti lipofilici [2].

Ad oggi, nonostante in molti abbiano proseguito con gli studi, la funzione fisiologica ed evolutiva della ferroptosi rimane ignota, mentre è stata chiarita la sua implicazione in meccanismi patologici. Questo capitolo si propone di fornire una visione dei meccanismi e delle proprietà che la caratterizzano, ponendo l'attenzione sulla loro complessità.

2.1. La ferroptosi è diversa da tutte le altre forme di morte cellulare regolata.

Questa morte cellulare regolata presenta aspetto morfologico, regolazione biochimica e genetica singolari. Per esempio, l'apoptosi è evidente nel *blebbing* della membrana cellulare, nella frammentazione del nucleo e nella condensazione della cromatina; la membrana plasmatica, invece, si rompe e il citoplasma e gli organelli aumentano di volume nella morte per necrosi, se questa è indotta dal perossido di idrogeno. Nulla di quanto descritto interessa le cellule ferroptotiche, sebbene esse condividano con il meccanismo necrotico il rilascio di composti intracellulari (in particolare, di alcuni DAMPs). Il solo elemento realmente evidente nella ferroptosi è l'aspetto danneggiato dei mitocondri: dalle analisi al TEM si vede chiaramente che tali organelli sono più piccoli e che le loro membrane sono notevolmente più dense del normale.

Per il resto è stata verificata l'assenza di ogni possibile correlazione con le altre forme di morte cellulare, in quanto gli specifici effettori di queste ultime non erano in grado di influenzare la ferroptosi. Per esempio, gli inibitori delle caspasi o delle catepsine, protagoniste dell'apoptosi, come anche gli inibitori della morte cellulare per autofagia, non hanno sortito alcun effetto. La morte indotta da erastina è indipendente anche dal macchinario apoptotico Bax/Bak, tanto che non avviene il rilascio di citocromo *c*.

Infine, il *pattern* di espressione genica in grado di regolare l'esecuzione della ferroptosi si discosta totalmente da quelli di controllo di tutte le altre morti cellulari geneticamente regolate e coinvolge i *pathways* metabolici di seguito descritti.

2.2. I *pathways* metabolici coinvolti nella ferroptosi.

2.2.1. Metabolismo degli aminoacidi e del glutatione.

Nel lavoro pubblicato da Dixon et al. nel 2012, il gruppo di ricerca scoprì che l'erastina era in grado di indurre la ferroptosi agendo sul *System X_c⁻*, un antiporto che scambia glutammato intracellulare e cistina in rapporto 1:1. Nello specifico, essa inibiva la sua subunità SLC7A11, producendo l'aumento, verificato

sperimentalmente, dell'espressione del gene come strumento di compensazione da parte della cellula. Dato che l'inibizione del Sistema X_c^- comporta l'avvio della ferroptosi cellulare, evidentemente il metabolismo degli aminoacidi e la loro disponibilità intracellulare ed extracellulare sono correlati alla regolazione del suo meccanismo. Difatti è stato osservato che la concentrazione extracellulare di glutammato influenza la funzione dell'antiporto: se è particolarmente elevata, il Sistema smette di importare la cistina, presto trasformata in cisteina, determinando l'avvio della ferroptosi cellulare.

Lo stesso *System X_c^-* , poi, permette la sintesi di glutatione (GSH), un tripeptide attivo nel mantenimento dell'equilibrio redox della cellula: costruito tramite il legame tra cisteina, glutammato e glicina, partecipa come cofattore alla reazione di riduzione dei perossidi lipidici operata dalla glutatione perossidasi 4 (GPX4). Quindi la disponibilità intracellulare di cisteina, proporzionale all'attività dell'antiporto, è fondamentale per le reazioni a valle, tanto che alcune cellule sono capaci di sfruttare una reazione alternativa di sintesi della Cys a partire dalla metionina, in caso di malfunzionamento del *System X_c^-* (sono di conseguenza resistenti alla ferroptosi). Eppure, per avviare quest'ultima, l'inibizione del Sistema X_c^- non è condizione necessaria.

La famiglia delle glutatione perossidasi (GPX) è utilizzata dalle cellule e dai loro organelli per mantenere l'equilibrio ossido-riduttivo e la GPX4 è l'enzima antiossidante primario, attivo contro il meccanismo ferroptotico: trasforma i perossidi lipidici in alcoli lipidici, a ridotta tossicità, ponendosi, per così dire, come elemento di collegamento tra il metabolismo degli aminoacidi e quello dei lipidi. Infatti, la sua funzione e la sua espressione sono spesso alterati nei modelli sperimentali per la ferroptosi.

2.2.2. Metabolismo dei lipidi.

La reazione di perossidazione, considerata a monte della maggior parte degli eventi ferroptotici, era in precedenza distinta tra una forma enzimatica, che necessitava dell'azione delle lipossigenasi (LOX), e una non enzimatica, innescata dai radicali liberi presenti nell'ambiente. Tuttavia, oggi non si segna un confine tanto netto tra i due meccanismi, considerato che l'avvio della ferroptosi è generalmente dovuto alla concomitanza di tanti fattori.

Il substrato della perossidazione è rappresentato dagli acidi grassi polinsaturi (o PUFAs), presenti nelle cellule sia in forme libere che associate ad altre componenti lipidiche, come i fosfolipidi di membrana. In particolare, l'inserimento di PUFAs in fosfatidiletanolamine sembra essere la chiave d'innescò del meccanismo perossidativo e la reazione che porta ai cosiddetti PL-PUFA(PE) endogeni è catalizzata, per esempio, dall'enzima ACSL4: fa parte delle acil-CoA sintetasi ("*Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 4*") e i composti attivi da esso prodotti sono cruciali, appunto, nella segnalazione cellulare che causa la ferroptosi. Diversi gruppi di ricerca, inoltre, hanno riscontrato la presenza dei perossidi lipidici derivanti dai PL-PUFA(PE) nei *bilayers* fosfolipidici delle membrane, ma non si è ancora giunti all'identificazione del compartimento *trigger* della morte cellulare: è stato ipotizzato che si trattasse del reticolo endoplasmatico, dei mitocondri o ancora dei lisosomi.

Per quanto riguarda, invece, le LOXs, il meccanismo con cui esse riescono a perossidare i PUFAs è ancora sconosciuto. Con alta probabilità agiscono preferenzialmente sugli acidi grassi polinsaturi liberi nella cellula, piuttosto che su quelli contenuti in molecole fosfolipidiche, ma è possibile anche che siano in grado di ossidare efficacemente i componenti delle strutture diverse dai *bilayer* che i PL-PUFA(PE) tendono a formare.

Di derivazione perossilipidica sono alcuni sottoprodotti della frammentazione, come il 4-idrossinonenale (4-HNE), presenti ad alti livelli nelle cellule e negli organelli in ferroptosi: esso è considerato un marcatore del *pathway* attivo, oltre che di stress ossidativo.

2.2.3. Metabolismo del ferro.

Si definisce la ferroptosi come un meccanismo ferro-dipendente dato che, fin dai primi studi, è emerso che i composti chelanti ioni ferro sono in grado di inibirla. Evidentemente il suo meccanismo prevede il loro accumulo eccessivo, fortemente *detrimental* per le cellule: in effetti si osserva un significativo aumento del contenuto di ferro citosolico e mitocondriale in seguito all'induzione della ferroptosi; inoltre, l'aggiunta di ferro esogeno incrementa la suscettibilità delle cellule a tale meccanismo.

Nel citosol e nei mitocondri, il ferro forma i cosiddetti *Labile Iron Pool* (LIP), dove è presente in due forme distinte, la ridotta Fe(II) e l'ossidata Fe(III). Tra di esse esiste un equilibrio, in condizioni fisiologiche, ma esso viene pienamente alterato nelle cellule o nei mitocondri soggetti a ferroptosi: nello specifico, aumenta la quantità relativa di Fe^{2+} , ione particolarmente attivo nelle reazioni redox e responsabile della formazione di specie reattive dell'ossigeno, le quali possono promuovere la perossidazione dei lipidi. La produzione di ROS ferro-dipendente procede attraverso le reazioni di Haber-Weiss e di Fenton: il loro contributo è una delle ipotesi più rilevanti per il ruolo chiave che il ferro ricopre nell'innescare della ferroptosi dato che, in realtà, gli esatti meccanismi che lo vedono protagonista non sono chiari.

In ogni caso, anche le proteine responsabili del mantenimento dell'omeostasi del ferro svolgono importanti funzioni nell'induzione o nell'inibizione della ferroptosi: per esempio, la transferrina (che importa ioni dall'ambiente extracellulare verso il citoplasma) risulta necessaria per l'avvio della ferroptosi, nella fase di accumulo. Ancora la ferritina, la quale mantiene stabile la quantità di ferro nei LIP sequestrandolo se è in eccesso, può diminuire nelle cellule, a causa della cosiddetta ferritinofagia, aumentando la suscettibilità cellulare alla ferroptosi. Infine, la regolazione dell'omeostasi cellulare del ferro è realizzata anche dall'aconitasi che, quando il ferro scarseggia, funziona da regolatore positivo post-trascrizionale dei geni coinvolti nel suo metabolismo (in particolare, ciò è stato verificato per l'ACO1 citosolica); inoltre sappiamo che è importante anche nella regolazione dello stress ossidativo della cellula, riuscendo essa a ridurre le specie reattive dell'ossigeno.

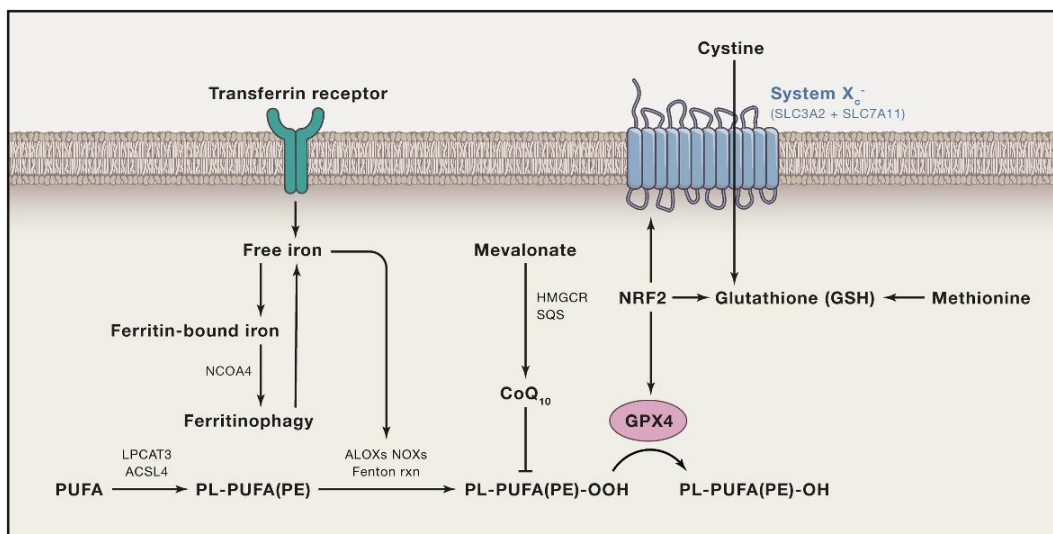


Figura 1. In figura, i *pathways* che regolano la ferroptosi, descritti nei paragrafi 2.2.1, 2.2.2, 2.2.23.

2.3. Il ruolo della ferroptosi in patologie e neoplasie e il possibile impiego di composti modulatori.

La ferroptosi ha suscitato un grande interesse nella ricerca, poiché possiede un legame duplice con la patologia: se da una parte può essere sfruttata come meccanismo terapeutico per inibire la proliferazione delle cellule tumorali, dall'altra è stato riconosciuto che può contribuire alla manifestazione di diverse patologie, motivo per cui, in questi casi, sarebbe maggiormente utile inibirla.

Il trattamento di formazioni neoplastiche con attivatori della ferroptosi ha mostrato efficacia nell'inibizione della loro crescita: in particolare, da alcuni studi è emerso che l'uso di molecole che bloccano la funzione del Sistema X_c^- è utile per bloccare proprio la crescita tumorale, così come l'inibizione chimica e genetica della sintesi di glutatione, inducendo la morte delle cellule neoplastiche secondo il meccanismo ferroptotico. È stato sperimentato tramite studi *in vivo* che composti analoghi all'erastina, di per sé letale per cellule tumorali ingegnerizzate, sono efficienti nel trattamento di neoplasie xenotrapiantate.

Per questa ragione lo studio degli attivatori della ferroptosi è stato estremamente prolifico negli ultimi anni, in virtù del loro potenziale impiego come antitumorali: se ne conoscono numerosissimi, di diversa natura chimica e con diversi *target* cellulari, sia piccole molecole e nanoparticelle, ma anche strutture di dimensioni maggiori, come proteine o acidi nucleici. È risultata particolarmente efficace l'inattivazione dei VDAC, canali ionici mitocondriali, che comporta un veloce aumento di ROS e porta alla ferroptosi (pare che questa sia una delle modalità di azione dell'erastina): tra gli altri composti attivi in questo senso, il DIDS contribuisce all'efficacia della radioterapia contro alcune forme di cancro. Anche l'utilizzo di piccole molecole che agiscono sul metabolismo lipidico per attivare la ferroptosi è risultato efficace nel trattamento specifico contro il carcinoma epatocellulare, per esempio il farmaco sorafenib.

Dall'altra parte, è stata individuata una possibile connessione fra l'attivazione del meccanismo ferroptotico e il fenotipo di alcune patologie, per esempio in provocate da ischemie, ma anche in malattie neurodegenerative. In queste ultime, l'analisi dei

livelli di ferro nel cervello ne ha evidenziato un forte incremento, pertanto la correlazione con la ferroptosi è evidente. In altri casi si è osservato che l'eliminazione della proteina GPX4 in topi adulti causa morte neuronale simile a quella osservata nei pazienti affetti da AD.

Conseguentemente le ricerche portate avanti in merito propongono di impiegare composti inibitori della ferroptosi a scopo terapeutico: in effetti, si è visto che la somministrazione di composti RTAs (*Radical Trapping Antioxidant*, tra questi le Ferrostatine e le Lipostatine) protegge efficacemente i modelli sperimentali da molte malattie (ad esempio i danni ischemici ai reni, al fegato, al cervello e anche al cuore). Questa è la classe di inibitori primariamente impiegata negli studi e la loro funzione ricalca, d'altronde, quella di molecole RTA endogene: esse rappresentano la modalità di protezione delle cellule, in particolare, dalla perossidazione lipidica. Degli inibitori della ferroptosi sono infine note alcune categorie chimiche; tuttavia, sono stati meno studiati degli attivatori con funzione antitumorale e la sperimentazione che li coinvolge come farmaci è ancora alle sue fasi iniziali: non abbiamo informazioni, ad esempio, sulla loro possibile tossicità.

2.4. Introduzione allo studio: *knockout* di Sirtuina 3, la somministrazione di Ferrostatina-1 e un possibile *link* con l'atassia di Friedreich.

Per introdurre lo studio di Cantrell et al. [1] preso in esame nel presente elaborato, è utile ricordare che la Sirtuina 3 è una deacetilasi mitocondriale NAD⁺-dipendente e una regolatrice chiave di molti processi cellulari, tra cui lo stato ossidativo. Lo stesso gruppo di ricerca aveva già reso nota una possibile implicazione di tale enzima nel meccanismo ferroptotico: il *knockout* del suo gene nei cardiomiociti, infatti, induce l'alterazione dei livelli di espressione di proteine ad esso correlate (aumento di 4-HNE, ROS e decremento di GPX4), come si discuterà in modo analitico nei capitoli successivi. Anche in quest'altro caso i topi manifestavano disfunzione cardiaca (in particolare, fibrosi cardiaca) [4]. L'anello di collegamento proposto tra SIRT3 e ferroptosi è rappresentato dalla proteina p53, specificamente dalla sua attività regolatoria della trascrizione di alcuni geni specifici: in questa risulta cruciale la sua acetilazione che, se assente, non induce la ferroptosi. Ciò è dimostrato dalle analisi condotte su topi esperimenti la p53 mutata presso i 4 residui lisinici (nominati p53^{4KR}) spesso modificati, in cui le funzioni ferroptotiche, inattive, non sono alterate. Invece, l'assenza della Sirtuina 3 nei modelli SIRT3cKO determina l'aumento non solo dell'acetilazione della componente proteica della cellula, compresa la p53, ma anche della morte ferroptotica; al contrario, nella linea di topi sperimentali SIRT3cKO/p53^{4KR} (dall'incrocio tra i SIRT3cKO e i mutanti per la p53) non si osserva l'aumento della ferroptosi [8]. Probabilmente la proteina acetil-p53 induce tale morte cellulare mediante la *down*-regolazione della trascrizione del gene *Slc7a11* per la subunità del *System X_c⁻*, inducendo la rottura dell'equilibrio ossidativo garantito dal glutatione. Tuttavia, le funzioni cellulari di p53 sono numerosissime, quindi è possibile che la causa sia da ritrovare anche in altri *pathways*.

La Ferrostatina-1 è spesso utilizzata come sistema per indagare il ruolo della ferroptosi nei gruppi sperimentali utilizzati, proprio come nell'articolo che si sta introducendo. Si tratta di una piccola molecola identificata da Dixon e il suo gruppo nel 2012, mediante uno *screening high-throughput*, come efficiente inibitore dei

meccanismi ferroptotici indotti da erastina ed RSL3. Probabilmente ha attività di molecola riducente, grazie all'ammina aromatica primaria nella sua struttura, e di RTA, che le permette di agire sui perossidi lipidici con la sua porzione lipofila.

Infine, fratassina è una proteina della matrice mitocondriale responsabile, secondo meccanismi molecolari non del tutto chiariti, dell'assemblaggio dei *cluster* ferro-zolfo, nonché del loro trasferimento su proteine ISC-dipendenti. La mutazione in omozigosi del suo gene *FXN*, rappresentata dall'espansione di una specifica tripletta nucleotidica, comporta nei suoi portatori la manifestazione dell'Atassia di Friedreich (FRDA), a causa della riduzione patologica dei livelli di proteina e, quindi, degli scompensi nelle attività mitocondriali in generale. I pazienti presentano un quadro clinico complesso, con progressiva degenerazione neuronale, atassia e insufficienza cardiaca, la quale si rivela il sintomo letale nell'85% dei casi. A livello sperimentale, è stata dimostrata una correlazione tra la fratassina e proprio la Sirtuina 3: i modelli murini per la FRDA mostrano lisine acetilate aumentate rispetto ai *wild-type*, soprattutto presso le proteine *target* di SIRT3, come la subunità NDUFA9 del Complesso I [9]. Per questo motivo è possibile dedurre che tale deacetilasi sia inibita in assenza di FXN, ipotesi da cui derivano alcune considerazioni contenute nello studio poi analizzato. La fratassina è stata anche testata come possibile regolatore della ferroptosi ed è emerso che la sua inibizione favorisce notevolmente il meccanismo di morte cellulare indotto dall'erastina e interrotto con successo dal trattamento con Ferrostatina-1 [3].

3. Materiali e metodi.

3.1. Il modello animale.

Per la sperimentazione descritta nel presente elaborato sono stati utilizzati esemplari di topo SIRT3loxP con funzione, *in primis*, di controllo, in quanto animali *wild-type* (WT); inoltre, il loro incrocio con esemplari appartenenti a un altro ceppo transgenico, caratterizzato dal promotore cardiomiociti-specifico MyHC-Cre, ha dato vita a una linea contraddistinta dal *knockout* del gene per SIRT3 (SIRT3KO), confermato mediante PCR e, per quanto attiene alla sua espressione nei cardiomiociti, con un Western Blot.

I topi utilizzati per la ricerca sono stati mantenuti in laboratorio, nutriti e trattati per le sperimentazioni in accordo con le direttive dei *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Per la maggior parte degli esperimenti descritti di seguito è stato utilizzato un campione di 3–6 topi, per ciascun gruppo sperimentale, mentre le misure ecocardiografiche sono state eseguite, inizialmente, su 5–17 esemplari e su 12 dopo il trattamento con Ferostatina-1.

3.2. Iniezione di Fer-1 e isolamento del muscolo cardiaco.

Gli animali sui quali si è lavorato sono stati sottoposti a un trattamento con Ferostatina-1 della durata di quattordici giorni, con iniezioni intraperitoneali giornaliere. La dose quotidiana era pari a 1 mg/kg di peso corporeo.

Si è, quindi, proceduto all'estrazione dei cuori, successiva a eutanasia (sempre secondo i protocolli approvati dai comitati etici), e quindi alla conservazione in N₂ liquido.

