

Ana Vivancos Prellaço
Tesis Doctoral

Papel de la peroxirredoxina Tpx1 y del factor de transcripción Pap1 en la respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂

**Memoria presentada para optar al título de Doctor por la Universitat
Pompeu Fabra (UPF)**

**Dirección de la tesis: Dra. Elena Hidalgo Hernando
Unitat de Senyalització Cel·lular**

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut (CEXS)

**Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida de la Universitat
Pompeu Fabra**

Dipòsit legal: B.34198-2006
ISBN: 978-84-690-3511-5

**A mi madre
A los Juan Vivancos
A Ivan
(por orden de
aparición en mi vida)**

AGRADECIMIENTOS

Permettez-moi d'inscrire votre nom en tête de ce livre et au-dessus de sa dédicance; car c'est à vous, surtout, que j'en dois la publication ... Acceptez donc ici l'hommage de ma gratitude, qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera jamais à la hauteur de votre éloquence et de votre dévouement.

Gustave Flaubert 'Madame Bovary'

Agradezco esta tesis, por adelantado a algunos porque después serán nombrados, a todos aquellos que han participado de mi vida y la han llenado de tantas cosas buenas en el pasado, el presente y el futuro. A todos los que me han querido, muchas gracias.

A mi familia toda. Sobretudo a mi madre, sin la que no podría estar aquí; te debo tantas cosas, te quiero tanto. Eres la persona más importante de mi vida. A mi padre; me faltas más que nadie. Lo siento, no tengo palabras. A mis hermanos. Tata; me has enseñado a aplicar la lógica en la vida (aunque no se me da muy bien), la tenacidad y el esfuerzo. Te admiro por todo ello y por muchas más cosas. Nito; no pudimos estar mucho tiempo juntos. Quiero que sepas que si me he dedicado a la ciencia, en gran medida es por ti. Pepe; quizás al que más me parezco, el que me es más próximo y a la vez más distante. Eres mi referente en muchas cosas, buenas y no tan buenas, supongo que como todos los hermanos mayores. A mis cuñados José Luis y Angèlica, por formar junto a Ivan el 'selecto' club; sin vosotros no seríamos nadie. A la Lucita; mi otra madre, la que era grande y podía sentarme encima sin chafarla. La que me cuidó todas las vacaciones de mi infancia, con la que he reído tanto, la que me malcriaba. A mis abuelos, a mi tía Hannah, a Carvel, a Marcos; me habéis hecho sentir parte de vuestro núcleo, que tanto bien me hizo. Fuistéis mi familia del fin de semana, en Roda (aunque yayí, a estas alturas sigo sin saber decirlo bien). A mi yayeta; sin duda, la más especial, la más sabia y, casi seguro, la más longeva. A las nuevas hornadas; mis sobrinos estupendos; Laura, Martonet, Joan y Maria. Siempre os querré. A Cristóbal padre; Anuska y Crijin; no fue fácil, pero lo superamos con holgura. Gracias por aguantar mi adolescencia de perros y por aceptar y querer a esta rojilla. A la meva família política, m'heu rebut com si fós una més, l'Elena (la meva favorita), el Miquel, la Montserrat, el Fermí (A mi aire II) i les meves cunyadites l'Anaïs i la Berta.

A mis amigos. Sois un puntal en mi vida, aunque sé que a veces os he abandonado un poco, lo siento, soy un poco voluble, pero nunca olvido a quién quiero. A Laura, Mercè y Ril; hemos vivido tanto, hemos salido, hemos compartido todo el proceso de hacernos adultas, nos hemos enfadado, reconciliado... Laura, gracias especialmente a ti, que me comprendes más que nadie de mi entorno. Y gracias a Mercè y Ril por aguantar nuestras conversaciones tostón sobre ciencia *et al.* Gracias a Mercè, has sido la mejor amiga que he tenido en la vida, esa es la verdad. A Beli; mi otra hermana, me lo he pasado tan bien, escuchando tus historias con el mundo, durmiendo hasta en las piedras contigo (bueno, es cierto, tú no dormías), riendo de la Yoli Rayante, visitándote en Londres (cuando aún volaba). Sé que estarás ahí para siempre. Yo también. A la Sandri; mi amiga de Farmacia, eres una de mis mejores amigas, aunque se llamen más el Jordiet con el Ivy (así nos hacen de puente). A Tita; la única que ha conseguido mandarme en una poyata. Tu Heini que te quiere y que te traerá todos los eppendorf que necesites. A mis amigos vía Ivan; David, Zaida, Quim (A mi aire) y Anna. Ahora sois mis amigos también/ Ara sou també amics meus. Gràcies, Anna, per animar-me tant a continuar amb aquesta feina, en moments de prendre decisions vitals.

A Ivan, el piuchi, mi presente y mi futuro. Te ha tocado lo peor: mis preocupaciones varias, mis hipocondrías múltiples, mis contracturas, las explicaciones de mis resultados (te valoro

mucho el esfuerzo por entender quién son Pap1 y Tpx1) así que te dedico a ti especialmente esta tesis. Me has ayudado tanto y me ayudas en tantas cosas de la vida, me siento tan bien a tu lado, me comprendes y aceptas a pesar de todos mis defectos y de todas las limitaciones que la ciencia te va a representar, no puedo ser más feliz que contigo. Te quiero más que a mi vida... (no te la puedo cantar desde una hoja pero quizás es mejor que la escriba y deje de desafinarla).

A mis compañeros de viaje en el lab. Quizás soís (junto a Ivan) los que más habéis aguantado durante estos 5 años. Quiero aprovechar estas líneas para disculparme por cualquier conducta que os haya dolido/cabreado, soy consciente de que me he equivocado a veces, no iba con mala sangre. Os quiero.

Gracias mil a Elena, mi directora de tesis, cariñosamente 'la boss'. Sin ti, sencillamente no habría habido tesis, mucho menos una tan bonita y que me ha hecho amar tanto la ciencia. He aprendido mucha ciencia escuchándote, cuando te paras a pensar y de pronto saltas con esa idea estupenda. Me has enseñado más cosas que sólo ciencia: me has convertido en una persona un poco más presentable, me has ayudado a conocerme un poco mejor y me han servido de mucha reflexión nuestras charlas sobre la vida, el entorno científico, el tabaco... Por todo ello, mi cariño, mis respetos y agradecimiento eternos.

A José, gracias por todas esas miles de dudas resueltas, por tanto que he aprendido contigo, por ser tan buena gente. Gracias por tus consejos sobre ciencia y sobre la vida. Gracias por la psicoanálisis de los últimos tiempos (también gracias a Elena por su inestimable ayuda en este período). Mucha suerte en el futuro.

A la Perrita, Churripé, Estrés, gracias por tantas cosas. Por ser mi compi de poyata y cederme siempre el espacio de la llama, por ser tan amiga de lo ajeno y robarme las puntas, el sample 1X, por ponerme los preinóculos cuando he estado estresada, por esperarme para el coffee, los pitís, por maquinar el amigo invisible (sí, Miriam, siempre nos dijimos a quién teníamos), por esas uñas de espátula (es que eres imbé...), por ese Sabina, por esos warnings, los futbolines... Gracias por ser mi otra mitad en el labo.

A la Birri, llegaste dos años más tarde pero ahora no puedo imaginar el labo sin ti. Gracias por ser la DJ más pasional (y aporreamos el cerebro a veces), por tus dulces de Mallorca (que disfruto desde el recuerdo), por tus risas, tu compañerismo, por aguantar mis bromas, mi vocabulario soez, porque vas a ser una gran científica. Gracias también por el último período en la poyata, reconozco que le has hecho sombra a la P. Nos vemos fuera.

Al Malap. Gràcies per ser la persona que més m'ha demostrat el valor de la paciència i de la diplomàcia eterna, per mantenir-te a dos metres bajo tierra, per la companyia i el recolzament incondicional que sempre he tingut en tu, per escoltar les històries del papichur, per aguantar les brometes diverses, per les calçotades, en fi.

A la Mercita, ese crack en forma de técnico de laboratorio. Gracias por esa paciencia monumental, aunque somos como los yayos: todo el día roñando. Gracias por todas esas palabras nuevas, ese papel Batman, ese centro Lady Vap (IDIBAPS), están rebautizados. Me ha encantado ayudarte y que me ayudases, ver cómo eres capaz de mucho más todavía.

A Carrine Nicole, mi primera (y favorita) post-doc, gracias por el apoyo, por tu paciencia con el pitufo gruñón (aunque yo no soy gruñona), por los consejos, por los quesos que me traías 100% MG mín., por la salsa de los calçots.

A Ali (a-li-ce!), gracias por tu buen humor, cuando no estás en fase cebollita (no te preocupes, la cebollita es buena para liberar estrés), por TANTA comida riquísima (que me tienes cebada), por tener tanta paciencia conmigo, por esa personalidad generosa, por esa mamá bestial que llevas dentro, por entrar en las conversaciones tres frases después, por ser una alegría en el labo.

A Blanca. Te debo un agradecimiento especial por la paciencia de aguantar el fetiche que llevo dentro (no te preocupes, no soy peligrosa). He encontrado por primera vez a alguien que me comprende en algunos de mis sentimientos del pasado, has sido como mi hermana que me ha faltado para hablar de ello. Eres también mi alter-ego freaky de los libros. Tienes suerte, Mme. Bovary en la librería, por descubrir. En el futuro, aquí me tienes.

A Alberto, el caracartón, de su caraculet, muchas gracias por tantas bromas, esas entradas de la P. a la máquina de hielo, esos audios del Rellano.com, esas llaves de karate (que te aprovechas de los que somos más pequeños que tú. Deberías tomar ejemplo de Mónica), ese volei que me acabará rompiendo algún hueso (los Pombe Warriors se debe constituir algún día), esas señales viarias en el labo, en fin, no puedo escribirlo todo por falta de memoria y de espacio.

A mis estudiantitos: Jesusito y Albita (lo siento, tengo que usar el diminutivo con vosotros). Me habéis dado mucho más que yo a vosotros, estoy segura. Seguid con esa ilusión, me ha encantado trabajar con vosotros.

Gracias a Mónica, por esos ánimos que siempre me intentas dar, por esas prácticas contra viento y marea, por esos árboles filogenéticos tan raros que te encantan, por todas esas cosas diferentes que te caracterizan.

Gracias a los Posas: a Miquel Àngel por esas cenas en mi casa, a Laura por ser la primera que me abrió su corazón en el labo, a la Chur ets molt especial, a la Meri molta sort a Mallorca, segur que hi trobaràs la felicitat, a en Xavi que esto es sancho de ávila sin ti y radio teletaxi y olé, a la Laia per oferir-me un exemple de saber fer al laboratori (no és peloteo pel tema del tribunal), a Montse B eres un cielo y vales un montón, a Manel, Montse M, Àlex, Nuri, Marisa, Laia, por toda la paciencia y comprensión en la convivencia en el labo. Gracias a Paula, tú sí que fuiste un rayito de luz en el labo. Te he echado en falta muchas veces en el labo. La mejor de las suertes a todos.

Gracias a los genéticos, sin vuestros erlenmeyers más de un día me habría quedado sin experimentos. Gracias al mapache Lucena y a Jesús, el villano más bueno del mundo, me habéis alegrado las horas de las comidas, aunque seáis los más perros para recoger la mesa. Yo, al menos, me busco una excusa para no hacerlo y quedo bien.

Y gracias a mis escritores y músicos favoritos, me acompañáis en la vida y me llenáis de historias, sentimientos e ideas. Gracias a Sabina, porque has estado en el labo, con el eléctrico o el acústico (no sé), incombustible, estos 5 años.

INDICE

PRÓLOGO	1
INTRODUCCIÓN	5

1. ¿QUÉ SON LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO?	5
1.1. Descripción de los ROS	5
1.2. Procesos celulares en los que se generan ROS	6
1.3. Reactividad de los ROS con biomoléculas	8
1.4. Estrés oxidativo: definición	10
2. SISTEMAS DETOXIFICANTES DE ROS CELULARES	11
2.1. Sistemas no enzimáticos	11
2.1.1. Glutathiona	11
2.1.2. Tiorredoxina	12
2.1.3. Vitaminas	13
2.2. Sistemas enzimáticos	13
2.2.1. Catalasa	13
2.2.2. Glutathiona Peroxidasa (GPx)	14
2.2.3. Peroxirredoxina (Prx)	15
2.2.3.1. Clasificación de las Prx	15
2.2.3.2. Inactivación de las Prx por oxidación a sulfínico de su C _p	18
2.2.3.3. Reactivación catalizada de las Prx inactivas por formación de sulfínico	19
2.2.3.4. Implicación de las Prx en otras actividades celulares	19
2.2.4. Glutarredoxina (Grx)	20
2.2.5. Superóxido dismutasa (SOD)	21
2.2.6. Glutathiona S-transferasa (GST)	22
3. SISTEMAS SENSORES Y DE RESPUESTA CELULAR A ESTRÉS OXIDATIVO	23
3.1. Procariotas	23
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	23
3.1.1.1. OxyR	23
3.1.1.2. SoxR	25
3.1.2. <i>Bacillus subtilis</i>	25
3.1.2.1. PerR	25
3.1.2.2. OhrR	26
3.2. Eucariotas unicelulares	26
3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.2.1.1. YAP1	27
3.2.1.2. SKN7	29
3.2.2. <i>Candida albicans</i>	29
3.2.2.1 Cap1	29

3.2.2.2. Hog1	30
3.3. Eucariotas pluricelulares	31
3.3.1. AP-1	31
3.3.2. NF κ B	32
3.3.3. Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)	33
3.3.3.1. JNK	33
3.3.3.2. p38	34
3.3.4. Nrf2	34
4. RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	35
4.1. Pap1	35
4.2. Prr1	37
4.3. Sty1	38
OBJETIVOS	41
RESULTADOS Y METODOLOGÍA	45
1. CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE Pap1 EN RESPUESTA A DIFERENTES DOSIS DE H ₂ O ₂	47
1.1. La cinética de activación de Pap1 varía en función de la concentración de oxidante en el medio	47
1.2. Las cisteínas 278, 501 y 532 participan en la formación de un puente disulfuro intramolecular activador en el factor de transcripción Pap1	49
1.3. La cinética de activación de Pap1 depende de Sty1 sólo tras tratamientos con dosis altas de H ₂ O ₂	50
1.4. La preactivación de la ruta de Sty1 o la superexpresión de <i>gpx1</i> y <i>ctt1</i> acelera la activación de Pap1 tras tratamientos de altas dosis de H ₂ O ₂	52
1.5. La superexpresión de Gpx1 permite recuperar sólo parcialmente la activación de Pap1 a dosis altas de H ₂ O ₂ en una cepa Δ <i>sty1</i>	53
2. PAPEL DE LA PEROXIRREDOXINA (Prx) Tpx1 COMO SENSOR DE H ₂ O ₂ Y TRANSDUCTOR DE LA SEÑAL A Pap1.	63
2.1. La peroxirredoxina Tpx1 es requerida para la activación de Pap1	63
2.2. La activación de Pap1 a nivel transcripcional depende de las cisteínas 48 y 169 de Tpx1	66

