



UNIVERSITAT DE LLEIDA

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE UNA
FAMILIA DE GLUTAREDOXINAS MONOTIÓLICAS EN
LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae***

María Teresa Rodríguez-Manzaneque Martínez

Julio 2002

Memoria presentada por María Teresa Rodríguez-Manzaneque Martínez para optar al grado de Doctora en Biología. Ha sido dirigida por el Doctor Enrique Herrero Perpiñán y realizada en el Grupo de Biología Molecular de Microorganismos, en el Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida.

Lleida, julio de 2002

RESUM

Les glutaredoxines són enzims que intervenen en reaccions redox i que la seva funció principal consisteix en protegir les cèl·lules contra estrès oxidatiu mitjançant el manteniment de l'estat redox adequat dels grups sulfidril de les proteïnes cel·lulars. Treballs anteriors han descrit l'existència de dues glutaredoxines en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, Grx1 i Grx2, que contenen dues cisteïnes en el seu centre actiu les quals són essencials per a mantenir la seva funció. Aquestes dues glutaredoxines juguen diferents papers en la cèl·lula en la protecció contra estrès oxidatiu.

Aquest treball consisteix en l'estudi i caracterització d'una nova família de glutaredoxines en *S. cerevisiae*, formada per Grx3, Grx4 i Grx5, que es diferencia de la ja descrita perquè les proteïnes tenen una única cisteïna en el seu centre actiu. S'ha realitzat un anàlisi comparatiu de les seqüències de les dues famílies de glutaredoxines de llevat amb les existents en altres organismes, i s'ha vist que l'estructura bàsica de les mateixes està conservada des de bacteris a humans. L'anàlisi funcional dels mutants d'aquesta nova família ha revelat que, de les tres glutaredoxines monotioliques, Grx5 és la que desenvolupa una funció més important en la protecció contra estrès oxidatiu, clarament diferenciada de Grx3 i Grx4. Grx5 s'ha vist localitzada en la mitocondria, essent aquesta localització indispensable per al normal funcionament de l'enzim. Grx3 i Grx4, en canvi, es troben al nucli. D'acord amb la sublocalització cel·lular, es mostren diferents evidències de què Grx5 es troba directament implicada en la biosíntesi dels centres Fe/S, que en llevats té lloc a la mitocondria. Els mutants mancats de Grx5 són defectuosos en l'activitat d'enzims amb centres Fe/S i acumulen en excés de ferro, tant al citosol com a la mitocondria. Estudis mitjançant la tècnica del doble-híbrid han demostrat una interacció física entre Grx5 i Isa1, una altra proteïna de la matriu mitocondrial que intervé en la síntesi dels centres Fe/S. Les dades existents indiquen que les glutaredoxines monotioliques poden portar a terme funcions especialitzades cada una d'elles en diferents compartiments del llevat, sense excloure la possible redundància funcional entre Grx3 i Grx4.

RESUMEN

Las glutaredoxinas son enzimas que intervienen en reacciones redox y cuya función principal consiste en proteger las células contra estrés oxidativo a través del mantenimiento del estado redox adecuado de los grupos sulfidrilo de las proteínas celulares. Trabajos anteriores han descrito la existencia de dos glutaredoxinas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Grx1 y Grx2, que contienen dos cisteínas en su centro activo las cuales son esenciales para mantener su función. Estas dos glutaredoxinas juegan diferentes papeles en la célula en la protección contra estrés oxidativo.

El presente trabajo consiste en el estudio y caracterización de una nueva familia de glutaredoxinas en *S. cerevisiae*, formada por Grx3, Grx4 y Grx5, que se diferencia de la ya descrita porque las proteínas poseen una única cisteína en su centro activo. Se ha realizado un análisis comparativo de las secuencias de las dos familias de glutaredoxinas de levadura con las existentes en otros organismos, observándose que la estructura básica de las mismas está conservada desde bacterias a humanos. El análisis funcional de los mutantes de esta nueva familia ha revelado que, de las tres glutaredoxinas monotiólicas, Grx5 es la que desarrolla una función más importante en la protección contra estrés oxidativo, claramente diferenciada de Grx3 y Grx4. Grx5 se ha visto localizada en la mitocondria, siendo esta localización indispensable para el normal funcionamiento de la enzima. Grx3 y Grx4, en cambio, se encuentran en el núcleo. En concordancia con la sublocalización celular, se muestran varias evidencias de que Grx5 se halla directamente implicada en la biosíntesis de los centros Fe/S, que en levaduras tiene lugar en la mitocondria. Los mutantes carentes de Grx5 son defectivos en la actividad de enzimas con centros Fe/S y acumulan un exceso de hierro, tanto en el citosol como en la mitocondria. Estudios mediante la técnica del doble-híbrido han demostrado una interacción física entre Grx5 e Isa1, otra proteína de la matriz mitocondrial que interviene en la síntesis de centros Fe/S. Los datos existentes apuntan a que las glutaredoxinas monotiólicas pueden desempeñar funciones especializadas cada una de ellas en compartimentos diversos de la levadura, sin excluir la posible redundancia funcional entre Grx3 y Grx4.

SUMMARY

Glutaredoxins are enzymes involved in redox reactions, whose main function consists of protecting cells against oxidative stress through maintaining a normal redox status of sulfhydryl groups in cellular proteins. Previous work has described two glutaredoxins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Grx1 and Grx2, that contain two cysteines residues in their active site, which are essential for their enzymatic function. These two glutaredoxins play different roles in protecting cells against oxidative stress.

The present work consists of the study and characterisation of a new family of glutaredoxins in *S. cerevisiae*, composed by Grx3, Grx4 and Grx5. These have a single cysteine in the active site of the protein, in contrast to the previous glutaredoxins. A comparative analysis of the sequences of the two families of the yeast glutaredoxins and the glutaredoxins of other organisms has been carried out, and the basic structure of these enzymes is indeed conserved from bacteria to humans. The functional analysis of mutants of this new family reveals that Grx5 is the most important monothiolic glutaredoxin in protecting cells against oxidative stress, and that its function is different from that of Grx3 and Grx4. Grx5 is located in mitochondria and this localisation is needed for the normal function of the enzyme. In contrast, Grx3 and Grx4 are located at the nucleus. According to the subcellular location, several evidences are shown demonstrating that Grx5 is directly involved in the biosynthesis of Fe/S clusters, which takes place at the mitochondrial matrix in yeast. The *grx5* mutants are defective in the activity of Fe/S enzymes and accumulate iron both in mitochondria and cytosol. Two-hybrid assays show that there is a physical interaction between Grx5 and Isa1, another matrix mitochondrial protein that participates in the synthesis of Fe/S clusters. All these data suggest that monothiolic glutaredoxins play specialised functions in different compartments of yeast, which does not exclude the possibility that Grx3 and Grx4 could be functionally redundant.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Estrés oxidativo	I-1
1.1. Generalidades	I-1
1.2. Agentes que producen estrés oxidativo	I-1
1.3. Efectos de las ROS sobre las células	I-3
2. Homeostasis de iones metálicos	I-4
2.1. Transporte de hierro	I-5
2.1.1. Transporte de hierro de baja afinidad	I-5
2.1.2. Transporte de hierro de alta afinidad	I-5
2.1.3. Regulación del transporte de hierro	I-7
2.1.4. Transporte de hierro intracelular	I-8
2.2. Transporte de cobre	I-8
2.2.1. Mecanismo de entrada de cobre en la célula	I-8
2.2.2. Transporte de cobre intracelular	I-10
3. Mecanismos de defensa contra estrés oxidativo	I-11
3.1. Defensa contra estrés oxidativo en <i>E. coli</i>	I-12
3.1.1. Defensa contra en anión superóxido	I-12
3.1.2. Defensa contra peróxido de hidrógeno	I-13
3.2. Defensa contra estrés oxidativo en <i>S. cerevisiae</i>	I-14
3.2.1. Sistemas de defensa no enzimáticos	I-15
3.2.1.1. Glutati6n	I-15
3.2.1.2. Metalotioneínas	I-17
3.2.1.3. Homeostasis de iones metálicos	I-17
3.2.2. Sistemas de defensa enzimáticos	I-18
3.2.2.1. Tioredoxinas y glutaredoxinas	I-18
3.2.2.2. Catalasa	I-18
3.2.2.3. Superóxido dismutasa	I-19
3.2.2.4. Enzimas de la vía de las pentosas fosfato	I-20
3.2.2.5. Endonucleasa Apn1	I-20
3.2.3. Respuestas adaptativas inducidas en respuesta a estrés oxidativo	I-21
3.2.4. Regulación de la expresi6n génica por oxidantes	I-21
3.2.4.1. Factores de transcripci6n b-ZIP	I-21
3.2.4.2. Factores de transcripci6n que se unen a cobre	I-23
3.2.4.3. Factores de transcripci6n con dedo de zinc	I-23
4. Glutaredoxinas y tioredoxinas	I-24
4.1. Generalidades	I-24
4.2. Tioredoxinas	I-25
4.2.1. Tioredoxinas en <i>E. coli</i>	I-25
4.2.2. Tioredoxinas en <i>S. cerevisiae</i>	I-26
4.3. Glutaredoxinas en <i>E. coli</i>	I-26
4.4. Glutaredoxinas en <i>S. cerevisiae</i>	I-28
4.4.1. Glutaredoxinas diti6licas y monoti6licas	I-28

4.4.2. Relación tioredoxinas-glutaredoxinas	I-30
4.5. Otras oxidoreductasas microbianas	I-31
4.6. Glutaredoxinas y tioredoxinas en células animales	I-33
5. Biosíntesis de centros Fe/S	I-34
5.1. Generalidades	I-34
5.2. Biosíntesis de centros Fe/S en bacterias	I-35
5.3. Biosíntesis de centros Fe/S en <i>S. cerevisiae</i>	I-36
5.3.1. La proteína Nfs1	I-37
5.3.2. Las proteínas Isu1 e Isu2	I-39
5.3.3. La proteína Nfu1	I-39
5.3.4. La ferredoxina Yah1 y su reductasa Arh1	I-39
5.3.5. Las proteínas Isa1 e Isa2	I-40
5.3.6. Las chaperonas Ssq1 y Jac1	I-41
5.3.7. El transportador ABC, Atm1	I-43
5.3.8. Las proteínas Bat	I-45
5.3.9. Homeostasis del hierro	I-45
5.4. Biosíntesis de centros Fe/S en humanos	I-47
6. Objetivos	I-47

ARTÍCULOS PRESENTADOS:

1. Rodríguez-Manzaneque MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:8180-90.

2. Rodríguez-Manzaneque MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, Herrero E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell.* **13**:1109-21.

3. Rodríguez-Manzaneque MT, Swaminathan S, Herrero E, Sunnerhagen P. The monothiolic glutaredoxin Grx5 of *S. cerevisiae* interacts with Isa1 and its cellular localisation is different to Grx3 and Grx4. (Enviado a *Yeast*).

4. Rodríguez-Navarro S, Llorente B, Rodríguez-Manzaneque MT, Ramne A, Uber G, Marchesan D, Dujon B, Herrero E, Sunnerhagen P, Pérez-Ortín JE. Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6. (Enviado a *Yeast*).

DISCUSIÓN: D-1

CONCLUSIONES: C-1

BIBLIOGRAFÍA: B-1

1. ESTRÉS OXIDATIVO

1.1. GENERALIDADES

La supervivencia de las células depende de su capacidad para notar alteraciones en el medio y responder a ellas. Cambios físicos o químicos del medio pueden acarrear efectos negativos en la célula, y la supervivencia de ésta exige una respuesta rápida a dichos cambios. Estas alteraciones del medio o **estrés** pueden ser más importantes en microorganismos debido a que el medio externo de éstos es altamente variable y condiciones como la temperatura, osmolaridad o nutrientes no son siempre constantes.

El **estrés oxidativo** se produce por la exposición de un organismo a oxígeno o a otras moléculas altamente oxidantes, en ocasiones generadas por el propio metabolismo. *Saccharomyces cerevisiae* ha desarrollado diferentes tipos de respuesta a estrés oxidativo y su estudio es de vital importancia para entender los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo en eucariotas superiores. Existen evidencias de la conservación funcional y estructural de componentes implicados en la respuesta frente a diferentes tipos de estrés a lo largo de la evolución. Esto es importante si se tiene en cuenta que algunos de los daños producidos por estrés oxidativo están relacionados con enfermedades neurodegenerativas, procesos de envejecimiento o cáncer, entre otras patologías (Aruoma y Halliwell, 1998).

1.2. AGENTES QUE PRODUCEN ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo puede ser consecuencia de la propia respiración aeróbica de la célula (Halliwell y Gutteridge, 1984). El oxígeno es una molécula altamente reactiva que puede ser reducida parcialmente para generar **especies reactivas de oxígeno (ROS)**. Éstas, por tanto, son producidas por:

- a) Procesos metabólicos normales, como la respiración aeróbica o la β -oxidación de los ácidos grasos.
- b) El sistema inmune, para la destrucción de potenciales competidores o patógenos.

c) Substancias químicas externas.

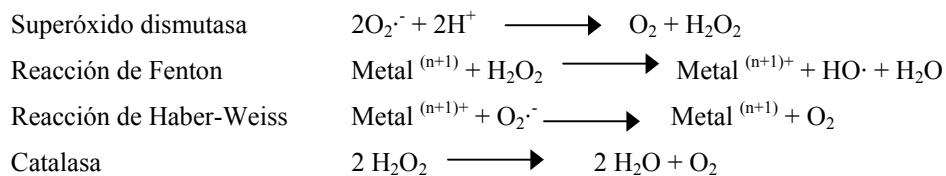
La toxicidad de las ROS es debida a su capacidad de dañar diferentes componentes celulares. Por ejemplo, las ROS producen roturas en la doble hélice o modificaciones químicas en las bases nitrogenadas del DNA (Storz *et al.*, 1987). También afectan a lípidos, formando peróxidos lipídicos, y a proteínas, donde las cadenas laterales de los aminoácidos son oxidadas perdiendo la molécula proteica su función (Wolf *et al.*, 1986).

Las ROS más comunes son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($HO\cdot$), el oxígeno singlete ($O\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El **anión superóxido** ($O_2^{\cdot-}$) es generado por diferentes vías (Imlay y Fridovich, 1991):

- a) Como consecuencia de la respiración mitocondrial, por la oxidación de los miembros de la cadena respiratoria.
- b) Por autooxidación vía interacción con diferentes agentes reductores celulares, como el glutatión, el NADH y otros.
- c) Por la acción de agentes químicos externos, como paracuat y menadiona, que pueden atravesar la membrana fácilmente.

El anión superóxido no es por sí solo un radical muy reactivo, pero da lugar a otras ROS que sí son altamente reactivas y tóxicas. Por ello, es importante que la célula posea mecanismos para eliminarlo. La destrucción del anión superóxido tiene lugar a través de las reacciones siguientes, en las que intervienen las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, de las que se hablará más adelante:



El **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) es generado por la destrucción del anión superóxido a través de la superóxido dismutasa (esquema anterior) y por mecanismos de reacción de algunas oxidasas (Halliwell y Gutteridge, 1984). La enzima catalasa destruye H_2O_2 para generar agua. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre porque no posee ningún electrón desapareado, pero puede atravesar fácilmente la membrana y dar lugar al **radical hidroxilo** ($HO\cdot$) por los siguientes mecanismos (Halliwell y Gutteridge, 1984):

- ▶ Por descomposición espontánea de H_2O_2 a $\text{HO}\cdot$.
- ▶ Por la reacción de Fenton, en la cual, gracias a la presencia de un metal, se genera $\text{HO}\cdot$ a partir de H_2O_2 (esquema anterior). Algunos de los metales que pueden participar en esta reacción son hierro o cobre, entre otros.
- ▶ Por la reacción de Haber-Weiss, que tiene lugar entre las formas oxidadas de Fe^{3+} o Cu^{2+} y el anión superóxido, generando la forma reducida de los metales; éstos, vía Fenton, generan el radical $\text{HO}\cdot$.

1.3. EFECTOS DE LAS ROS SOBRE LA CÉLULA

Las ROS, como se ha comentado antes, afectan la célula a diferentes niveles, siendo el radical hidroxilo el agente que produce mayor daño celular. Las **proteínas** son dañadas mediante una oxidación de los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína (Storz *et al.*, 1987; Wolf *et al.*, 1986). Algunos aminoácidos son oxidados a derivados carbonilados, quedando así marcados para su eliminación y renovación. Durante el envejecimiento de la célula aumenta el nivel de los derivados carbonilados, lo que relaciona el envejecimiento celular con la oxidación proteica (Stadtman, 1992). Las enzimas que contienen centros Fe/S en su estructura son oxidadas por el anión superóxido, lo que provoca la desintegración de los centros y, por tanto, una pérdida de la funcionalidad de la enzima (Flint *et al.*, 1993). Otra consecuencia de la destrucción de los centros Fe/S es que el hierro procedente de los mismos se acumula en la célula, donde cataliza la oxidación del DNA junto con el peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton (Keyer y Imlay, 1996).