3.3. Misurazioni ecocardiografiche.

Per valutare la funzione cardiaca nei diversi gruppi della sperimentazione sono state realizzate misurazioni ecocardiografiche utilizzando il sistema di *imaging* per piccoli animali Vevo 3100 Preclinical Imaging Platform. Durante l'acquisizione di tali misure, i topi erano anestetizzati, avendo inalato isoflurano, al 1-1.5%, e ossigeno medicinale (100%).

Stabilizzando il battito cardiaco nel *range* dei 450-500 battiti per minuto, è stato possibile stabilire il valore di diversi parametri miocardici, tra i quali la frazione di eiezione (in inglese, EF), la riduzione percentuale della dimensione del ventricolo sinistro durante la fase sistolica ("*fractional shortening*", FS), quindi il volume e il diametro del ventricolo sinistro, sia alla fine della diastole che della sistole (che, rispettivamente, sono LV Volume;d, LV Volume;s, LV Diameter;d ed LV Diameter;s). Si tratta di valori che indicano, appunto, la funzione ventricolare nello specifico. Ugualmente per il ventricolo sinistro sono stati misurati lo spessore della parete anteriore (LVAW) e posteriore (LVPW), il volume sistolico (SV) e la gittata cardiaca (CO).

Inoltre, mediante ecocardiografia Doppler mitrale e tissutale è stata analizzata la funzione diastolica dei topi sottoposti all'esperimento: è stato, quindi, possibile

misurare precisamente la velocità picco del flusso mitrale all'inizio della diastole (E) e quella finale, cioè l'atriale (A), insieme al tempo di rilasciamento isovolumetrico (IVRT) e a quello di contrazione isovolumetrica (IVCT). A questo punto, la somma degli ultimi due valori, diviso il tempo di eiezione aortica (AET, misurabile mediante la visualizzazione a quattro camere), ha indicato l'indice di performance miocardica, informativo a proposito della funzione ventricolare sinistra insieme sistolica e diastolica: $MPI = (IVRT + IVCT) / AET$.

3.4. Separazione del citosol e dei mitocondri.

Dai cuori di topo estratti è stato isolato il solo ventricolo sinistro, quindi omogeneizzato in agitazione tramite un buffer con la seguente composizione: KCl 100mM, Mops 50mM, MgSO₄ 5mM, EGTA 1mM e, infine, ATP 1mM. La porzione correttamente omogeneizzata è stata separata dal resto con 10 minuti di centrifuga (500 rcf): è stato prelevato il solo surnatante, utile per i passaggi successivi.

Questo è stato centrifugato ulteriormente, per 15 minuti a 800 rpm, in modo tale da separare un nuovo surnatante, citosolico, che è stato subito addizionato con un cocktail di inibitori delle proteasi e quindi congelato in N₂ liquido; il pellet mitocondriale, invece, prima risospeso in un buffer KME (KCl, Mops ed EGTA), ha poi subito un nuovo procedimento di centrifuga per 15 minuti (800 rpm). Il pellet risultante, corrispondente a una frazione grezza di mitocondri, è stato infine risospeso nello stesso buffer KME, addizionato con 7.5µl di inibitori delle proteasi per ml di soluzione, e quindi posto a sua volta in azoto liquido per essere conservato.

3.5. Western blot.

Al fine di misurare il livello di espressione delle proteine di nostro interesse, si è proceduto con duplice analisi di Western blot sulle frazioni citosolica e mitocondriale, così da mettere in evidenza anche le differenze tra le due, oltre che tra i gruppi sperimentali. Le proteine estratte dai campioni sono state separate mediante SDS-PAGE in condizioni riducenti e poi trasferite su una membrana di PVDF, per procedere con l'*immunoblotting* e l'incubazione *overnight* con gli anticorpi. In particolare, i primari impiegati riconoscevano specificamente il 4-idrossinonenale (4-HNE), la Glutazione Perossidasi 4 (GPX4), la ferroportina, l'aconitasi, la Fratassina (FXN), la proteina p53 e anche la sua specifica modifica post-traduzionale acetil-Lys370. Inoltre, sono stati impiegati anticorpi primari per ISCU, MitoNEET, ACSL4, per la Ferritina Mitocondriale (FtMt), e SLC7A11. In seguito, le membrane sono state incubate con anticorpi secondari anti-mouse e anti-rabbit, coniugati con la perossidasi di rafano, che in seguito alla somministrazione del suo substrato permette di evidenziare le bande relative alle proteine sopraelencate.

3.6. I saggi.

Sono stati impiegati alcuni kit per la realizzazione di saggi, ad esempio per il dosaggio del ferro cellulare e mitocondriale nei campioni di miocardio e per testare la funzione dell'aconitasi. È stato, infine, portato avanti un test per misurare la quantità di perossidi lipidici (MDA) nell'intero tessuto cardiaco raccolto dagli animali.

3.7. Misurazioni sui mitocondri isolati.

3.7.1. Misurazione della quantità di ROS mitocondriali.

Mediante l'*Amplex Red Assay* è stata misurata la produzione di ROS mitocondriali (mtROS): è stato possibile visualizzare e quantificare il perossido di idrogeno nel campione e, contemporaneamente, il consumo di ossigeno molecolare.

Per tali misurazioni è stato utilizzato il Fluorespirometro Oroboros O2k (impiegato anche per il calcolo del livello della respirazione cellulare) settando specifici parametri di concentrazione di O₂ e di temperatura (37°C).

Il campione biologico sottoposto alla tecnica è il pellet di mitocondri intatti ottenuto per mezzo di una nuova omogenizzazione del miocardio isolato iniziale, lavato, risospeso in un *resuspension buffer* (mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM e MOPS 5 mM, a pH 7.4) e tenuto in ghiaccio.

3.7.2. Il potenziale di membrana mitocondriale.

Insieme alla respirazione dei mitocondri intatti e alla produzione di mtROS, con lo stesso Fluorespirometro Oroboros O2k è stato misurato il potenziale di membrana mitocondriale come il livello di *quenching* della fluorescenza emessa dalla safranina (1 µM nel campione). Di conseguenza, il decadimento del potenziale corrisponde all'aumento della fluorescenza osservata.

3.7.3. Saggi sui singoli complessi della catena respiratoria.

Utilizzando uno spettrofotometro, è stata misurata, alla temperatura di 25°C, l'attività specifica di alcuni enzimi mitocondriali, quali il Complesso I della catena di trasporto degli elettroni, il Complesso II, il Complesso III e l'aconitasi.

Per quanto riguarda il primo, l'attività è stata valutata in base all'andamento temporale dell'ossidazione del NADH. Lo spettrofotometro è stato impostato, quindi, alla lunghezza d'onda di 340 nm e alla soluzione nella cuvetta, insieme alla frazione mitocondriale, viene aggiunto anche NADH concentrato 100 µM.

Il Complesso II, invece, ossida gradualmente il sale sodico idrato di 2,6-dicloroindofenolo (DCPIP), fenomeno osservato sperimentalmente scegliendo 600 nm come lunghezza d'onda.

Per quanto riguarda il Complesso III, viene valutato l'andamento tempo-dipendente della riduzione del citocromo c, a 550 nm. Nella cuvetta, quindi, è stato aggiunto un analogo del coenzima Q, il *decylubiquinone*.

Infine, come indicazione dello stress ossidativo delle cellule, si effettua la misurazione dell'attività dell'aconitasi, in base al *time-course* della formazione di *cis*-aconitato (in questo caso lo spettrofotometro è stato settato a 240 nm).

Ognuno dei tassi di attività mitocondriale così ottenuti è stato normalizzato in base all'attività della citrato sintasi (che condensa ossalacetato e coenzima A, formando citrato), la quale funge da indicatore del contenuto in mitocondri in ciascun campione cardiaco utilizzato.

Separatamente, grazie al Fluorespirometro Oroboros O2k è stata misurata l'attività anche del Complesso IV della catena respiratoria mitocondriale, tramite l'aggiunta di ascorbato 3mM alla soluzione e un altro composto, il TMPD, cosicché questo cedesse elettroni al citocromo c.

3.8. L'analisi statistica.

Tutti i risultati sperimentali riportati nel presente elaborato sono espressi come la media aritmetica tra i dati raccolti nelle singole ripetizioni, $\pm \sigma$.

Utilizzando, poi, il *t*-test, è stato possibile riconoscere differenze statisticamente significative, o meno, tra i gruppi sperimentali (i test sono a due code, a campioni accoppiati o non accoppiati in base al caso specifico). Si considera statisticamente significativo un $p < 0.05$.

4. Risultati.

4.1. Il *knockout* di SIRT3 nei cardiomiociti causa insufficienza cardiaca nei topi.

Dalle misurazioni ecocardiografiche eseguite sui topi sperimentali, distinti tra *wild-type* e SIRT3cKO, oltre che tra maschi e femmine, emerge nel complesso l'insufficienza cardiaca negli esemplari che non esprimono la Sirtuina 3, tuttavia, come sarà chiarito di seguito, il fenotipo dei maschi è risultato ben più grave di quello delle femmine.

Quelli, infatti, in confronto ai WT, hanno riportato riduzioni significative dei valori della frazione di eiezione (EF), della *fractional shortening* (FS), nonché del volume sistolico (SV) e della gittata cardiaca (CO): è evidente che la funzione ventricolare sinistra, a cui tutti i parametri fanno riferimento, è fortemente compromessa e non garantisce il pompaggio dell'opportuno volume di sangue. Anche il diametro e il volume sistolici sono cambiati notevolmente di valore nei topi SIRT3cKO rispetto ai SIRT3loxP, oltre alla massa del ventricolo sinistro, la quale è aumentata. L'importante incremento nei parametri di tempo di contrazione e rilasciamento isovolumetrici (rispettivamente, IVCT e IVRT) comporta anche l'impennata dell'indice di performance miocardica MPI: indica, ancora, una globale e chiara disfunzione ventricolare sinistra, in questo caso grave. Si evidenzia anche l'assottigliamento delle pareti anteriore e posteriore dello stesso ventricolo sinistro in fase sistolica (LVAW;s e LVPW;s). Infine, anche la velocità del flusso mitrale decresce nei maschi SIRT3cKO rispetto ai *wild-type*, con corrispondente abbassamento del rapporto E/A (figura 2).

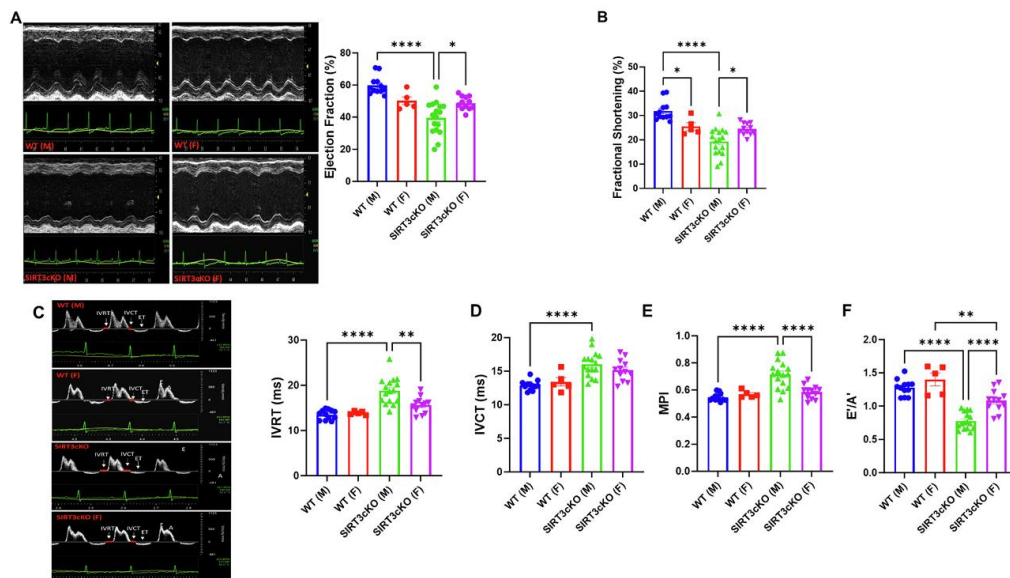


Figura 2. A. I maschi SIRT3cKO mostrano una EF significativamente ridotta rispetto ai WT e rispetto alle femmine SIRT3cKO. B. Nei maschi SIRT3cKO, anche la FS è significativamente ridotta che nei selvatici, mentre le femmine SIRT3cKO non mostrano variazioni significative. C. I valori di IVRT sono notevolmente maggiori rispetto ai *wild-type* solo nei maschi. D. Anche l'IVCT aumenta notevolmente degli esemplari maschi SIRT3cKO rispetto ai WT, mentre le femmine non mostrano una differenza significativa. E. L'MPI aumenta significativamente in entrambi i sessi. F. Il rapporto E/A risulta alterato sia nei maschi che nelle femmine SIRT3cKO.

Dall'altra parte, il fenotipo patologico mostrato dalle femmine SIRT3cKO è apparso meno grave, l'alterazione dei parametri miocardici più circoscritta e la ragione per cui ciò si è verificato è sconosciuta. Infatti, è sì emersa una riduzione dello *stroke volume* (SV) e del *cardiac output* (CO) dal confronto tra le SIRT3cKO e le WT, proprio come per i maschi della stessa linea transgenica, ma i valori di volume e diametro sistolici, sebbene leggermente diminuiti, non hanno mostrato differenze significative; lo stesso vale per la performance miocardica MPI, che si assesta su un livello statisticamente uguale a quello delle femmine *wild-type*. Il rapporto E/A risulta significativamente minore nelle SIRT3cKO, ma la compromissione della funzione mitrale è più lieve che nei maschi anche in questo caso. Va infine aggiunto che, se lo spessore della parete anteriore del ventricolo sinistro in sistole (LVAW;s) è rimasto pressoché invariato, quella posteriore (LVPW;s) ha vissuto un abbassamento significativo. Il quadro che se ne desume è di alterazione delle funzioni diastoliche nelle femmine, più che sistoliche, e viceversa per i maschi.

Il motivo per cui i risultati degli esami ecocardiografici sono così diversi tra maschi e femmine rimane ignoto e rappresenta un interessante spunto per successive sperimentazioni sul ruolo, potenzialmente distinto, della Sirtuina 3 nei cardiomiociti. Tuttavia, ai fini dello studio preso in esame in questo elaborato, si procede considerando i soli esemplari maschi SIRT3cKO (in paragone con i maschi *wild-type*) i quali, mostrando un fenotipo cardiaco maggiormente compromesso, permettono un'analisi approfondita dei meccanismi d'interesse: ci si riferirà, nei prossimi paragrafi, ai soli dati ottenuti dai maschi.

4.2. Nei topi SIRT3cKO si osserva uno stato di iperacetilazione mitocondriale, la ferroptosi e il malfunzionamento dell'aconitasi.

Dalle analisi di Western blot è emerso chiaramente che la maggior parte delle differenze dei livelli proteici tra topi SIRT3cKO e *wild-type* risiede nei mitocondri, il che è coerente con la localizzazione della proteina Sirtuina 3 in tale compartimento; pertanto, è facile prevedere che il maggiore scompenso dovuto alla sua assenza riguardi, appunto, i mitocondri.

SIRT3, come sappiamo, è un enzima che agisce da deacetilasi di alcuni specifici *target*, per questo è stato valutato lo stato di acetilazione totale della componente proteica, confrontando tra loro la frazione mitocondriale e il citosol dei cardiomiociti isolati. Si è effettivamente verificato che il livello di lisine acetilate nei mitocondri dei SIRT3cKO è fortemente incrementato, ma non nel citosol (figura 3). Tale difformità risulta identica nel test sull'espressione della proteina p53 mitocondriale acetilata presso la Lys370, bersaglio specifico della Sirtuina 3, invece la quantità di p53 totale è considerevolmente diminuita nei mitocondri dei SIRT3cKO, confrontati con i WT; al contrario, i rispettivi livelli nel citosol rimangono statisticamente invariati.

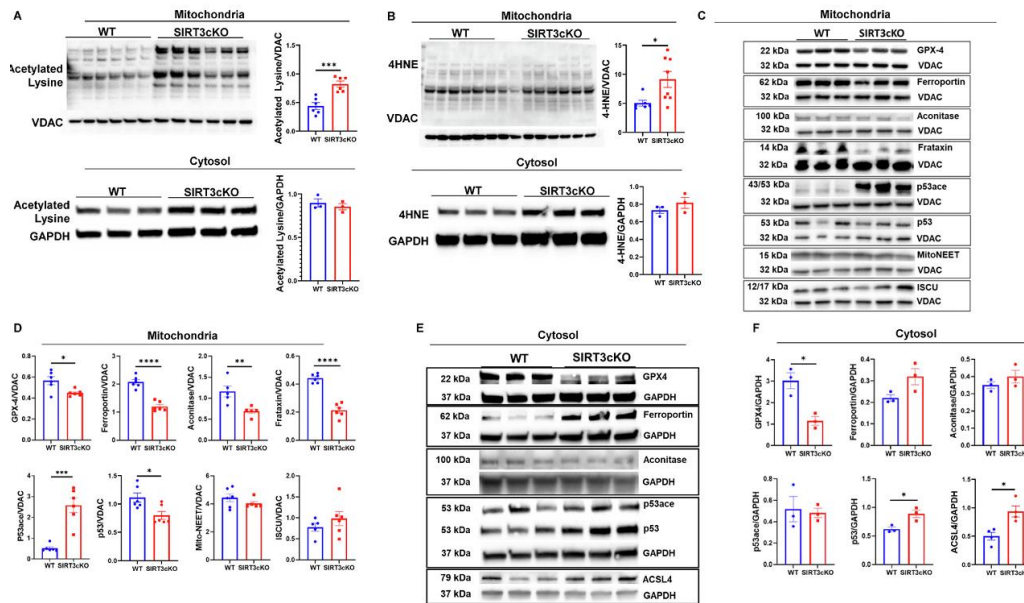


Figure 3. I topi SIRT3cKO mostrano, in confronto ai WT: **A.** livelli significativamente maggiori di lisine acetilate nei mitocondri, ma non nel citosol. **B.** Un aumento di 4-HNE mitocondriale e non citosolico. **D.** Nei mitocondri, la GPX4, la ferroportina, l’aconitasi, la frataxina e la proteina p53 totale sono ridotte, mentre l’acetil-p53 risulta aumentata. Invece, la MitoNEET e la ISCU non sono alterate. **F.** I livelli di GPX4 citosolica sono ridotti in modo significativo. L’aconitasi e la p53 acetilata non variano nel citosol, così come la p53 totale e la ACSL4 citosolica.

Coerentemente con quanto già precedentemente sperimentato dagli stessi autori dell’articolo qui esaminato, dai *blotting* si nota chiaramente che il *knockout* genico di SIRT3 crea uno scompenso in alcune proteine facenti parte dell’ampio meccanismo ferroptotico, *in primis* nel metabolismo degli aminoacidi, poiché l’espressione della glutazione perossidasi 4 (GPX4) è significativamente diminuita, sia nei mitocondri che nel citosol; lo stesso esito è stato rilevato a proposito del metabolismo dei lipidi, infatti aumentano i livelli citosolici di ACSL4 dei cardiomiociti di SIRT3cKO rispetto ai SIRT3loxP. Anche il metabolismo del ferro è risultato parzialmente alterato quando è mancata la Sirtuina 3 e, infatti, la ferroportina mitocondriale è stata significativamente diminuita. Infine, la molecola considerata *marker* della ferroptosi, 4-HNE (4-idrossinonenale) è risultata fortemente presente nei mitocondri dei SIRT3cKO, ma non nel citosol. Tutto ciò permette di concludere che la SIRT3 ha un importante ruolo nella ferroptosi e, nello specifico, l’inibizione della sua espressione induce il meccanismo ferroptotico nei mitocondri.

Hanno subito variazioni significative anche i livelli di espressione dell’aconitasi mitocondriale, che è ridotta, al contrario della sua quantità nel citosol. Ugualmente, la frataxina (FXN), a sua volta proteina mitocondriale, risulta diminuita in conseguenza del *knockout* della Sirtuina 3.

Invece, l’espressione di altre proteine coinvolte nel metabolismo del ferro, come la ferritina mitocondriale (FtMt), e nell’*uptake* del glutazione, ovvero una subunità del Sistema X_c (la SLC7A11), non sono state modificate dalla soppressione della SIRT3. Allo stesso modo, la Sirtuina 3 non ha effetti importanti sulla mitoNEET,

né sull'enzima di assemblaggio dei *clusters* Fe-S (ISCU), nonostante entrambe siano proteine dipendenti dal ferro (figura 3).

4.3. Nei topi SIRT3cKO si evidenzia una disregolazione dell'omeostasi del ferro e un aumento della produzione di ROS mitocondriali.