2.3. Srx1 es requerido para la activación de Tpx1 y de Pap1 después de altas dosis de oxidante	67
2.4. Srx1 se expresa específicamente tras estrés oxidativo de manera Sty1-dependiente	69
2.5. Pap1 y Tpx1 interaccionan <i>in vivo</i>	70
2.6. Los mutantes constitutivamente nucleares de Pap1 no se oxidan en respuesta a H ₂ O ₂	73
3. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA EXISTENCIA DE UNA Prx SENSIBLE A INACTIVACIÓN POR SUSTRATO EN <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	81
3.1. Estructura de Tpx1 y relación con actividad e inactivación por sustrato	81
3.2. Estado redox de la Prx robusta en estrés oxidativo	82
3.3. La forma robusta de Tpx1 es independiente de Srx1	83
3.4. Efecto de la presencia de una peroxirredoxina robusta sobre la activación de Pap1	84
3.5. La forma resistente de Tpx1 provoca sensibilidad a oxidantes <i>in vivo</i>	85
3.6. Determinación de la actividad catalítica de Tpx1 Δ CTD	86
4. ESTUDIO DEL PAPEL DE Tpx1 EN EL CRECIMIENTO AERÓBICO DE <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	89
4.1. Aislamiento de una cepa Δ <i>tpx1</i> en anaerobiosis	89
4.2. Tpx1 es esencial en aerobiosis	90
4.3. Efecto de los residuos cisteína esenciales para la actividad peroxidasa de Tpx1 en <i>S. pombe</i>	92
4.4. La activación de las rutas de Pap1 o de Sty1 no constituyen la base del carácter esencial de Tpx1 en aerobiosis en <i>S. pombe</i>	94
5. METODOLOGÍA	97
5.1. Cepas y plásmidos	97
5.2. Técnicas experimentales	101
DISCUSIÓN	107
1. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Pap1 SE ACTIVA, A TRAVÉS DE Tpx1, EN RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO POR H ₂ O ₂ DE SEVERIDAD MODERADA	109
2. Sty1 ES REQUERIDO PARA LA REACTIVACIÓN DE Tpx1 MEDIADA POR Srx1	111
3. Tpx1 ES ESENCIAL EN AEROBIOSIS	114

4. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA EXISTENCIA DE UNA Prx SENSIBLE EN *S. pombe* 117

CONCLUSIONES 126

BIBLIOGRAFÍA 129

PRÓLOGO

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular durante procesos metabólicos como la respiración o tras la exposición a ciertos agentes ambientales como las radiaciones UV. Estas ROS pueden reaccionar con biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA e inactivar su función, por lo que las células han desarrollado actividades enzimáticas que se encargan de mantener niveles no-tóxicos de estos oxidantes. Se llama estrés oxidativo a la situación en la cual se produce un incremento en la concentración intracelular de ROS como consecuencia de un aumento en la generación o una disminución en la degradación de las mismas. En respuesta a estrés oxidativo, la célula activa rutas de señalización y factores de transcripción específicos que activan la expresión de proteínas antioxidantes encargadas de reestablecer los niveles redox intracelulares y de reparar los desperfectos causados por estos oxidantes.

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* es un organismo modelo ideal para el estudio de las respuestas a estrés oxidativo en las células eucariotas ya que posee sensores específicos a estrés oxidativo como el factor de transcripción Pap1 (*pombe AP-1-like*) y rutas de respuesta global a estrés, como las descritas en las células de mamífero, que son activadas por diferentes tipos de estrés. En el centro de esta ruta de respuesta global a estrés se encuentra la MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) Sty1.

Al inicio de esta Tesis Doctoral se sabía que existe una relación entre las vías de respuesta a estrés oxidativo por H_2O_2 , Pap1 y Sty1. Sin embargo, no se conocía la base molecular de dicha relación. En este trabajo hemos determinado que la activación de Pap1 se da en respuesta a dosis moderadas, pero no severas, de H_2O_2 . Hemos identificado a la peroxirredoxina Tpx1 como sensor y transmisor de la señal de estrés oxidativo a Pap1. La inactivación temporal de Tpx1, durante estrés oxidativo severo, por oxidación a sulfínico de su cisteína catalítica inhibe la transmisión de señal a Pap1. En dichas condiciones, se activa la ruta de Sty1, que media la inducción de Srx1, cuya función es reducir y, con ello, reactivar a Tpx1. Finalmente, hemos estudiado el papel esencial de Tpx1 en aerobiosis.

INTRODUCCIÓN

1. ¿QUÉ SON LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO?

La vida aeróbica es aquella que se da en un ambiente rico en oxígeno (O_2) y que desarrolla un metabolismo consistente en la transferencia final de electrones al O_2 reduciéndolo a agua (H_2O) para la obtención de energía. Este proceso constituye el último paso de la fosforilación oxidativa, que se da a nivel mitocondrial y que acopla un flujo electrónico, cuyo aceptor final es el O_2 , a la generación de ATP.

A nivel químico, el O_2 es una molécula paramagnética, con dos electrones desapareados y de igual spin. Esta característica condiciona su reactividad en el sentido de que la reducción a H_2O energéticamente más favorable es a través de la transferencia de cuatro electrones de uno en uno. En la respiración, pueden transferirse los electrones al O_2 de manera secuencial, y la reducción parcial de éste, por transferencia de menos de cuatro electrones, provoca la aparición de las especies reactivas del oxígeno (ROS).

1.1. Descripción de los ROS

La reducción parcial del O_2 , por transferencia de uno, dos o tres electrones, conduce a la formación de ROS: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Fig. 1). Estas tres especies tienen una capacidad oxidante mucho mayor que la del propio O_2 , tal como muestran sus potenciales redox. Esta capacidad oxidante junto con su elevada reactividad, constituyen la base de su toxicidad.

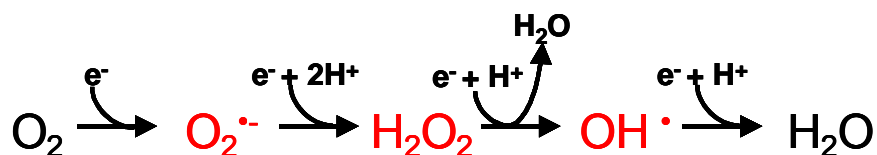


Figura 1. Las especies reactivas del oxígeno (ROS), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular (O_2).

El ión $O_2^{\cdot-}$ se forma por la transferencia de un electrón al O_2 . Su carga negativa real limita su capacidad de oxidar moléculas con alta densidad electrónica, así como la de atravesar membranas.

El H_2O_2 es el resultado de la ganancia de dos electrones por parte del O_2 . La estabilidad del enlace O-O limita su reactividad, sin embargo, difunde libremente por los compartimentos celulares.

El radical OH^{\cdot} es de las tres especies la más reactiva y no halla impedimentos para la libre difusión. Además, es capaz de reaccionar con cualquier tipo de biomolécula.

1.2. Procesos celulares en los que se generan ROS

En aerobiosis, la principal fuente de ROS es la cadena de transporte electrónico mitocondrial, que acopla la reducción del O_2 a la generación de ATP. Esencialmente, los electrones de flavinas reducidas $FADH_2$ (flavina adenina dinucleótido) y $NADH$ (nicotinamida adenina dinucleótido) provenientes de la glicólisis o del ciclo de Krebs fluyen hasta el O_2 a través de una serie de complejos proteicos ubicados en la membrana interna mitocondrial: Complejo I: $NADH$ deshidrogenasa, complejo II: succinato deshidrogenasa, complejo III: citocromo *c* reductasa y complejo IV: citocromo oxidasa. Los electrones fluyen a través de los complejos por transferencia a grupos flavinas, centros hierro-sulfuro (Fe-S), grupos hemo e iones cobre que poseen las proteínas de estos complejos. La ubiquinona y el citocromo *c* son las proteínas encargadas de transportar los electrones desde un complejo al siguiente. Cualquiera de estos grupos es susceptible de donar un electrón al O_2 en lugar de al siguiente componente de la cadena, generándose así el ión $O_2^{\cdot-}$. La reducción puede seguir hasta la formación de H_2O_2 por superposición de orbitales moleculares entre el dador electrónico y el anión $O_2^{\cdot-}$. Este proceso genera una mezcla de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en proporción diferente entre los distintos componentes de la cadena de transporte electrónico.

Existen xenobióticos que interactúan con los componentes de la cadena de transporte electrónica y que provocan un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ a través de dos mecanismos: bloqueando el transporte electrónico en algún punto de la cadena, con un aumento consiguiente en el estado reducido de los transportadores anteriores, o funcionando como aceptores de electrones de algún transportador y

donadores de estos electrones al O_2 , siendo éste el caso de drogas como el paraquat o la menadiona, que utilizan los electrones de NADH o NADPH para reducir al O_2 generando $O_2^{\cdot-}$ en un mecanismo conocido como *redox-cycling*. Existen más fuentes de electrones, a nivel mitocondrial, que pueden reducir parcialmente al oxígeno, como la glicerol-fosfato deshidrogenasa (Drahota *et al.* 2002) o la monoamino oxidasa (Hauptmann *et al.* 1996; Cadenas and Davies 2000), que cataliza la desaminación oxidativa de aminas biogénicas, generando H_2O_2 .

La exposición a radiaciones X, γ o UV también promueve la formación de ROS.

La producción de ROS puede ser enzimática, como es el caso de los enzimas detoxificadores SOD, que generan $H_2O_2 + O_2$ a partir de 2 moléculas de $O_2^{\cdot-}$. Es también el caso de las NADPH oxidasas, localizadas en la membrana celular de macrófagos, células pilomorfonucleares y células endoteliales (Babior 2000; Babior 2002; Vignais 2002) así como de las oxigenasas dependientes del citocromo P450 (Coon *et al.* 1992). La proteólisis de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa es otra fuente de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Turrens 2003).

Existen fuentes de H_2O_2 independientes de la producción de $O_2^{\cdot-}$; es el caso de la β -oxidación de ácidos grasos, catalizada por la acil-CoA oxidasa, que se da a nivel peroxisomal en células eucariotas. (Chance *et al.* 1979) (Fig. 2.).

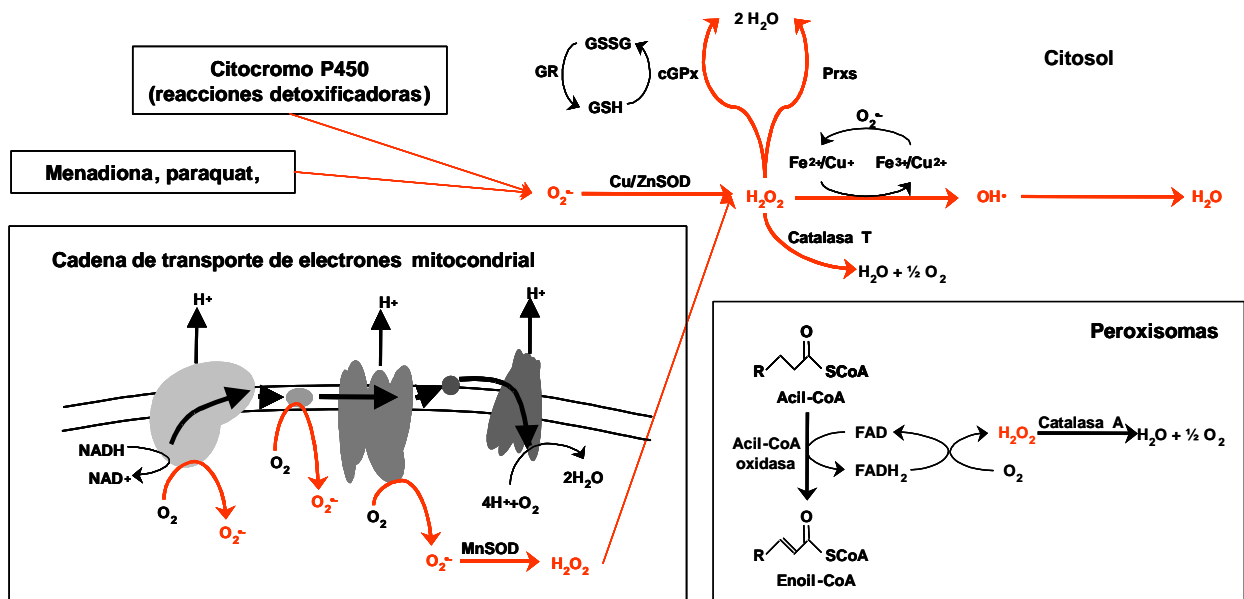
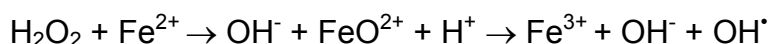


Figura 2. Producción y detoxificación de ROS en las células eucariotas.

El radical OH[•] se genera cuando un átomo de hierro ferroso transfiere un electrón al H₂O₂ según la reacción de Fenton:



El Fe³⁺ es reducido a Fe²⁺ por el anión O₂^{•-} así como por cisteínas o glutatona. De esta forma, lugares en los que se generan radicales H₂O₂ y O₂^{•-}, como es el caso de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, proporcionan las condiciones para la formación de radical OH[•] según la reacción de Fenton. El cobre (en su forma Cu⁺) también puede catalizar esta reducción.

El hierro ferroso libre, es decir, no incorporado en enzimas ni en proteínas que almacenan hierro, proviene de la liberación desde centros Fe-S dañados por oxidación, de la pérdida espontánea de metales que sufre, por ejemplo, la aconitasa de *Escherichia coli* (Varghese *et al.* 2003) así como de pérdidas en procesos de tráfico de hierro.

1.3. Reactividad de los ROS con biomoléculas

La reactividad de los ROS con casi todas las biomoléculas (DNA, glúcidos, lípidos y proteínas) constituye su mecanismo de toxicidad.

El anión O₂^{•-} es capaz de oxidar clusters Fe-S de ciertas proteínas, inestabilizándolos y provocando el desensamblaje de un átomo de Fe²⁺. Este es el caso de la dihidroxiácido deshidratasa (Flint *et al.* 1993a), aconitasa B (Gardner and Fridovich 1991) o fumarasa A y B (Liochev and Fridovich 1993) de *E. coli*. La consecuencia de la liberación de Fe²⁺ es en primer lugar, la inactivación de los enzimas, y en segundo lugar, la mutagénesis debido a la aparición de radical OH[•].

Otro ejemplo de inactivación enzimática por O₂^{•-} es la transcetolasa. La inhibición de este enzima de la vía de las pentosas fosfato, resulta en la imposibilidad de sintetizar eritrosa-4-fosfato, precursor de los aminoácidos aromáticos. Provoca, por lo tanto, auxotrofia para estos aminoácidos en células procariotas y eucariotas unicelulares defectivas en sistemas detoxificantes de O₂^{•-}, las superóxido dismutasas (Benov and Fridovich 1999). También se ha observado en estas células auxotrofia para el sulfuro (Benov *et al.* 1996; Benov and Fridovich 1997), aunque se desconoce el mecanismo a través del cual se produce.