Sobre **lípidos**, el estrés oxidativo causa la peroxidación de los mismos, lo que produce una pérdida de la integridad de la membrana celular (Coyle y Puttfarcken, 1993). La sensibilidad de los lípidos a peroxidación depende del grado de insaturación de la cadena (Porter *et al.*, 1995). La pérdida de permeabilidad de la membrana es debida, por un lado, a la formación de una unión covalente entre los radicales acil, lo que produce un aumento de la rigidez de la membrana. También puede ser debida a la incorporación de cadenas cortas o productos de oxidación que disminuyen el orden de la membrana (Dix y Aikens, 1993; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996). Iones metálicos como

el cobre pueden inducir la peroxidación de lípidos promoviendo estrés oxidativo sobre las membranas (Howlett y Avery, 1997).

Sobre el **DNA**, las ROS, especialmente el radical HO·, producen roturas en la doble cadena, así como pérdida de las bases nitrogenadas (Storz *et al.*, 1987). También se ha visto que el empaquetamiento del cromosoma en eucariotas protege el DNA contra estrés oxidativo (Ljungman y Hanawalt, 1992).

2. HOMEOSTASIS DE IONES METÁLICOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LEVADURA

Como se ha dicho anteriormente, la generación de ROS, en algunos casos, está catalizada por iones metálicos, de los cuales los principales en el proceso son el cobre y el hierro. Estos metales son nutrientes esenciales y juegan papeles importantes en diferentes procesos biológicos, como ser cofactores de enzimas o actuar como donadores o aceptores de electrones, según su estado iónico, en gran variedad de reacciones bioquímicas. Sin embargo, una acumulación excesiva de los mismos puede tener efectos tóxicos, ya que generan ROS por las reacciones antes descritas. Esto significa que la célula ha de desarrollar mecanismos que acumulen niveles suficientes de estos metales para permitir las reacciones bioquímicas normales, pero sin que ello favorezca la producción de ROS.

Los sistemas celulares de transporte de hierro y cobre son de dos tipos:

1. **Sistemas de alta afinidad**, cuando el ion metálico se encuentra en bajas concentraciones. Están altamente regulados.
2. **Sistemas de baja afinidad**, cuando el ion es abundante. Suelen ser constitutivos.

Además de estos sistemas de captación de metales, la célula también requiere un sistema intracelular de transporte, ya que los iones metálicos se encuentran compartimentalizados en diferentes orgánulos subcelulares (Golgi, mitocondrias, etc.).

2.1. TRANSPORTE DE HIERRO

Aunque el hierro es abundante en la naturaleza, se encuentra normalmente en forma insoluble como $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Así, para captar hierro se necesitan sistemas que solubilicen el ion férrico. Algunos organismos poseen sideróforos, que son moléculas de bajo peso molecular quelantes de hierro secretadas por bacterias, algunos hongos y plantas. En *S. cerevisiae*, el Fe^{3+} extracelular es reducido a la forma soluble Fe^{2+} por reductasas que se encuentran en la membrana plasmática. El Fe^{2+} generado es el sustrato de un sistema de baja afinidad y otro de alta afinidad (Dix *et al.*, 1994).

2.1.1. Transporte de hierro de baja afinidad

En *S. cerevisiae*, este sistema es el responsable del transporte de Fe^{2+} cuando éste se encuentra en altas concentraciones. Dicho sistema es específico para Fe^{2+} , no para Fe^{3+} , aunque es capaz de transportar otros iones metálicos (Dix *et al.*, 1994), ya que la entrada de Fe^{2+} es inhibida a altas concentraciones de Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} . En consonancia con ello, la sobreexpresión del transportador de baja afinidad provoca que las células sean más sensibles a estos metales.

El transportador del sistema de baja afinidad en *S. cerevisiae* está codificado por *FET4*. Fet4 es una proteína integral de membrana con seis dominios transmembranales y su sobreexpresión aumenta la captación por el sistema de baja afinidad, mientras que la delección del gen elimina completamente esta actividad (Dix *et al.*, 1997).

2.1.2. Transporte de hierro de alta afinidad

La actividad reductasa de Fe^{3+} en *S. cerevisiae* depende de dos genes, *FRE1* y *FRE2*, que presentan un 24.5 % de identidad y codifican para proteínas de membrana. Los niveles de mRNA de los dos genes aumentan en condiciones de escasez de hierro y son reprimidos cuando hay exceso del mismo (Georgatsou y Alexandraki, 1994). La delección de los dos genes da lugar a un mutante incapaz de crecer en un medio limitante de hierro, por lo que la actividad reductasa es importante en el sistema de alta afinidad de captación del metal (Georgatsou y Alexandraki, 1994). Esta actividad reductasa

también juega un papel importante en el sistema de alta afinidad de captación de cobre, tema que se tratará en el apartado 2.2. El análisis del genoma de *S. cerevisiae* ha detectado la presencia de cinco genes más, estructuralmente relacionados con los anteriores, *FRE3-FRE7* (Eide, 1998). Fre3 y Fre4 son reductasas que actuarían como potenciales sideróforos de hierro (Urbanowski y Piper, 1999). Fre5, Fre6 y Fre7 tienen una función desconocida (Martins *et al.*, 1998).

UTR1 codifica para una subunidad citoplasmática requerida para la actividad reductasa (Anderson *et al.*, 1994). Un mutante nulo *utr1* sólo muestra un 5 % de la actividad reductasa presente en una célula normal. La sobreexpresión por separado de *UTR1* y *FRE1* no produce un aumento de la actividad reductasa, pero la sobreexpresión de las dos a la vez produce un aumento de cinco veces en la actividad (Lesuisse *et al.*, 1996).

El transporte de alta afinidad en *S. cerevisiae* es inducido cuando el hierro es limitante, siendo exclusivo para el transporte de Fe^{2+} , a diferencia del sistema de baja afinidad. Un componente importante de dicho transporte es *FET3*. Este gen no es requerido para el sistema de baja afinidad, lo que indica que las dos vías de captación están separadas. *FET3* codifica para una glicoproteína integral de la membrana plasmática de 72 kDa, cuyo dominio oxidasa catalítico está localizado en la superficie celular (De Silva *et al.*, 1995). La actividad transportadora de *FET3* requiere cobre, ya que se ha visto que células deficientes en cobre presentan bajos niveles de la actividad del sistema de alta afinidad (Dancis *et al.*, 1994b). La proteína Fet3 oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} en una reacción dependiente de cobre. Fet3 contiene un solo dominio transmembrana y se cree que podría formar parte de un complejo proteico heteromérico. Una segunda subunidad de este complejo podría ser el producto de *FTR1*, consistente en una permeasa de 404 aminoácidos con seis dominios transmembrana (Stearman *et al.*, 1996).

Así, en el sistema de alta afinidad, el Fe^{2+} producido por las reductasas Fre1 y Fre2, es oxidado a Fe^{3+} por la oxidasa Fet3 de manera dependiente de cobre. Fe^{3+} es transferido a la permeasa Ftr1 que, gracias a un cambio conformacional, libera Fe^{3+} al citoplasma. En mamíferos también existe una proteína que oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} , la ceruloplasmina, y ésta, al igual que Fet3, está relacionada con el transporte de hierro (Osaki *et al.*, 1966; Eide, 1998). La **Figura 1** muestra un esquema del transporte de hierro y cobre en levadura.

Se ha descrito un segundo complejo oxidasa/permeasa en *S. cerevisiae* que podría estar relacionado con el transporte de hierro. La expresión de dos genes homólogos de *FET3* y *FTR1*, *FET5* y *FTH1* respectivamente, está regulada por hierro, aumentando sus niveles de mRNA en células limitadas del mismo (Spizzo *et al.*, 1997). Fet5 es una oxidasa integral de membrana que cuando se sobreexpresa puede suprimir el defecto en la captación de hierro del mutante *fet3*. Fth1 junto con Fet5 forman un complejo transportador localizado en la vacuola (Urbanowski y Piper, 1999).

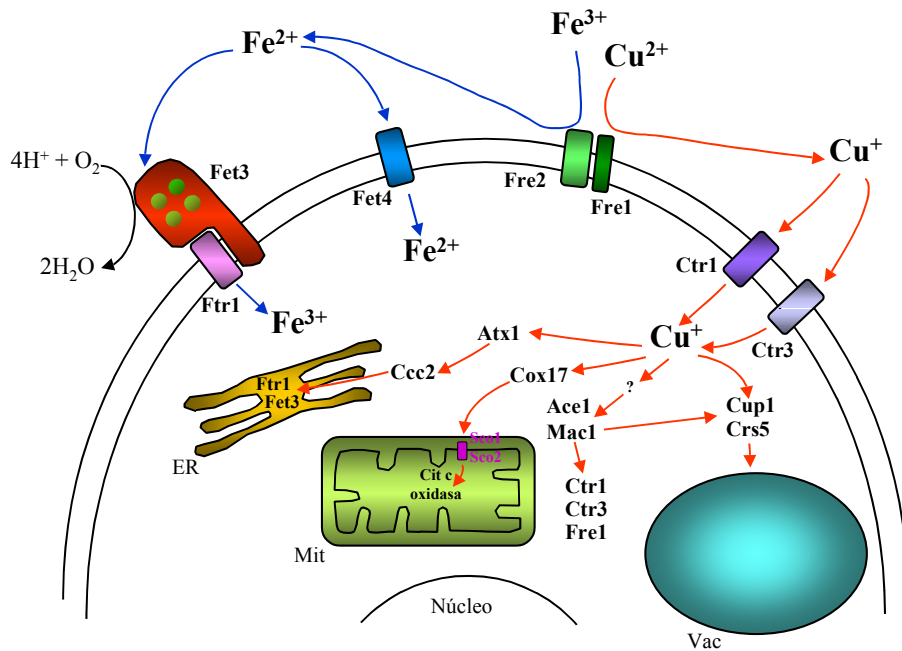


Figura 1. Transporte de hierro (flechas en azul) y de cobre (en rojo) en *S. cerevisiae*. Véase el texto para más detalle sobre la función de cada uno de los genes implicados. ER: retículo endoplasmático. Mit: mitocondria. Vac: vacuola.

2.1.3. Regulación del transporte de hierro

En el sistema de transporte de alta afinidad en *S. cerevisiae*, el primer nivel de control es transcripcional. El crecimiento en un medio limitante en hierro produce un aumento de la expresión de los genes *FRE1* y *FRE2* y de *FET3*, *FTR1*, *FET5* y *FTH1* (Casas *et al.*, 1997; Spizzo *et al.*, 1997; Georgatsou y Alexandraki, 1994). El hierro también controla la transcripción de genes transportadores de cobre, *CCC2* y *ATX1* (ver apartado 2.2), lo que es importante para proporcionar cobre a Fet3. Todos estos genes están regulados por el factor transcripcional Aft1 (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Recientemente se ha descrito un segundo activador transcripcional en *S. cerevisiae* regulado por hierro y homólogo a Aft1, Aft2 (Blaiseau *et al.*, 2001). Aft2 es requerido

en la homeostasis del hierro y resistencia a estrés oxidativo cuando Aft1 está ausente. Análisis fenotípicos y moleculares sugieren que Aft1 y Aft2 tendrían funciones solapantes (Blaiseau *et al.*, 2001).

El sistema de transporte de baja afinidad también está regulado, pero de manera independiente de *AFT1*. El nivel de Fet4 aumenta en células con niveles limitantes de hierro; en cambio, el mRNA no varía, lo que indica que la regulación viene dada por un mecanismo posttranscripcional que es desconocido (Casas *et al.*, 1997; Dix *et al.*, 1997).

2.1.4. Transporte de hierro intracelular

Muchos organismos eucariotas almacenan hierro intracelular acompañado en forma de ferritina; sin embargo, *S. cerevisiae* almacena hierro en la vacuola, aunque los genes implicados en el transporte se desconocen (Raguzzi *et al.*, 1988).

Otro destino importante del hierro es la mitocondria, donde es utilizado para la síntesis de proteínas hemo y no hemo. Un gen que podría estar implicado en la homeostasis del hierro en la mitocondria es *YFHI*, el homólogo en levaduras de la frataxina humana FRDA (Babcock *et al.*, 1997). Mutaciones en FRDA son responsables de la ataxia de Friedreich, una enfermedad neurodegenerativa que afecta a una de cada 50000 personas (Durr *et al.*, 1996). Tanto la proteína humana como la de levadura se encuentran localizadas en la mitocondria. Una célula delecionada para *YFHI* presenta una acumulación de hasta diez veces más hierro en la mitocondria respecto de una cepa salvaje y una pérdida del DNA mitocondrial debido seguramente a su oxidación catalizada por hierro (Babcock *et al.*, 1997; Foury y Cazzalini, 1997). Sin embargo, el papel de *YFHI* como regulador directo del transporte de hierro mitocondrial es cuestionado en otros trabajos que atribuyen a Yfh1 una función reguladora de la fosforilación oxidativa (Ristow, *et al.*, 2000). Además, Yfh1 también podría participar en la biosíntesis de centros Fe/S que tiene lugar en la mitocondria y que se explicará en apartados posteriores.

2.2. TRANSPORTE DE COBRE

2.2.1. Mecanismo de entrada de cobre en la célula

En *S. cerevisiae*, el cobre es un cofactor de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc citosólica (Sod1), de la citocromo c oxidasa y de las oxidasas de hierro Fet3 y Fet5. Al igual que en el caso del hierro, el sistema de alta afinidad de captación de cobre requiere la participación de reductasas de la membrana plasmática para reducir el Cu^{2+} a Cu^+ . Estas reductasas son las mismas que intervienen en el transporte de hierro, Fre1 y Fre2 (Georgatsou *et al.*, 1997; Hassett y Kosman, 1995). Una vez reducido a Cu^+ , el ion es tomado por la proteína transportadora de cobre de alta afinidad, Ctr1 (Cu transporter 1). *CTR1* fue identificado por ser los mutantes *ctr1* defectuosos para la captación de hierro por el sistema de alta afinidad (debido al requerimiento de cobre de la oxidasa Fet3), aunque también lo son para la captación de cobre (Dancis *et al.*, 1994a). Un mutante *ctr1* es muy sensible a estrés oxidativo causado por drogas como la menadiona y presenta una actividad muy baja de la superóxido dismutasa Sod1 (Dancis *et al.*, 1994a). En la **Figura 1** está esquematizado el mecanismo del transporte de cobre en levadura.

Ctr1 es una proteína integral de la membrana plasmática de 406 aminoácidos, con tres dominios transmembrana. Puede formar complejos multiméricos consigo misma y no se conocen proteínas que puedan interaccionar con ella *in vivo*. En su extremo amino-terminal, Ctr1 presenta repeticiones de un posible dominio de unión a cobre, Met-X-X-Met, el cual es parecido a dominios encontrados en proteínas que intervienen en la homeostasis del cobre en procariotas (Dancis *et al.*, 1994a).

Además de *CTR1*, algunas cepas de levadura contienen un segundo gen que interviene en el sistema de alta afinidad. *CTR3* (Copper transporter 3) codifica para una proteína de 241 aminoácidos con tres dominios transmembrana, que presenta similitud de secuencia con Ctr1 (Knight *et al.*, 1996). Ctr3, al igual que Ctr1, estaría localizada en la membrana plasmática.

Por último, Ctr2 fue identificada en *S. cerevisiae* por presentar similitud de secuencia con el transportador de Cu COPT1 de *Arabidopsis thaliana* (Kampfenket *et al.*, 1995). Células defectuosas en *CTR2* no presentan alteraciones en el requerimiento de cobre, pero son más resistentes a sus efectos tóxicos. Por el contrario, células que sobreexpresan *CTR2* son más sensibles a cobre, por lo que este gen podría jugar un papel importante en la acumulación de cobre o en su compartimentalización intracelular (Eide, 1998).

La expresión de los genes de los transportadores Ctr1 y Ctr3 está regulada por cobre (Dancis *et al.*, 1994a). La expresión de la reductasa Fre1 también está regulada por cobre independientemente de su regulación por hierro y por Aft1. La expresión de Fre2, en cambio, no está regulada por cobre (Georgatsou *et al.*, 1997; Hassett y Kosman, 1995). La regulación de *CTR1*, *CTR3* y *FRE1* por cobre es transcripcional y mediada por el factor de transcripción Mac1 (Hassett y Kosman, 1995; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1997). A otro nivel de regulación, Ctr1 es degradada por mecanismos desconocidos en células tratadas con cobre, lo que supone una protección contra la toxicidad producida por este metal (Ooi *et al.*, 1996).