La ferroptosi, come è noto, si caratterizza per la rottura dell'omeostasi del ferro e, come conseguenza, anche dell'equilibrio ossidativo, cellulare o mitocondriale. In questo caso, lavorando con i cardiomiociti di topi SIRT3cKO, ed essendo la Sirtuina 3 una proteina mitocondriale, a livello citosolico lo stato di equilibrio è apparso conservato, tanto che il contenuto di ferro si è mantenuto invariato nei SIRT3cKO rispetto ai WT (negli studi *whole heart* non si evidenziano alterazioni significative), e l'attività dell'aconitasi citosolica non è particolarmente compromessa dall'assenza di SIRT3, segno del mantenimento anche di una fisiologica produzione di ROS.

Viceversa, i mitocondri dei cardiomiociti di SIRT3cKO hanno presentato una situazione fortemente alterata rispetto alle condizioni di equilibrio. Innanzitutto, la percentuale del Fe(II) dei *Labile Iron Pool* mitocondriali è maggiore che nei *wild-type*, mentre il Fe(III) è significativamente ridotto (figura 4): lo stato ferroso è maggiormente redox-attivo, il che lo rende direttamente implicato nel meccanismo ferro-dipendente della ferroptosi.

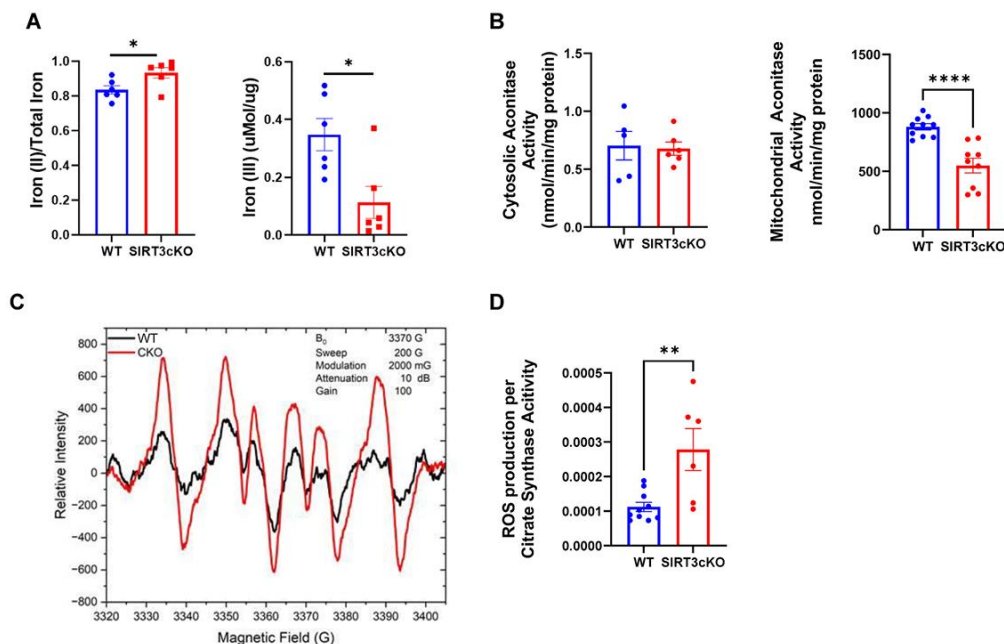


Figura 4. **A.** Nei mitocondri, la proporzione di Fe(II) nei LIP è significativamente maggiore che nei *wild-type*, mentre il Fe(III) risulta ridotto. **B.** L'aconitasi perde parzialmente la propria attività, ma solo nei mitocondri: nel citosol non è in alcun modo alterata. **D.** La produzione di ROS mitocondriali è molto aumentata nei SIRT3cKO, in confronto ai topi selvatici.

Anche lo stato ossidativo dei mitocondri di SIRT3cKO è compromesso rispetto ai WT, come è stato verificato con la spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica, la quale ha mostrato un'impennata nella formazione di ROS mitocondriali; così, anche le analisi portate avanti sulla respirazione guidata dal

Complesso I della ETC ci dicono che la produzione di specie reattive dell'ossigeno è notevolmente accentuata in assenza della Sirtuina 3. Come è prevedibile in una condizione di questo tipo, l'attività dell'aconitasi mitocondriale è a sua volta gravemente compromessa, data la sua sensibilità alle stesse ROS.

Interessante è, invece, il risultato restituito dal saggio MDA per la perossidazione dei lipidi, eseguito sull'intero tessuto miocardico dei SIRT3cKO: infatti, sebbene la formazione eccessiva di perossidi lipidici caratterizzi in numerosi casi la ferroptosi, nello studio qui analizzato non si evince alcun aumento globale.

4.4. Fer-1 migliora gradualmente la funzione cardiaca.

Un'ulteriore prova del contributo della ferroptosi mitocondriale alla cardiomiopatia dimostrata dai soggetti sperimentali, nello specifico dai transgenici SIRT3cKO, risiede nei risultati ottenuti in seguito al trattamento degli stessi con la Ferrostatina-1: è, infatti, una molecola con funzione di inibitore specifico della ferroptosi. Lo scopo della terapia con Fer-1, infatti, consiste nel provare che, interrompendo il meccanismo ferroptotico, viene ripristinata la condizione fisiologica originaria.

In effetti, nel corso del trattamento, si è assistito a un progressivo incremento dei parametri miocardici prima gravemente ridotti dalla cardiomiopatia, quali la frazione di eiezione, così come la FS, il volume sistolico e la *cardiac output*, ma anche lo spessore della parete anteriore del ventricolo sinistro (LVAW;s), l'IVCT e l'indice di performance miocardica.

Tuttavia, la funzione sistolica non è stata pienamente recuperata con il trattamento con Ferrostatina-1, poiché, per esempio, i valori di IVRT e il rapporto E/A per l'influsso mitrale non sono modificati da esso (figura 5).

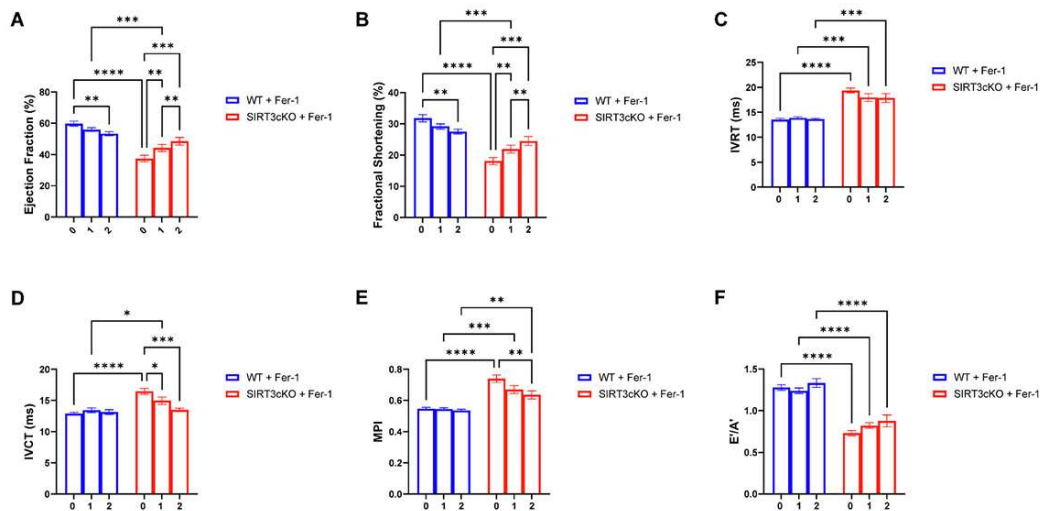


Figura 5. In seguito al trattamento con Fer-1, nei cuori dei topi SIRT3cKO: **A.** La *ejection-fraction* è significativamente aumentata. **B.** I valori di FS aumentano a loro volta. **C.** L'IVRT non viene alterato significativamente dalla Ferrostatina-1. **D.** Invece, IVCT aumenta. **E.** L'MPI risulta notevolmente maggiore. **F.** Il rapporto E/A non varia.

4.5. Fer-1 determina l'aumento dell'espressione di GPX4 nei mitocondri e ripristina il funzionamento dell'aconitasi.

Le analisi di Western blot mostrano l'evidente effetto della Ferrostatina-1 anche sul piano molecolare, in quanto parte delle proteine influenzate dal *knockout* di SIRT3 e, quindi, interessate dal processo di ferroptosi, vivono un graduale ripristino, sia nella loro espressione che a livello di attività enzimatica.

La glutatione perossidasi 4 (GPX4), infatti, va incontro ad un rapido ed evidente incremento durante le due settimane di trattamento, e questo si osserva non solo nei topi privi di Sirtuina 3, bensì anche nella linea di controllo: Fer-1, quindi, influenza direttamente la sintesi di questo enzima. Ugualmente, l'aconitasi è ben più presente ed attiva in seguito alla somministrazione prolungata del composto, nei SIRT3cKO (figura 6).

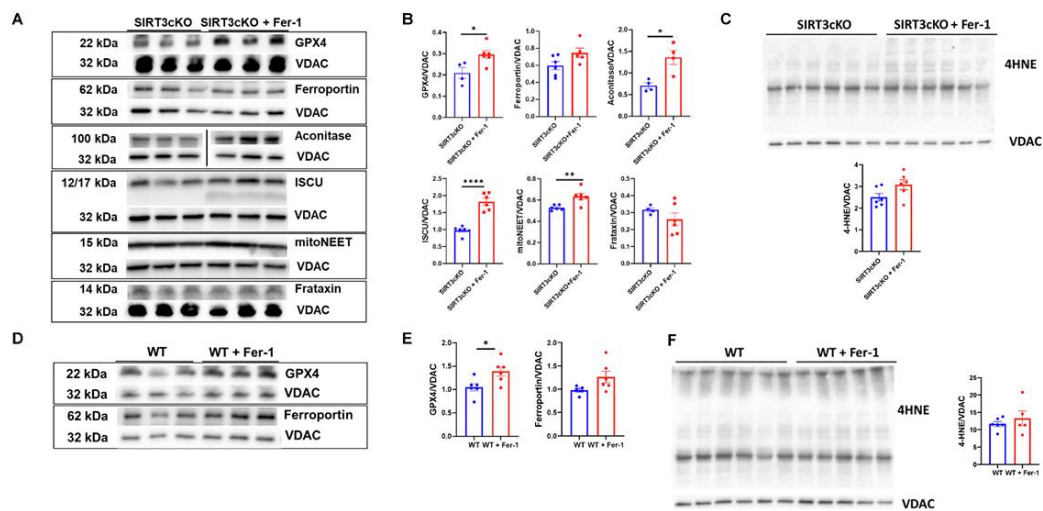


Figura 6. In seguito al trattamento con Fer-1: **B.** la GPX4 e l'aconitasi mitocondriale risultano significativamente aumentate. Anche ISCU e MitoNEET subiscono la stessa variazione. Invece, i livelli di frataxina non variano. **C.** Il 4-HNE non cambia significativamente dopo il trattamento con Ferrostatina-1. **E.** La GPX4 è *upregulated* anche nei WT, mentre la ferroportina no. **F.** Neanche nei *wild-type* i livelli di 4-HNE sono alterati dalla Fer-1.

Anche in questo caso, però, la Ferrostatina-1 non riporta pienamente alla condizione fisiologica: la ferroportina, sebbene presenti un leggero aumento nei SIRT3cKO, non è significativamente risanata e nei WT, addirittura, non è in alcun modo influenzata dalla Fer-1; allo stesso modo l'espressione di 4-HNE rimane invariata. Inoltre, non si assiste a una drastica riduzione della formazione di specie reattive dell'ossigeno nei mitocondri dopo la terapia.

Un risultato interessante, per concludere, è il notevole aumento dell'espressione delle proteine mitoNEET e ISCU nei topi SIRT3cKO, durante i giorni di somministrazione della Ferrostatina-1: questa, evidentemente, opera specificamente a livello di *cluster* ferro-zolfo mitocondriale, e così contribuisce all'omeostasi del ferro.

4.6. Fer-1 recupera parzialmente la funzione dei complessi della catena respiratoria.

Vari sono gli effetti sortiti sia dal *knockout* per il gene per la Sirtuina 3 nei cardiomiociti di topo, che dalla Fer-1, sui complessi costituenti la catena respiratoria dei mitocondri: ciascuna proteina, in base alle proprie peculiari attività, risponde differentemente.

- Le attività del Complesso I sono molto compromesse dalla rimozione della SIRT3 e risultano inibite rispetto a quelle osservate nei WT. La Ferrostatina-1 non influenza in alcun modo la NADH deidrogenasi, pertanto non si notano effetti significativi, se non sul potenziale di membrana mitocondriale misurato durante la respirazione guidata dal Complesso I stesso, incrementato dal *knockout* di SIRT3 e riportato a valori normali dalla Fer-1.
- Per quanto riguarda il Complesso II, si è osservato che né il potenziale di membrana mitocondriale durante la respirazione guidata da esso, né la sua attività vengono influenzati dal *knockout* della Sirtuina 3. Invece, la Fer-1 sortisce solo l'effetto di completa inibizione del *pathway* rappresentato proprio dalla respirazione guidata dal Complesso II, sia nei SIRT3cKO che nei SIRT3loxp.
- Neanche l'attività del Complesso III è alterata dal *knockout* della Sirtuina 3, né dal trattamento con la Ferrostatina-1.
- Statisticamente significativa, invece, è l'influenza che la rimozione di SIRT3 dai cardiomiociti di topo e la somministrazione della Fer-1 hanno sul Complesso IV: nel primo caso la sua attività vive una forte compromissione, successivamente ripristinata nel corso del trattamento.

5. Discussione.

Gli esperimenti effettuati hanno dimostrato la fondatezza dell'assunto sostenuto nello studio esaminato nel presente elaborato, ovvero che sia la funzione cardiaca che la ferroptosi mitocondriale sono funzionalmente correlate al *knockout* genico della Sirtuina 3, per le motivazioni discusse di seguito. In questo contesto, inoltre, ci si propone di verificare anche la funzione della Ferrostatina-1.

Quanto alla funzione cardiaca, i topi SIRT3cKO mostrano alcuni parametri miocardici alterati, ma bisogna evidenziare anche che maschi e femmine riportano fenotipi ben distinti, per gravità e per quadro complessivo: infatti gli esemplari maschi transgenici vedono la propria funzione cardiaca notevolmente compromessa, ma il fenotipo più gravemente danneggiato riguarda nello specifico la fase di sistole; viceversa, i dati ecocardiografici raccolti dalle femmine, le quali nel complesso non possiedono un fenotipo particolarmente compromesso, si discostano dai valori standard limitatamente alla funzione diastolica. Ciò suggerisce, evidentemente, che i meccanismi patologici che causano insufficienza cardiaca sono diversi tra maschi e femmine. Uno spunto interessante per future sperimentazioni riguarda proprio il ruolo che il sesso ha nella funzione cardiaca, in particolare nel contesto di deficienza di Sirtuina 3.

Inoltre, la ragione per cui, in seguito alle prime sperimentazioni, è stato deciso di circoscrivere la ricerca ai soli topi SIRT3cKO maschi non è da ascrivere esclusivamente al fenotipo cardiomiopatico più evidente, bensì anche all'efficacia parziale del trattamento con la Fer-1, che non ripristina pienamente la funzione cardiaca, ottenendo i massimi limitatamente ai parametri corrispondenti alla sistole. Di conseguenza, è possibile ipotizzare che la disfunzione diastolica sia dovuta a meccanismi collaterali e sia secondaria nello studio di interesse dell'elaborato.

I risultati sperimentali hanno dimostrato che la Ferrostatina-1 è stata in grado di migliorare alcuni parametri miocardici nei topi SIRT3cKO, e soprattutto di ripristinare parzialmente la funzione sistolica. I cambiamenti a cui si è assistito sono emersi secondo un andamento tempo-dipendente, progressivamente nel corso dei quattordici giorni; pertanto, è possibile valutare positivamente il prolungamento del trattamento con tale molecola che, impiegata per più giorni, potrebbe portare a ulteriori effetti positivi sui cardiomiociti degli esemplari testati. Tuttavia, è da evidenziare anche l'effetto sortito dalla stessa Fer-1 sui topi della linea di controllo, in cui ha portato all'abbassamento significativo della frazione di eiezione e della *fractional shortening*: la possibile tossicità del composto è un fattore importante da considerare, in particolare se si pensa a terapia sul lungo periodo.

I dati restituiti dalle analisi di Western blot indicano, poi, che la Sirtuina 3 ricopre un ruolo fondamentale nella regolazione dell'acetilproteoma mitocondriale, almeno nei cardiomiociti murini: infatti, lo stato di acetilazione totale dei mitocondri è fortemente incrementato in seguito al *knockout* genico della deacetilasi.

Uno dei suoi *target*, già noto, ma confermato anche dallo studio esaminato, è la proteina p53: nei topi SIRT3cKO, infatti, è ridotta nella sua forma deacetilata, mentre è altamente rappresentata come acetil-p53 nei mitocondri.

Si tratta di uno dei possibili iniziatori del meccanismo ferroptotico, in particolare nella sua forma modificata in fase post-traduzionale: sono stati identificati quattro residui lisinici soggetti ad acetilazione e la loro funzione è stata esaminata con numerosi studi su topi esprimenti una versione mutata della proteina p53. Ne è emerso, *in primis*, che la modifica contemporanea di più di una Lys è ridondante, in quanto alla sostituzione con arginina di una o due di esse non corrisponde la perdita di funzione del complesso, né per quanto riguarda il legame con il DNA, né nell'induzione della ferroptosi. Cruciale è, invece, la Lys98 (K98): la sua mutazione puntiforme, infatti, compromette definitivamente la capacità della p53 di attivare il meccanismo ferroptotico. Nel caso dello studio qui analizzato, pertanto, la scomparsa di ognuno dei gruppi acetile da p53 ha determinato l'aumento del fenomeno: la mancanza di SIRT3 ha comportato l'acetilazione della proteina anche sulla K98, da cui dipende l'attivazione della ferroptosi.

Il meccanismo attraverso il quale la proteina acetil-p53 riesce ad attivare il *pathway* di morte cellulare dipendente dal ferro non è stato ancora precisamente descritto, sebbene sia stato scoperto che agisce specificamente sulla subunità SLC7A11 dell'antiporto cistina/glutammato, il Sistema X_c⁻, mediante l'intervento sulla sua sintesi (è una delle funzioni trascrizionali di p53). Eppure, nei topi SIRT3cKO impiegati per la ricerca di questo studio l'espressione di SLC7A11 non è in alcun modo alterata dalla rimozione della deacetilasi di p53, pertanto l'attività di quest'ultima deve essere diversa in questo caso.

Non è, quindi, chiaro come la proteina p53 agisce per indurre l'attivazione della ferroptosi nel contesto di rimozione della Sirtuina 3, né se ne sia effettivamente responsabile. Di conseguenza, sarebbe stato utile includere nella progettazione della ricerca di Cantrell et al. [1] una tecnica per l'inibizione di p53: sarebbe stato possibile, eventualmente, osservare l'effetto che ha sul meccanismo ferroptotico e quali altri *pathways* vengono alterati.

I Western blot informano anche sulla forte riduzione dei livelli di fratassina (FXN) nei cardiomiociti dei topi SIRT3cKO, rispetto ai *wild-type*. È un risultato interessante, in quanto permette di indagare la correlazione che intercorre tra tale proteina, coinvolta nella biogenesi dei *cluster* ferro-zolfo, e la Sirtuina 3, in particolare nell'effetto fenotipico della cardiomiopatia. Infatti, una specifica mutazione di FXN è responsabile della *Friedreich's Ataxia* che spesso porta nei pazienti proprio alla manifestazione di cardiomiopatia, sintomo che si rivela letale in molti casi. L'articolo che si sta discutendo in questo elaborato propone una lettura che mette in relazione la disfunzione cardiaca osservata nei SIRT3cKO e la FRDA, corroborata, appunto, dalla diminuzione di fratassina dalle cellule cardiache esaminate.

Attualmente è riconosciuta la funzione di SIRT3 come deacetilasi specifica anche per FXN, come emerge dagli esperimenti portati avanti su altri ceppi murini con genoma SIRT3^{-/-} [3]: è stato verificato che lo stato di acetilazione della Lys189 della fratassina aumenta in assenza di Sirtuina 3; successivamente, è stato anche sperimentato che l'acetil-FXN non svolge efficientemente la propria funzione nell'omeostasi mitocondriale del ferro, il che apre anche una possibilità sul coinvolgimento della ferroptosi nell'ataxia di Friedreich.

Grazie ad altre ricerche [9], inoltre, è emerso un possibile ruolo dell'acetilproteoma anche nella stessa atassia di Friedreich: questi studi sono stati condotti su lisati cellulari provenienti da modelli murini di FRDA, caratterizzati dalla disregolazione dei complessi respiratori ISC-dipendenti (fenomeno coerente con il fenotipo patologico umano, ovviamente). È stato rilevato un aumento significativo delle lisine acetilate totali, incluse le proteine *target* di SIRT3 (in particolare, NDUFA9, subunità del Complesso I), indiretta dimostrazione che la deacetilasi mitocondriale di nostro interesse è inibita in assenza di FXN.