La oxidación de triosas por $O_2^{\cdot-}$ genera dicarbonilos, como el metilglioxal, que son tóxicos debido a su reactividad sobre grupos amino de proteínas así como sobre ácidos nucleicos (Imlay 2003).

El H_2O_2 encuentra numerosas biomoléculas diana: es capaz de oxidar residuos cisteína y metionina que se hallen expuestos o accesibles en las proteínas. Los residuos cisteína sufren oxidación por H_2O_2 en el grupo tiolato a sulfénico, que puede reaccionar con otras cisteínas para formar puentes disulfuro o ser oxidado a grupo sulfínico o sulfónico. Dado que la oxidación de las cisteínas debe iniciarse sobre un grupo tiolato, esta reacción está más favorecida en entornos básicos, donde se producirá con mayor facilidad la desprotonización del sulfhidrilo. El entorno de una cisteína depende de los aminoácidos que se encuentren en su proximidad y pueden modificar su pK_a , haciéndola más susceptible o menos a sufrir oxidación por parte del H_2O_2 . Es ésta la característica que utilizan los sensores de H_2O_2 , como OxyR de *E. coli*, para sensar incrementos por encima de una determinada concentración intracelular de este radical así como enzimas como las peroxidasas, detoxificantes de H_2O_2 con elevada afinidad por el sustrato, incluyendo cisteínas ácidas y expuestas en su estructura, aunque no está caracterizada la base de tan elevada reactividad (Aslund *et al.* 1999).

La oxidación de residuos metionina expuestos en la superficie de proteínas genera metionina sulfóxido. Se cree que esta oxidación puede servir para proteger otros residuos esenciales de la proteína (Levine *et al.* 1996). Se ha observado que esta oxidación es reversible y se halla catalizada por el enzima metionina sulfóxido reductasa (MsrA) y constituye un posible mecanismo regulatorio sobre la actividad de ciertas proteínas, al igual que la oxidación de cisteínas (Ciorba *et al.* 1997).

El H_2O_2 es capaz de oxidar los mismos centros Fe-S de deshidratasas que el ión $O_2^{\cdot-}$ (Flint *et al.* 1993b). También es capaz de oxidar las proteínas, por introducción de grupos carbonilo, tanto en la cadena principal, donde puede provocar rupturas en la cadena polipeptídica, como en las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos.

El DNA mitocondrial es también susceptible al daño por H_2O_2 , que introduce escisiones de cadena sencilla (Cadenas and Davies 2000).

El radical OH^{\cdot} es el más reactivo de los ROS y su capacidad para difundir libremente le confiere la mayor toxicidad. Su reactividad deriva de su alto potencial redox para reducirse a agua. El radical OH^{\cdot} inactiva varios enzimas de la cadena de

transporte electrónico mitocondrial: NADH deshidrogenasa, NADH oxidasa, succinato deshidrogenasa, succinato oxidasa y ATPasa (Zhang *et al.* 1990).

El daño más importante que provoca el radical OH[•] consiste en el ataque a ácidos nucleicos, en especial al DNA. Dado que es un radical que ataca de forma inespecífica, aunque tiene elevada capacidad de difusión, es poco probable que difunda lejos de dónde se originó. El DNA une átomos de hierro con alta afinidad y, por tanto, crea condiciones favorables para la formación de OH[•] a través de la reacción de Fenton. Este radical es capaz de oxidar tanto los azúcares como las bases nitrogenadas del DNA, generando un amplio abanico de lesiones (Hutchinson 1985; Dizdaroglu 1991).

El radical OH[•] es capaz, al igual que el H₂O₂, de introducir oxidaciones en las proteínas que generen grupos carbonilo sobre la cadena principal y ruptura de ésta, así como sobre las cadenas laterales. Es capaz de atacar también a los lípidos de membrana, que con su alto contenido en dobles enlaces, son oxidados con facilidad. El ataque provoca la peroxidación lipídica, que desemboca en cambios en las características físicoquímicas de la membrana, como su fluidez, que se ve disminuida y, con ello, se producen cambios en la interacción con proteínas.

1.4. Estrés oxidativo: definición

El estrés oxidativo se define como un aumento intracelular de ROS por falta de equilibrio entre la formación y la detoxificación celular (por medios enzimáticos o no) de los ROS.

La pérdida del equilibrio entre producción y degradación de ROS se puede producir por aumentos en la producción (debido a cambios metabólicos, exposición a radiaciones, a drogas) o por disminución en la capacidad detoxificante (por daños en los enzimas detoxificantes, mutaciones en genes de componentes de sistemas detoxificantes).

2. SISTEMAS DETOXIFICANTES DE ROS CELULARES

La célula ha desarrollado sistemas para degradar los ROS y mantener el potencial redox adecuado en cada compartimento celular. Estos sistemas pueden ser no enzimáticos (glutaciona, tioredoxina y vitaminas) o enzimáticos (catalasa, glutaciona peroxidasa, peroxirredoxina, glutarredoxina, SOD y glutaciona S-transferasa).

2.1. Sistemas no enzimáticos

2.1.1. Glutaciona (GSH)

La glutaciona es un tripéptido (glutamina-cisteína-glicina), ubicuo en los sistemas celulares, que contiene una única cisteína que sufre oxidación y reducción en respuesta a oxidantes o reductores del entorno (Sies 1999). Está presente en concentración del rango de la milimolaridad en todas las células con crecimiento aeróbico y con ello es el antioxidante basado en tioles más abundante. Tiene, por tanto, un papel importante en mantener el estado redox celular. Los ROS, como H_2O_2 , otros peróxidos y radicales libres, oxidan la forma GSH reducida en su cisteína, que pasa a formar un puente disulfuro con la cisteína de otra molécula de GSH, formando así un dímero covalente (GSSG). La reducción de GSSG a 2xGSH se lleva a cabo a cambio de electrones del NADPH (generado en el citosol en la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato y que cataliza la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) y está catalizada por la glutaciona reductasa. La presencia de GSH reducida en condiciones de estrés oxidativo se asegura por este ciclo de reciclaje de la forma tiólica además de en la síntesis, siendo inducibles las rutas biosintéticas de la GSH por este estrés. En condiciones basales, la relación entre las formas reducida y oxidada de la GSH es de 11-100:1 en células eucariotas (Chai *et al.* 1994; Grant *et al.* 1996; Muller 1996).

Existen más funciones desempeñadas por la GSH: reacciona con puentes disulfuro de otras proteínas, reduciéndolos, regulando, por tanto, el estado de sulfhidrilos celular. También es capaz, mediante un mecanismo descrito más adelante (ver punto 2.2.6), de reaccionar con cisteínas de diversas proteínas y formar un puente disulfuro intramolecular mediante la actividad de las glutaciona S-

transferasas. La GSH funciona también como proveedora de capacidad reductora a varias actividades enzimáticas como por ejemplo la ribonucleótido reductasa, la glutatióna peroxidasa o la glutarredoxina. Es capaz de unirse a iones Cu^{2+} a través de su cisteína, disminuyendo así la posible toxicidad debida a la reacción de Fenton. También se une al radical NO^{\bullet} y forma GSNO, forma no tóxica de este prooxidante.

Mutantes de *E. coli* en los genes que codifican para enzimas de la vía de síntesis de la GSH crecen de manera salvaje tanto en medio rico como mínimo y sólo presentan fenotipos de baja supervivencia tras tratamientos con oxidantes específicos de la GSH como la diamida (Apontoweil and Berends 1975; Fuchs and Warner 1975; Greenberg and Demple 1986).

Mutantes de *S. cerevisiae* en los genes que codifican para enzimas de la vía de síntesis de la GSH son sensibles a oxidantes como peróxidos, ión $\text{O}_2^{\bullet-}$, peroxidación lipídica o metilglioxal, metabolito secundario de la glicólisis (Izawa *et al.* 1995; Grant *et al.* 1996; Stephen and Jamieson 1996). Los mutantes que no poseen GSH presentan fenotipo de bajo crecimiento en medio rico y no son capaces de crecer en medio mínimo (Ohtake and Yabuuchi 1991; Wu *et al.* 1994; Grant *et al.* 1996) por lo que parece que la GSH se halla regulando el potencial redox basal de estas células.

2.1.2. Tiorredoxina (Trx)

La tiorredoxina es una proteína pequeña de alrededor de 12 kDa. Se halla de manera ubicua en células procariontas y eucariotas, donde se localiza en citoplasma, membrana, espacio extracelular y mitocondrias. La Trx tiene un centro activo: Cys-Gly-Pro-Cys, esencial para su actividad oxidorreductasa de disulfuros proteicos como son los de la ribonucleótido reductasa (Reichard 1993) y regula la afinidad por el DNA de varios factores de transcripción, como p53 (Ueno *et al.* 1999), $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Matthews *et al.* 1992) y AP-1 (Hirota *et al.* 1997).

La Trx se oxida formando un dímero covalente por puente disulfuro (Trx-S_2) entre las dos cisteínas, reduciendo otro puente disulfuro. La reducción de Trx-S_2 es catalizada por la tiorredoxina reductasa (TR) y utiliza electrones donados por el NADPH, que en conjunto constituyen el sistema tiorredoxina. La actividad

detoxificadora de ROS de la Trx se lleva a cabo por la peroxirredoxina (Prx) (ver punto 2.2.3), siendo éste un mecanismo enzimático (Fig. 3.).

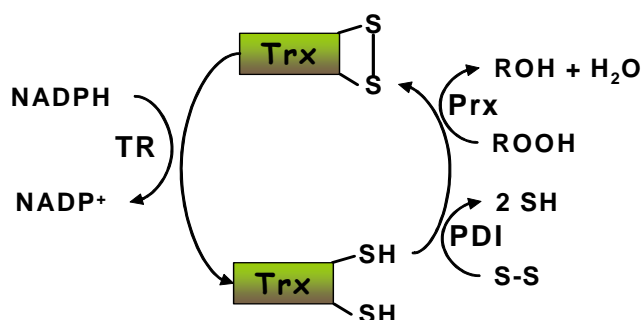


Figura 3. Sistema Tiorredoxina y actividades enzimáticas asociadas. La Tiorredoxina (Trx) puede servir como dador electrónico a las actividades Peroxirredoxina (Prx) y Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI). Su reciclaje depende de la actividad Tiorredoxina Reductasa (TR) y del NADPH.

2.1.3 Vitaminas

Las vitaminas C y E son las que se cree pueden tener un papel cuantitativo en la protección contra los efectos adversos de los ROS, dado que son las más abundantes vitaminas hidrosoluble y liposoluble, respectivamente. Los antioxidantes neutralizan los ROS por donación de uno de sus electrones. La forma oxidada de estos antioxidantes no es reactiva, con lo que la reacción antes mencionada consigue un efecto neto de desaparición de moléculas activas a nivel redox.

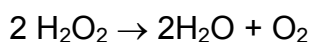
La vitamina E es una de las más eficaces moléculas con actividad de freno de reacciones en cadena. Es la principal molécula antioxidante que actúa sobre la peroxidación lipídica.

La vitamina C actúa a nivel citosólico como antioxidante. Participa en la reducción de la vitamina E.

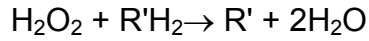
2.2. Sistemas enzimáticos

2.2.1. Catalasa

La catalasa es un enzima peroxisomal que cataliza la dismutación del H_2O_2 en H_2O y O_2 :



También es capaz de detoxificar diferentes sustratos como por ejemplo fenoles y alcoholes, a través de la reducción acoplada de H_2O_2 :



La catalasa, aunque tiene un recambio alto, no se encarga de detoxificar niveles bajos, aunque tóxicos, de H_2O_2 porque es difícil de saturar con H_2O_2 y además el ciclo catalítico requiere la interacción de dos moléculas de H_2O_2 con un único centro activo, lo que es menos probable a bajas concentraciones de H_2O_2 (Gutteridge and Halliwell 2000).

Dado que la catalasa se halla en los peroxisomas de las células eucariotas, su papel más importante es el de detoxificar el H_2O_2 producido en la β -oxidación de ácidos grasos que se da en este orgánulo. El efecto de la catalasa sobre el H_2O_2 citosólico depende de la difusión de H_2O_2 en los peroxisomas. Su actividad disminuye el riesgo de formación de radical OH^\bullet por la reacción de Fenton catalizada por iones Cu o Fe (Halliwell 1999).

2.2.2. Glutaciona peroxidasa (GPx)

GPx se encarga de reducir H_2O_2 y otros peróxidos, como los peróxidos lipídicos, a alcoholes utilizando la GSH como poder reductor.



El reciclaje de GSSG se asegura mediante la actividad glutaciona reductasa.

Se han detectado GPx en células de levadura y mamífero (Ursini *et al.* 1995; Inoue *et al.* 1999; Collinson *et al.* 2002). Las GPx de mamífero tienen una selenocisteína en su lugar activo que se oxida durante el ciclo catalítico de selenolato a selenénico, que es reducido por GSH (Fig. 4.). En levadura, sin embargo, el lugar activo contiene cisteína (Inoue *et al.* 1999; Collinson *et al.* 2002). En levadura, la disrupción de los genes que codifican para las GPx son viables y crecen a la misma velocidad que la cepa salvaje en condiciones basales, pero presentan sensibilidad a tratamientos con H_2O_2 y tert-butil hidroperóxido (Inoue *et al.* 1999).

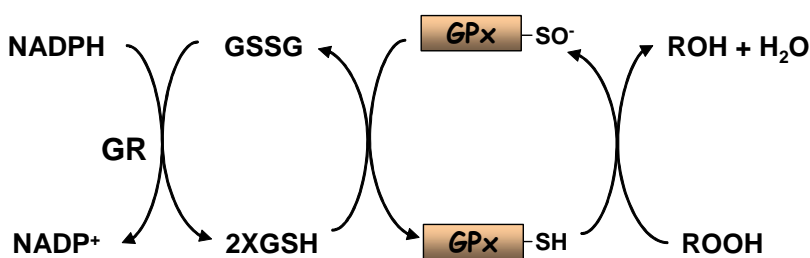


Figura 4. Glutaciona peroxidasa (GPx). La Glutaciona (GSH) es el dador electrónico para la actividad Glutaciona Peroxidasa (GPx). Su reciclaje depende de la actividad Glutarredoxina (GR) y del NADPH.

2.2.3. Peroxirredoxina (Prx)

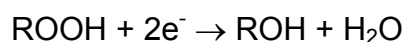
Las peroxirredoxinas son proteínas muy conservadas a lo largo de la evolución, se hallan en procariotas, archaea, y eucariotas. Además de como peroxirredoxinas, se las conoce también como tiorredoxina peroxidasa (Tpx), dado que utilizan Trx como dador electrónico y como alquil-hidroperóxido-C22 reductasas (AhpC), una excepción en las Prx, que utilizan AhpF como dador de electrones.