2.2.2. Transporte de cobre intracelular

Una vez el cobre está dentro de la célula se une rápidamente a ligandos como Sod1. Si los niveles de cobre son altos, también se une a las metalotioneínas que en *S. cerevisiae* están codificadas por *CUP1* y *CRS5* y cuya expresión es activada por el regulador transcripcional *ACE1* (Butt *et al.*, 1984; Culotta *et al.*, 1994). El cobre también es transportado a compartimentos celulares como la mitocondria, para el ensamblaje a proteínas como Fet3 o la citocromo c oxidasa.

CCC2 es un gen que codifica para una ATPasa tipo-P que proporciona cobre a Fet3 en el retículo endoplasmático. Ccc2 muestra gran similitud con los transportadores de cobre que presentan alteraciones en las enfermedades humanas de Menkes (MNK) y Wilson (WD) (Yuan *et al.*, 1995). MNK y WD son transportadores intracelulares que pasan cobre del citoplasma al sistema secretor. En el hígado, la proteína WD es la que media el transporte de cobre, mientras que MNK lo hace en otros tejidos. Ccc2 presenta dos motivos de unión a metales (MTCXXC) en su extremo amino-terminal. Esta misma secuencia se encuentra repetida seis veces en MNK y WD. No se sabe qué papel puede tener, pero podría ser el sitio de unión del cobre citoplasmático para su transporte (Pufahl *et al.*, 1997).

Dada la elevada toxicidad del cobre, éste no puede encontrarse en forma libre dentro de la célula, por lo que es transportado por proteínas citoplasmáticas solubles, llamadas chaperonas de cobre, hasta las proteínas destino. El gen *ATX1* de levadura codifica para una proteína de 73 aminoácidos, que contiene el motivo de unión a metales anteriormente descrito MTCXXC (Lin y Culotta, 1995). Un mutante nulo *atx1* no crece en un medio limitado de hierro y este defecto es suprimido tratando las células

con cobre, lo que sugiere que la entrega de cobre a Fet3 es defectuosa en estos mutantes (Lin *et al.*, 1997). Así, el papel específico de Atx1 sería entregar cobre a Fet3. *ATX1* está regulado por el factor de transcripción Aft1 (Lin y Culotta, 1995). Se ha visto que Atx1 interacciona con Ccc2, con lo que a través de esta proteína llegaría el cobre a Fet3 (**Figura 1**).

Cox17 es otra chaperona de cobre que proporciona este metal a la mitocondria con destino a la citocromo c oxidasa (Glerum *et al.*, 1996). Cox17 es una proteína rica en cisteína, soluble y citoplasmática. Como en el caso de Atx1, Cox17 une cobre *in vitro*. Un transportador mitocondrial recibiría el cobre proporcionado por Cox17 y lo cedería a la citocromo c oxidasa. Dicho transportador no se ha identificado, aunque podría tratarse de Sco1 y/o Sco2, que codifican para proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna (Glerum *et al.*, 1996).

Una tercera chaperona de cobre en *S. cerevisiae* es Lys7, necesaria para proporcionar cobre a la superóxido dismutasa Sod1 (Culotta *et al.*, 1997). Lys7 contiene el motivo de unión a cobre MTCXXC. Una cepa nula *lys7* posee niveles normales de la proteína Sod1, pero falla en la incorporación de cobre a la enzima. Este defecto es específico para Sod1, por lo que Lys7 proporcionaría cobre sólo a esta superóxido dismutasa.

El exceso de cobre es acumulado en la vacuola de la levadura, lo que sugiere la existencia de otras chaperonas, quizás las metalotioneínas Cup1 y Crs5, que intervendrían en este transporte (Eide *et al.*, 1996).

El transporte intracelular de cobre mediado por chaperonas también parece existir en células humanas. Se han identificado homólogos humanos de *ATX1*, *COX17* y *LYS7* (HAH1, hCOX17 y CCS, respectivamente) (Klomp *et al.*, 1997). La expresión de estas proteínas en el correspondiente mutante de *S. cerevisiae* restablece el transporte de cobre y suprime los defectos de los mutantes, lo que demuestra la conservación funcional interespecífica.

3. MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA ESTRÉS OXIDATIVO

Para protegerse contra el daño causado por estrés oxidativo las células poseen enzimas antioxidantes, así como moléculas antioxidantes de bajo peso molecular y actividades reparadoras del daño. Algunas de dichas actividades se expresan a bajos niveles durante el crecimiento normal de la célula, mientras que otras se expresan única o preferentemente en respuesta a estrés oxidativo. A continuación se detallarán los mecanismos de defensa en la bacteria *Escherichia coli*, por ser el organismo donde se realizó en primer lugar la caracterización en detalle de muchos de estos mecanismos, y en *S. cerevisiae*, por su implicación en los trabajos que se describirán en posteriores apartados.

3.1. DEFENSA CONTRA ESTRÉS OXIDATIVO EN *E. coli*

3.1.1. Defensa contra el anión superóxido

Algunas de las actividades de defensa inducibles por $O_2^{\cdot-}$ están reguladas por los factores de transcripción SoxRS, por ejemplo la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*sodA*), la endonucleasa IV reparadora de DNA (*nfo*), la fumarasa C (*fumC*) y la aconitasa (*acnA*) (Hidalgo y Demple, 1996; Cunningham *et al.*, 1997). La activación de SoxRS también lleva a un aumento de los niveles de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*), que incrementa el poder reductor de la célula. Paralelamente, SoxRS aumenta los niveles del represor Fur (*fur*), que disminuye la entrada de hierro y así reduce la formación de $HO\cdot$ (Carmel-Harel y Storz, 2000; Storz y Imlay, 1999). SoxRS también confiere resistencia a diferentes drogas y a otras especies reactivas de nitrógeno (Nakajima *et al.*, 1995).

SoxR es una proteína de 17 kDa que se expresa constitutivamente, mientras que SoxS tiene 13 kDa y sus niveles son regulados por SoxR. El control del regulón *soxRS* tiene lugar en dos pasos (Nunoshiba *et al.*, 1992; Wu y Weiss, 1991). Bajo condiciones de estrés oxidativo la proteína SoxR es convertida a la forma activa, activando a su vez la transcripción de *soxS*. El consiguiente aumento en los niveles de SoxS lleva a la expresión de genes implicados en actividades antioxidantes (**Tabla 1**). SoxR es un homodímero con dos centros $[2Fe-2S]$ por dímero (Wu *et al.*, 1995). La oxidación de la forma reducida de SoxR $[2Fe-2S]^+$ a $[2Fe-2S]^{2+}$ parece ser el mecanismo de activación de SoxR (Gaudu *et al.*, 1997; Hidalgo *et al.*, 1997). La naturaleza del oxidante que

reacciona con el centro [2Fe-2S] en SoxR no está clara. $O_2^{\cdot-}$ podría ser un candidato, pero la generación de $O_2^{\cdot-}$ va acompañada del consumo de moléculas reductoras celulares, de modo que podría ocurrir que la actividad de SoxR estuviera regulada por alteraciones en los niveles de NADPH, la flavodoxina reducida o la ferredoxina reducida (Liochev *et al.*, 1994). SoxR es rápidamente reducido cuando el estrés oxidativo desaparece (Ding y Demple, 1997), pero el mecanismo de la reducción se desconoce. La actividad SoxR también parece ser modulada por el ensamblaje de los centros [2Fe-2S]. La exposición aeróbica a monotioles como el glutatión conlleva la destrucción del centro [2Fe-2S] de SoxR *in vitro*. Por el contrario, la presencia de ditioles como ditiotreitól o el enzima ditiólico tioredoxina promueve el ensamblaje del centro a la apoproteína SoxR (Ding y Demple, 1998).

No todas las actividades enzimáticas implicadas en la respuesta a superóxido están reguladas por SoxRS. Así, la superóxido dismutasa citosólica producto de *sodB* y la superóxido dismutasa periplasmática dependiente de Cu-Zn (*sodC*) protegen contra estrés oxidativo causado por $O_2^{\cdot-}$ y no están reguladas por SoxRS (Fridovich, 1995).

Gen	Actividad	Regulador
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso	SoxRS
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV	SoxRS
<i>fumC</i>	Fumarasa C	SoxRS
<i>acnA</i>	Aconitasa	SoxRS
<i>zwf</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	SoxRS
<i>fur</i>	Represor Fur de entrada de Fe	SoxRS/OxyR
<i>sodB</i>	Superóxido dismutasa citosólica	
<i>sodC</i>	Superóxido dismutasa periplasmática	
<i>katG</i>	Catalasa (hidroperoxidasa I)	OxyR
<i>grxA</i>	Glutaredoxina 1	OxyR
<i>grxB</i>	Glutaredoxina 2	
<i>grxC</i>	Glutaredoxina 3	
<i>trxA</i>	Tioredoxina 1	
<i>trxC</i>	Tioredoxina 2	
<i>trxB</i>	Tioredoxina reductasa	OxyR
<i>gorA</i>	Glutatión reductasa	OxyR
<i>gshA</i>	γ -Glutamil-cisteín sintasa	
<i>gshB</i>	Glutatión sintasa	
<i>ahpC</i>	alquil hidroperóxido reductasa	OxyR
<i>ahpF</i>	alquil hidroperóxido reductasa	OxyR
<i>tpx</i>	tioredoxina peroxidasa	
<i>bcp</i>	tioredoxina peroxidasa	
<i>xthA</i>	Endonucleasa III	
<i>katE</i>	Hidroperoxidasa II	

Tabla 1. Actividades antioxidantes en *E. coli*

3.1.2. Defensa contra peróxido de hidrógeno

El tratamiento de *E. coli* con H₂O₂ provoca la síntesis de unas 30 proteínas e induce la activación del factor de transcripción OxyR. Éste actúa sobre el promotor de al menos nueve genes, cuyos productos son necesarios para la protección contra el estrés oxidativo (Storz *et al.*, 1990). Algunos de estos genes son los que codifican para la hidroxiperoxidasa o catalasa (*katG*), la glutaredoxina 1 (*grxA*), la glutatión reductasa (*gorA*) y el represor Fur (*fur*) (**Tabla 1**) (Hidalgo *et al.*, 1996). La actividad de OxyR también confiere resistencia a HOCl, solventes orgánicos y otras especies reactivas de nitrógeno (Dukan y Touati, 1996).

Otras enzimas que protegen contra H₂O₂ pero que no son inducidas por OxyR son la endonucleasa III reparadora de DNA (*xthA*), la DNA polimerasa I (*polA*) y la hidroxiperoxidasa II (*katE*).

OxyR es un activador transcripcional tetramérico que existe en dos formas, reducida y oxidada. Sólo la forma oxidada activa la transcripción (Storz *et al.*, 1990). Cuando OxyR está en su forma reducida los residuos C199 y C208 se encuentran en la forma libre tiólica; cuando OxyR se halla oxidada las dos cisteínas forman un enlace disulfuro (Zheng M *et al.*, 1998). Una mutación en cualquiera de las dos cisteínas impide que el factor transcripcional responda a H₂O₂. Así, la oxidación directa de OxyR por H₂O₂ y la consecuente formación del puente disulfuro es el mecanismo por el cual *E. coli* induce la expresión de actividades antioxidantes en respuesta a dicho agente.

3.2. DEFENSA CONTRA ESTRÉS OXIDATIVO EN *S. cerevisiae*

S. cerevisiae también ha desarrollado mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para mantener el estado redox adecuado en la célula (Carmel-Harel y Storz, 2000; Jamieson, 1998; Santoro y Thiele, 1997). La localización subcelular de las actividades antioxidantes juega un papel muy importante en la detección y reparación del daño

causado por el estrés. La **Tabla 2** muestra algunos de los genes y actividades más relevantes implicados en la respuesta a estrés oxidativo en levadura.

Sistema	Gen	Actividad	Regulador
Glutación	<i>GSH1</i>	Glutamilcisteín sintetasa	Yap1p
	<i>GSH2</i>	Glutación sintetasa	
	<i>GLR1</i>	Glutación reductasa	Yap1p
Tioredoxina	<i>TRX1</i>	Tioredoxina (citoplasma)	
	<i>TRX2</i>		Yap1p/Skn7p
	<i>TRR1</i>	Tioredoxin reductasa I (citoplasma)	Yap1p/Skn7p
	<i>TRX3</i>	Tioredoxina (mitocondria)	
	<i>TRR2</i>	Tioredoxin reductasaII (mitocondria)	
Glutaredoxina	<i>GRX1</i>	Glutaredoxina (citoplasma)	
	<i>GRX2</i>	Glutaredoxina (citoplasma)	Yap1p
	<i>GRX3 GRX4</i>	Glutaredoxina (núcleo)	
	<i>GRX5</i>	Glutaredoxina (mitocondria)	
Superóxido dismutasa	<i>SOD1</i>	Cu-Zn SOD (citoplasma)	Yap1p/Skn7p
	<i>SOD2</i>	Mn SOD (mitocondria)	Yap1p/Skn7p
Catalasa	<i>CTA1</i>	Catalasa A (peroxisoma)	
	<i>CTT1</i>	Catalasa T (citoplasma)	Yap1p/Skn7p Msn2/Msn4
Metalotioneína	<i>CUP1</i>	Homeostasis iones metálicos	Ace1p
	<i>CRS5</i>		
Endonucleasa	<i>APN1</i>	endonucleasa	
BSD	<i>BSD1/PMR1</i>	ATPasa tipo P (aparato Golgi)	
	<i>BSD2</i>	Homeostasis iones metálicos (ER)	
Ruta pentosas-fosfato	<i>ZWF1</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Yap1p
	<i>TKL1</i>	Transcetolasa	
	<i>APE1</i>	Ribulosa-5-fosfato epimerasa	
Glutación peroxidasa	<i>GPX1 GPX3</i>	glutación peroxidasa	
	<i>GPX2</i>	glutación peroxidasa	Yap1p
Tioredoxina peroxidasa	<i>TSA1 AHP1</i>	tioredoxina peroxidasa	Yap1p/Skn7p
	<i>YDR453C YBL064C</i>	tioredoxina peroxidasa	
	<i>YIL010W</i>		

Tabla 2. Defensas antioxidantes en *S. cerevisiae*

3.2.1. Sistemas de defensa no enzimáticos

3.2.1.1. Glutación

El glutatión (GSH) es un tripéptido (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) muy abundante en la célula, estando implicado en el mantenimiento del estado redox de aquélla. GSH reacciona, a través de su grupo sulfhidrilo, con los oxidantes para producir glutatión oxidado (GSSG). Éste es reducido por la glutatión reductasa (codificada por *GLR1*), a expensas de NADPH (Collinson y Dawes, 1995) (**Figura 2**). Células creciendo en fase exponencial en medio rico y en condiciones aeróbicas tienen una ratio GSH-GSSG elevada, indicando que la mayoría del glutatión intracelular está en forma reducida (GSH). La exposición de las células a H_2O_2 produce una reducción de los niveles de GSH y un giro en el balance redox hacia la forma oxidada GSSG (Grant *et al.*, 1998).

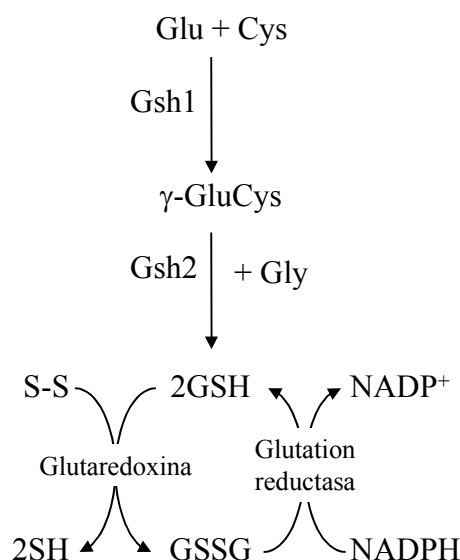


Figura 2. El ciclo del glutatión en *S. cerevisiae*. Gsh1: γ -glutamilcisteín sintetasa. Gsh2: glutatión sintetasa. γ -GluCys: γ -glutamilcisteína.