Tuttavia, nell'articolo qui analizzato non si fa alcun riferimento allo stato di acetilazione della fratassina, considerata solo come FXN totale nei mitocondri. Includere tecniche che mettessero in risalto l'eventuale differenza nei livelli di espressione della proteina nelle diverse forme modificate sarebbe stato importante, sia per comprendere più approfonditamente la sua funzione e la relazione intrattiene con la SIRT3, sia per determinare se si può correttamente parlare di una somiglianza tra i sintomi riportati dai topi SIRT3cKO e i modelli dell'atassia di Friedreich.

L'ultimo spunto di riflessione in merito a FXN proposto dall'articolo qui esaminato riguarda l'assenza di effetti della Ferrostatina-1 sulla sua espressione: neanche dopo le due settimane di trattamento la fratassina era presente in quantità maggiori nei cardiomiociti di SIRT3cKO, né in quelli della linea di controllo. Ciò significa che la molecola agisce a valle della proteina, motivo per cui potrebbe essere considerata come un possibile approccio terapeutico per la cardiomiopatia della *Friedreich's Ataxia*.

Diversi dei risultati discussi finora portano al riconoscimento della ferroptosi mitocondriale nella disfunzione cardiaca dei topi SIRT3cKO, precisamente nell'acetilazione specifica di p53 e nel mancato mantenimento dell'omeostasi del ferro nei mitocondri. Tuttavia, la prova primaria del fatto che sia la ferroptosi a causare le alterazioni osservate nei cardiomiociti SIRT3cKO è l'aumento importante di Fe(II) nel *pool* di ferro labile dei mitocondri, accompagnato dall'abbassamento dell'espressione proteica dell'aconitasi mitocondriale e della sua attività: l'equilibrio del ferro è chiaramente compromesso, come spesso avviene al principio di una morte ferroptotica. Non è questo, però, il solo aspetto rilevante, dato che l'analisi dei livelli di espressione rivela un'alterazione proprio in corrispondenza di tutti quei marcatori di ferroptosi di cui si parlava nel paragrafo 2.2: specie reattive dell'ossigeno abbondanti, aumento di 4-HNE, di ACSL4 e diminuzione di GPX4.

Risulta comunque evidente che la perossidazione lipidica cellulare non è coinvolta nel quadro ferroptotico mitocondriale del cuore dei topi SIRT3cKO, poiché dal saggio MDA non affiora alcuna differenza rispetto ai SIRT3loxp. Questo dato assume rilevanza se si considera che la formazione di ROS lipidiche è considerata tra le cause più evidenti e frequenti dell'avvio del *pathway* ferroptotico, in particolare quando raggiunge livelli letali. Nel nostro caso, invece, lo scompenso nell'omeostasi del ferro determina un'alterazione anche nello stato redox esclusivamente mitocondriale, e probabilmente ad essa contribuisce la produzione di ROS anche da altre vie, come quella dei complessi della ETC. In ogni caso i mitocondri non sono in grado di riportare i livelli di radicali liberi entro i limiti fisiologici, andando incontro a una morte regolata.

Tra l'altro, l'impiego della Ferrostatina-1 non sortisce alcun effetto neanche in relazione allo stress ossidativo mitocondriale. Nonostante ciò, però, è in grado di migliorare la funzione cardiaca, risultato che fornisce una prova ulteriore dell'implicazione della ferroptosi nel nostro modello. Inoltre, l'azione che Fer-1 opera solamente sui mitocondri e il recupero parziale di alcuni parametri ci dicono che la disfunzione mitocondriale è cruciale nella manifestazione di sintomi cardiomiopatici sui topi SIRT3cKO.

L'esperimento di Cantrell et al. [1], poi, manca anche di una possibile conferma dell'implicazione della ferroptosi mitocondriale nelle osservazioni condotte sul modello animale, quale l'esame al *Transmission Electron Microscopy* per verificare lo stato di danneggiamento dei mitocondri. Infatti, lo stress ossidativo procurato dal meccanismo ferroptotico ne compromette la stabilità e la struttura e se ciò fosse stato osservato, sarebbero rimasti ancora meno dubbi.

Risultato interessante è quello che riguarda la ferroportina: è una proteina ancora una volta implicata nella regolazione della quantità cellulare di ferro. Si pensava che fosse localizzata esclusivamente sulla membrana plasmatica, tuttavia lo studio qui discusso ha riscontrato una riduzione dei livelli di ferroportina nei SIRT3cKO rispetto ai WT, ma nella frazione mitocondriale, indicazione della presenza della proteina esportatrice di ferro anche presso tali organelli. In passato è stato già verificato che la ferroportina è presente sulle membrane mitocondriali, in particolare in *Arabidopsis thaliana*, su cui erano stati effettuati gli studi del caso, ma probabilmente è necessario procedere con ulteriori prove per raggiungere la piena certezza. A ogni modo, è plausibile considerare l'espressione di tale proteina anche a livello di altri compartimenti cellulari, essendo che la regolazione dell'omeostasi del ferro è fondamentale su più livelli.

È possibile che la Ferrostatina-1 abbia successo nel ripristinare una parziale funzione cardiaca, poiché influisce sull'espressione di altre proteine di biogenesi e gestione dei *cluster* ferro-zolfo: riesce a regolare specificamente la proteina di membrana mitoNEET e la ISCU, entrambe funzionalmente associate ai *cluster* Fe-S. In particolare, la prima è impiegata dai mitocondri nel trasferimento di ISC (tipicamente 2F-2S) dal proprio sito di legame a quello di altre proteine, citoplasmatiche o mitocondriali, ma anche nella protezione dallo stress ossidativo, poiché riesce a mantenere l'equilibrio redox mitocondriale. La ISCU, invece, è una proteina fondamentale nell'assemblaggio degli ISC, sia con ruolo di interazione con atomi di ferro e di zolfo, ma anche come proteina di *scaffolding*. Data la funzione di entrambe le proteine qui sopra considerate all'intersezione tra l'omeostasi del ferro e l'equilibrio ossidativo mitocondriale, l'azione di *up*-regolazione che la Ferrostatina-1 compie su di esse può risultare utile nel ridurre il ferro e le ROS accumulate nel loro compartimento.

Come dimostrano i test sulla funzione mitocondriale, questa è fortemente compromessa nei cardiomiociti di SIRT3cKO, come conseguenza degli squilibri finora descritti. Innanzitutto, il potenziale di membrana mitocondriale risulta diminuito rispetto a quello misurato nei topi del controllo, sebbene poi cresca progressivamente con la somministrazione di Fer-1.

Se i Complessi II e III della *Electron Transport Chain* non sono per nulla toccati, né dal *knockout* della Sirtuina 3, né tantomeno dal trattamento con il composto inibitore della ferroptosi (e così la respirazione da loro guidata), diversa è la situazione che concerne i Complessi I e il IV. Difatti, nessuno dei due è in grado di svolgere la propria funzione di trasporto elettronico nei SIRT3cKO, ma mentre la citocromo *c* ossidasi viene riattivata dalla Ferrostatina-1, la NADH deidrogenasi risulta ugualmente inibita.

Questa differenza tra i complessi non è, in realtà, sorprendente, in quanto è noto che la Sirtuina 3 regola direttamente l'attività del Complesso I: su ulteriori modelli SIRT3^{-/-} è stato infatti osservato che diverse proteine del complesso (e, in particolare, la NDUFA9) sono significativamente più acetilate che nei topi *wild-type*, e ciò ne compromette l'attività. Anche il Complesso IV è stato riconosciuto come *target* mitocondriale di SIRT3, in ricerche riguardanti l'osteogenesi.

Il fatto che il trattamento con Ferrostatina-1 recuperi la funzione della citocromo *c* ossidasi ci fa ritenere che, probabilmente, essa ne regoli l'attività enzimatica, perlomeno nel cuore, e così riesca a migliorare anche la funzione cardiaca dei topi SIRT3cKO. Invece, la prolungata compromissione del Complesso I è indice della fondamentale importanza della Sirtuina 3 nella sua regolazione.

È, infine, corretto ipotizzare che la Ferrostatina-1, il cui meccanismo d'azione non è ancora noto precisamente, operi nello specifico a livello mitocondriale, con un'azione mirata sull'assemblaggio e sulla funzione dei *cluster* ferro-zolfo. In questo modo, nel caso studio discusso in questo elaborato, è in grado di migliorare la funzione cardiaca dei topi sperimentali transgenici, nel cui genoma è stato indotto il *knockout* del gene per SIRT3.

La cardiomiopatia esibita dai medesimi è almeno in parte dovuta alla ferroptosi mitocondriale, ed è possibile identificare una somiglianza con quella dei pazienti affetti da atassia di Friedreich, somiglianza da indagare ulteriormente.

Infine, la ferroptosi osservata attraverso i suoi effetti sulla funzione mitocondriale e sui livelli di espressione proteica è dovuta, anche nei SIRT3cKO, alla contemporanea formazione di ROS, lipidiche e non, accumulo di Fe(II) nel *Labile Iron Pool* mitocondriale e il conseguente stress ossidativo. Eppure, i meccanismi specifici con cui tale forma di morte regolata si verifica restano misteriosi.

6. Bibliografia.

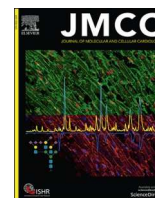
- [1] Cantrell AC, Besanson J, Williams Q, Hoang N, Edwards K, Bishop GR, Chen Y, Zeng H, Chen JX. Ferrostatin-1 specifically targets mitochondrial iron-sulfur clusters and aconitase to improve cardiac function in Sirtuin 3 cardiomyocyte knockout mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2024 Jul;192:36-47. doi: 10.1016/j.yjmcc.2024.05.003. Epub 2024 May 9. PMID: 38734062; PMCID: PMC11164624.
- [2] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012 May 25;149(5):1060-72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042. PMID: 22632970; PMCID: PMC3367386.
- [3] Du J, Zhou Y, Li Y, Xia J, Chen Y, Chen S, Wang X, Sun W, Wang T, Ren X, Wang X, An Y, Lu K, Hu W, Huang S, Li J, Tong X, Wang Y. Identification of Frataxin as a regulator of ferroptosis. *Redox Biol.* 2020 May;32:101483. doi: 10.1016/j.redox.2020.101483. Epub 2020 Mar 2. Erratum in: *Redox Biol.* 2023 Sep;65:102815. doi: 10.1016/j.redox.2023.102815. PMID: 32169822; PMCID: PMC7068686.
- [4] Feng X, Su H, He X, Chen JX, Zeng H. SIRT3 Deficiency Sensitizes Angiotensin-II-Induced Renal Fibrosis. *Cells.* 2020 Nov 20;9(11):2510. doi: 10.3390/cells9112510. PMID: 33233553; PMCID: PMC7699810.
- [5] Gao J, Huang C, Kong L, Zhou W, Sun M, Wei T, Shen W. SIRT3 Regulates Clearance of Apoptotic Cardiomyocytes by Deacetylating Frataxin. *Circ Res.* 2023 Sep 15;133(7):631-647. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.323160. Epub 2023 Aug 30. PMID: 37646156; PMCID: PMC10498872.
- [6] Scarpellini C, Klejborowska G, Lanthier C, Hassannia B, Vanden Berghe T, Augustyns K. Beyond ferrostatin-1: a comprehensive review of ferroptosis inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2023 Dec;44(12):902-916. doi: 10.1016/j.tips.2023.08.012. Epub 2023 Sep 26. PMID: 37770317.
- [7] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascón S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA, Zhang DD. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell.* 2017 Oct 5;171(2):273-285. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021. PMID: 28985560; PMCID: PMC5685180.
- [8] Su H, Cantrell AC, Chen JX, Gu W, Zeng H. SIRT3 Deficiency Enhances Ferroptosis and Promotes Cardiac Fibrosis via p53 Acetylation. *Cells.* 2023 May 19;12(10):1428. doi: 10.3390/cells12101428. PMID: 37408261; PMCID: PMC10217433.
- [9] Wagner GR, Pride PM, Babbey CM, Payne RM. Friedreich's ataxia reveals a mechanism for coordinate regulation of oxidative metabolism via feedback

inhibition of the SIRT3 deacetylase. *Hum Mol Genet.* 2012 Jun 15;21(12):2688-97. doi: 10.1093/hmg/dds095. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22394676; PMCID: PMC3363336.

- [10] Wang SJ, Li D, Ou Y, Jiang L, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation Is Crucial for p53-Mediated Ferroptosis and Tumor Suppression. *Cell Rep.* 2016 Oct 4;17(2):366-373. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.022. PMID: 27705786; PMCID: PMC5227654.

7. Appendice.

Si riporta di seguito l'articolo discusso nell'elaborato.



Ferrostatin-1 specifically targets mitochondrial iron-sulfur clusters and aconitase to improve cardiac function in Sirtuin 3 cardiomyocyte knockout mice

Aubrey C. Cantrell^a, Jessie Besanson^a, Quinesha Williams^a, Ngoc Hoang^a, Kristin Edwards^a, G. Reid Bishop^a, Yingjie Chen^b, Heng Zeng^{a,*}, Jian-Xiong Chen^{a,*}

^a Department of Pharmacology & Toxicology, University of Mississippi Medical Center, School of Medicine, Jackson, MS 39216, USA

^b Department of Physiology & Biophysics, University of Mississippi Medical Center, School of Medicine, Jackson, MS 39216, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Ferroptosis
SIRT3
Cardiomyopathy
Mitochondrial dysfunction
Friedreich's ataxia

ABSTRACT

Aims: Ferroptosis is a form of iron-regulated cell death implicated in ischemic heart disease. Our previous study revealed that Sirtuin 3 (SIRT3) is associated with ferroptosis and cardiac fibrosis. In this study, we tested whether the knockout of SIRT3 in cardiomyocytes (SIRT3cKO) promotes mitochondrial ferroptosis and whether the blockade of ferroptosis would ameliorate mitochondrial dysfunction.

Methods and results: Mitochondrial and cytosolic fractions were isolated from the ventricles of mice. Cytosolic and mitochondrial ferroptosis were analyzed by comparison to SIRT3loxP mice. An echocardiography study showed that SIRT3cKO mice developed heart failure as evidenced by a reduction of EF% and FS% compared to SIRT3loxP mice. Comparison of mitochondrial and cytosolic fractions of SIRT3cKO and SIRT3loxP mice revealed that, upon loss of SIRT3, mitochondrial, but not cytosolic, total lysine acetylation was significantly increased. Similarly, acetylated p53 was significantly upregulated only in the mitochondria. These data demonstrate that SIRT3 is the primary mitochondrial deacetylase. Most importantly, loss of SIRT3 resulted in significant reductions of frataxin, aconitase, and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in the mitochondria. This was accompanied by a significant increase in levels of mitochondrial 4-hydroxynonenal. Treatment of SIRT3cKO mice with the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 (Fer-1) for 14 days significantly improved preexisting heart failure. Mechanistically, Fer-1 treatment significantly increased GPX4 and aconitase expression/activity, increased mitochondrial iron-sulfur clusters, and improved mitochondrial membrane potential and Complex IV activity.

Conclusions: Inhibition of ferroptosis ameliorated cardiac dysfunction by specifically targeting mitochondrial aconitase and iron-sulfur clusters. Blockade of mitochondrial ferroptosis may be a novel therapeutic target for mitochondrial cardiomyopathies.

1. Introduction

Mitochondrial dysfunction is becoming increasingly recognized as a contributor to disease states, including cardiac hypertrophy and heart failure, among others [1]. Because the heart requires significant energy,

the mitochondria play a major role in providing the ATP necessary for cardiac cells to function; thus, it stands to reason that mitochondrial dysfunction has catastrophic impacts on the heart. Mitochondrial dysfunction results not only in decreased ATP production, but also increased reactive oxygen species (ROS) formation and oxidative stress

Abbreviations: CFR, Coronary flow reserve; CO, Cardiac output; EF, Ejection fraction; EPR, Electron paramagnetic resonance; ETC, Electron transport chain; Fer-1, Ferrostatin-1; FRDA, Friedreich's ataxia; FS, Fractional shortening; GPX4, Glutathione peroxidase 4; HF, Heart failure; HFpEF, Heart failure with preserved ejection fraction; HFrEF, Heart failure with reduced ejection fraction; IVCT, Isovolumic contraction time; IVRT, Isovolumic relaxation time; LV, Left ventricle; LVAW;s, Left ventricular anterior wall thickness during systole; LVPW;s, Left ventricular posterior wall thickness during systole; MPI, Myocardial performance index; ROS, Reactive oxygen species; SIRT3, Sirtuin 3; SIRT3cKO, Cardiomyocyte-specific Sirtuin 3 knockout; SV, Stroke volume; TIGAR, Tp53-inducible glycolysis and apoptosis regulator; WT, Wild-type; 4-HNE, 4-hydroxynonenal.

* Corresponding authors at: Department of Pharmacology and Toxicology, University of Mississippi Medical Center, 2500 North State Street, Jackson, MS 39216, USA.

E-mail addresses: hzensg@umc.edu (H. Zeng), jchen3@umc.edu (J.-X. Chen).

<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2024.05.003>

Received 8 January 2024; Received in revised form 1 May 2024; Accepted 7 May 2024

Available online 9 May 2024

0022-2828/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

in the cell [2].

Sirtuin 3 (SIRT3) is a member of the sirtuin family of deacetylases, and primarily localizes to the mitochondria where it serves as a protein deacetylase [3]. This function places SIRT3 in a key role as a regulator of a wide variety of pathways, such as mitochondrial oxidative phosphorylation, where it deacetylates proteins in Complexes I and II in the electron transport chain (ETC) to favor the use of the ETC over glycolysis for energy [4,5]. Loss of SIRT3 is associated with aging and disease states including metabolic syndrome and cancer [6–8]. Additionally, our lab and others have demonstrated that SIRT3 has a protective function in the heart, reducing cardiac hypertrophy and fibrosis, as well as improving cardiac function and reducing ROS formation [9,10]. Our recent studies also implicated that SIRT3 may be involved in iron overload-mediated ferroptosis [11]. Our lab has developed a cardiomyocyte-specific SIRT3 knockout (SIRT3cKO) mouse model in order to evaluate more precisely the role that SIRT3 plays in the heart, and more specifically in cardiac mitochondria. We found that this model spontaneously develops severe cardiac dysfunction leading to mortality.

Ferroptosis is a form of cell death that is distinct from apoptosis and necrosis, and is canonically considered to be iron-regulated, although it may be activated by a variety of factors including iron overload, excessive lipid peroxidation, and excessive ROS formation [12–16]. Activation of ferroptosis has been implicated in a variety of disease states, including heart failure, cardiomyopathy, ischemia/reperfusion injury, and fibrosis in Angiotensin-II-induced hypertension [17–20]. Despite increasing recognition of its role in the pathophysiology of diseases, the efficacy of ferroptosis inhibitors in the treatment of these conditions has not been widely investigated, and the role of the mitochondria in ferroptosis remains an area of debate.

Ferostatin-1 (Fer-1) is a small-molecule drug that has been identified as a ferroptosis inhibitor [12]. Its mechanism of action is unclear, as studies have shown Fer-1 to act through multiple different pathways, and sometimes yield conflicting results [12,21,22]; however, it is clear that Fer-1 is not an iron chelator [12]. Some studies have suggested that Fer-1 may act by scavenging or trapping ROS, upregulating GPX4, or directly inhibiting lipid peroxidation [12,21,23]. We suggest that Fer-1 may act via different mechanisms depending on the tissue, thus explaining the wide variability in its mechanism. It has been shown that Fer-1 improves mitochondrial function and cardiac function in a model of iron overload-induced cardiomyopathy [24]. However, to our knowledge, the efficacy of Fer-1 in the treatment of mitochondrial cardiomyopathies has yet to be investigated, and its precise mechanism of action in the heart has yet to be elucidated.

Friedreich's ataxia (FRDA) is a neurodegenerative disease characterized by a decrease in expression of the mitochondrial protein frataxin [25]. Although classified primarily as a neurodegenerative disease, the most prevalent cause of patient mortality is a mitochondrial cardiomyopathy presenting as cardiac dysfunction resulting from decreased frataxin expression in the heart [26]. Frataxin is involved in mitochondrial iron homeostasis, and decreased expression of this protein leads to iron overload, which in turn increases the susceptibility of cells to activation of ferroptosis [27,28]. Interestingly, loss of frataxin is associated with decreased expression of SIRT3 and increased lysine acetylation in the heart, suggesting a potential role for SIRT3 in the development of FRDA and its associated mitochondrial cardiomyopathy [29]. At this point in time, there is no cure for FRDA, and treatments focus primarily on symptomatic amelioration of neurodegeneration rather than addressing the underlying etiology of the disease as a whole.