Las Prx se localizan en el citosol, mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, núcleo y membranas. Se encuentran en abundancia, son una de las diez proteínas más abundantes en *E. coli* (Link *et al.* 1997), componen 0.1-0.8% de proteína soluble en mamíferos (Chae *et al.* 1999) y PrxII es la segunda o tercera proteína más abundante en eritrocitos (Moore and Shriver 1997). Además de su abundancia, las Prx tienen elevada afinidad por el sustrato, aunque moderada eficiencia catalítica (Hofmann *et al.* 2002). En conjunto, es probable que su papel antioxidante sea importante en presencia de concentraciones bajas y moderadas de H₂O₂ (Rhee *et al.* 2005).

Su actividad antioxidante consiste en la reducción de peróxidos gracias a los electrones donados por una disulfuro reductasa (Trx, AhpF, triparredoxina) (Chae and Rhee 1994; Poole *et al.* 2000).

2.2.3.1. Clasificación de las Prx

Existen tres clases de Prx pero el mecanismo catalítico básico es el mismo para todas ellas: una cisteína del centro activo (cisteína peroxidática) en forma tiolato (estabilizado por una arginina proximal) se oxida a sulfénico por el peróxido sustrato (H₂O₂, peroxinitrito, hidroperóxidos orgánicos), reduciéndose éste a alcohol o agua (en el caso de H₂O₂) (Ellis and Poole 1997b; Ellis and Poole 1997a):



El mecanismo de reciclaje para reducir la Prx, que necesita de una segunda cisteína, es lo que diferencia a las tres clases de enzimas. Las Prx se clasifican en función del número de cisteínas implicadas en la catálisis (Chae and Rhee 1994): las de dos cisteínas (2-Cys Prx) y las de una cisteína (1-Cys Prx). Las 2-Cys Prx se hallan subdivididas en dos clases, según si son homodímeros (2-Cys Prx típicas) o monómeros (2-Cys Prx atípicas) funcionales.

a) 2-Cys Prx típicas: Es la clase más amplia de Prx e incluye, entre otros, AhpC de *S. typhimurium*, TSA1 de *S. cerevisiae*, Tpx1 de *S. pombe* y Prxl-IV de humanos. Poseen dos cisteínas con actividad redox conservadas: la cisteína peroxidática (C_P) (ubicada en torno al residuo 50) y la resolutive (C_R) (cercana al residuo 170) (Hofmann *et al.* 2002). Esta clase de Prx son dímeros obligatorios y las subunidades poseen cada una un centro activo idéntico (Hirotsu *et al.* 1999; Schroder *et al.* 2000). El primer paso de la reacción de detoxificación de H_2O_2 es la oxidación de la C_P a sulfénico, reduciendo el sustrato. El segundo paso consiste en el ataque de la C_R de la otra subunidad del homodímero a la C_P sulfénica. Esta condensación resulta en la formación de un puente disulfuro intermolecular entre las dos subunidades. Este puente disulfuro es reducido por trx o AhpF (en el caso de que la Prx sea AhpC) (Fig. 5.). La substitución de la C_P a serina genera un enzima sin actividad antioxidante, mientras que el enzima que posee la C_R substituida por serina tiene igual actividad antioxidante que el salvaje, mediante ensayos de protección de la glutamina sintetasa. Esto es debido, probablemente, a la capacidad de otra/s cisteínas celulares de formar un puente disulfuro entre las dos C_P del homodímero (Chae and Rhee 1994).

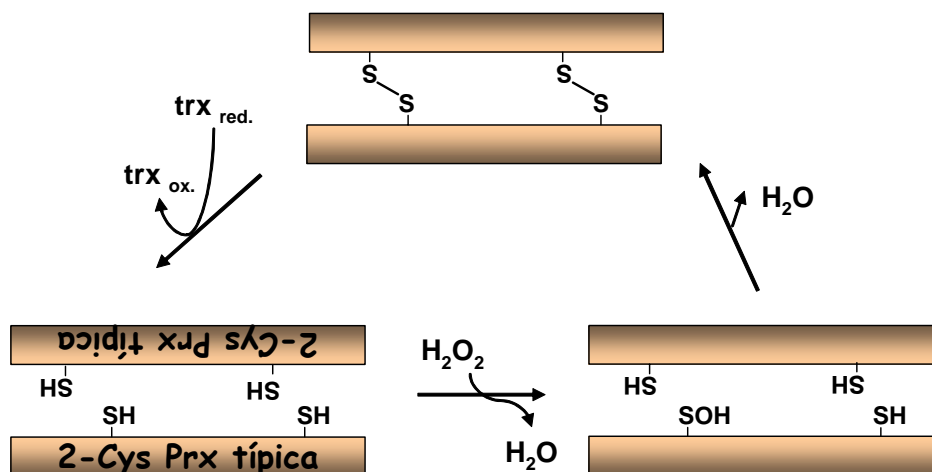


Figura 5. 2-Cys Prx típicas.

b) 2-Cys Prx atípicas: Forma parte de este grupo la PrxV de humanos. Estas Prx poseen el mismo mecanismo que las 2-Cys Prx típicas pero difieren de éstas en que aunque dímeros obligados, son funcionalmente monoméricas (Seo *et al.* 2000), de manera que tanto C_P como C_R se hallan en el mismo polipéptido, formándose un

punto disulfuro intramolecular tras la condensación. Este punto disulfuro es reducido por Trx (Fig. 6.). Las C_R de las 2-Cys Prx típicas y atípicas no están conservadas, aunque tienen idéntica función.

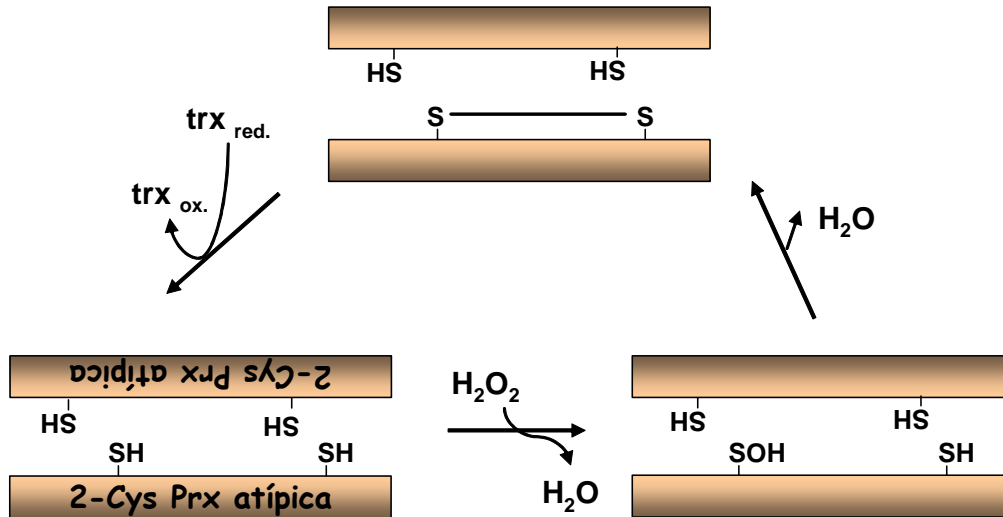


Figura 6. 2-Cys Prx atípicas.

c) 1-Cys Prx: estas Prx contienen una única cisteína con actividad redox, que sufre oxidación a sulfénico por reacción con H₂O₂, sin embargo, no puede formar un puente disulfuro como las otras clases de Prx dado que no existe una segunda cisteína redox (Fig. 7.). Se desconoce la identidad del reductor del sulfénico que se forma sobre la cisteína, aunque se cree que puede ser la GSH. PrxVI de humanos pertenece a este grupo (Kang *et al.* 1998).

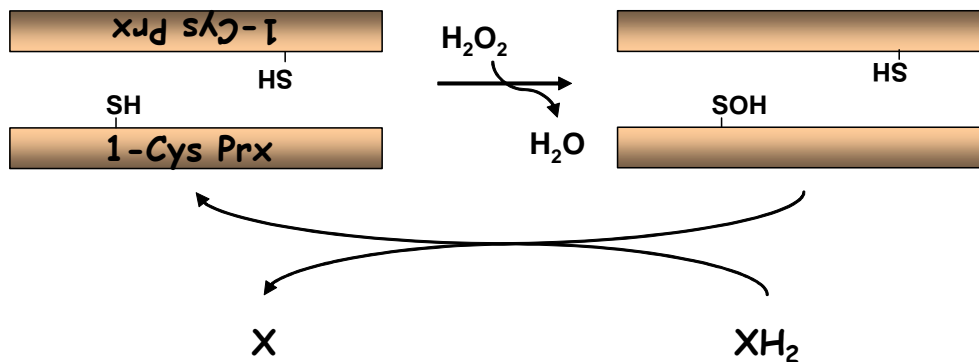


Figura 7. 1-Cys Prx.

2.2.3.2. Inactivación de las Prx por oxidación a sulfínico de su C_P

Las 2-Cys Prx de eucariotas, pero no las de procariotas, sufren durante su ciclo catalítico una sobreoxidación en su C_P a ácido sulfínico en presencia de concentraciones elevadas de peróxidos en el medio celular. El sulfénico que se genera en el primer paso de la catálisis sobre la C_P es inestable y puede reaccionar con la C_R de la otra subunidad del homodímero para formar un puente disulfuro estable u oxidarse a ácido sulfínico (Claiborne *et al.* 1999). Esta sobreoxidación provoca la inactivación del enzima. Existe una progresión lineal en la formación de sulfínico en las Prx al aumentar el H₂O₂ intracelular. El porcentaje de sulfínico formado en Prx1 de macrófagos de ratón aumenta de forma lineal a medida que aumenta la concentración de H₂O₂ en el medio de cultivo hasta el 100% cuando es de 0.5 mM tras tratamientos de 10 min (Woo *et al.* 2003). Experimentos *in vitro* sobre las 2-Cys Prx demuestran que AhpC de *Salmonella typhimurium* sufre un proceso de inactivación también lineal pero requiriendo concentraciones mucho más altas, de unas 110 veces más, que Prx1 de mamíferos (Wood *et al.* 2003b). AhpC es, por tanto, un enzima más robusto frente a inactivación por sobreoxidación que las Prx de eucariotas. La comparación de las secuencias y estructura de las Prx robustas (AhpC de *S. typhimurium*, AhpC de *E. coli*, AhpC de *S. mutans*) con las Prx sensibles (TSA1 de *S. cerevisiae*, Tpx1 de *S. pombe*, Prx1-IV de humanos), revela diferencias en dos motivos conservados que poseen las Prx sensibles pero no las robustas. Estos motivos son, en primer lugar, una inserción de tres residuos dos de los cuales son básicos asociados a una secuencia GGLG y, en segundo lugar, una extensión C-terminal que contiene un motivo YF conservado (Wood *et al.* 2003b). Estudios estructurales revelan que el motivo YF se halla rodeando a la C_P y al motivo GGLG en la estructura terciaria de la proteína, estabilizando esta conformación (fully folded: FF) y manteniendo alejada a la C_R. La oxidación de la C_P a los dos estados sulfénico y sulfínico no requiere cambios en la estructura de la proteína, al contrario que la formación del puente disulfuro, que requiere el paso a una conformación locally unfolded (LU). La estabilización que ejerce el motivo YF del extremo C-terminal sobre la conformación FF explica la posibilidad de sobreoxidación de la C_P de las Prx sensibles (Wood *et al.* 2003b). De hecho, deleciones en el extremo C-terminal que afecten al motivo YF resultan en pérdida

de la sensibilidad de la 2-Cys Prx de *S. pombe*, Tpx1, que se convierte en un enzima robusto (Koo *et al.* 2002).

2.2.3.3. Reactivación catalizada de las Prx inactivas por formación de sulfínico

La sobreoxidación de las 2-Cys Prx sensibles es reversible (Woo *et al.* 2003) y se aisló una actividad enzimática en *S. cerevisiae* encargada de la reducción de sulfínico a tiol de la C_P (Biteau *et al.* 2003). Esta actividad se denominó sulfirredoxina (Srx1) y se halló también en mamífero (Budanov *et al.* 2004; Chang *et al.* 2004). Para su actividad, se demostró *in vitro* que Srx1 depende del potencial reductor proporcionado por un tiol, de hidrólisis de ATP y de presencia de iones Mg²⁺ (Biteau *et al.* 2003; Chang *et al.* 2004). La misma actividad se ha observado en PA26 y Hi95, de la familia de las sestrinas (Budanov *et al.* 2004). Srx1 es un enzima con elevada especificidad de sustrato, dado que no reduce las formas sulfiniladas de PrxV, PrxVI ni GAPDH (Woo *et al.* 2005). Los procariontes, que poseen 2-Cys Prx robustas, no poseen Srx.

Existe, por tanto, un ciclo de inactivación-reactivación sobre las 2-Cys Prx sensibles. Se propuso que dicha inactivación temporal pudiera jugar un papel en señalización celular ya que permite un aumento temporal de H₂O₂ intracelular y, con ello, la activación de rutas de señalización redox-sensibles (Georgiou and Masip 2003; Wood *et al.* 2003b). De todas formas, la relación entre una Prx y vías de señalización no estaba establecida hasta la realización de este trabajo.

2.2.3.4. Implicación de las Prx en otras actividades celulares

Se ha observado que PrxI y PrxII forman *in vitro* e *in vivo* unas estructuras decaméricas formadas por cinco dímeros unidos a través de regiones hidrofóbicas, así como unos complejos multiméricos esféricos de 22-28 nm de diámetro. La aparición de estas formas correlaciona con la exposición a temperatura elevada y a H₂O₂. Ensayos *in vitro* de fracciones purificadas de TSA1 de *S. cerevisiae* de estas estructuras demuestran que éstas son capaces de proteger de la desnaturalización a proteínas expuestas a elevadas temperaturas y a H₂O₂, mientras que no poseen actividad peroxidasa. La formación de estas estructuras *in vivo* es transitoria después de tratamientos con H₂O₂ (en concentración que induce la sulfinilización de

TSA1) así como de hiperaerobiosis y depende de la presencia de tiorredoxina. La presencia de Srx1 es esencial para la reversión de estas formas. La substitución de la C_P por serina impide que TSA1 forme estos complejos, sin embargo, la substitución de la C_R por serina provoca que estas formas se hallen incluso en el estado basal (Jang *et al.* 2004).

Se ha descrito también la fosforilación de PrxI y II *in vivo* por Cdc2 en la fase M del ciclo celular. Durante la fase M, esta Cdk se halla activa y además puede interaccionar con las Prx, citosólicas, debido a la ruptura del envoltorio nuclear. La fosforilación de PrxI y II por Cdc2 conduce a la inactivación de éstas como peroxidasas. Se cree por ello que las Prx puedan tener un papel en la progresión normal del ciclo celular, a través de un mecanismo de aumento transitorio del H₂O₂ intracelular (Chang *et al.* 2002).