La biosíntesis del glutatión en *S. cerevisiae* requiere de la actividad de dos enzimas, γ -glutamilcisteín sintetasa y glutatión sintetasa, codificadas por los genes *GSH1* y *GSH2*, respectivamente (**Figura 2**) (Grant, 2001). El doble mutante *gsh1 gsh2* es todavía viable, pero presenta una tasa de crecimiento menor que las células salvajes y defectos en esporulación (Kistler *et al.*, 1990). Mutantes *gsh1* son hipersensibles a H_2O_2 y dependen de una fuente exógena de GSH para el crecimiento en medio mínimo, mientras que mutantes *gsh2* son insensibles a H_2O_2 y otros agentes oxidantes (Grant *et al.*, 1997). Mutantes nulos *gsh1* son incapaces de crecer en fuentes de carbono no

fermentables como glicerol y presentan un fenotipo “petite”, lo que sugiere que el GSH juega un papel importante en proteger las mitocondrias frente a las ROS producidas en la respiración. Mutantes deficientes en GSH son hipersensibles a H₂O₂, plomo, menadiona y otros componentes (Stephen y Jamieson, 1996). Sin embargo, las células de levadura deficientes en GSH son todavía capaces de inducir una respuesta adaptativa a estrés oxidativo, lo que sugiere que GSH no es importante como sensor en la respuesta a estrés.

3.2.1.2. Metalotioneínas

Son una clase de proteínas ricas en cisteína, con propiedades antioxidantes, que pueden unir diferentes iones metálicos y están presentes en un amplio rango de organismos, desde bacterias a humanos (Hamer, 1986). Estas proteínas suponen un vínculo de unión entre iones metálicos y la sensibilidad o resistencia a oxidantes, por lo que es de esperar una respuesta coordinada frente a estrés oxidativo e iones metálicos productores de ROS. Así, la producción de metalotioneínas es inducida transcripcionalmente por metales y su función es muy importante para evitar la toxicidad por metales como el cobre (Thiele, 1992).

Las metalotioneínas de levadura están codificadas por los genes *CUPI* y *CRS5*. Mutantes sin actividad Sod1 presentan sensibilidad a dióxigeno y superóxido generado por drogas, y necesitan los aminoácidos cisteína, metionina y lisina para el crecimiento aeróbico. Estos mutantes pueden ser complementados por la sobreexpresión de metalotioneínas de levadura y humanas (Tamai *et al.*, 1993). De acuerdo con su papel antioxidante, *CUPI* es activado transcripcionalmente cuando las células crecen en presencia de concentraciones muy elevadas de oxígeno, durante la respiración o durante la exposición a drogas como la menadiona (Liu y Thiele, 1996).

3.2.1.3. Homeostasis de iones metálicos

Un puente de unión entre estrés oxidativo y homeostasis de metales vendría dado por los genes *BSD1* y *BSD2* (by pass SOD defects). Mutaciones en estos dos genes parecen suprimir la hipersensibilidad a estrés oxidativo del mutante *sod1* (Liu *et al.*, 1992). El gen *BSD1* es idéntico a *PMR1*, que codifica para una ATPasa de tipo P que se encuentra en el aparato de Golgi y tiene una función en el metabolismo del calcio y

manganeso y en el transporte y procesamiento de proteínas secretoras (Lapinskas *et al.*, 1995). Mutantes con *PMR1* inactivo pueden suprimir el estrés oxidativo de una célula *sod1*, debido a una hiperacumulación de manganeso en el citosol, donde este ion se une a los radicales libres impidiendo la acción oxidante de éstos sobre macromoléculas celulares.

BSD2 codifica para una proteína transmembranal localizada en el retículo endoplasmático (Liu y Culotta, 1994). Este gen interviene en la homeostasis de iones metálicos. Mutantes en *BSD2* revierten los defectos aeróbicos de una cepa a la que le falta *SOD1* y presentan una mayor sensibilidad a cadmio y cobre y una acumulación de estos iones.

El gen *ATX1* también está implicado en la protección contra estrés oxidativo, ya que un mutante *atx1* es hipersensible a generadores de anión superóxido y a H_2O_2 . *ATX1*, como se ha explicado anteriormente en el apartado 2.1.3., interviene en la homeostasis del cobre y presenta homología con otros transportadores de metales de procariotas (Lin y Culotta, 1995).

3.2.2. Sistemas de defensa enzimáticos

3.2.2.1. Tioredoxinas y glutaredoxinas

Debido a que se dedicará un apartado exclusivamente a estos dos tipos de proteínas (apartado 4), a continuación sólo se hará una breve descripción de las mismas.

Tioredoxinas y glutaredoxinas son oxidoreductasas que contienen residuos de cisteína en regiones muy conservadas. Participan en numerosas reacciones enzimáticas, entre ellas en la reparación de proteínas oxidadas (Grant, 2001; Holmgren, 1989; Holmgren, 1990). En el sistema tioredoxina, la forma oxidada de la proteína es reducida directamente por el NADPH y la tioredoxina reductasa. En cambio, en el sistema glutaredoxina la reducción es llevada a cabo por el glutatión (GSH). Como se puede ver en la **Figura 3**, el glutatión oxidado (GSSG) vuelve a su estado reducido mediante una reacción dependiente de NADPH y catalizada por la glutatión reductasa (Holmgren, 1990).

3.2.2.2. Catalasa

La catalasa cataliza la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 . *S. cerevisiae* posee dos catalasas, denominadas A y T, codificadas por *CTA1* y *CTT1*, respectivamente. Ambas son hemoproteínas, pero Cta1 se encuentra en el peroxisoma y su principal función sería eliminar el H_2O_2 producido en la β -oxidación de los ácidos grasos (Jamieson, 1998). La catalasa T se encuentra en el citoplasma y su papel no está claro, aunque parece estar involucrada en la respuesta a estrés oxidativo, osmótico y carencia de nutrientes (Davidson *et al.*, 1996). Tanto los mutantes simples como dobles en ambos genes son incapaces de producir una respuesta adaptativa a H_2O_2 , por lo que ambas catalasas son importantes en la resistencia contra H_2O_2 (Izawa *et al.*, 1996).

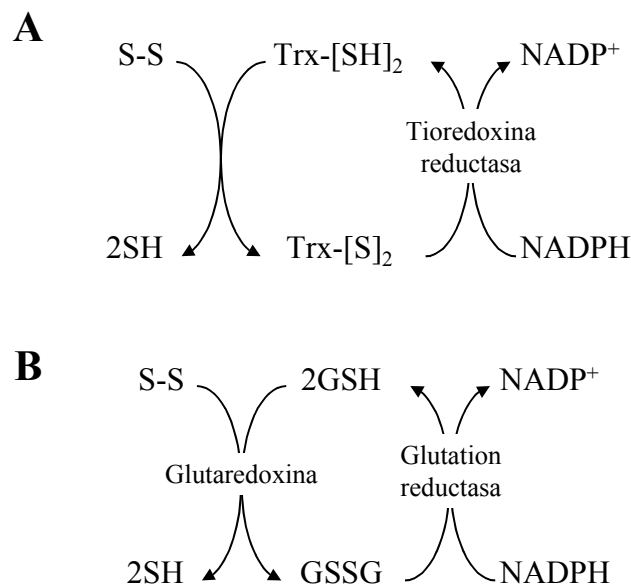


Figura 3. Los sistemas tioredoxina (A) y glutaredoxina (B) en *S. cerevisiae*. S-S y SH denotan grupos disulfuro y sulfhidrilo (respectivamente) en las proteínas.

3.2.2.3. Superóxido dismutasa (SOD)

Las superóxido dismutasas ejercen un papel protector contra ROS al catalizar la reacción en que dos moléculas de anión superóxido dan lugar a H_2O_2 y H_2O . *S. cerevisiae*, como otros eucariotas, contiene dos SODs intracelulares. La SOD dependiente de cobre y zinc está codificada por *SOD1* y se encuentra en el citoplasma, núcleo y otros compartimentos (ver más adelante). Es un homodímero, en el que cada subunidad está unida a un átomo de cobre y otro de zinc. La SOD dependiente de manganeso, producto de *SOD2*, está localizada en la mitocondria. Es un tetrámero, en el

que cada subunidad se une a un átomo de manganeso. Ni *SOD1* ni *SOD2* son estrictamente esenciales. Sod2 actúa en la mitocondria protegiendo del superóxido allí generado. Así, mutantes *sod2* muestran hipersensibilidad a oxígeno, que puede ser suprimida bloqueando la respiración (Guidot *et al.*, 1993).

El papel de Sod1 es más complejo. Células que no presentan este enzima muestran defectos en crecimiento aeróbico, auxotrofías para lisina, metionina o cisteína, crecimiento pobre en respiración (glicerol o etanol), altas tasas de mutaciones espontáneas y mayor pérdida de viabilidad en presencia de oxígeno (Gralla y Kosman, 1992; Strain *et al.*, 1998). Sod1 también interviene en la homeostasis del cobre y mutantes *sod1* presentan sensibilidad a este metal (Culotta *et al.*, 1995). La capacidad de Sod1 para unir cobre depende de Lys7, que, como ya se ha explicado anteriormente, es una chaperona de cobre que proporciona este metal exclusivamente a Sod1 (Culotta *et al.*, 1997). Tres mutaciones, de cuyos genes se hablará de nuevo más adelante, suprimen los defectos del mutante *sod1* (Strain *et al.*, 1998):

- ▶ Mutantes en *SSQ1* y *JAC1*, que codifican para chaperonas mitocondriales.
- ▶ Mutantes en *NFS1*, cuya función está relacionada con la biosíntesis de centros Fe/S en la mitocondria.

Sin embargo, la compartimentalización diferencial de las dos SOD de *S. cerevisiae* ha sido recientemente puesta en duda. En efecto, se ha descrito que Sod1 también se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria, donde ejercería un efecto protector frente a daño oxidativo (Sturz *et al.*, 2001).

3.2.2.4. Enzimas de la vía de las pentosas fosfato

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*ZWF1*), la transcetolasa (*TKL1*) y la ribulosa-5-fosfato epimerasa (*RPE1*) son enzimas involucradas en la ruta de las pentosas fosfato, que es importante para la producción de NADPH. Éste es usado por la glutatión reductasa y tioredoxina reductasa para oxidar glutatión (GSSG) y tioredoxina. Así, mutaciones en los citados tres genes, que afectan negativamente a esta ruta, hacen que las células sean más sensibles a H₂O₂ (Juhnke *et al.*, 1996).

3.2.2.5. Endonucleasa Apn1

Ya se ha comentado que las ROS pueden dañar el DNA. Debido a ello, algunas de las actividades reparadoras del DNA en levaduras proporcionan resistencia contra oxidantes. En consonancia con ello, mutaciones en el gen *APNI*, que codifica para la principal endonucleasa apurínica/apirimidínica, determinan hipersensibilidad a oxidantes (Ramotar *et al.*, 1991).

3.2.3. Respuestas adaptativas inducidas en respuesta a estrés oxidativo

El tratamiento de cultivos creciendo aeróbicamente en fase exponencial con niveles subletales de oxidantes puede llevar a la inducción de una protección a siguientes exposiciones de oxidantes que normalmente causarían la muerte (Mager y Ferreira, 1993). *S. cerevisiae* presenta dos tipos de respuesta adaptativa, una inducida por H₂O₂ y otra inducida por generadores de anión superóxido, como la menadiona (Jamieson, 1992; Jamieson *et al.*, 1994). La respuesta a H₂O₂ es diferente a la inducida por menadiona, pero algunas proteínas parecen ser sintetizadas por la exposición a los dos oxidantes, habiendo puntos de solapamiento en las dos respuestas.

El estudio global del proteoma en la respuesta a concentraciones moderadas de H₂O₂ ha sido llevado a cabo recientemente (Godon *et al.*, 1998). Así, se ha demostrado el aumento de al menos 115 proteínas pertenecientes a varias categorías:

- ✓proteínas antioxidantes
- ✓chaperonas y proteínas de choque térmico
- ✓proteínas involucradas en la maquinaria proteolítica
- ✓enzimas que redirigen el metabolismo de carbohidratos hacia la síntesis de trehalosa y la regeneración de NADPH

3.2.4. Regulación de la expresión génica por oxidantes

Se han identificado diferentes factores de transcripción de genes antioxidantes. Además, existe un solapamiento entre respuesta a estrés oxidativo y respuestas a otros estreses, como falta de nutrientes, choque térmico, choque osmótico y resistencia a metales pesados (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996; Santoro y Thiele, 1997).

3.2.4.1. Factores de transcripción b-ZIP

Los genes *YAP1* y *YAP2* de *S. cerevisiae* codifican para sendas proteínas que contienen un dominio básico con una cremallera de leucina (b-ZIP) similar al encontrado en la familia de activadores transcripcionales de mamíferos c-Jun (Fernandes *et al.*, 1997). Yap1 y Yap2 juegan un papel en la protección contra estrés oxidativo (Stephen *et al.*, 1995).

Yap1 se aisló por su capacidad para unirse a la misma secuencia del DNA que el factor de transcripción de mamíferos AP-1 (Jun/Fos) tanto *in vivo* como *in vitro* (Harshman *et al.*, 1988). La sobreexpresión de *YAP1* confiere resistencia a agentes tóxicos, como el cadmio, y mutantes nulos *yap1* son hipersensibles a oxidantes (Fernandes *et al.*, 1997). Yap1 se encuentra normalmente en el citoplasma, pero en respuesta a estrés oxidativo se acumula en el núcleo (Toone y Jones, 1999). Yap1 contiene en la región C-terminal tres residuos conservados de cisteína formando el dominio CRD (cysteine-rich domain), y se piensa que la oxidación de estas cisteínas actuaría como sensor del estado redox. CRD es necesario para mantener Yap1 en el citoplasma (Kuge *et al.*, 1997). Yap1 también presenta una secuencia de exportación nuclear a través de la cual el factor de exportación Crm1 mantiene Yap1 en el citoplasma en condiciones normales. Cuando se produce un estrés oxidativo, la interacción entre Crm1 y Yap1 es inhibida (por oxidación de las cisteínas del CRD), lo que hace que Yap1 se localice en el núcleo (Delaunay *et al.*, 2000; Kuge *et al.*, 2001). En éste, Yap1 se une al elemento de respuesta a AP-1 (ARE; TGACTCA). Este elemento está presente en promotores de genes que codifican para proteínas implicadas en respuesta a estrés, cuya expresión, de este modo, dependerá de Yap1.

Skn7 es un factor de transcripción que, juntamente con Sln1, está involucrado en la respuesta a estrés osmótico y regula la expresión, entre otros, del gen de la tioredoxina *TRX2*. Este papel de Skn7 es independiente de Hog1 (Li *et al.*, 1998). Por otro lado, Skn7 funciona en la respuesta a estrés oxidativo y se superpone parcialmente con la función de Yap1 (Lee *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 1997). Así, algunos de los genes dependientes de Yap1 que codifican para proteínas antioxidantes son también dependientes de Skn7 (**Tabla 2**). En cambio, genes que dirigen el flujo metabólico a la generación de NADPH a través de la vía de las pentosas fosfato son dependientes exclusivamente de Yap1 (Lee *et al.*, 1999). Skn7 posee un dominio de unión al DNA en la región N-terminal homólogo al del factor de choque térmico Hsf1, aunque la diana de Skn7 es desconocida (Raitt *et al.*, 2000). Además, Skn7 y Hsf1 interaccionan físicamente y ambos son requeridos probablemente para la inducción de genes de

respuesta a choque térmico como *HSP12* (Raitt *et al.*, 2000). Todas estas observaciones sugieren que *Skn7* estaría implicado en la respuesta a diferentes estreses junto con otros reguladores transcripcionales.

YAP2 confiere resistencia a cadmio y el mutante *yap2* es hipersensible a oxidantes (Hirata *et al.*, 1994). Su función no está muy clara y se desconocen sus dianas en los promotores.

3.2.4.2. Factores de transcripción que se unen a cobre

Ace1 es una proteína que une cobre y que regula la expresión de algunos genes que están implicados en la homeostasis de este metal, incluyendo *CUPI* (Thiele, 1988). Además, esta proteína también regula la expresión de *SOD1*, y se ha visto que *Ace1* se une al promotor de *SOD1 in vitro* (Gralla *et al.*, 1991). Sin embargo, en un mutante *ace1* todavía existe expresión de la enzima *SOD1*, por lo que otros factores de transcripción serían también responsables del nivel de expresión de *SOD1*.

Mac1 es otro factor transcripcional que presenta similitud de secuencia en el dominio de unión a DNA con *Ace1* (Jungmann *et al.*, 1993). Regula la transcripción de genes involucrados en la reducción de hierro y cobre y también media la inducción del gen *CTTI* por H_2O_2 . No hay evidencias de que *Mac1* se una al promotor de *CTTI*, por lo que su papel regulador podría ser indirecto. La presencia de cobre unido a *Ace1* y *Mac1* sugiere que estos factores de transcripción podrían actuar como sensores de oxidantes.