In this study, we hypothesized that the heart failure phenotype induced in SIRT3cKO mice involves induction of mitochondrial ferroptosis, and that this phenotype may be comparable to the mitochondrial cardiomyopathy occurring in FRDA patients. We also investigated whether heart failure in SIRT3cKO mice could be rescued by administration of the ferroptosis inhibitor Ferostatin-1 (Fer-1). Our data demonstrate that heart failure in SIRT3cKO mice is at least partially attributable to activation of the ferroptosis cell death pathway, with

similarities to the mitochondrial cardiomyopathy seen in FRDA, and that Fer-1 ameliorates the heart failure phenotype, as well as abrogating impaired GPX4 and aconitase seen in this model.

2. Methods

2.1. Animals

SIRT3loxP mice were obtained from Dr. Eric Verdin at Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California and used as wild-type (WT) controls. SIRT3loxP mice were also crossed with cardiomyocyte-specific promoter MyHC-Cre + mice purchased from The Jackson Laboratory (stock no. 011038) to generate a cardiomyocyte-specific SIRT3 knockout (SIRT3cKO) mouse strain. SIRT3cKO was confirmed by PCR, as well as by evaluating expression of SIRT3 in cardiomyocytes via Western blot (Supplementary Fig. S1). All experimental mice were fed laboratory standard chow and water and housed in individually ventilated cages. All protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at UMMC (Protocol ID: 1564, 1189) and were in compliance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85–23, Revised 1996).

2.2. Injection of Ferostatin-1 and tissue harvest

Ferostatin-1 (Cayman, 17,729) was administered to experimental mice via daily intraperitoneal injection at a dose of 1 mg/kg body weight/day for 14 days. After this point, mice from all groups were euthanized, and hearts were rapidly excised and snap frozen in liquid N₂ for further analysis, processed to isolate mitochondrial and cytosolic fractions, or prepared for assays according to the manufacturer's instructions.

2.3. Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed on mice using a Vevo 3100 Preclinical Imaging Platform with an MX400 transducer (FUJIFILM Visual Sonics Inc., Canada). Mice were anesthetized by inhalation of 1–1.5% isoflurane mixed with 100% medical oxygen. Heart rate was monitored and kept between 450 and 500 beats per minute for the duration of measurement. M-mode cine loops were analyzed by Vevo LAB software (FUJIFILM Visual Sonics Inc., Canada) to obtain ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), and myocardial parameters, including left ventricle (LV) end-systolic diameter (Diameter;s), LV end-diastolic diameter (Diameter;d), LV end-systolic volume (Volume;s), LV end-diastolic volume (Volume;d), thickness of the left ventricular anterior wall (LVAW) and posterior wall (LVPW) at end-systole and end-diastole, stroke volume (SV), and cardiac output (CO) [30–32].

Transmitral inflow pulsed-wave (PW) Doppler and Tissue Doppler (TD) imaging were used to assess diastolic function. Peak velocity of early (E) and late (A) filling of mitral inflow, isovolumic relaxation time (IVRT), isovolumic contraction time (IVCT), and aortic ejection time (AET) were assessed from an apical 4-chamber view. The myocardial performance index (MPI) was calculated using the following formula: $MPI = (IVRT + IVCT)/AET$. TD images were obtained from the mitral annulus to measure tissue motion velocity in early and late diastole (e' and a' , respectively) and to calculate the E/e' ratio [32–35].

CFR was assessed in a modified parasternal LV short-axis view using PW Doppler at the left proximal coronary artery (LCA). Briefly, baseline (1% isoflurane) and hyperemic (2.5% isoflurane) coronary blood flow velocity were recorded. CFR was calculated as the ratio of hyperemic peak diastolic flow velocity to baseline peak diastolic flow velocity [30–32,34,35].

2.4. Mitochondrial and cytosolic fraction isolation

Left ventricles from excised hearts were isolated, then washed and homogenized in a buffer of 100 mM KCl, 50 mM Mops, 5 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, and 1 mM ATP using a Wheaton overhead stirrer (Wheaton, 903,476). The homogenate was then centrifuged at 500 rcf for 10 min and the pellet discarded to remove undigested tissue. The supernatant was centrifuged at 8000 rpm for 15 min to separate the mitochondrial pellet from the cytosolic supernatant. The cytosolic fraction was taken and protease inhibitor cocktails (Thermo Scientific, A32961, and Millipore Sigma, 11,836,170,001) added before snap freezing in liquid N₂. The mitochondrial pellet was washed via resuspension in KME buffer (100 mM KCl, 50 mM Mops, and 0.5 mM EGTA), then centrifuged at 8000 rpm for 15 min. The supernatant was discarded and the mitochondrial pellet was resuspended in KME with 7.5uL protease inhibitor cocktail added for every 1 mL KME. The mitochondria were then snap frozen in liquid N₂ for later analysis. This yields a crude mitochondrial fraction, which for the purpose of our study we refer to as the mitochondria due to the high mitochondrial density found in cardiomyocytes. The mitochondria comprise nearly 40% of total cardiomyocyte volume [36], and thus we assume that the relative contributions of other organelles are relatively insignificant compared to those of the mitochondria in this fraction.

2.5. Western blot analysis

Protein extractions from heart left ventricular mitochondrial and cytosolic fractions were prepared in lysis buffer with protease/phosphatase inhibitor cocktail (A32961, Thermo Fisher Scientific, NY). Lysates were separated by SDS-PAGE under reducing conditions, transferred to a PVDF membrane, and analyzed by immunoblotting. PVDF membranes were probed with primary antibodies against 4-HNE (1:1000, Abcam ab46545), GPX4 (1:1000, Novus Biologicals NBP2-76933), ferroportin (1:1000, Novus Biologicals NBP1-21502), aconitase (1:1000, Novus Biologicals NBP2-15244), frataxin (1:250, Abcam ab113691), p53 (acetyl K370) (1:1000, Abcam ab183544), p53 (1:1000, Cell Signaling Technologies #2524 or GeneTex GTX100629), ISCU (1:1000, Novus Biologicals NBP2-14998), MitoNEET (1:1000, Novus Biologicals NBP2-92696), ACSL4 (1:10,000, Abcam ab155282), FtMt (1:1000, Novus Biologicals NBP2-14961), or SLC7A11 (1:1000, Novus Biologicals NB300-318) overnight. The membranes were then washed and incubated with an anti-rabbit (#31460) or anti-mouse (#31430) secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:10000, Thermo Fisher Scientific, NY). Loading controls were probed with VDAC (1:1000, Cell Signaling Technologies #866) and GAPDH (1:2000, Cell Signaling Technologies #2118) antibodies. Densitometries were analyzed in the Image Lab software 6.0 (Bio-Rad, CA).

2.6. Assays

An iron assay kit was purchased from Abcam (ab83366) and performed according to the manufacturer's instructions on isolated cardiac mitochondria and whole heart tissue.

An aconitase activity assay kit was purchased from Abcam (ab83459) and performed according to the manufacturer's instructions to measure cytosolic aconitase derived from heart tissue.

A colorimetric calcium assay kit was purchased from Abcam (ab102505) and performed according to the manufacturer's instructions using whole heart tissue.

A Lipid Peroxidation (MDA) assay kit was purchased from Abcam (ab233471) and performed according to the manufacturer's instructions using whole heart tissue.

2.7. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy (EPR)

2.7.1. Sample preparation

Mitochondrial fractions were centrifuged at 8000 rpm for 15 min and supernatant discarded. The mitochondrial pellet was then resuspended in 400uL PBS and centrifuged at 8000 rpm for 15 min. This step was repeated three more times to ensure KME was completely removed from mitochondrial samples in order to prevent interference in EPR measurement. The final mitochondrial pellet was then resuspended in 150uL PBS and sonicated to rupture the mitochondrial membrane, and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatant collected as the mitochondrial protein extraction.

2.7.2. Spin Trapping Electron Paramagnetic Resonance (EPR) measurements

Spin-trapped cw-EPR signals of samples were acquired using a Miniscope MS400 Magnetec EPR spectrometer equipped with a TE102 rectangular cavity with an X-band operating frequency of 9.42 GHz, a center field of 337 mT with a sweep width of 20mT, a modulation frequency of 100 kHz, time constant of 0.03 s, and power of 5.00 mW. Power settings were set with a 10 dB attenuation, a modulation of 0.2 mT and a gain setting of 100. Aqueous samples were loaded into an LC-12 aqueous quartz flat cell and collected at room temperature. Maximum available field range is up to 6500G with a spin sensitivity 10⁸–10⁹ spins/G. Nitrogen temperature measurements are possible using liquid nitrogen. EPR spectra were simulated with the open source cw-EPR python package EPRSim developed by S. Rein in the laboratory of Prof. S. Weber at the University of Fribourg in Breisgau, Germany (<https://www.radicals.uni-freiburg.de/de/software>). In spin trap experiments, samples were incubated for different times to find optimally stable conditions. A cocktail of equimolar DMPO and PBN (100 μM each) was added at a volume of 100uL to 100uL of protein concentration matched homogenized and mitochondrial extracts prepared fresh and stored at -80 °C and centrifuged at 50,000 rpm in a TLA 100.1 rotor using a Beckman Optima TL benchtop ultracentrifuge at 4 °C. Careful attention was given to prevent the usage of any buffers containing Zn²⁺ or Mn²⁺ ions which each have known 5-line EPR spectra near g = 2. No EPR signals were observed in any extracts prior to the addition of the DMPO and PBN cocktail. DMPO (CAS # 3317-61-1, 113.2 g/mol, 98% purity) or 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide (3,4-dihydro-2,3-dimethyl-2H-pyrrole 1-oxide) and PBN (CAS # 3376-24-7, 177.3 g/mol, 98% purity) or N-tert-butyl-α-Phenylnitron were obtained from Cayman Chemical and used without further purification.

2.8. Isolated mitochondrial function measurements

2.8.1. Intact mitochondria isolation

Heart mitochondria were isolated from mouse hearts following previously established protocols with minor modifications [37]. In brief, heart tissue was minced with a razor blade with 200 μL of 1 mg/mL bacterial proteinase type XXIV (Sigma, cat#P8038). The minced tissue was added to 2 mL ice-cold isolation buffer (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM MOPS pH 7.4, 2 mM EDTA and 0.2% fatty acid-free BSA) and homogenized on ice with a 2 mL glass homogenizer and a Teflon pestle. The tissue was homogenized for 2 strokes and an additional stroke was performed with 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The homogenate was centrifuged at 300 ×g for 10 min at 4 °C. The supernatant was then centrifuged at 3000 ×g for 10 min at 4 °C, and the mitochondrial pellet washed once in ice-cold resuspension buffer (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM MOPS pH 7.4). After final resuspension of 100 μL resuspension buffer, mitochondrial protein concentration was determined using the DC Protein assay (Bio-Rad).

2.8.2. Mitochondrial respiration measurements

Intact mitochondria respiration was measured using the Oroboros O2k Fluorescence Respirometer at 37 °C by previously published methods [37].

Briefly, each chamber of the O2k was air-calibrated for the O₂ concentration in nano-pured water. The reaction mixture initially included buffer containing 10 mM KPi, 5 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM EDTA, and 75 mM Tris, pH 7.5 with complex I substrates 20 mM glutamate and 5 mM malate. The total volume of the assay mixture was 2.1 mL. State 2 respiration was initiated by injecting 5 µL fresh heart mitochondria. State 3 respiration is achieved by adding 2 mM ADP. The respiratory control ratio (RCR) was calculated by the ratio of state 3 to state 2 respiration. The addition of rotenone (0.38 µM) inhibited complex I. The addition of 20 mM succinate stimulated complex II-driven respiration. Complex III was inhibited by the addition of antimycin A (54 nM). Lastly, we measured complex IV activity alone at 37 °C by adding ascorbate (3 mM) and *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.3 mM) to donate electrons to cytochrome *c*.

2.8.3. Mitochondrial ROS measurement

Mitochondrial ROS (mtROS) was measured using the Amplex Red assay [37]. The rate of H₂O₂ production was measured simultaneously with oxygen consumption rates from intact mitochondrial respiration in the Oroboros O2k FluoRespirometer. We calculated the parameter of 'percent electron leak', defined as the percentage of electrons from NADH or succinate that are shunted to SO, as opposed to flowing to O₂ in Complex IV. Expression of ROS production as 'percent electron leak' enhances the comparisons of mtROS production induced in different animals.

2.8.4. Mitochondrial membrane potential

Membrane potential was measured simultaneously with the intact mitochondrial respiration rates in the Oroboros O2k FluoRespirometer by previously published methods [37]. Safranin (1 µM) fluorescence quenching indicates the development of membrane potential, while an increase in fluorescence indicates the loss of membrane potential [38]. The percentage of safranin quenching is calculated to compare the level of membrane potential in samples.

2.8.5. Individual mitochondrial complex assays

All enzyme activities were measured using a Jasco UV-Vis spectrophotometer at 25 °C following previously published methods [39]. *Citrate synthase* activity is a marker of mitochondrial content and was measured by previously published methods [39]. The reaction mixture in a micro-cuvette included 1 mM DNTB, 0.3 mM acetyl CoA, 1% sodium cholate, and 5 µL of heart mitochondria in a final volume of 200 µL. The reaction was initiated by adding 0.5 mM oxaloacetate. Citrate synthase activity was measured via production of coenzyme A (CoA.SH) from oxaloacetate. Under the presence of 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and free sulfhydryl groups of formed coenzyme A, a coupled reaction allows the formation of free 5-thio-2-nitrobenzoate anions measured at 412 nm ($\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The rates were normalized to mg mitochondrial protein. The citrate synthase rates were used to normalize all mitochondrial rates to mitochondrial content. *Complex I* activity was measured as the time-dependent oxidation of NADH at 340 nm using a measured extinction coefficient of $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The reaction mixture in a regular quartz cuvette contained 10 mM KPi, 5 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM EDTA, 75 mM Tris, pH 7.5, 100 µM Coenzyme Q1 (CoQ1), 5 µM antimycin A, and 5 µL heart mitochondria in a final volume of 2 mL. The reaction was initiated by adding 100 µM NADH and the fastest rates were obtained after NADH was added. *Complex II* activity was measured as the time-dependent oxidation of 2,6-dichloroindophenol sodium salt hydrate (DCPIP) at 600 nm using a measured extinction coefficient of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The reaction mixture in a micro-cuvette contained 10 mM KPi, 5 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM EDTA, 75 mM Tris, pH 7.5, 20 mM succinate, 80 µM DCPIP, 1 mM KCN, 5 µM Antimycin A, 4 µM rotenone, and 5 µL of heart mitochondria in a final volume of 200 µL. Reactions were initiated by adding 50 µM decylubiquinone and the linear rates were obtained. *Complex III* activity was measured as the time-dependent reduction of cytochrome *c* at 550

nm using a measured extinction coefficient of $18.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The reaction mixture in a regular glass cuvette contained 10 mM KPi, 5 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM EDTA, 75 mM Tris, pH 7.5, 3 mM KCN, 4 µM rotenone, 60 µM cytochrome *c*, 5 µL of heart mitochondria in a final volume of 2 mL. Reactions were initiated with 100 µM reduced decylubiquinone. *Aconitase* activity is a measure of oxidative stress and was measured as the time-dependent formation of cis-aconitate at 240 nm using a measured extinction coefficient of $2.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [40]. The reaction mixture in a quartz cuvette containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.6 mM MnCl₂, 30 mM citrate, and 0.2% peroxide-free Triton-X 100. For each enzyme, the inhibited non-enzymatic background rates were subtracted from the enzymatic rates.

2.9. Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM. The assumptions of normality in both comparison groups were determined by normality and log-normality test. Statistical significance was determined by using Student's *t*-test (two-tailed, paired or unpaired as appropriate) between the means of two groups, or one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test for multiple comparisons in GraphPad Prism 8 software (San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Cardiomyocyte-specific knockout of SIRT3 leads to heart failure in mice, with males demonstrating further impairment compared to females

First, we examined the cardiac phenotype of SIRT3cKO mice. The echocardiographic analysis reveals that SIRT3cKO male and female mice both exhibit cardiac dysfunction when compared to their WT counterparts. While heart rate and coronary flow reserve (CFR) remained unchanged between two groups (Supplemental Fig. S2), the ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were both significantly decreased in the SIRT3cKO males, while the females did not exhibit a significant change in either parameter (Fig. 1A-B). Meanwhile, both male and female SIRT3cKO mice demonstrate a significantly reduced cardiac output (CO) and stroke volume (SV) compared to their WT counterparts. Intriguingly, while SIRT3cKO males demonstrate a significant change in systolic diameter and volume compared to both WT males and SIRT3cKO females, SIRT3cKO females showed no difference. Although SIRT3cKO females demonstrated a trend towards decrease in both diastolic diameter and volume, neither of these changes reached statistical significance. Furthermore, SIRT3cKO males demonstrated increased LV mass compared to the females (Table 1). SIRT3cKO males exhibit an increased isovolumic relaxation time (IVRT) compared to both WT males and SIRT3cKO females, and an increased isovolumic contraction time (IVCT) compared to WT males, while SIRT3cKO females show no difference in these parameters compared to WT females (Fig. 1C-D). SIRT3cKO males show an increase in MPI compared to WT males and SIRT3cKO females, and both SIRT3cKO males and females exhibited a decreased E'/A' ratio compared to their WT counterparts, with males showing further impairment in this marker compared to the females (Fig. 1E-F). Finally, SIRT3cKO males but not females exhibit a significant decrease in LV anterior wall thickness during systole (LVAW; s). LV posterior wall thickness during systole (LVPW;s) is significantly decreased in both male and female SIRT3cKO mice compared to their WT counterparts (Table 1). Based on these data, SIRT3cKO male mice display more severe cardiac dysfunction compared to the females. Therefore, we determined to use male mice for the duration of our study.

3.2. SIRT3cKO promotes mitochondrial protein hyperacetylation, ferroptosis, and aconitase dysregulation

Because SIRT3 is localized primarily to the mitochondria, we compared levels of protein acetylation and ferroptosis in both the

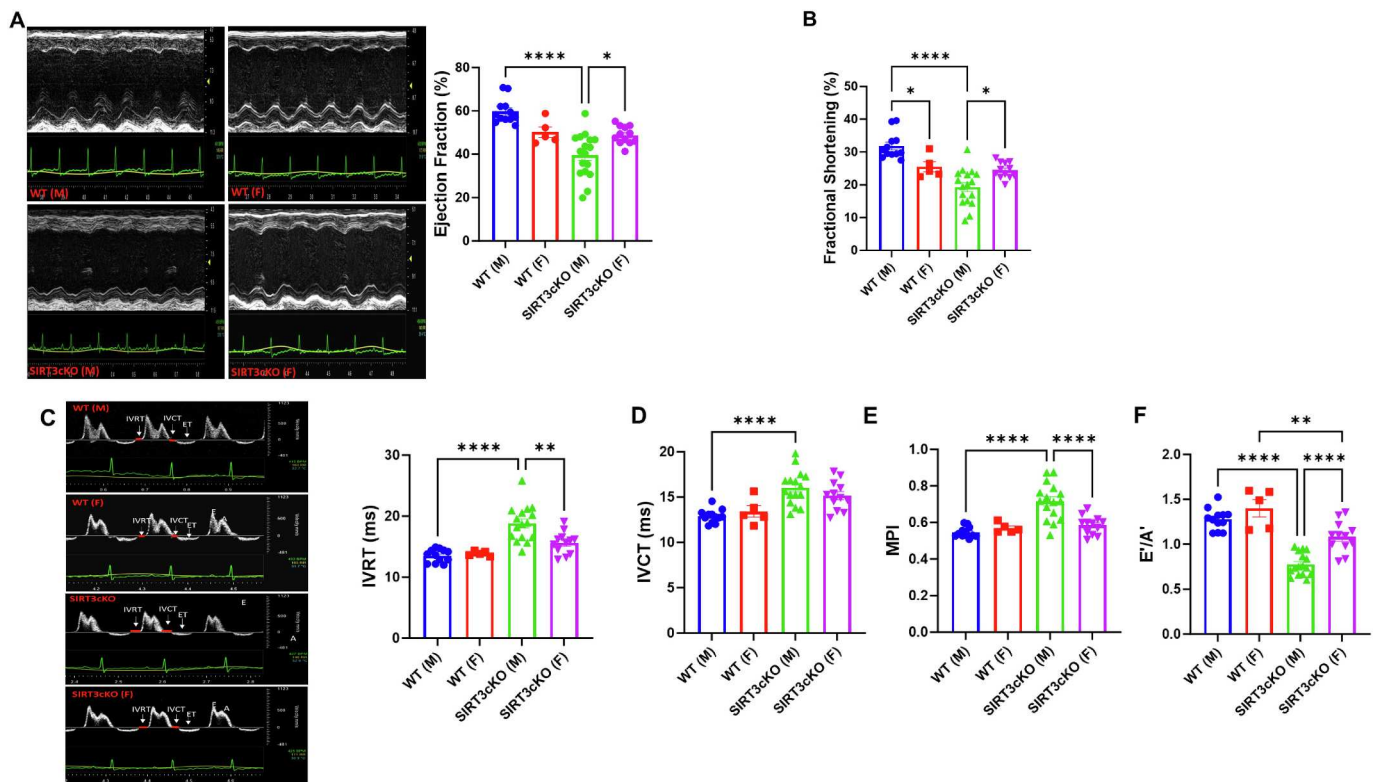


Fig. 1. Echocardiography demonstrates severe impairment of cardiac function in SIRT3cKO mice. **A.** EF is significantly decreased in SIRT3cKO males, but not females, and SIRT3cKO males have a decreased EF compared to SIRT3cKO females. **B.** FS is significantly decreased in SIRT3cKO males, but not females, compared to their WT counterparts, while SIRT3cKO males have decreased FS compared to SIRT3cKO females. **C.** SIRT3cKO males exhibit an increased IVRT compared to both WT males and SIRT3cKO females, while SIRT3cKO females do not show a significant change in IVRT compared to WT females. **D.** SIRT3cKO males demonstrate an increased IVCT compared to WT males, while SIRT3cKO females show no difference compared to WT females. **E.** MPI was significantly increased in SIRT3cKO males compared to WT males and SIRT3cKO females. **F.** E'/A' ratio was significantly decreased in both SIRT3cKO males and females, and was significantly lower in SIRT3cKO males than females. $N = 5-17$ mice per group. Data is presented as Mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using One-Way ANOVA.