En células de mamífero, se ha demostrado que PrxII es responsable de la inactivación de la señal iniciada por factores de crecimiento, mediante la detoxificación del H₂O₂ producido tras la estimulación con los mismos. El H₂O₂ provoca la oxidación de residuos cisteína de la proteína fosfatasa PTEN, que forman un puente disulfuro intramolecular que inactiva el enzima. La reducción del H₂O₂ por PrxII permite la reducción y reactivación de PTEN. De esta manera, se descompone PIP₃ que se forma en respuesta al estímulo y es responsable de activar la proteína quinasa Akt, que activa la proliferación celular (Kwon *et al.* 2004).

2.2.4. Glutarredoxina (Grx)

La Grx tiene actividad tiol-disulfuro oxidorreductasa, que le permite reducir puentes disulfuro de proteínas (mediante un mecanismo ditiólico) o disulfuros mixtos (mediante un mecanismo mono o ditiólico) (Bushweller *et al.* 1992). Los electrones que permiten esta reducción fluyen desde el NADPH a la glutatona reductasa (GR), después hasta la GSH y, finalmente, a la Grx. El centro activo de la Grx, al igual que en múltiples proteínas con actividad redox (p.ej. tiorredoxina, T4 glutarredoxina, disulfuro isomerasas, DsbA, NrdH redoxina), está constituido por la secuencia Cys-X-X-Cys (siendo X cualquier aminoácido). El centro activo CXXC se halla en una estructura secundaria que contiene además un área hidrofóbica accesible al solvente y un lugar de unión para la GSH. Las proteínas que poseen este dominio forman la superfamilia de la tiorredoxina.

Se han hallado Grx en todos los sistemas celulares procariotas y eucariotas, así como también en virus. Existen múltiples isoformas diferentes en los distintos organismos, con estructura y actividad catalítica distintas. Actualmente, se clasifican en tres grupos (Vlamis-Gardikas and Holmgren 2002):

a) El primer grupo está constituido por las Grx clásicas, con el motivo CXXC siendo habitualmente Cys-Pro-Tyr-Cys. Actúan como donadores electrónicos de la ribonucleótido reductasa. Su tamaño es de unos 10 kDa. Ejemplos de esta clase de Grx son Grx1 y Grx3 de *E. coli*.

b) El segundo grupo está estructuralmente relacionado con las glutationa S-transferasas (GSTs) (ver punto 2.2.6), pero con actividad oxidorreductasa. Contienen el motivo CPYC que les dota de su actividad diferente a las GSTs. Grx2 de *E. coli* pertenece a esta clase.

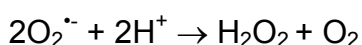
c) El tercer grupo se define por poseer un centro activo monotiólico: Cys- Gly- Phe- Ser. Estas Grx catalizan la reducción de los puentes disulfuro mixtos entre una proteína y la GSH, es decir, productos glutatiolizados. La unión al sustrato se da a través de la región GSH del disulfuro mixto, dado que la Grx tiene un dominio de unión al tripéptido. Ejemplos de este grupo se hallan en algunas Grx de levadura: yGrx3, yGrx4 y yGrx5 de *S. cerevisiae*, PICOT (protein kinase C-interacting cousin of thioredoxin) de humanos.

2.2.5. Superóxido dismutasa (SOD)

Las SOD son enzimas con átomos metálicos en sus centros activos y que catalizan la reducción a H₂O₂ y la oxidación a O₂ de dos moléculas de anión O₂^{•-} en un mecanismo de dos pasos (Miller 2004):



siendo la reacción total:



Se clasifican las SODs en función del metal de su centro activo. Aunque catalizan la misma reacción, cada una de las SOD tiene diferente estructura:

Cu,Zn-SOD: SOD con Cu y Zn en el centro activo. El Cu sufre modificación redox durante el ciclo catalítico, el Zn se cree que tiene un papel estructural. Es un

homodímero. Las Cu,Zn-SOD se hallan ubicadas en el citosol de células eucariotas, en el periplasma de procariotas Gram -, en los plastidios de plantas y en el líquido extracelular de mamíferos.

Mn-SOD: SOD con Mn en el centro activo. Se hallan como homodímeros en procariotas y homotetrámeros en mitocondria. Las Mn-SOD de procariota y eucariota tienen elevada homología de secuencia. El gen de la Mn-SOD de procariota es inducible tras estrés oxidativo por el regulón *soxRS* (ver punto 3.1.1.2).

Fe-SOD: se halla en procariotas de forma constitutiva, su gen no se induce por estrés oxidativo. Su función podría ser la de proveer protección frente a la formación de $O_2^{\cdot -}$ en una transición de crecimiento anaeróbico a aeróbico.

Ni-SOD: se ha hallado en *Streptomyces griseus*. Es un homotetrámero, cada subunidad pesa 13 kDa.

2.2.6. Glutathion S-transferasa (GST)

El proceso que catalizan las GSTs, la S-glutathionización, consiste en la oxidación de sulfhidrilos de residuos cisteína para formar puentes disulfuro mixtos con una molécula de GSH. Este mecanismo es reversible por reducción con Trx, disulfuro isomerasa o Grx (Jung and Thomas 1996). Los procesos de S-glutathionización pueden ser inducidos por cambios en el potencial redox celular así como por formación de ROS y RNS (especies reactivas del nitrógeno).

La S-glutathionización de proteínas se ha implicado en detoxificación durante estrés oxidativo, estabilización de proteínas extracelulares, protección de proteínas frente a oxidación irreversible de residuos críticos de cisteína y en regulación de actividad enzimática (Gilbert 1984; Ziegler 1985; Cotgreave and Gerdes 1998).

Se han detectado numerosos enzimas que sufren S-glutathionización tras estrés oxidativo: glicógeno fosforilasa (Klatt and Lamas 2000), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ((Lind *et al.* 1998), GST (Dafre *et al.* 1996; Sies *et al.* 1998), SOD (Klatt and Lamas 2000), malato deshidrogenasa (Eaton and Shattock 2002), así como proteínas estructurales y de transporte, como hemoglobina y actina (Klatt and Lamas 2000). Se ha demostrado también la glutathionización de la tioredoxina humana (Casagrande *et al.* 2002). Esta modificación puede también regular la función o actividad de proteínas, como es el caso de enzimas

conjugadores de ubiquitina (Obin *et al.* 1998) o la unión a DNA del factor de transcripción c-Jun (Klatt *et al.* 1999).

Este mecanismo también se utiliza para la detoxificación de drogas, mediante la conjugación con GSH, ya que disminuye su reactividad y aumenta la hidrofilia, facilitando la excreción. No existe ninguna característica en común entre los múltiples sustratos de las GSTs.

3. SISTEMAS SENSORES Y DE RESPUESTA CELULAR A ESTRÉS OXIDATIVO

La situación de estrés oxidativo es peligrosa dado que puede conducir a múltiples daños celulares. Las células, por tanto, han desarrollado sistemas que permiten sentir y responder al insulto oxidativo. La respuesta conduce a la inducción de genes codificantes para proteínas con actividad detoxificante de ROS así como de funciones de reparación del DNA.

3.1. Procariotas

Centrales en la respuesta a estrés oxidativo de las bacterias son factores de transcripción que contienen cisteínas o clusters FeS con actividad redox, capaces de transmitir la señal química (ROS) en biológica (respuesta celular). Ejemplos de este tipo de proteínas son: OxyR, PerR y SoxR.

3.1.1. Escherichia coli

3.1.1.1. OxyR

El factor de transcripción OxyR de *E. coli* es capaz de sentir y responder a H₂O₂, diamida (oxidante de tioles y generador de estrés por disulfuros), RNS y a una disminución en la relación GSH/GSSG. Regula la transcripción de genes involucrados en el metabolismo y protección de peróxidos (*katG*, *ahpC*, *ahpF*, *dps*), en el balance redox (*gor*, *grxA*, *trxC*) y reguladores como *fur* (sensor de Fe) y el RNA *oxyS* (Zheng *et al.* 1998; Zheng *et al.* 1999).

OxyR posee en total seis cisteínas, dos de las cuales sufren una oxidación durante estrés oxidativo (Fig. 8.). La reacción inicial con H_2O_2 provoca la oxidación de la Cys-199 a sulfénico. Esta Cys es altamente reactiva dado que una Arg proximal estabiliza la formación del ión tiolato (Choi *et al.* 2001). La presencia en OxyR de un puente disulfuro ha sido un tema controvertido, sin embargo. Análisis de espectrometría de masas y de marcaje *in vivo* han revelado que la forma activa posee un puente disulfuro entre la Cys199 y la Cys208 de la proteína (Lee *et al.* 2004). En el estado reducido, ambas cisteínas se hallan alejadas (17Å), de manera que la formación del puente disulfuro entre ellas provoca un cambio conformacional en el factor de transcripción que repercute en su unión al DNA (Choi *et al.* 2001). OxyR se une al DNA como tetrámero y en su forma reducida se une a dos surcos mayores adyacentes del DNA. La forma oxidada de OxyR, sin embargo, se une a cuatro surcos mayores adyacentes del DNA y activa la transcripción mediante contacto directo con la RNA polimerasa.

La activación de OxyR en respuesta a H_2O_2 es sensible; niveles de 100 nM intracelular son activadores (Gonzalez-Flecha and Demple 1997). Además, la activación de OxyR es transitoria; se oxida 30 segundos después de un insulto extracelular de 100 μ M de H_2O_2 y vuelve al estado reducido en 5 min. (Aslund *et al.* 1999). La reducción de la forma disulfuro está a cargo del enzima glutarredoxina 1, codificado por un gen regulado por el propio OxyR. La vía de activación de OxyR está, por tanto, autorregulada.

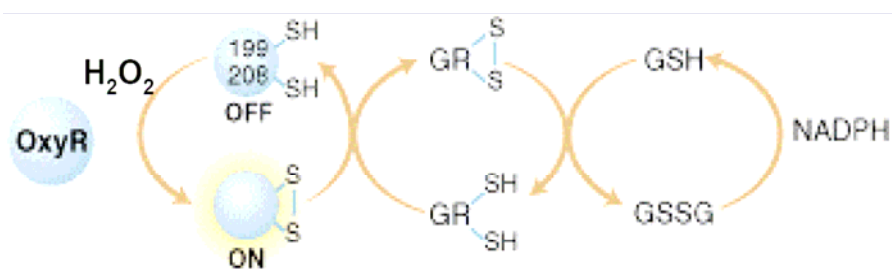


Figura 8. Mecanismo de activación de OxyR por formación de un puente disulfuro intramolecular. *Science* Vol. 279:1655 1998.

3.1.1.2. SoxR

El factor de transcripción de *E. coli* SoxR, activa la transcripción de un único gen, *soxS*, en respuesta a $O_2^{\cdot-}$ y a óxido nítrico (NO) (Storz and Imlay 1999). Niveles elevados de proteína SoxS inducen la expresión de varios genes que conforman el regulón *soxRS*: *sodA* (SOD), *zwf* (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), *fpr* (NADPH:flavodoxina oxidorreductasa), *fumC* (fumarasa C), *acnA* (aconitasa), *nfo* (endonucleasa IV) y *micF* (RNA regulador).

SoxR es una proteína de 17 kDa con homología al regulador dependiente de mercurio MerR. Contiene un motivo HTH (helix-turn-helix) de unión a DNA en la zona N-terminal. Forma un homodímero en solución, cada monómero contiene un cluster [2Fe-2S] (Hidalgo *et al.* 1995; Wu *et al.* 1995). Los clusters [2Fe-2S] son esenciales para la actividad transcripcional de SoxR dado que se oxidan o nitrosilan, conduciendo a cambios conformacionales en el dímero que provocan la inducción del gen *soxS*.

Los productos génicos de *resC* y del operón *rsxABCDGE* se ocupan del mantenimiento de la forma reducida de estos clusters [2Fe-2S], tanto en el estado basal como después de una señal de activación (Koo *et al.* 2003).

3.1.2. *Bacillus subtilis*

3.1.2.1. PerR

El factor de transcripción PerR se identificó como el regulador más importante de la respuesta a peróxidos en *Bacillus subtilis*. Está presente también en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Campilobacter jejuni*.

PerR es un represor transcripcional perteneciente a la superfamilia Fur de factores de transcripción regulados por metales, y controla la expresión de los genes *mrgA*, *katA* (catalasa), *ahpCF* (peroxirredoxina), *perR* y *zosA* (sistema de asimilación de Zn) en respuesta a H_2O_2 .

PerR se encuentra asociado al DNA en forma dimérica en condiciones basales, reprimiendo la expresión de su regulón. Posee dos iones metálicos unidos en cada subunidad, PerR:Zn,Fe. El Zn^{2+} tiene una función estructural, mientras que el Fe^{2+} posee función reguladora (Herbig and Helmann 2001). La presencia de

bajas concentraciones de H₂O₂ provoca la desrepresión de su regulón. PerR sensa el H₂O₂ a través de la oxidación de los residuos His37 o His91 catalizada por el metal Fe²⁺. Estos residuos son ligandos del ión Fe²⁺, que se pierde tras la oxidación (Lee and Helmann 2006). El cambio conformacional que resulta provoca la disociación de PerR del DNA y a la desrepresión del regulón.

3.1.2.2. OhrR

El factor de transcripción OhrR (organic hydroperoxide resistance protein regulator) pertenece a la familia MarR de factores (Fuangthong *et al.* 2001) y responde a la presencia de peróxidos orgánicos, como tert-butil hidroperóxido o cumeno hidroperóxido, además de a H₂O₂. Los peróxidos orgánicos son nocivos porque atacan ácidos grasos de cadena larga además de otros componentes no polares de la membrana. OhrR controla la expresión del gen *ohrA*, que codifica para una actividad alquil hidroperóxido reductasa, mediante la unión a elementos de la región promotora de este gen. La activación del factor tiene como consecuencia la desrepresión del gen *ohrA* (Fuangthong *et al.* 2001). El enzima Ohr reduce los peróxidos orgánicos mediante su reducción a alcoholes (Lesniak *et al.* 2002; Cussiol *et al.* 2003).

OhrR forma un homodímero que se activa, a través de la oxidación a sulfénico de su único residuo cisteína, Cys15, en respuesta a la presencia de peróxidos orgánicos. No se ha encontrado un puente disulfuro intramolecular en el homodímero (Fuangthong and Helmann 2002). Recientemente, se ha establecido la base estructural de la disociación del homodímero oxidado de la región operadora de *ohrA* (Hong *et al.* 2005).

3.2. Eucariotas unicelulares

La detoxificación de ROS en células eucariotas es llevada a cabo por actividades enzimáticas similares a los que utilizan los procariontes, y que se inducen como parte de la respuesta a estrés oxidativo (Jamieson 1998; Chen *et al.* 2003). Los mecanismos de señalización se componen de sistemas específicos de respuesta, como en el caso de las bacterias, así como de sistemas generales de respuesta.