3.2.4.3. Factores de transcripción con dedo de zinc

La expresión de una amplia serie de genes de levadura es inducida por diferentes tipos de estrés como el osmótico, oxidativo, térmico y de daño al DNA. Se habla en este caso de “respuesta general al estrés” (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000). Algunos de estos genes son *DDR2*, *HSP12* y *CTTI*, que presentan en su promotor un elemento de respuesta a estrés o STRE con la secuencia AGGGG (Marchler *et al.*, 1993).

Dos proteínas con un dedo de zinc, codificadas por *MSN2* y *MSN4*, se unen al elemento STRE y son necesarias para la inducción de los genes de respuesta a estrés. Células que no presentan estos dos genes muestran una elevada sensibilidad a diferentes estreses, incluido el oxidativo (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). Aunque *Mns2* y *Msn4*

regulan la expresión de *CTT1*, entre otros genes, mutaciones en *MSN2/4* no eliminan la expresión de *CTT1* en presencia de H_2O_2 , lo que demuestra que un mismo gen con función antioxidante puede responder a diversos factores transcripcionales. Como en el caso de Yap1, la localización nuclear de Msn2/4 es regulada por la situación de estrés, siendo en este caso modulada por la vía Ras (Görner *et al.*, 1998).

4. GLUTAREDOXINAS Y TIOREDOXINAS

4.1. GENERALIDADES

Ya se ha comentado brevemente en el apartado 3.2.2.1 que las glutaredoxinas y las tioredoxinas son enzimas implicadas en la respuesta a estrés oxidativo, concretamente en el mantenimiento del estado redox de las proteínas de la célula (Dempfle, 1998; Rietsch y Beckwith, 1998). Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la formación de puentes disulfuro intermoleculares en las proteínas, lo que puede conllevar una inactivación de las enzimas debido a la oxidación de los residuos cisteína (Creighton, 1992). Además del glutatión, cuya función ya se ha comentado, glutaredoxinas y tioredoxinas pueden ayudar a reducir los puentes disulfuro, recuperando así su función las proteínas.

Glutaredoxinas y tioredoxinas son oxidoreductasas que fueron originalmente identificadas como donadoras de hidrógeno para la ribonucleótido reductasa, enzima esencial para la síntesis del DNA; sin embargo, aquellas también son necesarias para la actividad de otras enzimas metabólicas que forman un disulfuro como parte de su ciclo catalítico, como la 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato reductasa (Holmgren, 1979; Holmgren, 1990). Algunas de las funciones reguladoras asignadas a glutaredoxinas y tioredoxinas son el plegamiento y la regulación de proteínas, la reducción de dehidroascorbato, la reparación de proteínas dañadas oxidativamente y el metabolismo del azufre (Grant, 2001). Glutaredoxinas y tioredoxinas son estructuralmente similares y contienen típicamente dos residuos de cisteína en su centro activo; éste se halla muy conservado a lo largo de la evolución. Las tioredoxinas presentan en su centro activo la secuencia Cys-Gly-Pro-Cys, mientras que en el caso de las glutaredoxinas la secuencia

es Cys-Pro-Tyr-Cys. A pesar de ello, como se observa en la **Figura 3**, ambas enzimas llevan a cabo su función de manera diferente (Holmgren, 1990; Holmgren y Åslund, 1995). Además, las glutaredoxinas no muestran actividad con la tioredoxina reductasa ni las tioredoxinas son reducidas por el GSH o la glutatión reductasa (Holmgren, 1979). Es por ello que se habla de dos vías diferentes que usan NADPH, directa o indirectamente, para reducir los puentes disulfuro de las proteínas: el **sistema tioredoxina** (que consiste en la/s tioredoxina reductasa/s y la/s tioredoxina/s) y el **sistema glutaredoxina** (formado por la glutatión reductasa, el glutatión y la/s glutaredoxina/s). Ambos sistemas se hallan presentes tanto en bacterias como en levaduras y en eucariotas superiores (Holmgren, 1979; Holmgren, 1990).

Debido al paralelismo funcional de estas dos oxidoreductasas se explicará primero brevemente en qué consisten las tioredoxinas, para pasar luego a describir las glutaredoxinas. Nos centraremos en primer lugar en *E. coli* y seguidamente, con más extensión, en *S. cerevisiae*, aunque se haga mención también a eucariotas superiores.

4.2. TIOREDIXINAS

4.2.1. Tioredoxinas en *E. coli*

En *E. coli* el sistema tioredoxina está formado inicialmente por la tioredoxina 1 (codificada por *trxA*), descubierta como donador de electrones para la ribonucleótido reductasa, y la tioredoxina reductasa (codificada por *trxB*), necesaria para reducir la tioredoxina 1 oxidada (Holmgren, 1985). Más tarde se descubrió la tioredoxina 2 (codificada por *trxC*) en base a su similaridad de secuencia con la tioredoxina 1 (Miranda-Vizuet *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1998). Las dos tioredoxinas presentan en su centro activo el motivo C-X₁-X₂-C. Células que presentan mutaciones individuales de los genes *trxA*, *trxB* y *trxC* son viables. Los mutantes en *trxC* no son sensibles a H₂O₂ y la expresión de este gen está inducida por OxyR (Ritz *et al.*, 2000). Los mutantes en *trxA* son sensibles a H₂O₂ y la expresión de *trxA* no se ve aumentada con la exposición a H₂O₂ (Michan *et al.*, 1999; Ritz *et al.*, 2000). Células delecionadas en *trxB* son sensibles a H₂O₂ y su expresión en la respuesta a estrés oxidativo aún no ha sido estudiada (Ritz *et al.*, 2000).

Se han construido mutantes múltiples de *E. coli* que están afectados en los sistemas tioredoxina y glutaredoxina y se ha estudiado en ellos el estado tiol/disulfuro. Se ha visto que ambos sistemas contribuyen en la reducción de los puentes disulfuro en el citosol y que los dos sistemas pueden substituirse parcialmente (Prinz *et al.*, 1997).

4.2.2. Tioredoxinas en *S. cerevisiae*

S. cerevisiae contiene dos genes que codifican para tioredoxinas citoplasmáticas (*TRX1* y *TRX2*). Células que presentan mutaciones en cada uno de estos genes por separado muestran un crecimiento y una morfología similar a la célula salvaje (Kuge y Jones, 1994). El doble mutante *trx1 trx2* es auxotrófico para los aminoácidos metionina y cisteína y asimila deficientemente el sulfato, siendo incapaz de crecer en un medio conteniendo sulfato como única fuente de azufre. Además, el doble mutante muestra una disminución en la tasa de crecimiento resultado de una prolongada fase S y un acortamiento de la fase G1 (Muller, 1991). La auxotrofia para metionina es debida a una reducción en la actividad 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato reductasa, que convierte el 3'-fosfoadenosín 5'-fosfosulfato a sulfito. El mutante simple *trx2* es extremadamente sensible a H₂O₂ y resistente a diamida (Kuge y Jones, 1994; Muller, 1991), y la expresión del gen *TRX2* es inducida por H₂O₂ y diamida de manera dependiente de Yap1 y Skn7. Estos datos indican que Trx2 juega un papel importante en la defensa contra estrés oxidativo en *S. cerevisiae*. Se desconoce la regulación de la expresión de *TRX1*.

La expresión del gen *TRR1*, que codifica para la tioredoxina reductasa 1, también es inducida por H₂O₂ de manera dependiente de Yap1 y Skn7 (Lee *et al.*, 1999). Células que no presentan este gen son hipersensibles a H₂O₂ y a t-butil hidroperóxido (Machado *et al.*, 1997).

Se ha identificado un segundo sistema tioredoxina en *S. cerevisiae* localizado en la mitocondria (Pedrajas *et al.*, 1999). Este sistema incluye la tioredoxina 3 (codificada por *TRX3*), y la tioredoxina reductasa 2 (codificada por *TRR2*); su función sería proteger contra el estrés oxidativo generado durante el metabolismo respiratorio. Un mutante *trx3* muestra una tasa de crecimiento y una sensibilidad a H₂O₂ similar a la cepa salvaje. En cambio, un mutante *trr2* es hipersensible a H₂O₂. Los promotores de *TRX3* y *TRR2* contienen secuencias de unión a Yap1 y a los reguladores de respuesta general a estrés Msn2/4, aunque se desconoce la regulación de la expresión de dichos dos genes.

4.3. GLUTAREDOXINAS EN *E. coli*

La glutaredoxina 1 (Grx1) de *E. coli* (codificada por *grxA*) fue descubierta porque proporciona electrones a la ribonucleótido reductasa en cepas mutantes en la tioredoxina 1 (Holmgren, 1976). La viabilidad del doble mutante *trxA grxA* revela que la tioredoxina y la glutaredoxina no son esenciales para la biosíntesis de ribonucleótidos, pero sí para la reducción del sulfato (Russel *et al.*, 1990). Las glutaredoxinas 2 (Grx2) y 3 (Grx3), codificadas por *grxB* y *grxC*, respectivamente, fueron encontradas después de inactivar los genes de la glutaredoxina 1 y la tioredoxina 1 y observar que la célula aún presentaba actividad glutatión reductasa (Åslund *et al.*, 1994). Grx3 sí muestra actividad como donador de hidrógeno para la ribonucleótido reductasa, pero no es muy eficiente (Åslund *et al.*, 1994); no obstante, en ausencia de la tioredoxina 1 y la glutaredoxina 1 es la responsable de realizar esta función. Es evidente que en condiciones normales Grx3 debe tener otras funciones en la célula. Apoyando esta idea, se ha purificado una glutaredoxina en eritrocitos humanos, denominada GrxB (Terada *et al.*, 1992). En los eritrocitos no tiene lugar la síntesis de DNA, por lo que esta enzima podría proteger de daño oxidativo junto con el GSH. GrxB presenta un tamaño atípico (27 kDa), algo superior al usual en las glutaredoxinas (9-12 kDa). Los mutantes simples en los genes *grxA* y *grxC* presentan tasas de crecimiento similares a la cepa salvaje (Prinz *et al.*, 1997; Russel y Holmgren, 1988). No se ha descrito el fenotipo del mutante en *grxB* ni la expresión de *grxB* y *grxC* en respuesta a estrés oxidativo. En cambio, la expresión de *grxA* es claramente inducible por H₂O₂ de manera dependiente de OxyR (Zheng M *et al.*, 1998).

4.4. GLUTAREDOXINAS EN *S. cerevisiae*

4.4.1. Glutaredoxinas ditiólicas y monotiólicas

En *S. cerevisiae* se han descrito dos genes, *GRX1* y *GRX2*, que codifican para dos glutaredoxinas, Grx1 y Grx2, respectivamente. Ambas poseen dos cisteínas en su centro activo (Cys-Pro-Tyr-Cys), que, como se ha dicho anteriormente, está muy conservado a lo largo de la evolución (Luikenhuis *et al.*, 1998). *GRX1* y *GRX2* presentan un 40-52% de identidad y un 61-76% de similaridad con los genes que codifican para glutaredoxinas en bacterias y en mamíferos (**Figura 4**). Mutantes simples en estos dos genes son viables y poseen unas tasas de crecimiento similares a una cepa salvaje, tanto en medio rico como en medio mínimo, lo que indica que el sulfato puede ser asimilado como fuente de sulfuro en ausencia de Grx1 y Grx2 (Luikenhuis *et al.*, 1998), mientras que las tioredoxinas sí son esenciales para el metabolismo del azufre (Muller, 1991). Por el contrario, en *E. coli* ambos sistemas tioredoxina y glutaredoxina sirven como donadores de hidrógeno para la 3'-fosfoadenosín 5'-fosfosulfato reductasa.

	<u>Region N</u>	<u>Region C</u>
<i>Grx1</i>	17 NEIFVASKTYCPYCHAALNTLFEKLVPRS	51 LQLNDMK-EGADIQAALYEINGQR--TVPNIYINGKHIIGGNDLQELRETGEL
<i>Grx2</i>	51 KEVVFVAAKTYCPYCKATLSTLFLQELNVPKS	85 LELEDMS-NGSEIQDALEBISGQK--TVPNVYINGKHIIGNSDLETLLKNGKL
<i>S. pombe</i>	15 NDVVVFAKSYCPYCHATEKVIADK----KI	45 YQIDLNM-NGDEIQSYLLKKTGQR--TVPNIFIHQKHVGGNSDFQALFKKGEL
<i>E. coli</i> 1	1 MQTVIFGRSGCPYCVRAKDLAEKLSNERD	33 YQYVDIRA-EGITKEDLQQKAGKPVETVPQIFVDQQHIGGYTDFAAWVKENLD
<i>E. coli</i> 3	2 ANVEIYTKPTCPYCHRAKALLSSKGVSFQ	31 ELPID---GNAAKREEMIKRSGRT-TVPQIFIDAQHIIGCDDLVALDARGGL
Arroz	13 APVVVYSKSYCPFCVVRVKKLFGQLGATFK	43 IELDGES-DGSELQSALAEWTGQR--TVPNVFINGKHIIGCDDTLALNNEGKL
Cerdo	13 GKVVVFIKPTCPFCRKTQELLSQLPFKEGL	45 FVDITATSDTNEIQDYLLQQLTGAR--TVPRVFIGKECIGGCTDLESMHKRCEL
Conejo	13 GKVVVFIKPTCPYCRKTQEILSGLPFKQGL	45 FVDITATSDMSEIQDYLLQQLTGAR--TVPRVFLGKDCIGGCSDLIAMQEKCEL
Vaca	12 GKVVVFIKPTCPYCRKTQELLSQLPFKQGL	44 FVDITAAGNISEIQDYLLQQLTGAR--TVPRVFIGQECIGGCTDLVNMHERGEL
Humano	13 GKVVVFIKPTCPYCRRAQEILSGLPIRQGL	45 FVDITATNHTNEIQDYLLQQLTGAR--TVPRVFIGKDCIGGCSDELVSLQSQSEL
Consensus	v v k CPyC l	q l g r TVP fi iGG D g l

Figura 4. Análisis comparativo de secuencias de glutaredoxinas ditiólicas de diferentes organismos. En rojo se han remarcado las cisteínas del centro activo. Los números indican la posición del primer aminoácido en cada región.

A pesar del alto grado de homología entre las dos proteínas (64%), Grx2 es la que presenta una mayor actividad oxidoreductasa *in vivo*. Además, el mutante *grx1* es sensible a estrés oxidativo inducido por el anión superóxido, mientras que una célula delecionada para *GRX2* es sensible a H₂O₂. Esto indica que las dos glutaredoxinas juegan diferentes papeles tanto durante el crecimiento normal como en condiciones de estrés (Luikenhuis *et al.*, 1998). Estos mismos autores han propuesto que la función principal de Grx2 sería reducir los puentes disulfuro formados como resultado del daño causado por las ROS. Grx1 funcionaría igual, pero sería necesaria junto con Grx2 bajo determinadas condiciones de estrés o tras la formación de unos substratos disulfuro concretos. Apoyando esta idea, la expresión de *GRX1* y *GRX2* aumenta diferencialmente bajo distintas condiciones de estrés (H₂O₂, anión superóxido, diamida, choque térmico, choque osmótico y fase estacionaria). Los niveles de inducción son

similares para *GRX1* y *GRX2* en respuesta a H_2O_2 , menadiona y diamida. Sin embargo, *GRX1* se induce doce y seis veces en respuesta a choque térmico y osmótico, respectivamente, mientras que *GRX2* sólo lo hace dos veces (Luikenhuis *et al.*, 1998). *GRX1* contiene un elemento de respuesta a estrés STRE en su región promotora, mientras que *GRX2* contiene dos. Ya se ha comentado en el apartado 3.2.4.3. que los elementos STRE representan la manera como las levaduras captan y responden a condiciones de estrés (Marchler *et al.*, 1993). De acuerdo con la presencia de este tipo de elementos en los promotores de *GRX1* y *GRX2*, la expresión de estos genes es activada por la vía de la MAP quinasa Hog1 y regulada negativamente por la vía Ras-proteín quinasa A (Grant *et al.*, 2000). La inducción de la expresión de *GRX1* y *GRX2* en respuesta a crecimiento en fase estacionaria y en una fuente de carbono no fermentable es muy débil en el doble mutante *msn2 msn4* y en cepas mutadas en los elementos STRE. Esto indica que deben existir otras vías involucradas en la respuesta a estas condiciones de crecimiento (Grant *et al.*, 2000). Una vía regulada por fuentes de carbono no fermentables implica los factores de transcripción Hap 2/3/4/5 (Zitomer y Lowry, 1992); sin embargo, no se han encontrado motivos de unión a Hap en los promotores de *GRX1* y *GRX2*. En resumen, los dos genes presentan diferentes patrones de expresión que confirman diferentes funciones celulares.