Table 1

Echocardiographic measurements of WT and SIRT3cKO male and female mice. Data are presented as Mean \pm SEM. $N = 5-17$ mice per group; ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using One-Way ANOVA.

	WT (M)	WT (F)	SIRT3cKO (M)	SIRT3cKO (F)	WT (M) v WT (F)	WT (M) v SIRT3cKO (M)	WT (F) v SIRT3cKO (F)	SIRT3cKO (M) v SIRT3cKO (F)
CO (mL/min)	25.4 ± 0.7	20.6 ± 0.7	15.5 ± 0.5	16.9 ± 0.4	***	****	**	ns
SV (uL)	56.7 ± 1.8	46.5 ± 1.7	34.7 ± 1.2	36.8 ± 1.2	**	****	**	ns
Diameter;s (mm)	3.1 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1	ns	*	ns	*
Diameter;d (mm)	4.6 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.2 ± 0.1	ns	ns	ns	ns
Volume;s (uL)	39.2 ± 1.9	46.9 ± 4.5	56.7 ± 4.7	40.0 ± 1.8	ns	**	ns	*
Volume;d (uL)	95.9 ± 4.4	93.5 ± 5.1	91.4 ± 4.2	77.7 ± 2.1	ns	ns	ns	ns
LV mass (mg)	80.4 ± 3.5	64.8 ± 4.0	78.4 ± 3.6	63.3 ± 3.8	ns	ns	ns	*
LVAW;s (mm)	1.00 ± 0.03	0.79 ± 0.04	0.76 ± 0.02	0.81 ± 0.04	**	****	ns	ns
LVAW;d (mm)	0.60 ± 0.03	0.46 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.55 ± 0.02	**	ns	ns	ns
LVPW;s (mm)	0.94 ± 0.03	0.79 ± 0.05	0.68 ± 0.02	0.66 ± 0.01	*	****	*	ns
LVPW;d (mm)	0.59 ± 0.01	0.55 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.52 ± 0.01	ns	ns	ns	ns

mitochondria and the cytosol. Western blotting demonstrated that SIRT3cKO mice have significantly increased levels of mitochondrial, but not cytosolic, total acetylated lysine (Fig. 2A). Additionally, mitochondrial but not cytosolic 4-hydroxynonenal (4-HNE) was significantly increased in SIRT3cKO mice (Fig. 2B). SIRT3cKO mice also exhibit decreased levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4) in both the mitochondria and cytosol, and increased levels of ACSL4 in the cytosol when

compared to the WT control. Furthermore, the iron export protein ferroportin is significantly decreased in the mitochondria of SIRT3cKO mice, despite trending towards increase in the cytosol. Mitochondrial, but not cytosolic, aconitase expression is significantly decreased in SIRT3cKO mice. Frataxin expression in the mitochondria is also significantly abrogated in SIRT3cKO hearts. Acetylated p53 is significantly upregulated in the mitochondria but not the cytosol of SIRT3cKO mice,

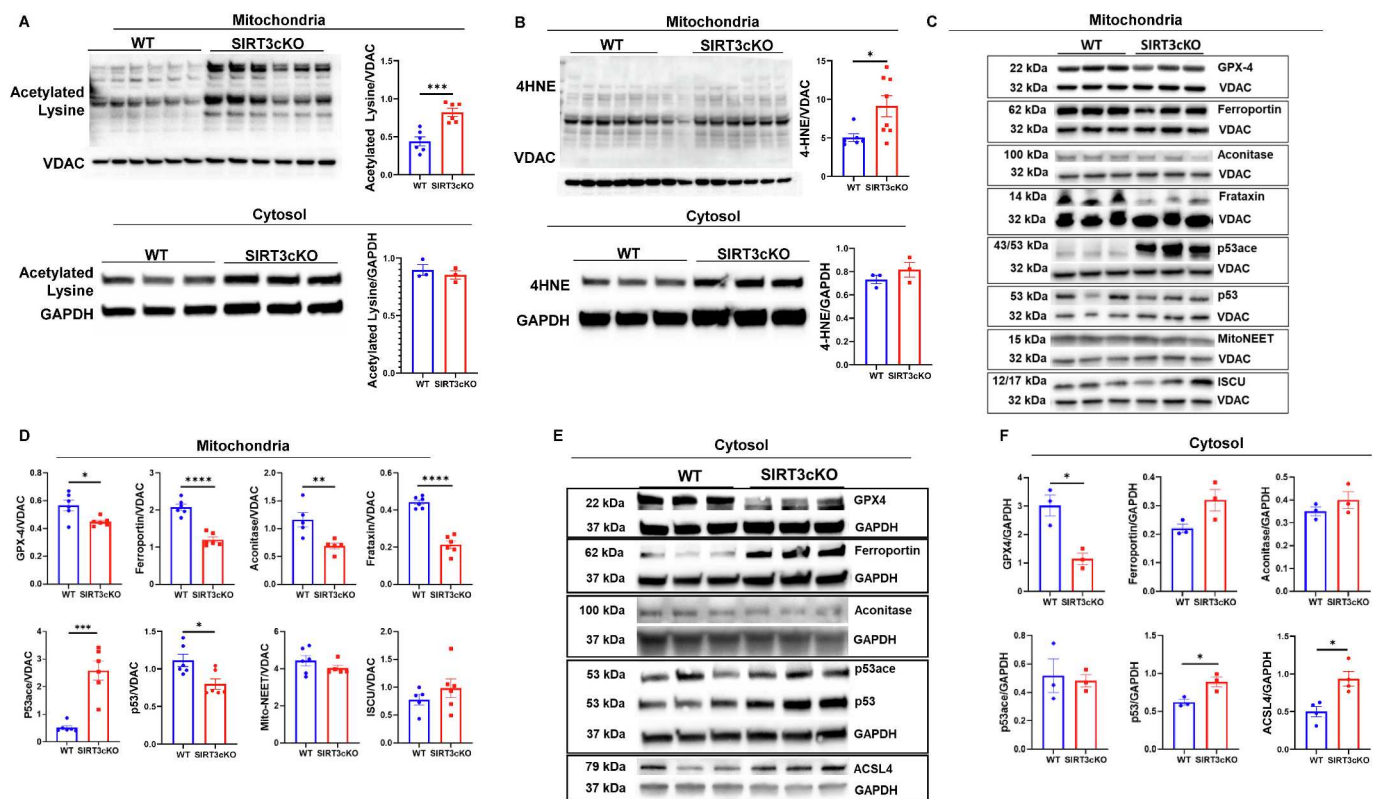


Fig. 2. SIRT3cKO mice demonstrate alterations in protein expression, primarily in the mitochondria. **A.** Mitochondrial, but not cytosolic, total lysine acetylation is significantly increased in SIRT3cKO mice. **B.** SIRT3cKO mice have increased mitochondrial but not cytosolic 4-HNE. **C.** Representative Western blot bands on mitochondrial proteins. **D.** Mitochondrial GPX4, Ferroportin, aconitase, frataxin, and total p53 are significantly decreased in SIRT3cKO mouse hearts, while mitochondrial acetylated p53 is significantly increased. MitoNEET trends towards decrease in SIRT3cKO mitochondria, but is not significantly altered. ISCU is not significantly altered in SIRT3cKO mitochondria. **E.** Representative Western blot bands on cytosolic proteins. **F.** Cytosolic GPX4 expression is significantly decreased in SIRT3cKO mouse hearts, while cytosolic ferroportin trends towards increase. Cytosolic aconitase and acetylated p53 are unchanged in SIRT3cKO hearts. Total cytosolic p53 and cytosolic ACSL4 are significantly increased in SIRT3cKO mice. $N = 3-6$ mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using Student's *t*-test (two-tailed).

while total p53 is significantly decreased in SIRT3cKO mitochondria. Interestingly, the iron-containing mitochondrial membrane protein mitoNEET trended towards a decrease in expression in SIRT3cKO mitochondria, although insignificant, while the iron-sulfur cluster assembly enzyme (ISCU) was not significantly altered in SIRT3cKO cardiac mitochondria (Fig. 2C-F). Mitochondrial ferritin (FtMt) and the cystine-glutamate antiporter SLC7A11 both demonstrated slight, although insignificant, decreases in SIRT3cKO mitochondria compared to the WT, and SLC7A11 demonstrated a similar trend in SIRT3cKO cytosol (Supplemental Fig. S4). These data suggest that SIRT3 directly impacts mitochondrial aconitase and ferroptosis.

3.3. SIRT3cKO mice demonstrate dysregulation of mitochondrial iron homeostasis and increased mitochondrial ROS formation

We next examined the contributions of iron homeostasis and ROS formation in the mitochondria. Male SIRT3cKO mice exhibit an increase in the percentage of the mitochondrial labile iron pool that exists in the iron (II) state, as well as a decrease in total mitochondrial iron (III) (Fig. 3A). Meanwhile, whole heart iron levels remained unchanged in SIRT3cKO mice compared to WT (Supplemental Fig. S5A). Cytosolic aconitase activity is unchanged in SIRT3cKO mouse hearts, while mitochondrial aconitase activity is significantly decreased in SIRT3cKO hearts (Fig. 3B). EPR spectroscopy demonstrated that SIRT3cKO mice have significantly increased mitochondrial ROS compared to the WT (Fig. 3C). Furthermore, mitochondrial ROS formation measured during Complex I-driven respiration was also increased in SIRT3cKO mice compared to the WT (Fig. 3D). Intriguingly, lipid peroxidation in the

whole heart measured by an MDA assay revealed no change in total cardiac lipid peroxidation in SIRT3cKO mice compared to WT (Supplemental Fig. S5B). Taken together, our data implicate the involvement of mitochondrial iron homeostasis and mitochondrial ROS formation in the activation of ferroptosis in SIRT3cKO hearts.

3.4. Fer-1 rescues impaired cardiac function in SIRT3cKO mice in a time-dependent manner

We then investigated whether mitochondrial ferroptosis contributes to the cardiac dysfunction of SIRT3cKO mice via treatment with the ferroptosis inhibitor Fer-1 for 2 weeks. SIRT3cKO mice treated with Fer-1 demonstrate progressive improvement in systolic function as shown by increased EF, FS, SV, and CO over the course of treatment (Fig. 4A-B, Table 2). Furthermore, LVAW(s) was significantly increased over the course of Fer-1 treatment (Table 2). Finally, Fer-1 improved IVCT and MPI in SIRT3cKO mice, but not IVRT or E'A' ratio (Fig. 4C-F).

3.5. Fer-1 upregulates expression of mitochondrial GPX4 and aconitase in SIRT3cKO mice, and reverses SIRT3cKO-induced decreases in mitochondrial aconitase activity and cardiac calcium dysregulation

Following Fer-1 treatment, SIRT3cKO mice demonstrate an increase in mitochondrial GPX4, and a slight but insignificant increase in mitochondrial ferroportin expression. Expression of mitochondrial aconitase is significantly increased in SIRT3cKO mice receiving Fer-1. Intriguingly, the iron-sulfur cluster assembly enzyme (ISCU) and the iron-

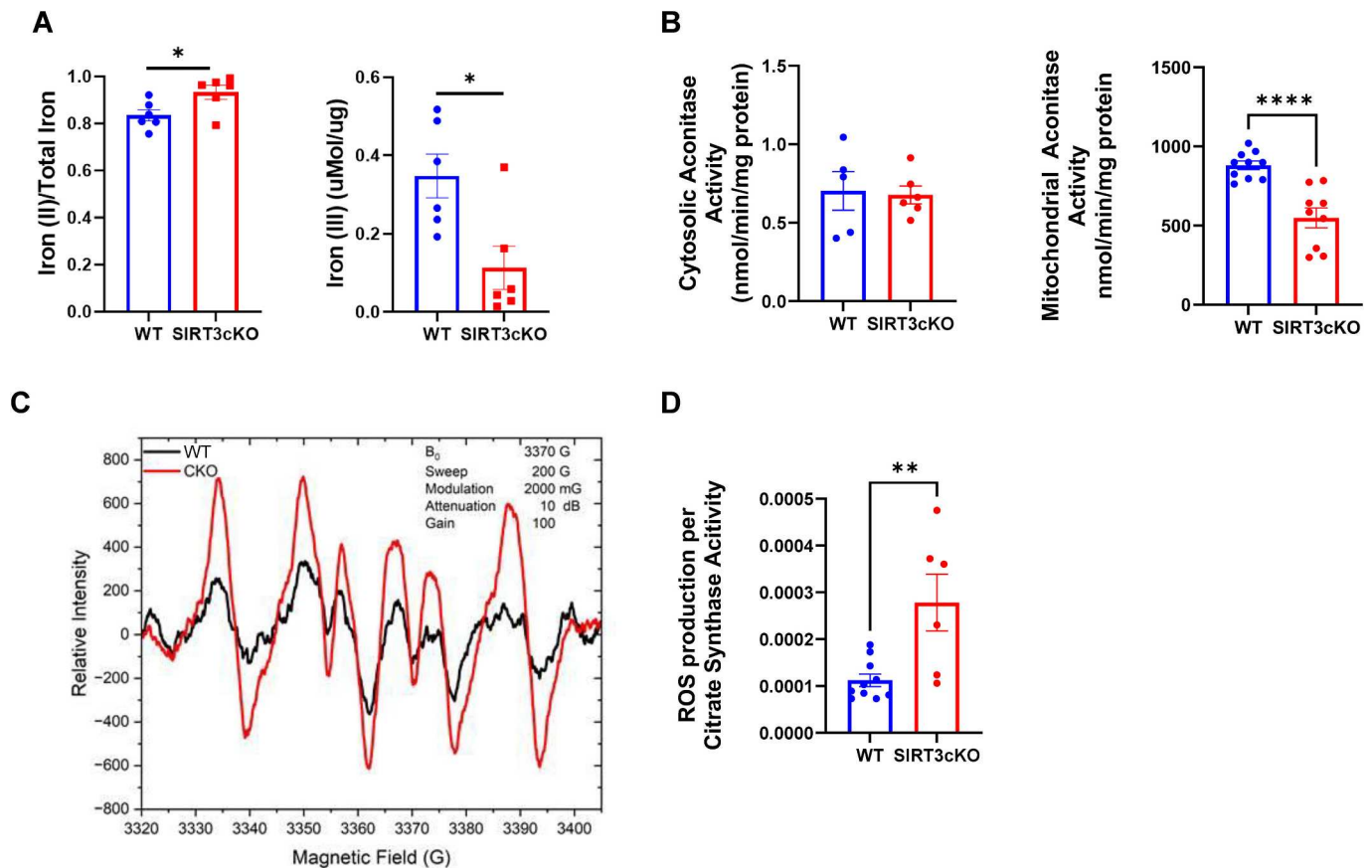


Fig. 3. SIRT3cKO mice demonstrate characteristics of mitochondrial iron dysregulation and increased ROS formation. **A.** Mitochondrial Iron (II)/Total labile iron ratio is significantly increased in SIRT3cKO hearts, while labile iron (III) is significantly decreased. $N = 6$ mice per group. **B.** Cytosolic aconitase activity is unchanged in SIRT3cKO mice, while mitochondrial aconitase activity is significantly decreased in SIRT3cKO mice. $N = 6$ mice per group. Mitochondrial aconitase measurements were performed in duplicate. **C.** EPR spectroscopy demonstrates a significant increase in cardiac ROS formation in SIRT3cKO mice. $N = 1$ mouse per group. **D.** Mitochondrial ROS production is significantly increased in SIRT3cKO mice compared to the WT. $N = 6$ mice per group. Measurements were performed in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ using Student's *t*-test (two-tailed).

containing mitochondrial membrane protein mitoNEET are significantly upregulated in SIRT3cKO mitochondria following Fer-1 treatment, suggesting that Fer-1 directly impacts mitochondrial iron-sulfur clusters and iron homeostasis. Additionally, mitochondrial frataxin is unaffected by Fer-1 (Fig. 5A-B). Mitochondrial 4-HNE expression is not significantly altered following Fer-1 treatment (Fig. 5C). In control mice treated with Fer-1, mitochondrial GPX4 expression is significantly increased, while mitochondrial ferroportin and 4-HNE are unchanged (Fig. 5D-F). SIRT3cKO mice also have decreased cardiac calcium, which is rescued by Fer-1 treatment (Fig. 6A). Additionally, mitochondrial aconitase activity is significantly abrogated in SIRT3cKO mouse hearts, and is significantly improved following Fer-1 treatment (Fig. 6B). Fer-1 treatment does not significantly decrease mitochondrial ROS production in SIRT3cKO mice (Fig. 6C).

3.6. SIRT3cKO mice have altered mitochondrial function, which is partially rescued by Fer-1

Membrane potential during Complex I-driven respiration is significantly decreased in SIRT3cKO mice, as shown by an increase in the % max safranin signal, and is increased following Fer-1 treatment (Fig. 6D). Complex IV activity is also significantly decreased in SIRT3cKO mice, and is improved following Fer-1 treatment (Fig. 6E). Interestingly, Complex I activity is suppressed in SIRT3cKO mice, and is not improved by Fer-1 treatment (Fig. 6F). Membrane potential during Complex II-driven respiration was not significantly altered in SIRT3cKO mice (Supplemental S7A). Complex I-driven respiration is significantly

decreased in SIRT3cKO mice, and is not rescued by Fer-1 treatment, and Complex II-driven respiration is not significantly altered in SIRT3cKO mice, although Fer-1 treatment suppressed this pathway in both WT and SIRT3cKO mice (Supplemental Fig. S7B). Complex II and Complex III activity are unchanged in SIRT3cKO mice, and remain unchanged following treatment (Supplemental Fig. S7C).

4. Discussion

In the present study, we investigated the novel regulatory role of cardiomyocyte SIRT3 on mitochondrial ferroptosis and cardiac function in mice. We also evaluated the effects of the ferroptosis inhibitor Fer-1 on the SIRT3cKO phenotype. We found that cardiomyocyte-specific knockout of SIRT3 in mice causes severe cardiac dysfunction characterized primarily by increased mitochondrial p53 acetylation and ferroptosis-related protein expression, with few changes in cytosolic protein expression. Additionally, mitochondrial function and iron homeostasis were disrupted in SIRT3cKO mice. Fer-1 treatment improved cardiac function in SIRT3cKO mice, and improved GPX4 and aconitase expression, as well as mitochondrial aconitase activity. Fer-1 treatment also reversed SIRT3cKO-induced decrease in mitochondrial aconitase activity and cardiac calcium levels.