3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1.1. YAP1

YAP1 es un factor de transcripción de la familia AP-1. Estos activadores transcripcionales se unen al lugar AP-1 del DNA (TGACTCA) o a secuencias similares a través de un dominio bZIP (basic leucine zipper). La familia AP-1 está altamente conservada en eucariotas y sus miembros activan la transcripción génica en respuesta a diferentes estímulos. YAP1 es homólogo a Pap1 de *S. pombe* y a CAP1 de *C. albicans*, presenta homología también con c-Jun en su dominio bZIP de unión al DNA.

YAP1 responde a situaciones de estrés oxidativo de diversas naturalezas: a H₂O₂, a cambio de metabolismo fermentativo a oxidativo, al oxidante de tioles diamida, a los electrófilos dietilmaleato, metil metano sulfonato y benomil, así como a cadmio, mercurio y selenato (Wu *et al.* 1993; Hirata *et al.* 1994; Kuge and Jones 1994; Wemmie *et al.* 1994; Stephen and Jamieson 1997; Takeuchi *et al.* 1997; Nguyen *et al.* 2001; Vido *et al.* 2001; Westwater *et al.* 2002; Wiatrowski and Carlson 2003).

La regulación de la actividad transcripcional de YAP1 se da a través de su localización subcelular. YAP1 posee una señal de localización nuclear (NLS) en su extremo N-terminal y una señal de exporte nuclear (NES) en el extremo C-terminal, en una de las dos regiones ricas en cisteínas del factor de transcripción (c-CRD: c-terminal cysteine rich domain). La región NES interacciona con el factor Crm1 de exporte nuclear. En condiciones basales, YAP1 se halla en un continuo transporte entre el núcleo y el citoplasma aunque principalmente localizado en el citoplasma, dado que la señal NES es dominante sobre la NLS. Las diversas señales que activan a YAP1, a través de distintos mecanismos, provocan un cambio conformacional en la región c-CRD que impide la interacción del NES con Crm1, de forma que se inhibe el exporte nuclear y, por tanto, la localización de YAP1 pasa a ser nuclear (Kuge *et al.* 1997; Yan *et al.* 1998).

La acumulación de YAP1 en el núcleo es suficiente para activar su respuesta transcripcional a estrés oxidativo (Kuge *et al.* 1997). Algunos de sus genes diana son antioxidantes como *TRX2* (tioredoxina), *TRR1* (tioredoxina reductasa), *GLR1* (glutaciona reductasa), *GSH1* (glutamil cisteína sintasa), *GSH2* (GSH sintasa),

ZWF1 (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), *GRX1-5* (glutarredoxinas), *TSA1*, *AHP1* (peroxirredoxinas) y *CTT1*, *CTA1* (catalasas).

El mecanismo de activación de YAP1 en respuesta a H_2O_2 está muy bien caracterizado. El H_2O_2 provoca la formación en YAP1 de un puente disulfuro intramolecular entre dos cisteínas pertenecientes a cada uno de los CRD: la Cys303 del n-CRD y la Cys598 del c-CRD. La oxidación de YAP1 es rápida y se da en respuesta a un rango amplio de concentraciones de H_2O_2 : concentraciones de $100 \mu M$ hasta $800 \mu M$ extracelular provocan la activación del factor de transcripción (Delaunay *et al.* 2000). YAP1 no sensa directamente H_2O_2 sino que lo hace GPX3, una glutatona peroxidasa que posee dos cisteínas redox (Cys36 y Cys82). La Cys36 se oxida por H_2O_2 a ác. sulfénico y transduce la señal a través de la formación de un puente disulfuro intermolecular con la Cys598 de YAP1, que isomeriza al puente disulfuro intramolecular entre Cys303 y Cys598, regenerándose así GPX3 reducido (Fig. 9.) (Delaunay *et al.* 2002).

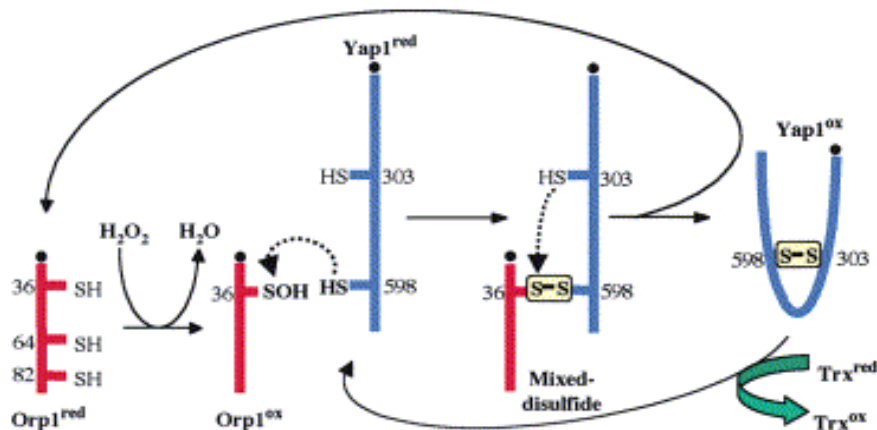


Figura 9. Mecanismo de activación de YAP1 por formación de un puente disulfuro intermolecular con Gpx1. *Cell* 111:471-481 2002.

Se ha encontrado otro puente disulfuro en la forma activada de YAP1, entre Cys310 y Cys629 (Wood *et al.* 2003a). Al formarse estos puentes disulfuro, el NES queda inaccesible a Crm1 (Wood *et al.* 2004). La reducción de YAP1 oxidado se da por el sistema Trx, que incluye la TRX y el enzima TRR1, tiorredoxina reductasa (Carmel-Harel and Storz 2000).

Otros oxidantes, como N-etilmaleimida (NEM) o diamida, poseen grupos electrófilos capaces de reaccionar con las cisteínas de YAP1, alquilándolas, provocando la pérdida de interacción por impedimentos estéricos con el exportador Crm1 (Azevedo *et al.* 2003).

3.2.1.2. SKN7

SKN7 es un factor de transcripción que participa en las respuestas a estrés oxidativo, osmótico y por calor. Posee homología con HSF1 (heat shock factor) de *S. cerevisiae* en su dominio de unión a DNA y con el dominio receptor de los sistemas de dos-componentes bacterianos y de eucariotas unicelulares.

En la respuesta a estrés oxidativo, se sabe que coopera con YAP1 en la inducción de genes antioxidantes, como *CTT1*, *SOD1*, *SOD2*, *TRR1*, *TRX2* o *TSA1* (Lee *et al.* 1999). SKN7 coopera también con HSF1 en la inducción de genes de heat shock que actúan como chaperonas moleculares específicamente en respuesta a estrés oxidativo (Raitt *et al.* 2000). El mecanismo por el cual se activa es desconocido pero diferente al que se utiliza en estrés osmótico (Krems *et al.* 1996; Morgan *et al.* 1997).

La activación de SKN7 en respuesta a estrés osmótico es provocada por la fosforilación en el residuo aspartil 427 en su dominio receptor que se da por la histidina quinasa sensora SLN1 (Brown *et al.* 1994; Morgan *et al.* 1995; Ketela *et al.* 1998).

3.2.2. *Candida albicans*

Candida albicans es una levadura patógena diploide en su ciclo vital que, por tanto, se enfrenta a los ROS generados por los macrófagos del sistema inmune del huésped para matar a las células fagocitadas. Por tanto, es de interés conocer sus rutas de respuesta a estrés oxidativo.

3.2.2.1. Cap1

Cap1 es un factor de transcripción de la familia AP-1 y de elevada homología a YAP1. Una cepa defectiva en Cap1 es sensible a estrés oxidativo, indicando la

posible función de esta proteína en la respuesta a oxidantes, al igual que YAP1. Es capaz de unirse a los mismos elementos de reconocimiento de los factores AP-1 (ARE) que YAP1 *in vitro*.

Tras estrés oxidativo, por tratamientos con diamida o H₂O₂, se acumula en el núcleo y regula la transcripción del gen *GLR1* (glutamina reductasa). Es capaz de activar constitutivamente la transcripción de un gen reportero, con una secuencia ARE en su promotor, integrado en *S. cerevisiae* (Zhang *et al.* 2000).

Se requiere todavía mucho más trabajo para entender cómo se regula Cap1 y su papel exacto en la respuesta a estrés oxidativo.

3.2.2.2. Hog1

Hog1 de *C. albicans* es una MAPK (mitogen activated protein kinase) que tiene un papel importante en la respuesta a múltiples estreses. Es homóloga a Hog1 de *S. cerevisiae* y a Sty1 de *S. pombe* (ver punto 4.2). El perfil de su respuesta a estreses es diferente a la de Hog1 de *S. cerevisiae* y a la de Sty1 de *S. pombe*.

Su activación por fosforilación y acumulación nuclear (al igual que sucede a Sty1 de *S. pombe*) revela que responde a estrés oxidativo, osmótico, a metales y a la molécula 'quorum' farnesol (San Jose *et al.* 1996; Alonso-Monge *et al.* 2003; Smith *et al.* 2004). Su respuesta a estrés térmico es atípica, dado que su fosforilación disminuye durante la primera hora después de un cambio de 23°C a 37°C. Por otra parte, se necesitan concentraciones elevadas de H₂O₂ para activar a Hog1 de *C. albicans* (Smith *et al.* 2004).

La activación de Hog1 por los estreses mencionados provoca la inducción de genes dependientes como *RHR2* (putativa glicerol fosfato deshidrogenasa) y *HSP12* (putativa proteína de heat shock). Este hecho apunta a que la respuesta mediada por esta MAPK es central y general a las situaciones de estrés, de forma similar a la que media Sty1 (ver punto 4.2) (Alonso-Monge *et al.* 2003; Smith *et al.* 2004). Estudios de microarrays han revelado que, en efecto, Hog1 media la respuesta central a los estreses osmótico y por metales pesados. Sin embargo, existen otras rutas alternativas en *C. albicans* que regulan la respuesta central a estrés oxidativo (Enjalbert *et al.* 2006).

3.3. Eucariotas pluricelulares

Las células de eucariotas pluricelulares poseen unos sistemas de respuesta a estrés conservados respecto a las unicelulares, sin embargo, el número de proteínas implicadas en la respuesta es mucho mayor, lo que sin duda permite afrontar la especialización que sufren estas células en los diferentes tejidos y que las condiciona en los estímulos que reciben y en las respuestas que deben dar para beneficio del conjunto.

3.3.1. AP-1

Los factores de transcripción AP-1 son una familia que comprende a los factores Jun (c-Jun, JunB y Jun D) y a los factores Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2). AP-1 es una actividad formada por homodímeros de Jun o heterodímeros de Jun y Fos. Los diferentes factores Jun y Fos y sus posibles combinaciones, que además tienen regulación diferencial, aseguran que cada tipo celular posea una mezcla compleja de dímeros AP-1 con diferencias sutiles en sus funciones (Wagner 2001).

Las proteínas Jun y Fos tienen un dominio bZIP de dimerización (a través de la cremallera de leucinas) y unión a DNA (a través de los residuos básicos). Los factores AP-1 se unen a secuencias TRE (TPA-response elements) del DNA para activar la transcripción de los genes diana (genes *c-jun* y *c-fos*) (Angel *et al.* 1987). Cada uno de los factores Jun y Fos tiene diferente potencial de transactivación e incluso, en algunas circunstancias, factores de bajo potencial activador pueden inhibir por competición sobre los promotores la actividad de factores de alto potencial transactivador (Chinenov and Kerppola 2001).

La actividad de los factores AP-1 en respuesta a múltiples estímulos se controla a través de la fosforilación de Jun (en Ser 63 y Ser 73) por la cascada de JNK (Jun N-terminal kinase) (Karin 1995; Gupta *et al.* 1996)(ver punto 3.3.3.1). Las kinasas que controlan a Fos son desconocidas, por el momento. Los factores AP-1 son nucleares y se activan tras la translocación al núcleo de la forma activada de JNK. Existe regulación en la actividad transcripcional de AP-1 también por niveles de proteína de los miembros de la familia *jun* y *fos* (Shaulian and Karin 2001; Fang *et al.* 2002).

3.3.2. NF κ B

NF κ B (nuclear factor κ B) es un factor de transcripción homo- o heterodimérico formado por la unión de dos de las diferentes subunidades descritas hasta el momento: p50, p52, p65 (RelA), RelB y c-Rel (Ghosh *et al.* 1998). Todos los dímeros formados son capaces de unirse al DNA en el motivo κ B. Se cree que cada dímero tiene funciones diferentes, aunque los genes diana de casi todos ellos son comunes. Estos genes se agrupan en: anti-apoptóticos, de regulación de la inflamación y de la inmunidad, de regulación positiva del ciclo celular y de reguladores negativos de NF κ B (Ghosh *et al.* 1998; Zhang and Ghosh 2001). Se ha descrito que muchos de los estímulos que activan a NF κ B provocan la formación de ROS intracelular, a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, la NADPH oxidasa y las ciclo o lipooxigenasas (Finkel and Holbrook 2000; Guengerich 2002; Sapone *et al.* 2003).

NF κ B se halla en condiciones basales en el citoplasma unido a su inhibidor I κ B (Ghosh and Karin 2002). Los I κ Bs son miembros de una familia que posee siete miembros conocidos en células de mamífero (Ghosh *et al.* 1998). Estímulos como infecciones víricas o bacterianas, el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1 o radiación UV o γ , provocan la disociación de I κ B de NF κ B, liberándose NF κ B que transloca al núcleo y activa la transcripción de sus genes diana (Baeuerle and Henkel 1994; Meyer *et al.* 1994; Siebenlist *et al.* 1994). El mecanismo de liberación de NF κ B se halla regulado por la fosforilación de I κ B por IKK (I κ B kinase), que conduce a la degradación a través de ubiquitinación de I κ B (Karin and Delhase 2000).

3.3.3. Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)

Las células eucariotas poseen cascadas de MAPK como vías de señalización de numerosos estímulos intra- y extracelulares. Estas vías se caracterizan por poseer un módulo citoplasmático de tres quinasas conservadas: la MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa) o MEKK, la MAPKK (MAP quinasa quinasa) o MEK y la MAPK (MAP quinasa), que se activan de forma secuencial para fosforilar a la

siguiente quinasa del módulo, hasta llegar a la fosforilación y activación de la MAPK.

El módulo de las MAPK recibe señales activadoras desde un sensor (frecuentemente ubicado en la membrana plasmática), a través de un sistema de phospho-relay (transferencia de fosfato) o de una proteína G y que culminan en la activación de la MAPKKK por fosforilación o por interacción con otras proteínas.

Una vez activa, la MAPKKK fosforila en residuos serina y treonina y activa a la MAPKK. Ésta, a su vez, fosforila en residuos treonina (a veces serina) y tirosina a la MAPK, activándola. La forma activa de la MAPK se transloca al núcleo, donde fosforila y activa a los factores de transcripción que se hallan bajo su control. Existen también otros sustratos de la MAPK con actividad quinasa, fosfolipasa o proteínas del citoesqueleto.