El trabajo descrito en la presente memoria se basa en la descripción y análisis de un nuevo grupo de glutaredoxinas en *S. cerevisiae*, que difiere del anterior (Grx1 y Grx2) en que sólo poseen una cisteína en su centro activo (Pro-Lys-Cys-Gly). Este grupo de **glutaredoxinas monotiólicas** está formado por Grx3, 4 y 5, codificadas por los respectivos genes *GRX3*, *GRX4* y *GRX5* (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). En contraste, Grx1 y Grx2, con dos residuos cisteína en su centro activo, definirían las **glutaredoxinas ditiólicas**. Glutaredoxinas de los dos grupos, monotiólicas y ditiólicas, coexisten en organismos desde bacterias hasta humanos.

Para reducir las proteínas ditioladas, las glutaredoxinas monotiólicas utilizarían un mecanismo diferente al usado por las ditiólicas (**Figura 5**). En el primer paso del **mecanismo ditiólico** la cisteína situada más al extremo N-terminal del centro activo reduce una cisteína del puente disulfuro de la proteína ditiolada, formándose un intermediario entre ésta y la glutaredoxina. En el siguiente paso, la segunda cisteína del centro activo ataca el intermediario liberándose la glutaredoxina oxidada y la proteína reducida (Bushweller *et al.*, 1992). Las glutaredoxinas monotiólicas atacan un intermediario formado entre el GSH y el puente disulfuro de la proteína oxidada

(**mecanismo monotiólico**). La glutaredoxina podría ser regenerada en un segundo paso a través de la acción de una segunda molécula de GSH, que reduciría el intermediario formado en el paso anterior entre el GSH y la glutaredoxina monotiólica oxidada (Bushweller *et al.*, 1992; Herrero y Ros, 2002).

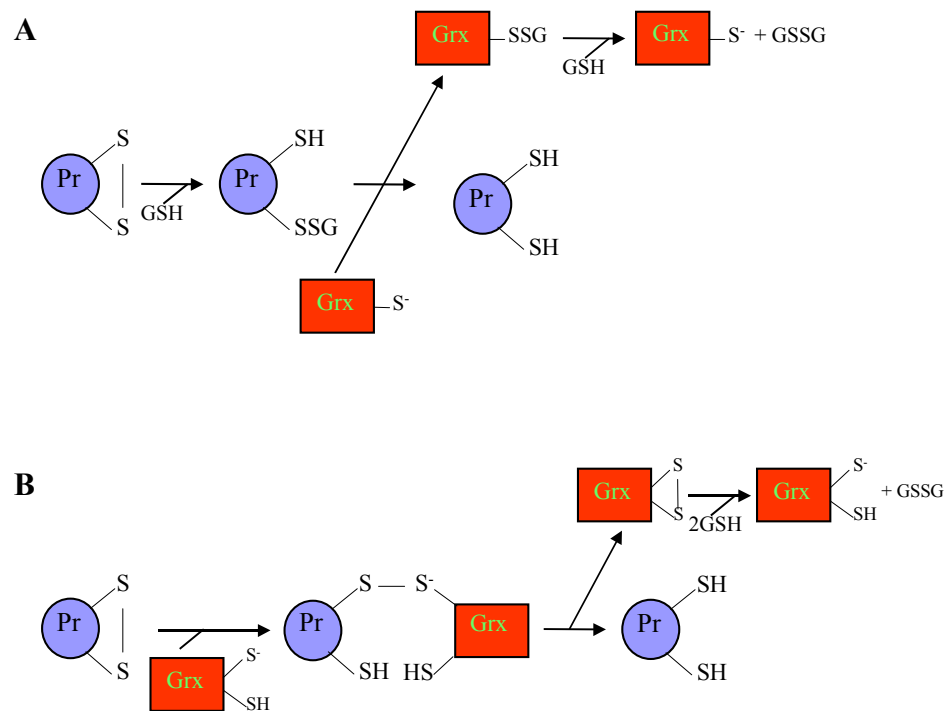


Figura 5. Mecanismo monotiólico (A) y ditiólico (B) de acción de las glutaredoxinas en *S. cerevisiae*. Pr: proteína.

4.4.2. Relación tioredoxinas-glutaredoxinas

Un punto de confluencia entre los sistemas tioredoxina y GSH/glutaredoxina en *S. cerevisiae* vendría dado por el hecho que un doble mutante *trx1 trx2* es inviable si no está presente la glutatión reductasa (codificada por *GLR1*). Esto indica que los mutantes tioredoxina necesitan GSH para sobrevivir (Muller, 1996). El triple mutante *trx1 trx2 glr1* puede crecer de manera limitada en condiciones anaeróbicas y la adición de GSH no rescata el fenotipo, lo que demuestra que el estrés oxidativo es el responsable de la letalidad de esta cepa. Otra evidencia de un solapamiento entre los dos sistemas es que la pérdida de los dos genes *TRX1* y *TRX2* conduce a un aumento de los niveles de GSSG, por lo que debe existir un vínculo entre el sistema tioredoxina y el estado redox de la célula (Muller, 1996). Además, la falta de *GLR1* en el mutante doble *trx1*

trx2 produce un aumento en los niveles de GSSG, con lo que las tioredoxinas podrían funcionar junto con Glr1 en el mantenimiento de una relación elevada GSH-GSSG dentro de la célula. De este modo, cualquier condición que conduzca a que el estado redox de los dos tioles del centro activo de las tioredoxinas sea el oxidado, afectará también al estado redox del GSH y, por tanto, al del sistema glutaredoxina (Grant, 2001). Se desconoce si el estado redox de las glutaredoxinas puede afectar el sistema tioredoxina, pero la delección de *GRX1* o *GRX2* no afecta el estado redox del GSH (Luikenhuis *et al.*, 1998).

El cuadruple mutante *trx1 trx2 grx1 grx2* es inviable y una tioredoxina o glutaredoxina ditiólica es necesaria y suficiente para el crecimiento (Draculic *et al.*, 2000). La razón concreta de este requerimiento es desconocida. En bacterias se han obtenido resultados parecidos, de modo que es necesario un sistema disulfuro reductasa para la viabilidad de las células (Prinz *et al.*, 1997). Ni las glutaredoxinas monotiólicas ni el sistema tioredoxina mitocondrial de *S. cerevisiae* parecen poder substituir la función esencial de los sistemas tioredoxina y glutaredoxina citoplasmáticos.

4.5. OTRAS OXIDOREDUCTASAS MICROBIANAS

En *E. coli*, una **alquil hidropéroxido reductasa** (codificada por *ahpCF*) convierte los hidropéroxidos lipídicos y otros hidropéroxidos (ROOH) en el correspondiente alcohol, usando NADH o NADPH como agente reductor (**Figura 6a**) (Jacobson FS *et al.*, 1989). La enzima está formada por dos componentes, la subunidad AhpC, que actúa sobre el substrato, y la flavoproteína AhpF, que puede usar NADH o NADPH para reducir la AhpC oxidada. El dominio C-terminal de AhpF es homólogo a la tioredoxina reductasa y contiene un centro disulfuro redox activo (Tartaglia *et al.*, 1990). El dominio N-terminal de AhpF también contiene un centro disulfuro redox activo, por lo que se puede interpretar que AhpF realiza una función intermedia entre una tioredoxina y una tioredoxina reductasa (Poole, 1996). Mutantes en los cuales el operón *ahpCF* ha sido eliminado son ligeramente sensibles a H₂O₂ y muy sensibles a hidropéroxido de cumeno, lo que indica que los productos del operón presentan actividad antioxidante (Storz *et al.*, 1989). La expresión de *ahpCF* está regulada por OxyR (Tartaglia *et al.*, 1989).

Se han descrito otras actividades peroxidasa en *E. coli*. Así, *tpx* codifica una peroxidasa periplasmática que podría proteger contra el daño en el DNA y la inactivación de la glutamina sintetasa causada por la oxidación (Cha *et al.*, 1995). La peroxidasa codificada por *bcp* presenta una actividad similar a la codificada por *tpx* (Jeong *et al.*, 2000). Mutantes en ambos genes son sensibles a oxidantes (Cha *et al.*, 1996; Jeong *et al.*, 2000). La expresión de estos genes no ha sido estudiada en detalle.

Las **glutación peroxidadas** son una de las principales defensas contra peróxidos en células de mamíferos. No están presentes en bacterias, pero en *S. cerevisiae* se han detectado tres genes, *GPX1*, *GPX2* y *GPX3*, que codifican para homólogos de glutación peroxidadas (Galiazzo *et al.*, 1987). El mecanismo de actuación de estas peroxidadas está reflejado en la **Figura 6b**. Sólo el mutante *gpx3* muestra sensibilidad a estrés oxidativo y ni los mutantes simples *gpx1* y *gpx2* ni el doble *gpx1 gpx2* presentan un fenotipo evidente (Inoue *et al.*, 1999).

En *S. cerevisiae* se han descrito los productos de cinco genes que poseen homología con la subunidad AhpC de *E. coli*. La primera de estas proteínas (codificada por *TSA1*) fue purificada en base a que protege contra daño oxidativo a la glutamina sintetasa (Kim *et al.*, 1988). Esta proteína se llamó proteína antioxidante específica para tioles (TSA) porque protege contra estrés oxidativo en proteínas que contengan exclusivamente tioles. Investigaciones posteriores han revelado que Tsa1 es una peroxidasa que reduce H_2O_2 y ROOH usando el hidrógeno que proviene de la tioredoxina, tioredoxina reductasa y NADPH (**Figura 4a**) (Chae *et al.*, 1994). Esta actividad ha sido denominada **tioredoxina peroxidasa** (TPx) y se ha visto que también está presente en procariotas y otros eucariotas además de la levadura. Concretamente, en mamíferos se han identificado al menos seis tipos de TPx. Se ha identificado un segundo gen, *AHP1* o *TSA2* cuyo producto también requiere la tioredoxina y la tioredoxina reductasa para su actividad *in vivo* e *in vitro* (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Tsa1 reduce preferentemente H_2O_2 , mientras que Ahp1, reduce compuestos ROOH (Jeong *et al.*, 1999). El mutante *tsa1* es sensible a H_2O_2 y t-butil hidroperóxido, mientras que el mutante *ahp1* sólo a t-butil hidroperóxido (Park *et al.*, 2000). La expresión de los genes *TSA1* y *AHP1* está inducida por H_2O_2 de manera dependiente de Yap1 y Skn7. Los productos de los genes *YDR453C*, *YBL064C* y *YIL010W* muestran homología con Tsa1 y Ahp1 y también presentan actividad peroxidasa dependiente de tioredoxina (Park *et al.*, 2000). Muy recientemente, cada isoforma TPx ha sido denominada según su localización celular (Hong *et al.*, 2002). Así, distinguimos:

- TPx citoplasmáticas: cTPx I (Tsa1), cTPx II (YDR453c) y cTPx III (Tsa2, Ahp1).
- TPx mitocondrial: mTPx (YBL064c).
- TPx nuclear: nTPx (YIL010w).

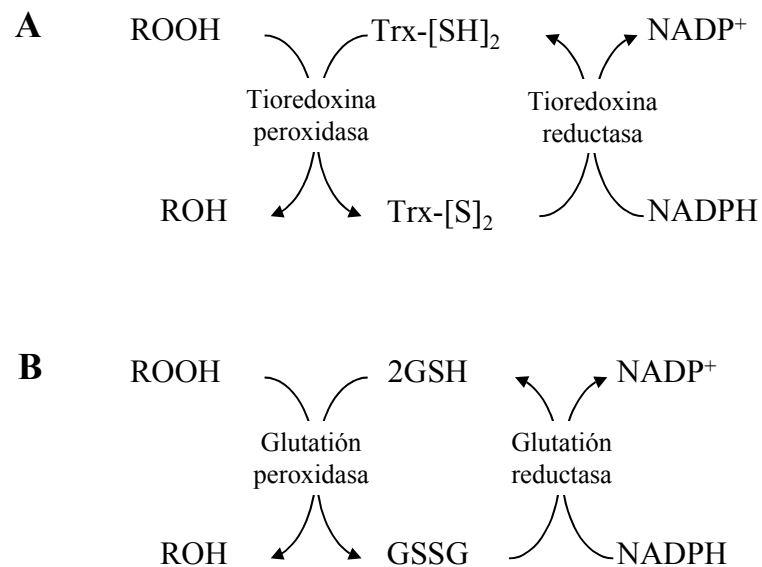


Figura 6. Eliminación de peróxidos por peroxidasas dependientes de tioredoxina (A) y GSH (B). ROOH: hidroperóxido; ROH: hidroxilo. R puede ser un hidrógeno o una cadena hidrocarbonada.

4.6. GLUTAREDOXINAS Y TIOREDOXINAS EN CÉLULAS ANIMALES

En células animales se han descrito dos sistemas tioredoxina, uno en el citosol y otro en la mitocondria (Lee *et al.*, 1999; Pedrajas *et al.*, 2000). Así mismo, se han descrito dos glutaredoxinas en humanos, ambas con el motivo Cys-Pro-Tyr-Cys en el centro activo: la glutaredoxina 1 (Grx1), localizada en el citosol (Padilla *et al.*, 1995), y la glutaredoxina 2 (Grx2), mitocondrial y nuclear (Gladyshev *et al.*, 2001; Lundberg *et al.*, 2001). Grx2 presenta un 36 % de identidad de secuencia con Grx1, y ambas son sensibles a inactivación por H₂O₂. Por tanto, ambas estarían implicadas en la protección contra estrés oxidativo en células animales.

En relación con las glutaredoxinas monotiólicas objeto de este trabajo, se ha descrito en células de mamíferos una proteína llamada PICOT (PKC-interacting cousin of thioredoxin), que interacciona con la isoforma δ de la proteína quinasa C. Está localizada en el citosol y regularía negativamente la función de PKC δ y la activación de células T (Witte *et al.*, 2000). La proteína PICOT humana, de 37.5 kDa, presenta un dominio N-terminal homólogo a secuencias de tioredoxinas, seguido de dos repeticiones de un motivo altamente conservado (Witte *et al.*, 2000). Este dominio se ha llamado PICOT-HD (PICOT homology domain) (Isakov *et al.*, 2000) y presenta homología con las glutaredoxinas monotiólicas de la levadura. En este sentido, Grx3, Grx4 y Grx5 han sido incluidas dentro de la familia PICOT-HD, junto a hipotéticas glutaredoxinas de otros organismos (Isakov *et al.*, 2000). En eucariotas inferiores como *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* sólo está presente uno de los dominios PICOT-HD, mientras que en *Arabidopsis thaliana* se han descrito tres repeticiones (**Figura 7**) (Isakov *et al.*, 2000).

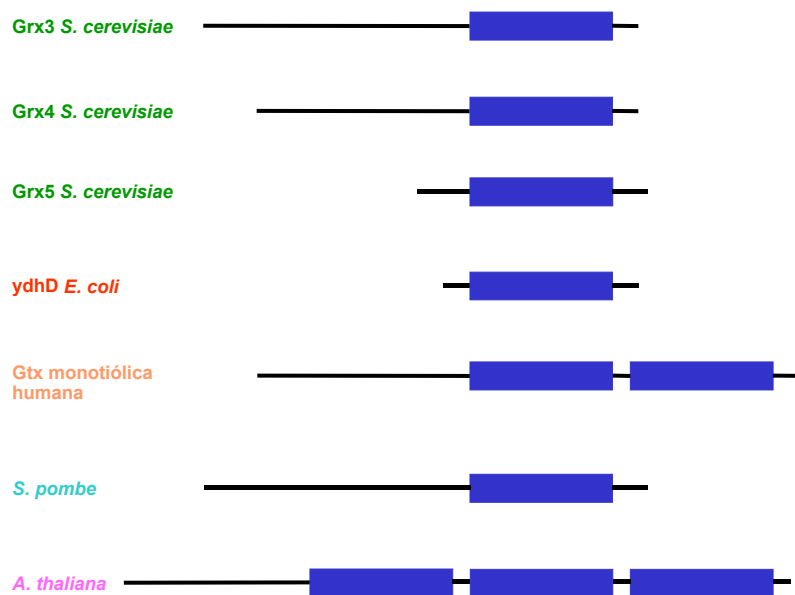


Figura 7. Representa esquemática de los dominios homólogos de proteínas PICOT (en azul) de algunos organismos.

5. BIOSÍNTESIS DE CENTROS Fe/S

5.1. GENERALIDADES

Las proteínas con centros Fe/S llevan a cabo funciones importantes en diferentes procesos de transporte de electrones y en reacciones enzimáticas (Beinert y Kiley, 1999). Dichas proteínas están presentes en todos los organismos y son especialmente sensibles a oxidantes. En células eucariotas se conocen proteínas con centros Fe/S en la mitocondria (como la aconitasa y subunidades de los complejos respiratorios I, II y III), en el citosol (como la glutamato sintasa y la isopropil malato sintasa, Leu1) y en el núcleo (como la endonucleasa Ntg2 de *S. cerevisiae*) (Lill *et al.*, 1999).