Echocardiography demonstrated significant impairment of cardiac function in SIRT3cKO mice. Intriguingly, SIRT3cKO male mice demonstrate more severe systolic impairment, while females exhibit more changes in diastolic function, suggesting that male and female SIRT3cKO mice may develop cardiac dysfunction via different

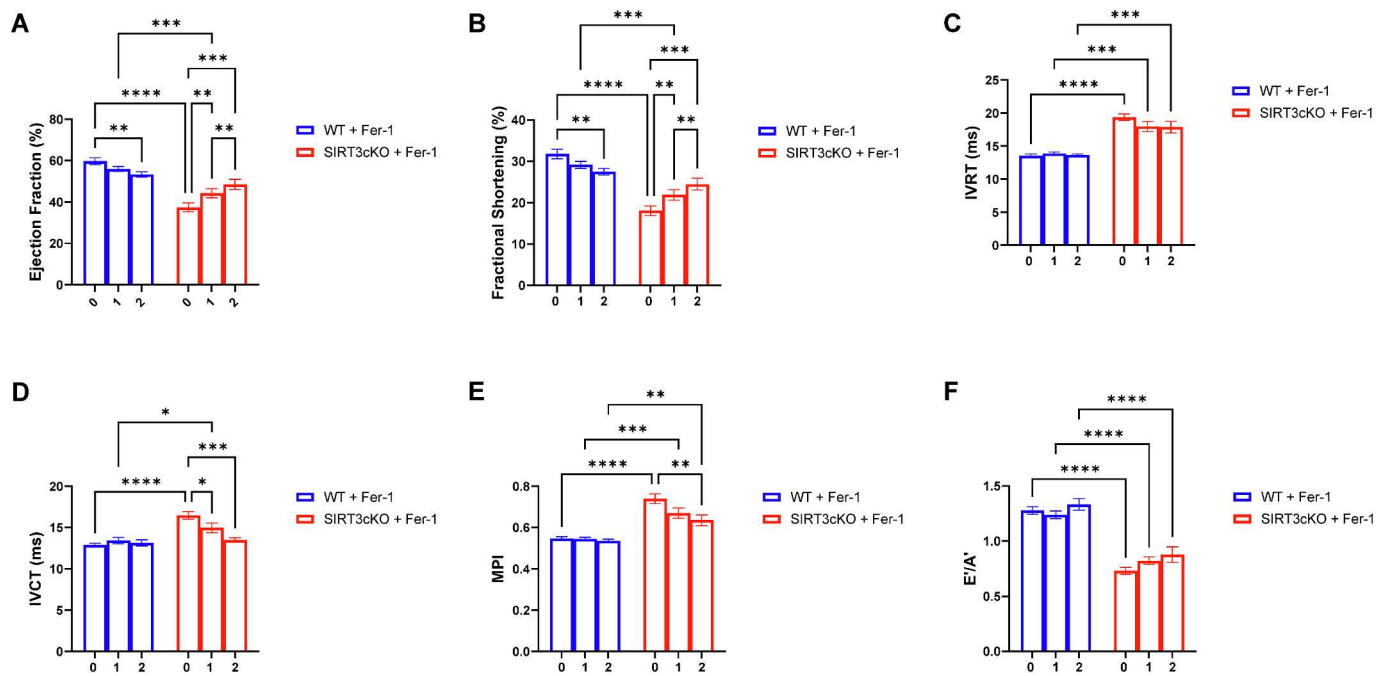


Fig. 4. Fer-1 treatment improves cardiac function in SIRT3cKO mice. **A.** EF is significantly increased following Fer-1 treatment in SIRT3cKO mice. **B.** FS is significantly improved following Fer-1 treatment in SIRT3cKO mice. **C.** IVRT is not significantly altered following Fer-1 treatment in SIRT3cKO mice. **D.** IVCT is significantly decreased in SIRT3cKO mice following Fer-1 treatment. **E.** MPI is significantly improved following Fer-1 treatment. **F.** E'/A' ratio is not significantly different in SIRT3cKO mice following Fer-1 treatment. $N = 12$ mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using Two-Way ANOVA.

Table 2

Echocardiographic measurements of WT and SIRT3cKO mice following Fer-1 treatment. Data are presented as Mean \pm SEM. $N = 12$ mice per group; ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using One-Way ANOVA.

	WT	WT + Fer-1 1Wk	WT +Fer-1 2Wk	SIRT3cKO	SIRT3cKO + Fer-1 1Wk	SIRT3cKO + Fer-1 2Wk	WT v SIRT3cKO	WT v WT + Fer-1 2Wk	SIRT3cKO v SIRT3cKO + Fer-1 1Wk	SIRT3cKO v SIRT3cKO + Fer-1 2Wk
CO (mL/ min)	25.4 \pm 0.7	24.4 \pm 0.8	24.3 \pm 0.6	15.7 \pm 0.5	18.1 \pm 0.9	19.6 \pm 0.6	****	ns	ns	**
SV (uL)	56.7 \pm 1.8	53.9 \pm 1.9	54.3 \pm 1.7	34.5 \pm 1.2	39.8 \pm 1.8	43.4 \pm 1.4	****	ns	ns	**
Diameter;s (mm)	3.1 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1	3.7 \pm 0.1	3.5 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1	**	ns	ns	ns
Diameter; d (mm)	4.6 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	ns	ns	ns	ns
Volume;s (uL)	39.2 \pm 2.9	42.9 \pm 2.5	48.2 \pm 2.8	59.8 \pm 4.6	51.4 \pm 4.0	47.9 \pm 4.4	**	ns	ns	ns
Volume; d (uL)	95.9 \pm 4.4	96.7 \pm 3.9	102.6 \pm 3.8	94.3 \pm 4.4	91.2 \pm 4.5	91.3 \pm 4.2	ns	ns	ns	ns
LV mass (mg)	80.4 \pm 3.5	87.6 \pm 4.0	83.6 \pm 3.3	78.4 \pm 3.6	77.4 \pm 3.6	75.1 \pm 1.9	ns	ns	ns	ns
LVAW;s (mm)	1.00 \pm 0.03	1.05 \pm 0.02	0.97 \pm 0.02	0.76 \pm 0.02	0.86 \pm 0.05	0.89 \pm 0.03	****	ns	ns	*
LVAW; d (mm)	0.60 \pm 0.03	0.64 \pm 0.02	0.60 \pm 0.02	0.61 \pm 0.02	0.64 \pm 0.03	0.59 \pm 0.02	ns	ns	ns	ns
LVPW;s (mm)	0.94 \pm 0.03	0.89 \pm 0.02	0.85 \pm 0.02	0.68 \pm 0.02	0.69 \pm 0.03	0.78 \pm 0.03	****	ns	ns	ns
LVPW; d (mm)	0.59 \pm 0.01	0.63 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02	0.57 \pm 0.02	0.55 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02	ns	ns	ns	ns

mechanisms. For this reason, following echocardiographic analysis we determined to focus on male mice for the remainder of the study, with future experiments aimed at elucidating sex differences within this model. Fer-1 was capable of rescuing many of the parameters impaired in SIRT3cKO males, and was particularly effective in rescuing systolic function, suggesting that the diastolic dysfunction observed in this model may be secondary to systolic dysfunction. Importantly, not all parameters of cardiac function were rescued by Fer-1. We observed a clear time-dependence in improvement of the parameters that were normalized with Fer-1 treatments; this suggests that extending the

treatment course could have further benefits on cardiac function. WT mice receiving Fer-1 treatment did demonstrate a slight but significant decrease in EF and FS at two weeks of treatment; this could be an important consideration when considering a long-term study as Fer-1 may have some toxicity.

SIRT3cKO mice exhibited increased acetylation of mitochondrial, but not cytosolic proteins, suggesting that SIRT3 acts as the primary mitochondrial deacetylase. The increased mitochondrial levels of acetylated p53, despite decreased total levels of p53, suggest that SIRT3 is a regulator of p53 activity by acting as its primary deacetylase.

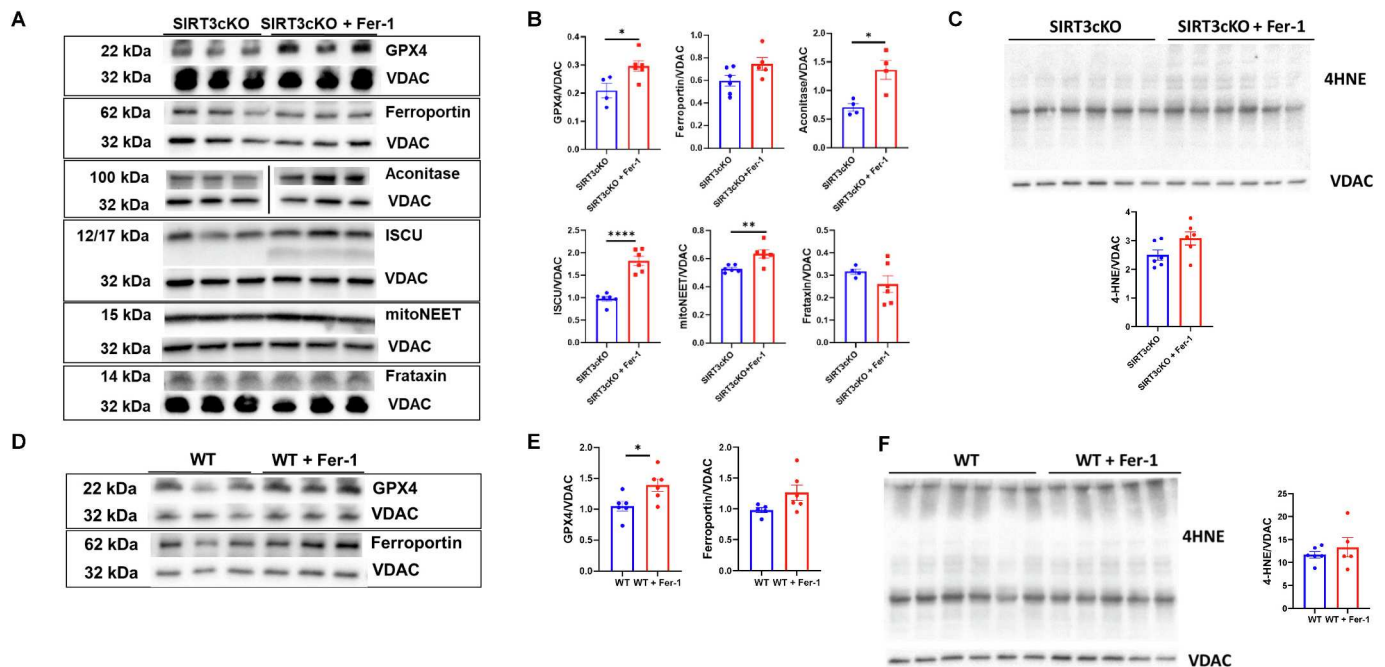


Fig. 5. Fer-1 induces some changes in mitochondrial protein expression in SIRT3cKO mice. **A.** Representative Western blot bands on SIRT3cKO mitochondrial proteins following Fer-1 treatment. **B.** Mitochondrial GPX4 expression is significantly increased, and mitochondrial ferroportin expression trends towards increase in SIRT3cKO mice following Fer-1 treatment. Expression of mitochondrial aconitase is significantly increased following Fer-1 treatment. Additionally, ISCU and mitoNEET expression are significantly increased in SIRT3cKO cardiac mitochondria following Fer-1 treatment. Mitochondrial frataxin expression remains unchanged in SIRT3cKO mice following Fer-1 treatment. **C.** Mitochondrial 4-HNE expression is not significantly different in SIRT3cKO mice following Fer-1 treatment. **D.** Representative Western blot bands on WT mitochondrial proteins following Fer-1 treatment. **E.** Mitochondrial GPX4 expression is significantly upregulated in WT mice treated with Fer-1, while mitochondrial ferroportin expression is unchanged. **F.** Mitochondrial 4-HNE expression is unchanged in WT mice treated with Fer-1. $N = 4-6$ mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ using Student's *t*-test (two-tailed).

Interestingly, acetylation of p53 at lysine residue K98 is associated with the ability of p53 to initiate ferroptosis [41], suggesting that loss of SIRT3 in the heart may trigger ferroptosis via an inability to deacetylate p53, providing yet another mechanism for the activation of this cell death pathway in our model. This is consistent with our previous study demonstrating that SIRT3 deficiency activates ferroptosis via increased p53 acetylation [42]. The role of mitochondrial p53 acetylation in ferroptosis warrants further investigation.

Frataxin is involved in iron-sulfur cluster biogenesis, and decreased levels of this protein lead to mitochondrial iron dysregulation [43,44]. Additionally, acetylation of frataxin is associated with decreased iron-sulfur cluster biogenesis and increased mitochondrial iron accumulation, and SIRT3 has been shown to be responsible for frataxin deacetylation [45]. We evaluated frataxin expression and found it to be significantly decreased in SIRT3cKO cardiac mitochondria. This leads us to believe that SIRT3cKO cardiac dysfunction may be related to the cardiomyopathy seen in FRDA patients. Frataxin expression was not improved following Fer-1 treatment, suggesting that Fer-1 acts downstream of frataxin deficiency and thus may be a therapeutic of interest for FRDA and its associated cardiomyopathy.

An increased proportion of iron (II) in the mitochondrial labile iron pool along with decreased protein expression of mitochondrial aconitase, taken together with decreased mitochondrial but not cytosolic aconitase activity, suggest that SIRT3cKO mice have dysregulation of iron homeostasis particularly in the mitochondria. Because it is highly reactive via the Fenton reaction to produce damaging ROS [46], increased levels of iron(II) are considered to be an initiating factor for ferroptosis [47], providing the first piece of evidence that ferroptosis may be involved in this model. Mitochondrial aconitase expression and activity were both significantly increased following Fer-1 treatment, suggesting that mitochondrial iron regulation is at least somewhat improved over 2 weeks of treatment. Mitochondrial ROS production was

also significantly increased in SIRT3cKO mice, and additional markers of ferroptosis including decreased GPX4 expression in both the mitochondria and cytosol, increased mitochondrial 4-HNE expression, and increased cytosolic ACSL4 expression are present in SIRT3cKO hearts. Lack of an increase in MDA levels in SIRT3cKO mice, coupled with decreased GPX4 expression, suggest that lipid peroxidation is not increasing in our model, but rather that ferroptosis is being activated by an impaired ability to handle ROS production by various pathways. Fer-1 was incapable of improving mitochondrial ROS production, suggesting that Fer-1 does not directly target ROS generation pathways in the mitochondria. Meanwhile, Fer-1 increased mitochondrial GPX4 expression in WT mice as well, while cardiac parameters were unchanged, suggesting that GPX4 expression may not be the primary driver of improved cardiac function in SIRT3cKO mice treated with Fer-1.

Interestingly, we demonstrated that SIRT3cKO mice have decreased mitochondrial Ferroportin expression. Ferroportin is canonically believed to be solely localized to the cell membrane; however, a recent study in plants demonstrated Ferroportin localization to the mitochondria [48]. Our study is the first to suggest that Ferroportin may localize to the mitochondria in mice to aid in iron export and protect the mitochondria from iron accumulation. However, additional work is required to confirm this finding. Furthermore, we found that ISCU and mitoNEET levels are significantly improved in SIRT3cKO mitochondria following Fer-1 treatment. ISCU is a scaffolding protein for iron-sulfur cluster biogenesis [49]. While ISCU was not significantly altered in SIRT3cKO mitochondria compared to WT, Fer-1 treatment resulted in a significant increase in ISCU expression in SIRT3cKO mitochondria. This suggests that iron-sulfur cluster biogenesis may be upregulated by Fer-1 to reduce iron accumulation in the mitochondria. MitoNEET has been implicated as a protein capable of reducing mitochondrial iron and ROS levels [50]. Taken together, it appears that Fer-1 directly targets the mitochondria to improve mitochondrial iron homeostasis and reduce

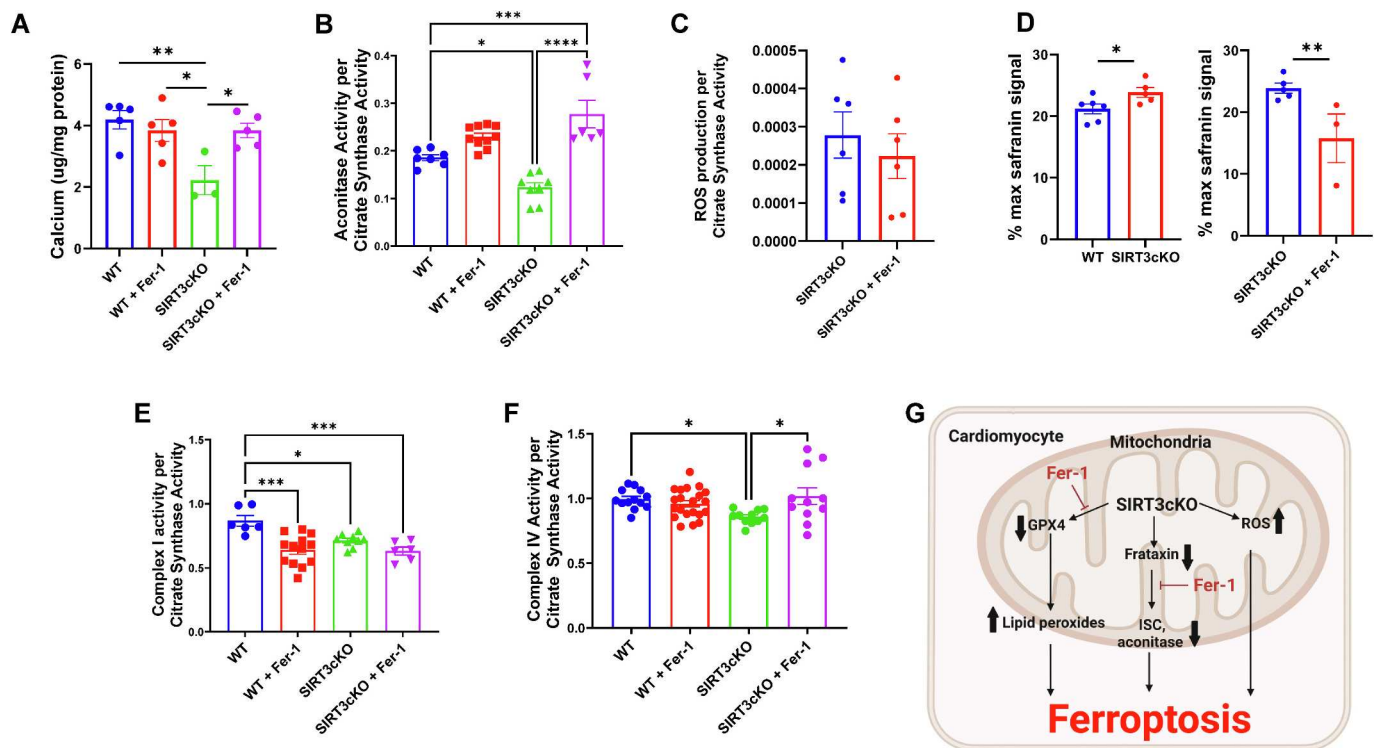


Fig. 6. Fer-1 treatment improves cardiac calcium handling and mitochondrial aconitase activity, and partially rescues mitochondrial function in SIRT3cKO mice. **A.** Total cardiac calcium levels are significantly decreased in SIRT3cKO mice, while Fer-1 treatment increases calcium levels. $N = 3-5$ mice per group. Experiments were run in duplicate and reads averaged to give one final value per mouse. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ using One-way ANOVA. **B.** Mitochondrial aconitase activity is significantly decreased in SIRT3cKO mice, and increased following Fer-1 treatment. $N = 3-6$ mice per group. Experiments were run in duplicate. $*p < 0.05$, $**p < 0.001$, $***p < 0.0001$ using One-Way ANOVA. **C.** Mitochondrial ROS formation does not significantly change in SIRT3cKO mice treated with Fer-1. $N = 3-6$ mice per group. Experiments were run in duplicate. **D.** Membrane potential during Complex I-driven respiration is significantly decreased in SIRT3cKO mice, as shown by increased % max safranin signal, and is significantly increased following Fer-1 treatment. $N = 3-6$ mice per group. Experiments were run in duplicate and reads averaged to give one final value per mouse. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ using Student's t-test (two-tailed). **E.** complex I activity is decreased in SIRT3cKO mice, and is not rescued by Fer-1 treatment. $N = 3-6$ mice per group. Experiments were repeated 2–3 times. $*p < 0.05$, $**p < 0.001$ using One-Way ANOVA. **F.** Complex IV activity is significantly decreased in SIRT3cKO mice, and significantly increased following Fer-1 treatment. $N = 3-6$ mice per group. 2 reads were taken per mouse. $*p < 0.05$ using One-Way ANOVA. **G.** Working model of SIRT3cKO-induced ferroptosis in mice and the impact of Fer-1 on SIRT3-regulated pathways.

mitochondrial ROS production, which in turn may contribute to the improved cardiac function seen in SIRT3cKO mice treated with Fer-1.

Our present study also revealed decreased cardiac calcium levels, which suggest that calcium homeostasis is dysregulated in SIRT3cKO mice. In the mitochondria, calcium is required for activation of components of the ETC [51], suggesting that abnormal calcium handling is intimately involved in the mitochondrial dysfunction observed in SIRT3cKO hearts. Furthermore, calcium is required for cardiomyocyte contraction [52], suggesting that decreased calcium levels may directly contribute to systolic dysfunction in SIRT3cKO mice.