Los módulos de MAPK se caracterizan porque existe siempre una única MAPK y varias MAPKK y MAPKKK, hecho que asegura la interconexión entre diferentes vías de MAPK (al compartir alguno de los componentes del módulo), así como la capacidad de los diferentes estímulos de activar la vía a través de diferentes componentes. Además, existe mayor número de moléculas de MAPK que de MAPKK y de MAPKKK en la célula, lo que permite la amplificación de la señal. La especificidad de la señal se logra a través de proteínas *scaffold*, que se hallan unidas a la vez a diferentes componentes del módulo, organizándolos. En este mismo sentido, los componentes de los módulos también interaccionan entre ellos.

La regulación negativa de las vías de MAPK se halla en proteína fosfatasas que desfosforilan e inactivan a la MAPKK y a la MAPK (serín treonín fosfatasas) o sólo a la MAPK (tirosín fosfatasas) (Chang and Karin 2001; Hohmann 2002; Roux and Blenis 2004).

3.3.3.1. JNK

La vía de JNK se activa fuertemente en respuesta a citoquinas, radiación UV, privación de factores de crecimiento, y, en menor medida a sérum y factores de crecimiento (Kyriakis and Avruch 2001).

Las MAPKKK de la vía son MEKK1-4, MLK2 y 3, Tpl-2, DLK, TAO1 y 2, TAK1 y ASK1 y -2. Las MAPKK son MEK4 y MEK7 (Kyriakis and Avruch 2001). El sustrato más conocido de JNK es el factor de transcripción c-Jun (ver punto 3.3.1).

3.3.3.2. p38

La vía de p38 se activa en respuesta a estrés oxidativo, daño en el DNA, hipoxia, isquemia, así como a los factores de crecimiento IL-1 y TNF (Freshney *et al.* 1994; Han *et al.* 1994; Wang *et al.* 2000; Bulavin *et al.* 2001).

Las MAPKKK de la vía son MEKK1-4, MLK2 y 3, DLK, ASK1, Tpl2 y Tak1. Las MAPKK son MEK3 y MEK6. Se conocen cuatro isoformas de p38 (α , β , γ y δ). Los sustratos de p38 son los factores de transcripción NF κ B, ATF1 y 2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, Ets-1 y p53, la proteína asociada a microtúbulos Tau y la fosfolipasa A2 (Kyriakis and Avruch 2001).

3.3.4. Nrf2

Nrf2 es un factor de transcripción crucial para el mantenimiento de la homeostasis redox celular. En condiciones basales, Nrf2 se halla localizado en el citoplasma por unión a la proteína rica en cisteínas Keap1. Tras estrés oxidativo, Nrf2 se disocia de Keap1 (Itoh *et al.* 1999) y se localiza en el núcleo, donde heterodimeriza con otros factores de transcripción y se une a un elemento cis denominado ARE (elemento de respuesta antioxidante). Este elemento ARE se localiza en los promotores de una batería de genes citoprotectores, que se inducen en respuesta a la unión de Nrf2 (Kwak *et al.* 2003; Nguyen *et al.* 2003). La localización citoplasmática basal del complejo lo señala para ubiquitinación y degradación por el proteasoma mediada por Keap1 (Zhang *et al.* 2004). El mecanismo molecular de activación de Nrf2 no está todavía demostrado. Existe una teoría que implica a Keap1 como un interruptor redox en situación de estrés oxidativo. Keap1, a través de sus cisteínas, sensoría el estrés oxidativo y liberaría a Nrf2 (Wakabayashi *et al.* 2004). Por otra parte, Nrf2 y Keap1 poseen dominios de exclusión nuclear (NES), y su localización basal está regulada por un proceso activo de exclusión nuclear, mediado por el factor Crm1 (Nguyen *et al.* 2005).

4. RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO EN *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

La levadura unicelular *Schizosaccharomyces pombe* es un excelente sistema modelo para el estudio de las respuestas a estrés oxidativo. Por una parte, su fácil manipulación genética y bioquímica, sumado a la secuenciación completa y correcta de su genoma (Wood *et al.* 2002), permite la caracterización a nivel molecular de las vías de transmisión de señal. Por otra parte, posee sistemas específicos de respuesta a estrés oxidativo como los que poseen las bacterias (es el caso del factor de transcripción Pap1), así como vías de respuesta general a estrés, como la de la MAPK Sty1. Las vías de respuesta general a estrés están conservadas en células eucariotas superiores, que poseen también rutas de MAPK que responden a múltiples señales.

4.1. Pap1

El factor de transcripción Pap1 (*Pombe AP-1*) pertenece a la familia AP-1 de activadores de la transcripción y es homólogo a YAP1 y a Cap1.

Pap1 responde de manera específica a estrés oxidativo y ha sido aislado en numerosos screenings que buscaban genes que confiriesen resistencia a agentes oxidantes. Mediante estos screenings se aislaron también genes que codificaban para proteínas que estabilizan la forma activada de Pap1 (como *pad1*, *crm1-809*, *hba1*) o bien forman parte de sus genes diana (como *hba2*, *pmd1*) (Toda *et al.* 1991; Toda *et al.* 1992; Nishi *et al.* 1993; Turi *et al.* 1994; Nagao *et al.* 1995; Kumada *et al.* 1996; Toone *et al.* 1998).

La actividad de Pap1 se regula a nivel de localización subcelular; en estado basal, Pap1 está localizado en el citoplasma, aunque se halla en un *shuttling* núcleo-citoplasmático. Pap1 posee señales de localización nuclear (NLS) y de exporte nuclear (NES). El NES se une al factor de exporte Crm1 y este proceso es dominante sobre el importe en condiciones de no estrés. Después de una señal activadora de Pap1, se producen cambios conformacionales en la región que contiene el NES impidiéndose la interacción con Crm1 (Toone *et al.* 1998). La inhibición del exporte nuclear de Pap1 conduce a la acumulación de éste en el núcleo y, con ello, a la activación transcripcional de sus genes diana (Castillo *et al.*

2002) (Fig. 11.). El exporte nuclear de Pap1 depende asimismo de Hba1, proteína con dominio de unión a Ran y que funciona como cofactor en el exporte de Pap1 y Sty1 del núcleo (Castillo *et al.* 2003).

Pap1 transactiva genes implicados en vías de detoxificación celular como *ctt1* (catalasa), *trx2* (tioredoxina), *trr1* (tioredoxina reductasa), *tpx1* (tioredoxina peroxidasa) y *pgr1* (glutathiona reductasa), así como transportadores de membrana de tipo ABC como *hba2/bfr1* y *pmd1*. Estos genes forman parte de la respuesta adaptativa celular a oxidantes que promueve Pap1; después de un insulto oxidativo inicial de baja concentración, prepara a las células para sobrevivir a un nuevo insulto de mayor concentración (Quinn *et al.* 2002).

Pap1 se activa en respuesta a oxidantes como dietilmaleato (DEM) y H₂O₂ y lo hace a través de la oxidación de cisteínas redox. Pap1 posee dos clusters ricos en cisteínas (CRD) en su secuencia: uno en la región central de la proteína (n-CRD) y otro en la región C-terminal (c-CRD), donde está ubicado el NES (Fig. 10.).

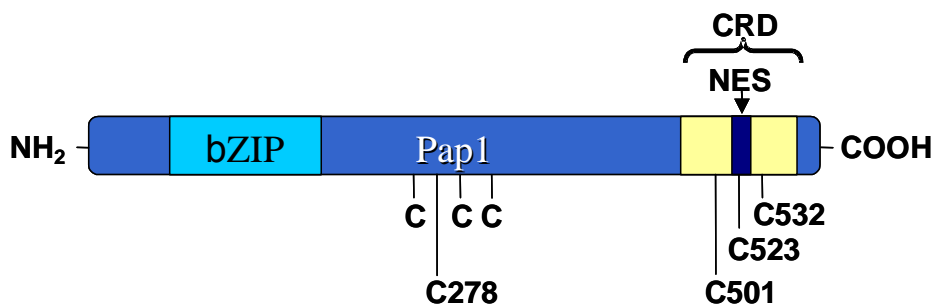


Figura 10. Estructura del factor de transcripción Pap1 de *Schizosaccharomyces pombe*.

En respuesta a H₂O₂ y mediante pruebas genéticas, se cree que H₂O₂ provoca la formación de un puente disulfuro intramolecular en Pap1 entre las Cys278 (del n-CRD) y Cys501 (del c-CRD) (Castillo *et al.* 2002). El puente disulfuro provoca un cambio conformacional en Pap1 que impide la interacción con Crm1 y, por tanto, induce la acumulación nuclear de Pap1. La reducción del puente disulfuro de Pap1 se lleva a cabo a través de la actividad Trr1, según pruebas genéticas (Castillo E y Hidalgo E, resultados no publicados). La inducción del gen que codifica para Trr1 depende de Pap1. De esta manera, Pap1 se autorregula negativamente.

Existe en *S. pombe* otra vía que responde a estrés oxidativo: la de la MAPK Sty1 (ver abajo). Se cree que existe una relación entre Sty1 y la activación de Pap1, dado que una cepa delecionada en la MAPK no es capaz de activar a Pap1 tras

estrés por H₂O₂ (Toone *et al.* 1998). Dado que Sty1 es una quinasa, se creyó que Pap1 podía ser su sustrato, pero pruebas *in vitro* nunca confirmaron esta hipótesis.

En respuesta a DEM, el NES deja de ser accesible a Crm1 por la alquilación de las tres cisteínas del c-CRD. DEM es un electrófilo que se conjuga con Cys523 y Cys532 de Pap1, formando aductos tioéter con cada una de ellas. La forma alquilada de Pap1 no interacciona con el exportador nuclear por causas estéricas. La activación de Pap1 en respuesta a DEM no es reversible, excepto a tiempos muy largos y no fisiológicos, tras el lavado del alquilante del medio (Castillo *et al.* 2002); Castillo E y Hidalgo E, resultados no publicados).

4.2. Prr1

El gen *prp1* codifica para un factor de transcripción con homología a un regulador de la respuesta de los sistemas reguladores de dos componentes bacterianos y a Skn7 de *S. cerevisiae*. Prr1 posee en el extremo C-terminal un dominio aceptor de fosfato con un residuo aspartato, lugar teórico de fosforilación, precedido de un dominio de unión a DNA homólogo al de HSF (heat shock factor) de mamífero. Posee también una señal de importe nuclear.

La cepa delecionada en el gen *prp1* muestra fenotipo de sensibilidad a estrés oxidativo generado por peróxido (H₂O₂ y t-BOOH), pero no a otros agentes oxidantes como diamida. También muestra sensibilidad a estrés por metales pesados, pero no parece tener efecto en estrés osmótico por sorbitol ni tampoco por irradiación con UV (Ohmiya *et al.* 1999). La falta de Prr1 conduce a falta de esterilidad por defectos en la conjugación y/o formación de esporas (Ohmiya *et al.* 2000).

Se ha comprobado que Prr1 regula la inducción de los genes antioxidantes *ctt1* y *trr1*, que también dependen de Pap1 (Ohmiya *et al.* 1999). Prr1 controla la inducción de *ste11*, que codifica para Ste11, factor que transactiva numerosos genes implicados en el desarrollo sexual (Ohmiya *et al.* 2000). Este gen también está controlado por el factor de transcripción Atf1, sustrato de la MAPK Sty1 (ver punto 4.3). Prr1 también tiene un papel en la inducción de *cta3*, gen que se induce tras estrés por cationes (Greenall *et al.* 2002).

4.3. Sty1

La vía de la SAPK Sty1 de *S. pombe* responde a multitud de estímulos de estrés, como son el osmótico, oxidativo, por temperatura, UV, limitación nutricional o metales pesados (Millar *et al.* 1995; Shiozaki and Russell 1995; Degols *et al.* 1996; Shiozaki and Russell 1996; Degols and Russell 1997) (Fig. 11).

El módulo central de quinasas consiste en la MAPK Sty1 (Millar *et al.* 1995; Shiozaki and Russell 1995; Kato *et al.* 1996), la MAPKK Wis1 y las aparentemente redundantes MAPKKK Wis4 y Win1. El módulo central de MAPK se activa por fosforilación activadora de un componente anterior en la vía que, a su vez, fosforila y activa al siguiente componente del módulo. La activación de la vía culmina en la fosforilación de Sty1. La fosforilación de Sty1 es revertida en el estado basal por la proteína fosfatasa Pyp1 y tras estrés por Pyp2 (Millar *et al.* 1995; Shiozaki and Russell 1995; Samejima *et al.* 1997; Shieh *et al.* 1997; Shiozaki *et al.* 1997; Shiozaki *et al.* 1998).

La vía de Sty1 cuenta entre sus proteínas diana al factor de transcripción Atf1, la proteína Csx1 (Rodríguez-Gabriel *et al.* 2003) y las quinasas Cmk2 y Srk1 (Sanchez-Piris *et al.* 2002; Lopez-Aviles *et al.* 2005). Existen evidencias genéticas de que existen más proteínas diana de Sty1, aún por describir.

La activación de la vía en respuesta a estrés oxidativo se da a través de un sistema de transferencia de fosfatos formado por las proteínas sensoras Mak2 y 3 (homólogas a Sln1 de *S. cerevisiae*), Mpr1 y el regulador de la respuesta Mcs4, que se une a las MAPKKK e inicia su fosforilación (Fig. 11.). Existe otra proteína homóloga a Mak 2 y 3, Mak1, que no interviene en la señalización a través de Sty1 en respuesta a estrés oxidativo, pero puede que intervenga en la activación de Prr1. La activación de Sty1 tras estrés térmico se produce por pérdida de interacción con la fosfatasa Pyp1. Existe otro nivel de control sobre la vía: se trata de la estabilización del mRNA mensajero de *atf1* que se produce tras estrés oxidativo y que es ejercida por la proteína Csx1, sustrato de Sty1 (Rodríguez-Gabriel *et al.* 2003).

La activación de Sty1 por cualquiera de los estreses antes mencionados conduce, a través de la fosforilación y activación de Atf1, a la inducción de una

batería de genes implicados en la supervivencia a la situación de estrés: síntesis de moléculas de protección ante estrés, así como modificación de vías metabólicas, y conocidos como pertenecientes a la respuesta general a estrés (CESR: core environmental stress response). Estudios a través de microarrays han permitido la caracterización de 140 genes que se han catalogado como pertenecientes al CESR (Chen *et al.* 2003). Paralelamente, cada estrés particular conduce a la inducción de ciertos genes que forman la respuesta específica a estrés (SESR: specific environmental stress response). La respuesta CESR está regulada principalmente por Atf1, mientras que la respuesta SESR se halla controlada en menor medida por Sty1-Atf1, y debe haber, por tanto, participación de otros factores.