Los centros Fe/S son grupos prostéticos que, además de participar en reacciones redox, están implicados en el reconocimiento de sustratos, la captación de estímulos ambientales y la regulación de la expresión de proteínas (Beinert y Kiley, 1999). Los centros Fe/S más comúnmente encontrados en proteínas son [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]. La biosíntesis de estos centros no se conoce todavía con detalle, pero ha de estar altamente regulada, ya que, como se ha comentado anteriormente, el exceso de hierro es tóxico y, a través de la reacción de Fenton, se generan radicales libres que dañan las membranas celulares, las proteínas, el DNA y los propios centros Fe/S (Imlay *et al.*, 1988). Las primeras investigaciones sobre la síntesis de proteínas con centros Fe/S se realizaron en bacterias (Zheng L *et al.*, 1998). Más tarde se observó que bastantes de los genes bacterianos implicados tienen su homólogo en eucariotas (Lill y Kispal, 2000). A lo largo de esta memoria se demostrará que una de las glutaredoxinas monotiólicas está implicada en la síntesis de centros Fe/S en la levadura, por lo que aquí se va a tratar con cierto detalle la síntesis de estos centros, especialmente en *S. cerevisiae*.

5.2. BIOSÍNTESIS DE CENTROS Fe/S EN BACTERIAS

Las primeras enzimas de la biosíntesis de centros Fe/S identificadas fueron las del operon *nif* (nitrogen fixation), que codifica proteínas implicadas en la biosíntesis de la nitrogenasa en la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*. Estudios genéticos en esta bacteria mostraban que la ausencia de dos de los genes del operon *nif*, *nifS* o *nifU*, producía la pérdida de la actividad nitrogenasa (Jacobson MR *et al.*, 1989). Aunque la apoproteína era sintetizada, los centros Fe/S esenciales para la actividad

estaban ausentes, lo que implicaba que *nifS* y *nifU* participan en la biosíntesis de dichos centros. La identificación de otros componentes de la maquinaria de síntesis de centros Fe/S en bacterias ha sido realizada tanto en *A. vinelandii* como en *E. coli*. La proteína NifS presenta actividad cisteína desulfurasa, que libera azufre a partir de cisteína para la biosíntesis de los centros. Otros genes del operón *nif* son *nifV* y *nifM* (Kennedy y Dean, 1992). Posteriormente se identificó la proteína IscS (iron-sulfur cluster synthesis) en *A. vinelandii* y en *E. coli*; esta proteína presenta similitud de secuencia con NifS (Flint, 1996; Zheng L *et al.*, 1998). Al contrario que *nifS*, *iscS* es esencial en *A. vinelandii*. Adyacentes a *iscS* se encuentran los ortólogos del operón *nif*, *iscU* e *iscA* (Zheng L *et al.*, 1998). IscU es una de las proteínas más altamente conservadas halladas en la naturaleza. Contiene tres residuos de cisteína que son esenciales para la función de la proteína (Garland *et al.*, 1999). El operón *isc* contiene cuatro genes adicionales llamados *hscB*, *hscA*, *fdx* y *orf3*. Los genes *hscB* y *hscA* muestran alto grado de homología con los genes que codifican las chaperonas del tipo DnaJ/Hsp40 y DnaK/Hsp70, respectivamente. HscB y HscA serían chaperonas que ayudarían en la maduración de las proteínas Fe/S. Similarmente a *iscS*, *hscA* es esencial en *A. vinelandii* (Zheng L *et al.*, 1998). El gen *fdx* codifica una ferredoxina con un centro [2Fe-2S] que llevaría a cabo una reducción en algún paso de la biosíntesis. Los genes *iscS*, *iscA*, *hscA* y *hscB* son esenciales para *E. coli*. Genes homólogos a *iscSUA*, *hscB/hscA* y *fdx* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en bacterias como en eucariotas inferiores y superiores.

5.3. BIOSÍNTESIS DE CENTROS Fe/S EN *S. cerevisiae*

En eucariotas las mitocondrias tienen como función principal proporcionar energía para las reacciones metabólicas. Otras funciones son la biosíntesis del grupo hemo, de cofactores y de algunos aminoácidos. Una importante función que se les ha atribuido recientemente es la biosíntesis de los centros Fe/S (Craig *et al.*, 1999; Lill *et al.*, 1999; Lill y Kisfal, 2000). En estos orgánulos se produce el ensamblaje de las proteínas Fe/S endógenas a partir de los centros Fe/S allí sintetizados y de apoproteínas importadas del citosol. Además, las mitocondrias también están implicadas en la síntesis de centros Fe/S destinados a proteínas citosólicas. Para la biosíntesis de los centros Fe/S la mitocondria utiliza un conjunto de proteínas llamado genéricamente complejo ISC

(iron-sulfur cluster assembly). Los componentes de este complejo en *S. cerevisiae* presentan una homología significativa con los encontrados en bacterias (Zheng L *et al.*, 1998). Componentes similares se han encontrado en otros eucariotas como el ser humano y las plantas. Así, se puede hipotetizar que la maquinaria ISC mitocondrial es de origen bacteriano y parece estar conservada en eucariotas inferiores y superiores.

A continuación se describirán cada uno de los componentes de la maquinaria ISC en *S. cerevisiae*. La **Figura 8** muestra un resumen del proceso. En la **Tabla 3** están representadas las proteínas conocidas que participan en la biosíntesis de centros Fe/S en *S. cerevisiae*, bacterias y humanos.

<i>S. cerevisiae</i>	Bacterias	Humanos	Función
Nfs1 ^{♦°}	NifS/IscS	hNFS1 (mit/cit/nuc)	Cisteín desulfurasa
Isu1 ^{♦°}	IscU, NifU (N-t)	IscU1 (cit)	Unen el hierro al centro Fe/S
Isu2 ^{♦°}	IscU, NifU (N-t)	IscU2 (mit)	
Nfu1 [♦]	NifU (C-t)	hNFU1	Maduración del centro Fe/S
Yah1 ^{♦°}	[2Fe-2S]-Fdx	Adrenodoxina	Participa en reacciones redox
Arh1 [°]	Fdx reductasa	Adrenodoxina reductasa	Reduce Yah1
Isa1 [♦]	IscA, HesB	hISA1	Incorporan los centros Fe/S a las apoproteínas
Isa2 [♦]	IscA, HesB		
Jac1 [°]	Hsc20 (hscB)		Proporciona especificidad de sustrato a Ssq1
Ssq1 [♦]	Hsc66 (hscA)		Protección de residuos cisteína
Atm1 [♦]	Atm1 (sólo en <i>Rickettsia prowazekii</i>)	hABC7	Transportador ABC de los centros Fe/S hacia el citosol
Yfh1 [♦]		Frataxina	Homeostasis del hierro; biosíntesis de centros Fe/S (?)
Bat1		BCAT	Exportación del centro Fe/S al citosol (?)
Bat2			

♦La delección del gen causa acumulación de hierro en la mitocondria.

°La delección del gen es letal. En el caso de las proteínas Isu1/2 la doble delección es letal.

Tabla 3. Componentes involucrados en la biosíntesis de centros Fe/S en *S. cerevisiae*, bacterias y humanos.

5.3.1. La proteína Nfs1

Nfs1 fue descubierta como supresora de un defecto en el procesamiento de tRNA (Kolman y Soll, 1993). Está localizada en la matriz mitocondrial (Nakai *et al.*, 1998; Kispal *et al.*, 1999), aunque investigaciones recientes han demostrado que, además, presenta una señal de localización nuclear (Nakai *et al.*, 2001). Mutantes en *NFS1* han sido aislados como supresores de los defectos auxotróficos y la sensibilidad a oxígeno causados por la delección de *SOD1* (Strain *et al.*, 1998). Nfs1 es homóloga de las proteínas bacterianas NifS y IscS, que actúan como cisteín desulfurasas. De hecho, la expresión de IscS de *E. coli* en la mitocondria de levadura reemplaza la falta de Nfs1, lo que indica que ambas proteínas tienen funciones similares (Kispal *et al.*, 1999). Por lo tanto, Nfs1 proporciona azufre elemental a partir de la cisteína para la síntesis del centro Fe/S. Esta actividad es requerida tanto para la síntesis de los centros Fe/S mitocondriales como para los citosólicos. Además, su función es ejecutada sólo cuando se encuentra en la mitocondria, ya que cuando Nfs1 o NifS se expresan en el citosol no se produce síntesis de los centros Fe/S (Kispal *et al.*, 1999). Nfs1 es esencial, y las actividades de enzimas con centros Fe/S (como la aconitasa o la succinato deshidrogenasa) disminuye cuando Nfs1 falta o está inactiva (Li *et al.*, 1999).

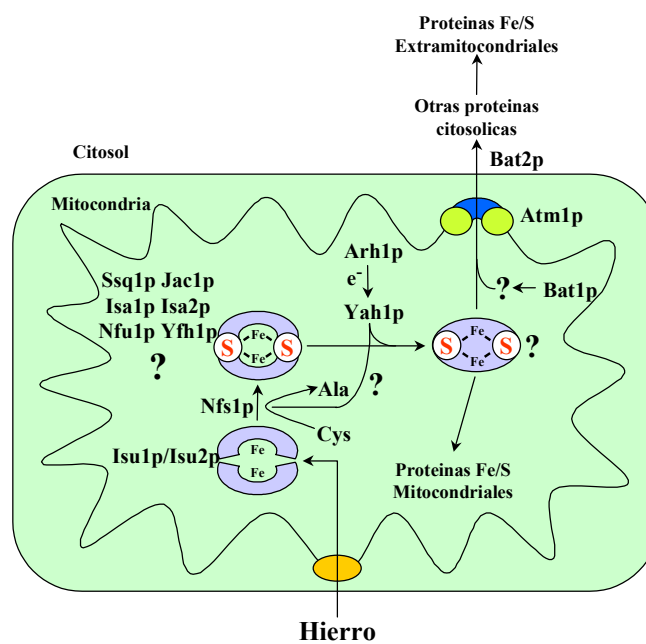


Figura 8. Representación hipotética de la biosíntesis de los centros Fe/S en la mitocondria. Ver texto para detalles.

Se le ha asignado a Nfs1 también una función en la captación y distribución del hierro intracelular (Li *et al.*, 1999). Así, en un mutante *nfs1* los niveles de hierro mitocondriales están fuertemente elevados (Kispal *et al.*, 1999), mientras que la cantidad de hierro presente en el citoplasma es menor que en la célula salvaje (Li *et al.*, 1999). No está claro cómo Nfs1 lleva a cabo esta función en relación con la homeostasis del hierro. En consonancia con ello, mutaciones en otros componentes de la maquinaria ISC de la levadura también acumulan hierro en la mitocondria (**Tabla 3**).

5.3.2. Las proteínas Isu1 e Isu2

Isu1 e Isu2 presentan una secuencia similar a las proteínas bacterianas IscU y a la región N-terminal de NifU (Fu *et al.*, 1994). Ambas proteínas se encuentran en la matriz mitocondrial (Garland *et al.*, 1999). La delección de cada uno de los genes *ISU* por separado produce defectos muy débiles en el crecimiento de las células; sin embargo, la doble delección es letal y causa una pérdida de la función de las proteínas Fe/S en la mitocondria (Mühlenhoff y Lill, 2000). Estos defectos pueden ser suprimidos cuando se introduce IscU en la mitocondria, demostrando que las proteínas Isu1/2 e IscU presentan funciones similares, uniéndose a hierro y sirviendo de base para el ensamblaje de los centros Fe/S. Al igual que su homóloga bacteriana, las proteínas Isu1/2 contienen residuos cisteína en el centro activo, siendo necesarios para la función de las proteínas (Mühlenhoff y Lill, 2000). Isu1 e Isu2 podrían formar homo o heterodímeros, pero se desconoce su función bioquímica concreta.

5.3.3. La proteína Nfu1

Las proteínas Isu1/2 podrían interactuar con Nfu1, que presenta una región similar a la región C-terminal de NifU. La delección de *NFUI* no produce consecuencias graves para la biosíntesis de centros Fe/S, por lo que Nfu1 es dispensable. En cambio, la inactivación conjunta de *NFUI* e *ISU1* sí causa un defecto significativo en el crecimiento y una fuerte reducción de las actividades de proteínas Fe/S mitocondriales (Schilke *et al.*, 1999). La interacción genética entre *NFUI*, *ISU1* y *SSQ1* (ver el apartado 5.3.7) sugiere que Nfu1 está involucrada en la biosíntesis de los centros Fe/S, pero su función bioquímica exacta no está clara.

5.3.4. La ferredoxina Yah1 y su reductasa Arh1

Al menos uno de los pasos de la biosíntesis de los centros Fe/S implica una reacción de reducción. En *S. cerevisiae* los electrones son transferidos a través de una cadena de transporte de electrones compuesta por la proteína homóloga de la adrenodoxina de humanos, Arh1, y la ferredoxina Yah1 (Barros y Nobrega, 1999). Arh1 es la reductasa de la ferredoxina y contiene un centro [2Fe-2S] (Lange *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). La adrenodoxina humana no complementa la delección de *ARH1* en *S. cerevisiae* (Manzella *et al.*, 1998).

Las ferredoxinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular que intervienen en diferentes procesos redox celulares (Matsubara y Saeki, 1992). Contienen un centro Fe/S en su centro redox activo. La regeneración de la forma reducida de estas proteínas se produce gracias a las ferredoxina reductasas, las cuales ganan los electrones por oxidación del NAD(P)H.

Yah1 y Arh1 son mitocondriales y están codificadas por genes esenciales. Su inactivación produce un defecto en la maduración de proteínas Fe/S (Lange *et al.*, 2000). Además, la delección de Yah1 conlleva una acumulación drástica de hierro en la mitocondria.

Los pasos de la biosíntesis de centros Fe/S que podrían requerir electrones (y por tanto la función de Yah1 y Arh1) son los siguientes (Lange *et al.*, 2000):

- a) La producción de azufre elemental por Nfs1.
- b) La reducción del hierro después de su importación a la matriz mitocondrial para evitar su precipitación en forma de ion férrico insoluble.
- c) La reducción de proteínas intermediarias (por ejemplo Isu1 e Isu2) en la biosíntesis de los centros.

5.3.5. Las proteínas Isa1 e Isa2

Estas dos proteínas presentan similaridad de secuencia con las bacterianas IscA y contienen tres cisteínas que se encuentran conservadas en proteínas del tipo IscA de bacterias, hongos, plantas y mamíferos (Jensen y Culotta, 2000; Kaut *et al.*, 2000). Estas tres cisteínas son esenciales para la función de Isa1 e Isa2 y podrían formar un motivo de unión a hierro. La delección de *ISAI* o *ISA2* produce un aumento de los niveles de

hierro mitocondriales, que podría ser la causa de la pérdida del DNA mitocondrial descrita en estos mutantes (Jensen y Culotta, 2000). Debido a ello, células sin uno de estos dos genes presentan un crecimiento más lento que células salvajes en presencia de fuentes de carbono fermentables (glucosa) y no crecen en fuentes de carbono no fermentables (glicerol). Células mutadas en uno o en los dos genes *ISA* son viables, por lo que las proteínas realizan una función dispensable. Sin embargo, son necesarias para una actividad normal de las enzimas mitocondriales aconitasa y succinato deshidrogenasa y para la citosólica isopropil malato sintasa (Jensen y Culotta, 2000; Kaut *et al.*, 2000; Pelzer *et al.*, 2000). No se conoce el papel exacto de estas proteínas, pero dado el carácter conservado de sus residuos cisteína podrían unirse de dos maneras al centro Fe/S en formación (Mühlenhoff y Lill, 2000):

- a) Las proteínas Isa podrían transferir el centro Fe/S desde las proteínas Isu a las apoproteínas.
- b) Las proteínas Isa podrían unirse a hierro y transferir este metal a las proteínas Isu antes de su unión al centro Fe/S.

Debido a que la ausencia de *ISA1* o *ISA2* produce efectos fenotípicos similares, ambas proteínas actuarían en el mismo paso de la síntesis quizás formando heterodímeros (Mühlenhoff y Lill, 2000). Sin embargo, como veremos más adelante en esta memoria, sus funciones no son totalmente superponibles.