We found that mitochondrial function is altered in SIRT3cKO mice, and partially rescued with Fer-1 treatment. Decreased membrane potential in SIRT3cKO mice, and increased membrane potential following Fer-1 treatment, during Complex I-driven respiration suggests mitochondrial dysfunction is indeed occurring in this model, and that Fer-1 can rescue mitochondrial function with even just 2 weeks of treatment. Complex I is activated by deacetylation, which is typically performed by SIRT3 [4]; thus, it is logical that Complex I-driven respiration and Complex I activity should both be decreased in SIRT3cKO hearts. Interestingly, despite improving mitochondrial membrane potential during Complex I-driven respiration, Fer-1 did not improve Complex I-driven respiration or Complex I activity. This is not entirely unexpected, since SIRT3 is directly responsible for activation of Complex I, and is entirely lacking from the cardiomyocytes of SIRT3cKO mice. We found no change in membrane potential during Complex II-driven respiration, Complex II-driven respiration as a whole, Complex II activity, or Complex III activity in SIRT3cKO mice, suggesting that Complexes II and III

are not involved in the mitochondrial dysfunction caused by loss of SIRT3. Intriguingly, Complex IV activity was suppressed in SIRT3cKO mice, and rescued by Fer-1 treatment, suggesting that SIRT3 may regulate Complex IV activity in the heart, and that Fer-1 may be directly targeting Complex IV in order to improve mitochondrial function. These results are consistent with a previous study demonstrating a role for SIRT3 in regulating Complexes I and IV in osteogenesis [53].

Our data suggest that Fer-1 acts to improve cardiac function in SIRT3cKO mice not by directly inhibiting lipid peroxidation, as shown by its inability to reduce 4-HNE expression or mitochondrial ROS production; however, it upregulates GPX4 expression, allowing increased scavenging of damaging lipid peroxides. Furthermore, it directly improves mitochondrial iron-sulfur cluster protein expression and mitochondrial function, suggesting that Fer-1 directly targets the mitochondria in order to improve cardiac function in SIRT3cKO mice.

5. Limitations

Because SIRT3cKO male and female mice exhibited differences in cardiac function, only male mice were used for the majority of this study. Evaluation of the phenotype of female SIRT3cKO mice will be beneficial to evaluate how sex can impact cardiac function in the context of cardiomyocyte SIRT3 deficiency. Additionally, this study used a dosing period of 2 weeks, and while many improvements were observed, it is possible that a longer dosing period would show further benefit. More studies are needed to evaluate efficacy of Fer-1 longer-term, as well as determining whether any toxicities may be associated with Fer-1

treatment over time in order to fully elucidate whether Fer-1 is a valid therapeutic to target FRDA, HF, and cardiomyopathies.

Further elucidation of the precise mechanisms of ferroptosis in SIRT3cKO mice is also necessary. Transmission electron microscopy to identify the characteristic changes in mitochondrial morphology will serve to further confirm the occurrence of ferroptosis in our model. Additionally, identification of whether the ferroptosis pathway seen in SIRT3cKO mice is mediated by p53 by eliminating the ability of p53 to initiate ferroptosis is an intriguing possibility to determine the exact pathway by which cardiac dysfunction is occurring in SIRT3cKO mice.

Furthermore, a recent study has identified frataxin acetylation as a driver of impaired mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis and mitochondrial iron accumulation, and that SIRT3 specifically drives this process [45]. In the future, evaluating frataxin acetylation may provide insight into the functionality of the frataxin that is expressed in SIRT3cKO hearts, and further confirm similarities between the SIRT3cKO phenotype and FRDA-associated cardiomyopathy.

In summary, our present studies demonstrate that cardiac dysfunction in SIRT3cKO mice is at least partially attributable to activation of mitochondrial ferroptosis, and that this phenotype has similarities to the mitochondrial cardiomyopathy that develops in FRDA patients. Furthermore, ferroptosis in SIRT3cKO mice is initiated by a combination of excessive lipid peroxidation, ROS formation, and mitochondrial iron (II) overload, and appears to be a direct result of mitochondrial dysfunction. Fer-1 ameliorated cardiac dysfunction in SIRT3cKO mice, further supporting the notion that ferroptosis is involved in the pathogenesis of cardiac dysfunction in this model, and appears to primarily impact mitochondrial protein expression and iron homeostasis, with some influence on mitochondrial ETC activity (Fig. 6G). The changes induced by Fer-1 treatment are almost exclusive to the mitochondria, suggesting for the first time that mitochondrial dysfunction may be a major driver of ferroptosis in the heart, and that Fer-1 may act via a mitochondrial targeting action. Because of the similarities between cardiac dysfunction in SIRT3cKO mice and FRDA cardiomyopathy, Fer-1 may be a potential therapeutic for treatment of FRDA, although more studies are necessary to fully elucidate the mechanisms by which Fer-1 inhibits ferroptosis.

Funding

This work was supported by the National Institute of General Medical Sciences and National Heart, Lung, and Blood Institute (R01HL151536, JX Chen), the National Heart, Lung, and Blood Institute (R56HL164321, H.Z) and University of Mississippi Medical Center Intramural Research Support Program (IRSP, H.Z.)

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

AI-assisted technologies were not used in the preparation of this manuscript.

CRediT authorship contribution statement

Aubrey C. Cantrell: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Jessie Besanson:** Methodology. **Quinesha Williams:** Writing – review & editing. **Ngoc Hoang:** Data curation. **Kristin Edwards:** Data curation. **G. Reid Bishop:** Data curation. **Yingjie Chen:** Writing – review & editing, Resources, Conceptualization. **Heng Zeng:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. **Jian-Xiong Chen:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors report no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2024.05.003>.

References

- [1] C. Vasquez-Trincado, I. Garcia-Carvajal, C. Pennanen, V. Parra, J.A. Hill, B. A. Rothermel, S. Lavandero, Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease, *J. Physiol.* 594 (3) (2016) 509–525.
- [2] A.V. Poznyak, E.A. Ivanova, I.A. Sobenin, S.F. Yet, A.N. Orekhov, The role of mitochondria in cardiovascular diseases, *Biology (Basel)* 9 (6) (2020).
- [3] R.A.H. van de Ven, D. Santos, M.C. Haigis, Mitochondrial Sirtuins and molecular mechanisms of aging, *Trends Mol. Med.* 23 (4) (2017) 320–331.
- [4] B.H. Ahn, H.S. Kim, S. Song, I.H. Lee, J. Liu, A. Vassilopoulos, C.X. Deng, T. Finkel, A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (38) (2008) 14447–14452.
- [5] H. Cimen, M.J. Han, Y. Yang, Q. Tong, H. Koc, E.C. Koc, Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria, *Biochemistry* 49 (2) (2010) 304–311.
- [6] D. Albani, E. Ateri, S. Mazzucco, A. Ghilardi, S. Rodilossi, G. Biella, F. Ongaro, P. Antuono, P. Boldrini, E. Di Giorgi, A. Frigato, E. Durante, L. Caberlotto, A. Zanardo, M. Siculi, M. Gallucci, G. Forloni, Modulation of human longevity by SIRT3 single nucleotide polymorphisms in the prospective study “Treviso Longeva (TRELONG)”, *Age (Dordr.)* 36 (1) (2014) 469–478.
- [7] M.D. Hirschey, T. Shimazu, E. Jing, C.A. Grueter, A.M. Collins, B. Aouizerat, A. Stancakova, E. Goetzman, M.M. Lam, B. Schwer, R.D. Stevens, M.J. Muehlbauer, S. Kakar, N.M. Bass, J. Kuusisto, M. Laakso, F.W. Alt, C.B. Newgard, R.V. Farese Jr., C.R. Kahn, E. Verdin, SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome, *Mol. Cell* 44 (2) (2011) 177–190.
- [8] H.S. Kim, K. Patel, K. Muldoon-Jacobs, K.S. Bisht, N. Aykin-Burns, J.D. Pennington, R. van der Meer, P. Nguyen, J. Savage, K.M. Owens, A. Vassilopoulos, O. Ozden, S. H. Park, K.K. Singh, S.A. Abdulkadir, D.R. Spitz, C.X. Deng, D. Gius, SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress, *Cancer Cell* 17 (1) (2010) 41–52.
- [9] N.R. Sundaresan, M. Gupta, G. Kim, S.B. Rajamohan, A. Isbatan, M.P. Gupta, Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (9) (2009) 2758–2771.
- [10] L. Li, H. Zeng, X. He, J.X. Chen, Sirtuin 3 alleviates diabetic cardiomyopathy by regulating TIGAR and cardiomyocyte metabolism, *J. Am. Heart Assoc.* 10 (5) (2021) e018913.
- [11] X. Feng, H. Su, X. He, J.X. Chen, H. Zeng, SIRT3 deficiency sensitizes angiotensin-II-induced renal fibrosis, *Cells* 9 (11) (2020).
- [12] S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht, R. Skouta, E.M. Zaitsev, C.E. Gleason, D.N. Patel, A.J. Bauer, A.M. Cantley, W.S. Yang, B. Morrison 3rd, B.R. Stockwell, Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death, *Cell* 149 (5) (2012) 1060–1072.
- [13] Y. Wang, Z. Wei, K. Pan, J. Li, Q. Chen, The function and mechanism of ferroptosis in cancer, *Apoptosis* 25 (11–12) (2020) 786–798.
- [14] E.M. Terzi, V.O. Sviderskiy, S.W. Alvarez, G.C. Whiten, R. Possemato, Iron-sulfur cluster deficiency can be sensed by IRP2 and regulates iron homeostasis and sensitivity to ferroptosis independent of IRP1 and FBXL5, *Sci. Adv.* 7 (22) (2021).
- [15] R.P. Abrams, W.L. Carroll, K.A. Woerpel, Five-membered ring peroxide selectively initiates Ferroptosis in Cancer cells, *ACS Chem. Biol.* 11 (5) (2016) 1305–1312.
- [16] M.M. Gaschler, A.A. Andia, H. Liu, J.M. Csuka, B. Hurllocker, C.A. Vaiana, D. W. Heindel, D.S. Zuckerman, P.H. Bos, E. Reznik, L.F. Ye, Y.Y. Tyurina, A.J. Lin, M. S. Shchepinov, A.Y. Chan, E. Peguero-Pereira, M.A. Fomich, J.D. Daniels, A. V. Bekish, V.V. Shmanai, V.E. Kagan, L.K. Mahal, K.A. Woerpel, B.R. Stockwell, FINO(2) initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation, *Nat. Chem. Biol.* 14 (5) (2018) 507–515.
- [17] X. Fang, H. Wang, D. Han, E. Xie, X. Yang, J. Wei, S. Gu, F. Gao, N. Zhu, X. Yin, Q. Cheng, P. Zhang, W. Dai, J. Chen, F. Yang, H.T. Yang, A. Linkermann, W. Gu, J. Min, F. Wang, Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (7) (2019) 2672–2680.
- [18] N. Li, W. Jiang, W. Wang, R. Xiong, X. Wu, Q. Geng, Ferroptosis and its emerging roles in cardiovascular diseases, *Pharmacol. Res.* 166 (2021) 105466.
- [19] C. Sun, F. Peng, J. Li, X. Cui, X. Qiao, W. Zhu, Ferroptosis-specific inhibitor Ferrostatin-1 relieves H(2)O(2)-induced redox imbalance in primary cardiomyocytes through the Nrf2/ARE pathway, *Dis. Markers* 2022 (2022) 4539932.
- [20] Z. Zhang, J. Tang, J. Song, M. Xie, Y. Liu, Z. Dong, X. Liu, X. Li, M. Zhang, Y. Chen, H. Shi, J. Zhong, Elabela alleviates ferroptosis, myocardial remodeling, fibrosis and heart dysfunction in hypertensive mice by modulating the IL-6/STAT3/GPX4 signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 181 (2022) 130–142.

- [21] S. Liu, F. Chen, J. Han, L. Wang, Y. Dong, Ferrostatin-1 improves neurological impairment induced by ischemia/reperfusion injury in the spinal cord through ERK1/2/SP1/GPX4, *Exp. Neurol.* 373 (2023) 114659.
- [22] S. Yu, Y. Mu, K. Wang, L. Wang, C. Wang, Z. Yang, Y. Liu, S. Li, M. Zhang, Gestational exposure to 1-NP induces ferroptosis in placental trophoblasts via CYP1B1/ERK signaling pathway leading to fetal growth restriction, *Chem. Biol. Interact.* 387 (2024) 110812.
- [23] R. Shah, K. Margison, D.A. Pratt, The potency of Diarylamine radical-trapping antioxidants as inhibitors of Ferroptosis underscores the role of autoxidation in the mechanism of cell death, *ACS Chem. Biol.* 12 (10) (2017) 2538–2545.
- [24] S. Kumfu, J. Sripetchwandee, C. Thonusin, N. Sumneang, C. Maneechote, B. Arunsak, T. Chunchai, T.T. Oo, A. Kongkaew, S.C. Chattipakorn, N. Chattipakorn, Ferroptosis inhibitor improves cardiac function more effectively than inhibitors of apoptosis and necroptosis through cardiac mitochondrial protection in rats with iron-overloaded cardiomyopathy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 479 (2023) 116727.
- [25] V. Campuzano, L. Montermini, Y. Lutz, L. Cova, C. Hindelang, S. Jiralerspong, Y. Trottier, S.J. Kish, B. Faucheux, P. Trouillas, F.J. Authier, A. Durr, J.L. Mandel, A. Vescovi, M. Pandolfo, M. Koenig, Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes, *Hum. Mol. Genet.* 6 (11) (1997) 1771–1780.
- [26] A.Y. Tsou, E.K. Paulsen, S.J. Lagedrost, S.L. Perlman, K.D. Mathews, G.R. Wilmot, B. Ravina, A.H. Koeppen, D.R. Lynch, Mortality in Friedreich ataxia, *J. Neurol. Sci.* 307 (1–2) (2011) 46–49.
- [27] A. Rotig, P. de Lonlay, D. Chretien, F. Foury, M. Koenig, D. Sidi, A. Munnich, P. Rustin, Aconitase and mitochondrial iron-Sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia, *Nat. Genet.* 17 (2) (1997) 215–217.
- [28] J. Du, Y. Zhou, Y. Li, J. Xia, Y. Chen, S. Chen, X. Wang, W. Sun, T. Wang, X. Ren, X. Wang, Y. An, K. Lu, W. Hu, S. Huang, J. Li, X. Tong, Y. Wang, Identification of Frataxin as a regulator of ferroptosis, *Redox Biol.* 32 (2020) 101483.
- [29] G.R. Wagner, P.M. Pride, C.M. Babbey, R.M. Payne, Friedreich's ataxia reveals a mechanism for coordinate regulation of oxidative metabolism via feedback inhibition of the SIRT3 deacetylase, *Hum. Mol. Genet.* 21 (12) (2012) 2688–2697.
- [30] X. He, H. Zeng, J.X. Chen, Ablation of SIRT3 causes coronary microvascular dysfunction and impairs cardiac recovery post myocardial ischemia, *Int. J. Cardiol.* 215 (2016) 349–357.
- [31] Y.K. Tao, H. Zeng, G.Q. Zhang, S.T. Chen, X.J. Xie, X. He, S. Wang, H. Wen, J. X. Chen, Notch3 deficiency impairs coronary microvascular maturation and reduces cardiac recovery after myocardial ischemia, *Int. J. Cardiol.* 236 (2017) 413–422.
- [32] H. Zeng, X. He, J.X. Chen, Endothelial Sirtuin 3 dictates glucose transport to cardiomyocyte and sensitizes pressure overload-induced heart failure, *J. Am. Heart Assoc.* 9 (11) (2020) e015895.
- [33] S. Gao, D. Ho, D.E. Vatner, S.F. Vatner, Echocardiography in mice, *Curr Protoc Mouse Biol* 1 (2011) 71–83.
- [34] X. He, H. Zeng, S.T. Chen, R.J. Roman, J.L. Aschner, S. Didion, J.X. Chen, Endothelial specific SIRT3 deletion impairs glycolysis and angiogenesis and causes diastolic dysfunction, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 112 (2017) 104–113.
- [35] X. He, H. Zeng, R.J. Roman, J.X. Chen, Inhibition of prolyl hydroxylases alters cell metabolism and reverses pre-existing diastolic dysfunction in mice, *Int. J. Cardiol.* 272 (2018) 281–287.
- [36] E. Barth, G. Stammer, B. Speiser, J. Schaper, Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24 (7) (1992) 669–681.
- [37] K.S. Edwards, S. Ashraf, T.M. Lomax, J.M. Wiseman, M.E. Hall, F.N. Gava, J. E. Hall, J.P. Hosler, R. Harmancey, Uncoupling protein 3 deficiency impairs myocardial fatty acid oxidation and contractile recovery following ischemia/reperfusion, *Basic Res. Cardiol.* 113 (6) (2018) 47.
- [38] K. Shirey, K.R. Stover, J. Cleary, N. Hoang, J. Hosler, Membrane-anchored cyclic peptides as effectors of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Biochemistry* 55 (14) (2016) 2100–2111.
- [39] N. Hoang, K. Brooks, K. Edwards, Sex-specific colonic mitochondrial dysfunction in the indomethacin-induced inflammatory bowel disease model in rats, *Front Physiol.* 15 (2024) 1341742.
- [40] L. Tretter, A. Ambrus, Measurement of ROS homeostasis in isolated mitochondria, *Methods Enzymol.* 547 (2014) 199–223.
- [41] S.J. Wang, D. Li, Y. Ou, L. Jiang, Y. Chen, Y. Zhao, W. Gu, Acetylation is crucial for p53-mediated Ferroptosis and tumor suppression, *Cell Rep.* 17 (2) (2016) 366–373.
- [42] H. Su, A.C. Cantrell, J.X. Chen, W. Gu, H. Zeng, SIRT3 deficiency enhances Ferroptosis and promotes cardiac fibrosis via p53 acetylation, *Cells* 12 (10) (2023).
- [43] S.S. Branda, Z.Y. Yang, A. Chew, G. Isaya, Mitochondrial intermediate peptidase and the yeast frataxin homolog together maintain mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Hum. Mol. Genet.* 8 (6) (1999) 1099–1110.
- [44] I.H. Castro, M.F. Pignataro, K.E. Sewell, L.D. Espeche, M.G. Herrera, M.E. Noguera, L. Dain, A.D. Nadra, M. Aran, C. Smal, M. Gallo, J. Santos, Frataxin structure and function, *Subcell. Biochem.* 93 (2019) 393–438.
- [45] J. Gao, C. Huang, L. Kong, W. Zhou, M. Sun, T. Wei, W. Shen, SIRT3 regulates clearance of apoptotic cardiomyocytes by Deacetylating Frataxin, *Circ. Res.* 133 (7) (2023) 631–647.
- [46] S. Toyokuni, Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes, *Redox Rep.* 7 (4) (2002) 189–197.
- [47] V. Stepanic, M. Kucerova-Chlupacova, Review and Chemoinformatic analysis of Ferroptosis modulators with a focus on natural plant products, *Molecules* 28 (2) (2023).
- [48] L.J. Kim, K.M. Tsuyuki, F. Hu, E.Y. Park, J. Zhang, J.G. Iraheta, J.C. Chia, R. Huang, A.E. Tucker, M. Clyne, C. Castellano, A. Kim, D.D. Chung, C.T. DaVeiga, E.M. Parsons, O.K. Vatamaniuk, J. Jeong, Ferroportin 3 is a dual-targeted mitochondrial/chloroplast iron exporter necessary for iron homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant J.* 107 (1) (2021) 215–236.
- [49] R. Lill, S.A. Freibert, Mechanisms of mitochondrial Iron-sulfur protein biogenesis, *Annu. Rev. Biochem.* 89 (2020) 471–499.
- [50] E. Tam, H.K. Sung, G. Sweeney, MitoNEET prevents iron overload-induced insulin resistance in H9c2 cells through regulation of mitochondrial iron, *J. Cell. Physiol.* 238 (8) (2023) 1867–1875.
- [51] A.L. Li, L. Lian, X.N. Chen, W.H. Cai, X.B. Fan, Y.J. Fan, T.T. Li, Y.Y. Xie, J. P. Zhang, The role of mitochondria in myocardial damage caused by energy metabolism disorders: from mechanisms to therapeutics, *Free Radic. Biol. Med.* 208 (2023) 236–251.
- [52] H. Honar, H. Liu, M.L. Zhang, T.K. Glenn, H. Ter Keurs, S.S. Lee, Impaired myosin isoform shift and calcium transients contribute to cellular pathogenesis of rat cirrhotic cardiomyopathy, *Liver Int.* 40 (11) (2020) 2808–2819.
- [53] G. Li, Z. Jian, H. Wang, L. Xu, T. Zhang, J. Song, Irisin promotes osteogenesis by modulating oxidative stress and Mitophagy through SIRT3 signaling under diabetic conditions, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2022 (2022) 3319056.