5.3.6. Las chaperonas Ssq1 y Jac1

La biosíntesis de centros Fe/S parece requerir las chaperonas Ssq1 y Jac1. En *S. cerevisiae* existen dos grandes familias de chaperonas (Craig *et al.*, 1993):

1. Chaperonas **Hsp70**, localizadas en diferentes compartimentos celulares (mitocondrias, retículo endoplasmático y citosol), tanto en eucariotas como en procariotas. Son responsables de la protección de las proteínas contra diferentes tipos de estrés uniéndose a ellas y estabilizándolas en una reacción dependiente de ATP.
2. Chaperonas **Hsp60**, presentes en mitocondrias y citosol en levaduras y también en otros eucariotas y en procariotas. En levaduras estas chaperonas facilitan el plegamiento y ensamblaje de proteínas de manera dependiente de ATP.
3. Otras familias de chaperonas no mayoritarias son:

3.1. Chaperonas **Hsp 90**, altamente conservadas en bacterias, levaduras y mamíferos. En levaduras están localizadas en el citoplasma y estabilizarían proteínas no plegadas hasta que éstas fueran adecuadamente compartimentalizadas.

3.2. Chaperona **Hsp104**. En condiciones normales se expresa a muy bajos niveles y es fuertemente inducible por choque térmico. Su función sería regular una proteasa o prevenir la agregación de estructuras en condiciones de estrés.

En *S. cerevisiae* se han identificado tres especies de Hsp70 en la mitocondria:

- i) **Ssc1**, que es la chaperona mayoritaria; participa en la translocación de proteínas del citosol a la mitocondria, función en la que interacciona con la proteína de la membrana mitocondrial interna Tim44 (Voos *et al.*, 1996). Además, Ssc1 funciona como una chaperona clásica en el plegamiento y ensamblaje de proteínas. En este caso, Ssc1 coopera con la chaperona del tipo DnaJ, Mdj1 (Horst *et al.*, 1997). La actividad ATPasa de Ssc1 es regulada por el miembro de la familia GrpE, Mge1, que funciona como un factor de intercambio de nucleótidos (Westermann *et al.*, 1995).
- ii) **Ecm10**, que presenta un alto grado de similaridad de secuencia con Ssc1 y cuya función no está clara (Baumann *et al.*, 2000).
- iii) **Ssq1**, que es una proteína no esencial unas dos mil veces menos abundante que Ssc1. Es homóloga de la chaperona bacteriana Hsc66.

Una delección en *SSQ1* provoca que las células sean sensibles al frío y que pierdan el DNA mitocondrial (Schilke *et al.*, 1996). Ssq1 está involucrada en el metabolismo del hierro, ya que en su ausencia se produce una acumulación de este metal en la matriz mitocondrial y un defecto de crecimiento en un medio con elevados niveles de hierro. Mutantes en *SSQ1* muestran defectos en el ensamblaje de enzimas mitocondriales con centros Fe/S (Lutz *et al.*, 2001). Aunque Ssq1 no está implicada en la importación y procesamiento de proteínas, sí se ha descrito que podría estar involucrada en la biogénesis del homólogo de la frataxina humana en levaduras, Yfh1, proteína también implicada en la homeostasis del hierro (Voisine *et al.*, 2000). Este proceso tiene que ser indirecto, ya que Yfh1 no parece ser un sustrato de Ssq1 (Voisine *et al.*, 2000).

El hecho que Ssq1 sea menos abundante que Ssc1 sugiere una función más especializada para aquella proteína. Sin embargo, *SSQ1* no es un gen esencial, a diferencia de otros genes que intervienen en la biosíntesis de centros Fe/S (**Tabla 3**). Además, la sobreexpresión de Ssc1 suprime, al menos parcialmente, los defectos de un mutante *ssq1*, lo que sugiere una superposición de las funciones de las dos chaperonas (Voisine *et al.*, 2000). Ssq1 tampoco interacciona con Mdj1, por lo que no juega un papel de chaperona clásica (Schmidt, *et al.*, 2001).

Recientemente se ha descrito una interacción genética entre mutantes en los genes *JAC1* y *SSQ1*. Mutaciones en cualquiera de estos genes se identificaron como supresores de la sensibilidad a oxígeno de un mutante *sod1*, al igual que el mutante *nfs1* (Strain *et al.*, 1998). Se han descrito también defectos en las enzimas aconitasa y succinato deshidrogenasa en los mutantes *jac1* y *ssq1* (Strain *et al.*, 1998; Voisine *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha podido comprobar una interacción directa entre ambas proteínas. Jac1 es homóloga de la chaperona bacteriana de tipo J, Hsc20 y, a diferencia de Ssq1, es una proteína esencial (Strain *et al.*, 1998). La función principal de las chaperonas de tipo J es proporcionar especificidad de sustrato a las chaperonas Hsp70 (Cyr *et al.*, 1994). De este modo, Jac1 podría ser esencial para dirigir Ssq1 a sustratos específicos. Jac1 está presente en la matriz mitocondrial en una concentración mucho más elevada que Ssq1 (Voisine *et al.*, 2000; Voisine *et al.*, 2001), por lo que probablemente interaccione adicionalmente con otras proteínas, quizá con Ssc1.

No se conoce en qué pasos de la biosíntesis de centros Fe/S podrían actuar estas chaperonas, habiéndose propuesto diferentes posibilidades (Münhlehoff y Lill, 2000):

- a) Estas proteínas podrían unirse a las apoproteínas antes de su ensamblaje con el centro Fe/S y proteger así sus residuos cisteína.
- b) Se podrían unir a proteínas involucradas en la biogénesis de centros Fe/S previniendo la oxidación de sus residuos cisteína. Un buen candidato para ello sería Nfu1, dado que se ha descrito que interacciona genéticamente con Ssq1 (Schilke *et al.*, 1999).
- c) Estas chaperonas podrían participar en la transferencia de los centros Fe/S de las proteínas Isu a las apoproteínas.

5.3.7. El transportador ABC, Atm1

Muchas de las proteínas Fe/S conocidas son mitocondriales, pero también las hay localizadas en el citosol. Ejemplos de éstas son la glutamato sintasa, una subunidad de la sulfito reductasa, la isopropil malato sintasa y la proteína reguladora del hierro en mamíferos (IRP-1). En *S. cerevisiae* existe, al menos, una proteína Fe/S en el núcleo, la endonucleasa Ntg2.

La maduración de las proteínas Fe/S extramitocondriales depende de la maquinaria mitocondrial ISC (Kispal *et al.*, 1999). Así, Nfs1 y las proteínas Isu1/2 intervienen en la maduración de proteínas citosólicas sólo cuando se hallan localizadas en la mitocondria (Kispal *et al.*, 1999; Münhlehoff y Lill, 2000).

De este modo, los centros Fe/S de proteínas citosólicas son formados en la matriz mitocondrial y luego exportados al citosol. Existen dos mecanismos posibles para este proceso:

- a) Las apoproteínas podrían ser importadas desde el citosol a la matriz mitocondrial, donde se ensamblarían al centro Fe/S para posteriormente ser exportadas las holoproteínas al citosol. Esto parece poco probable, ya que no se ha visto una acumulación de apoproteínas en la mitocondria cuando existe un defecto en la biosíntesis de centros Fe/S. Tampoco se ha descrito un mecanismo de transporte de holoproteínas desde la matriz al citosol.
- b) El centro Fe/S formado en la mitocondria sería exportado al citosol. En este caso, el inconveniente sería la labilidad del centro Fe/S, por lo que durante su transporte tendría que ser estabilizado por quelación.

Apoiando el segundo mecanismo, se ha identificado un transportador ABC en *S. cerevisiae*, Atm1, que está implicado en la exportación de centros Fe/s al citosol (Kispal *et al.*, 1999). Los transportadores ABC (ATP binding cassette) comprenden una familia de proteínas que catalizan el transporte activo de una amplia variedad de substratos a través de las membranas (Higgins, 1995). Se han encontrado transportadores ABC en la membrana plasmática y en las membranas intracelulares de orgánulos como los peroxisomas, las vacuolas, las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Atm1 está localizada en la membrana mitocondrial interna, con el dominio de unión al nucleótido situado hacia la matriz mitocondrial. Atm1 está involucrada específicamente en la formación de centros Fe/S citosólicos. Ni la ausencia del gen *ATM1* (Kispal *et al.*, 1997) ni su inactivación (Kispal *et al.*, 1999) tienen un efecto significativo en la función de proteínas Fe/S mitocondriales. En cambio, la actividad de proteínas Fe/S citosólicas como Leu1 se ve disminuída drásticamente. Por lo tanto, Atm1 media la exportación de

los componentes del centro Fe/S necesarios para su incorporación a proteínas citosólicas. La ausencia de *ATM1* causa también una acumulación de hierro en la matriz mitocondrial (Kispal *et al.*, 1997). *Atm1* parece estar muy conservada en eucariotas y se han descrito los homólogos en humanos (hABC7) (Bekri, *et al.*, 2000 ; Csere *et al.*, 1998) y en *Arabidopsis thaliana* (Sta1) (Kushnir *et al.*, 2001).

5.3.8. Las proteínas Bat

Se han descrito dos proteínas adicionales necesarias para la maduración de las proteínas Fe/S citosólicas. *Bat1* está localizada en la mitocondria y *Bat2* en el citosol. Ambas fueron originalmente identificadas como aminoácido transaminasas que catalizan el último paso de la síntesis de leucina, isoleucina y valina (Eden *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1996). Debido a un defecto en la actividad de proteínas Fe/S citosólicas cuando las proteínas *Bat* no están presentes, se les ha asignado una función adicional. (Prohl *et al.*, 2000). Ello estaría en consonancia con la interacción genética entre *ATM1* y *BAT1*. Sin embargo, la función bioquímica de las proteínas *Bat* no está clara. Quizá podrían catalizar la síntesis de un quelante de bajo peso molecular que facilitaría la exportación de los centros Fe/S formados en la matriz mitocondrial.

5.3.9. Homeostasis del hierro

La ausencia de muchos de los genes de la biosíntesis de los centros Fe/S produce una acumulación de hierro en la mitocondria (**Tabla 3**). También se ha descrito un aumento de hierro mitocondrial en células mutadas en el gen *YFHI*, acompañado de una disminución del hierro citosólico y daño en el DNA mitocondrial (Babcock *et al.*, 1997; Foury y Cazzalini, 1997). La acumulación de hierro en la mitocondria produce que las células sean más sensibles a oxidantes vía reacción de Fenton. *YFHI* es el homólogo en *S. cerevisiae* del gen que codifica para la frataxina humana. Defectos en el gen de la frataxina causan la ataxia de Friedreich, una enfermedad neurodegenerativa que afecta a una de cada cincuenta mil personas (Harding, 1981). Tanto la frataxina humana como su homóloga en levaduras están localizados en la mitocondria.

La disminución del hierro citosólico observado en mutantes *yfh1* produce una inducción del sistema de captación de hierro de alta afinidad, concretamente de la expresión de los genes *FET3* y *FTR1* (Babcock *et al.*, 1997; Hasset *et al.*, 1998). Tanto *Yfh1* como la frataxina humana están implicados en mantener la homeostasis del hierro

mitocondrial, lo que implica que en condiciones normales exista un flujo de hierro a través de la mitocondria (Radisky *et al.*, 1999). Yfh1 no puede ser un transportador de hierro mitocondrial porque no contiene secuencias transmembrana, pero podría mediar el transporte a través de Atm1. Sin embargo, no se ha observado ninguna interacción bioquímica entre Yfh1 y Atm1. La ausencia de Yfh1, además, produce defectos en la formación de proteínas Fe/S, por lo que dicha proteína también estaría implicada directa o indirectamente en la maduración de los centros Fe/S (Foury, 1999; Rötig *et al.*, 1997).

Células defectuosas en *YFHI* muestran un defecto en el crecimiento en fuentes de carbono fermentables, como resultado de la generación de mutantes ρ^- . Estos mutantes se caracterizan por un defecto o pérdida del DNA mitocondrial y una imposibilidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa (Babcock *et al.*, 1997). Así, una pérdida de *YFHI* conlleva una pérdida de la función mitocondrial.

Recientemente se han mostrado evidencias, contrapuestas a las anteriores, de que la frataxina ejerce su función primaria en la fosforilación oxidativa y su papel en la regulación de la homeostasis del hierro mitocondrial sería secundario, ya que ésta depende de ATP (Ristow *et al.*, 2000). La frataxina actuaría como activador de la fosforilación oxidativa, aumentando el potencial de la membrana mitocondrial y el contenido de ATP de la célula. En consonancia con ello, los pacientes afectados por la ataxia de Friedreich presentan primariamente una deficiencia de ATP y, como consecuencia, una alteración en el metabolismo del hierro.

En mamíferos se ha descrito una proteína Fe/S que regula la entrada de hierro en las células, llamada IRP-1 (Hentze y Kuhn, 1996; Rouault y Klausner, 1996). IRP-1 contiene un centro [4Fe-4S] en situaciones normales de hierro. Cuando la célula presenta una concentración de hierro insuficiente el centro Fe/S no está presente en IRP-1 y la apoproteína se une a unas secuencias del RNA llamadas elementos de respuesta a hierro (IRE), lo que conlleva un aumento en la expresión de proteínas involucradas en la asimilación de hierro (Hentze y Kuhn, 1996; Rouault y Klausner, 1997). Aunque IRP-1 no está presente en levaduras, podría existir un mecanismo alternativo de regulación de la entrada de hierro que implicase proteínas con centros Fe/S.

Mutaciones en la frataxina humana también producen una acumulación de hierro en la mitocondria. La deficiencia de la vitamina E en humanos causa un cuadro clínico similar a la ataxia de Friedreich (Ben Hamida, *et al.*, 1993). Sería posible que la frataxina interviniera en el transporte de hierro al exterior de la mitocondria y que cooperara con la vitamina E en proteger las células contra estrés oxidativo (Babcock *et al.*, 1997).

5.4. BIOSÍNTESIS DE CENTROS Fe/S EN HUMANOS

La maquinaria ISC mitocondrial parece estar altamente conservada en eucariotas y se han encontrado homólogos de las proteínas de levadura descritas en el apartado 5.3 en vertebrados, invertebrados, plantas y hongos. Los homólogos de humanos se resumen en la **Tabla 3** y algunos de ellos ya se han comentado al explicar los componentes de la biosíntesis de centros Fe/S en levaduras. Esta conservación conlleva que los mecanismos observados en levaduras sean relevantes para comprender la biología de los centros Fe/S en células humanas y algunas de las posibles enfermedades causadas por la desregulación de su síntesis.

En células de mamíferos la biosíntesis de centros Fe/S es más compleja que en levaduras porque podrían existir diferentes complejos ISC localizados en diferentes compartimentos celulares, no sólo en la mitocondria (Land y Rouault, 1998). En humanos se han encontrado dos proteínas IscU que se unen a hierro y que son homólogas de las proteínas IscU de bacterias y levaduras: IscU1, localizada en el citosol y en el núcleo, e IscU2, localizada en la mitocondria (Tong y Rouault, 2000). La homóloga en humanos de Nfs1 también ha sido localizada tanto en la mitocondria como en el citosol (Land y Rouault, 1998). Ello apoya la existencia de biosíntesis de centros Fe/S en diferentes compartimentos celulares.

La proteína humana hABC7 puede reemplazar la función del transportador Atm1 de levaduras (Bekri *et al.*, 2000; Csere *et al.*, 1998), y mutaciones en hABC7 producen un aumento considerable de los niveles de hierro mitocondrial (Bekri *et al.*, 2000). Parece, pues, probable que hABC7 lleve a cabo una función similar al transportador Atm1 de levaduras en la síntesis de proteínas Fe/S citosólicas y en la homeostasis del hierro en células humanas.

6. OBJETIVOS

El grupo de investigación en el que he realizado el trabajo expuesto en esta memoria participó en el Proyecto de Secuenciación del Genoma de la Levadura y posteriormente en el Proyecto de Análisis Funcional del Genoma de la Levadura. Dentro de este último, colaboró con otros laboratorios europeos en un subproyecto sobre el estudio de la relación estructura y función en familias génicas de función inicialmente desconocida. El presente trabajo trata de una de estas familias (E-201), que está formada por las ORFs *YDR098c* (*GRX3*), *YER174c* (*GRX4*) e *YPL059w* (*GRX5*).

Los objetivos concretos del trabajo han sido:

1. Obtención de mutantes simples y múltiples en los genes de la citada familia y estudio de su fenotipo.
2. Estudio genético de la relación de los productos de *GRX3-5* con otras glutaredoxinas de la levadura.
3. Estudio de la localización de los productos de *GRX3-5* y de sus funciones celulares específicas.
4. Análisis de la formación de posibles complejos con otras proteínas celulares, utilizando la técnica del doble híbrido.

Cabe remarcar también que en paralelo y en colaboración con el grupo del Dr. José Enrique Pérez-Ortín (Universidad de Valencia), se ha participado en la caracterización de la familia de genes *SNO*. Los resultados obtenidos se describen en el artículo 4, aunque no se tratan con más detalle en la memoria.