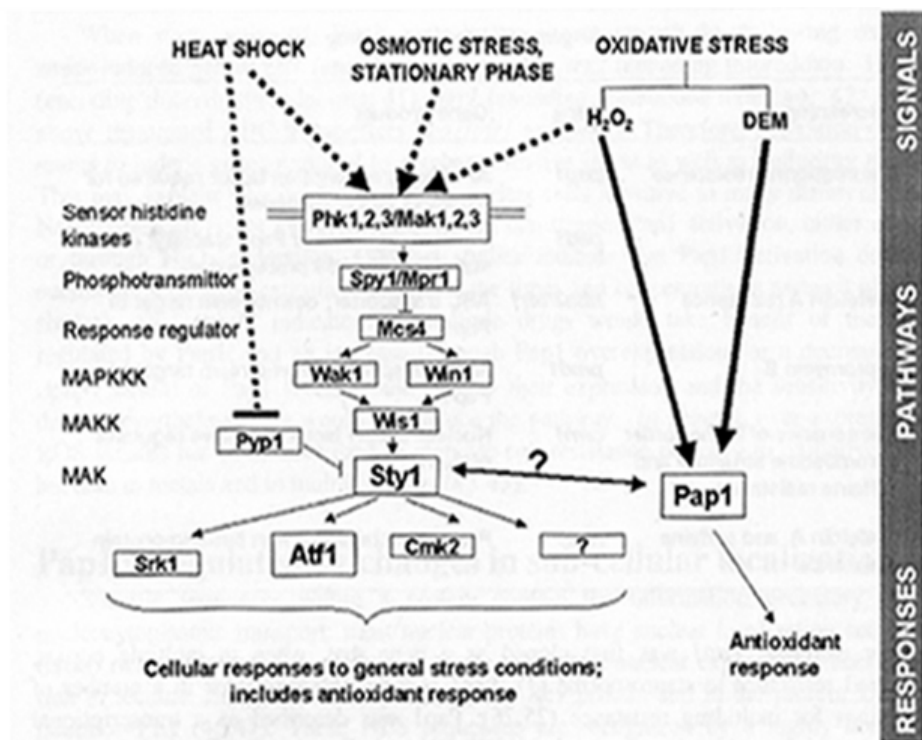


Figura 11. Rutas de respuesta a estrés en *Schizosaccharomyces pombe*. *Recent Devel. Cell Res.* 1:217-230 2003.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

- 1.- Determinar la relación entre Pap1 y Sty1 en la respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂.
- 2.- Determinar si existe un sensor anterior a Pap1 en la respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂.

RESULTADOS y METODOLOGÍA

1. CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE Pap1 EN RESPUESTA A DIFERENTES DOSIS DE H₂O₂

El factor de transcripción Pap1 se activa en respuesta a estrés oxidativo (por oxidantes como H₂O₂ o DEM) a través de su acumulación nuclear. La localización de Pap1 en estado basal es citoplasmática, existe una continua translocación al núcleo del factor (debido a que posee una señal de localización nuclear (NLS)) que es compensada por un transporte activo dependiente del factor de transporte Crm1. Tras tratamientos con agentes activadores de Pap1, éste deja de interactuar con Crm1 y, a consecuencia de ello, se acumula en el núcleo donde induce una respuesta transcripcional que se encarga de reparar los daños y corregir la situación de estrés oxidativo (Kuge *et al.* 1997).

El estrés oxidativo por H₂O₂ activa a Pap1 y lo hace de una forma dependiente de la MAPK Sty1 (Toone *et al.* 1998). La vía de la MAPK Sty1 se activa por H₂O₂ y, por tanto, quisimos determinar cuál era la relación entre la activación de Pap1 y Sty1 en respuesta a estrés por H₂O₂ en *S. pombe*.

Este bloque de resultados incluye:

Resultados publicados en el artículo "*Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration*" Ana P. Vivancos, Esther A. Castillo, Nic Jones, José Ayté and Elena Hidalgo. *Molecular Microbiology* (2004) 52, 1427-35.

Resultados no publicados que complementan los resultados anteriores.

1.1. La cinética de activación de Pap1 varía en función de la concentración de oxidante en el medio

Quisimos averiguar la cinética de activación de Pap1 en respuesta a diferentes dosis de H₂O₂ y, en este sentido, se estudió la localización subcelular de GFP-Pap1 en cinéticas de tiempo y concentración de oxidante en el medio (Fig. 12A; (Vivancos *et al.* 2004)

Se observó que, mientras dosis bajas de H_2O_2 extracelulares (0.2 mM) provocaban una activación rápida de Pap1 (tras ~ 5 min de tratamiento), las dosis más elevadas (≥ 1 mM H_2O_2) presentaban una activación más tardía de Pap1 (variable en función de la concentración de oxidante desde 30 hasta 105 min). La prueba bioquímica de que la forma nuclear de Pap1 era la que posee un puente disulfuro intramolecular (Fig. 12B; (Vivancos *et al.* 2004) se obtuvo a través del uso de extractos de TCA (ácido tricloroacético).

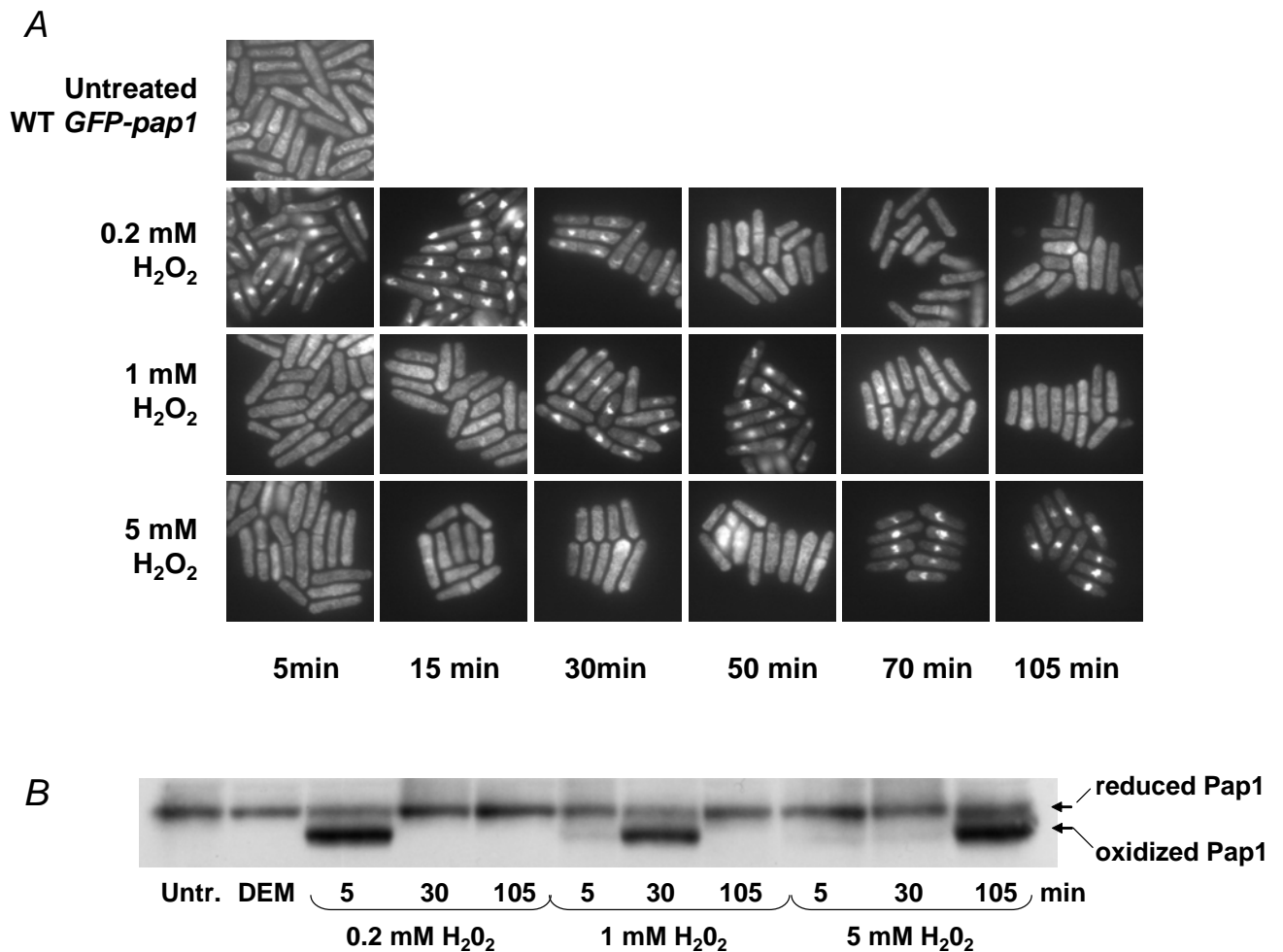


Figura 12. La cinética de activación de Pap1 depende de la concentración de oxidante. A. Localización subcelular de GFP-Pap1 en la cepa EHH14 (cepa $\Delta pap1$ que posee un alelo GFP-Pap1 integrado en el cromosoma bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) en cinéticas de tiempo y concentración de H_2O_2 . B. Se muestra el estado redox de GFP-Pap1 en la cepa EHH14 en cinéticas de tiempo y concentración de H_2O_2 y tras 50 min de tratamiento 4 mM dietilmaleato (DEM).

La técnica de obtención de extractos TCA permite congelar la situación redox intracelular por acidificación del medio a través de la adición de TCA en el momento de recogida de la muestra celular. A continuación se obtiene un

extracto proteico en un medio de TCA y se precipitan las proteínas. Se eliminan los restos de ácido y se resuspende el precipitado en un tampón que contiene iodoacetamida (IA), que alquila y bloquea la reactividad de los grupos SH de los residuos cisteína. Finalmente, se realiza una electroforesis desnaturante no reductora, que mantiene el puente disulfuro en Pap1, seguida de una inmunodetección con anticuerpo anti-Pap1. La forma oxidada de Pap1 presenta una movilidad en el gel de poliacrilamida diferente a la de la forma reducida, probablemente debido a que el puente disulfuro induce un cambio conformacional en la proteína.

1.2. Las cisteínas 278, 501 y 532 participan en la formación de un puente disulfuro intramolecular activador en el factor de transcripción Pap1

Se había determinado anteriormente, a través de pruebas genéticas, que las cisteínas de Pap1 implicadas en la respuesta a H₂O₂ eran, por una parte, la Cys278 del cluster de la región central de Pap1 y, por otra, las Cys501 y Cys532 del cluster de la región carboxilo terminal de Pap1 (Castillo *et al.* 2002)(Fig. 13A). La obtención de extractos de TCA no reductores permitió obtener pruebas bioquímicas de la esencialidad de estos residuos en la formación de un puente disulfuro intramolecular en Pap1 (Fig. 13B). A partir de los mismos, se pudo comprobar que el papel de Cys501 y Cys532 es parcialmente redundante: la ausencia de cada una de ellas por separado permite la formación de un puente disulfuro en una pequeña proporción de las moléculas de GFP-Pap1, mientras que la falta de ambas impide la oxidación del factor de transcripción. Se analizó la proteína GFP-Pap1.C501A,532T debido a que su localización basal es citoplasmática, mientras que GFP-Pap1.C501,532A posee una localización basal parcialmente nuclear. Esto es probablemente debido a que algunas de las modificaciones de las cisteínas de la región CRD pueden alterar la interacción con el exportador Crm1 y, con ello, sufrir un exporte deficitario.

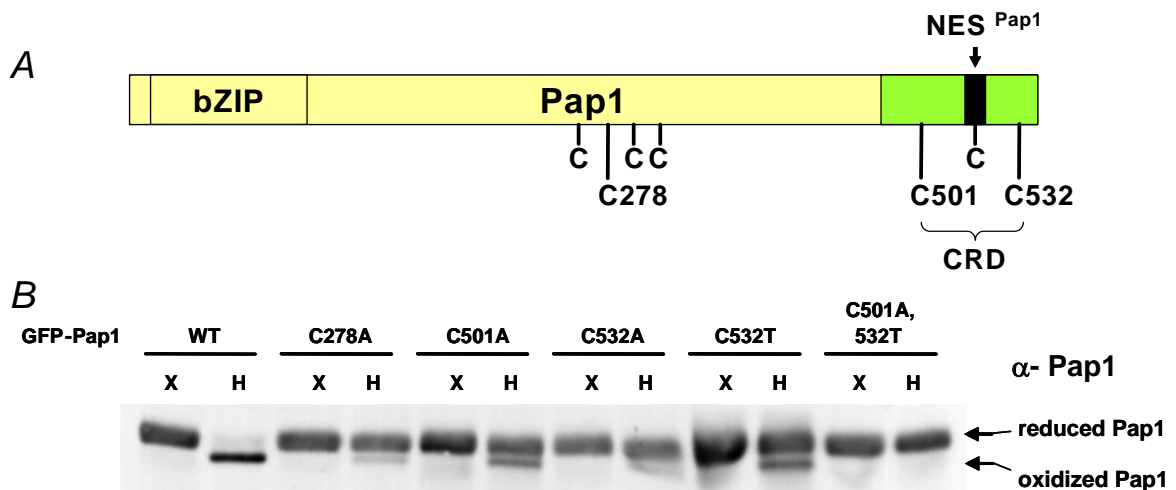


Figura 13. La activación de Pap1 por H₂O₂ a través de la formación de un puente disulfuro intramolecular depende de las cisteínas 278, 501 y 532. A. Esquema del factor de transcripción Pap1. En el esquema se indica el dominio de unión a DNA (bZIP), la región C-terminal rica en cisteínas (CRD), la señal de exporte nuclear de Pap1 y la posición relativa de los residuos de cisteína, figurando numerados los importantes para la formación del puente disulfuro intramolecular. B. Se muestra el estado redox de GFP-Pap1, GFP-Pap1.C278A, GFP-Pap1.C501A, GFP-Pap1.C523A, GFP-Pap1.C532T y GFP-Pap1.C501,532A en las cepas EHH14 y derivadas (cepas $\Delta pap1$ que poseen un alelo GFP-Pap1 integrado en el cromosoma o los correspondientes mutantes de cisteína bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) tras tratamientos de 5 min con 0.2 mM de H₂O₂.

1.3. La cinética de activación de Pap1 depende de Sty1 sólo tras tratamientos con dosis altas de H₂O₂

Realizamos una cinética de activación de Pap1 en una cepa delecionada en *sty1*. De esta manera se pudo observar que la activación de GFP-Pap1 sólo está abolida en la cepa defectiva en *sty1* tras tratamientos con dosis elevadas de oxidante, como demuestran su acumulación nuclear, su estado redox y la respuesta transcripcional Pap1-dependiente en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂ (Figs. 14A, B y C; (Vivancos *et al.* 2004). El estudio de la localización de Pap1 en una cepa delecionada en *atf1*, cuyo producto génico es el principal factor diana de Sty1, reveló que, tras dosis altas de H₂O₂ existe una activación pobre y retardada de Pap1 (Fig. 14D), lo cual indica que el requerimiento de Sty1 se halla mediado en gran medida, pero no de forma absoluta, por Atf1.

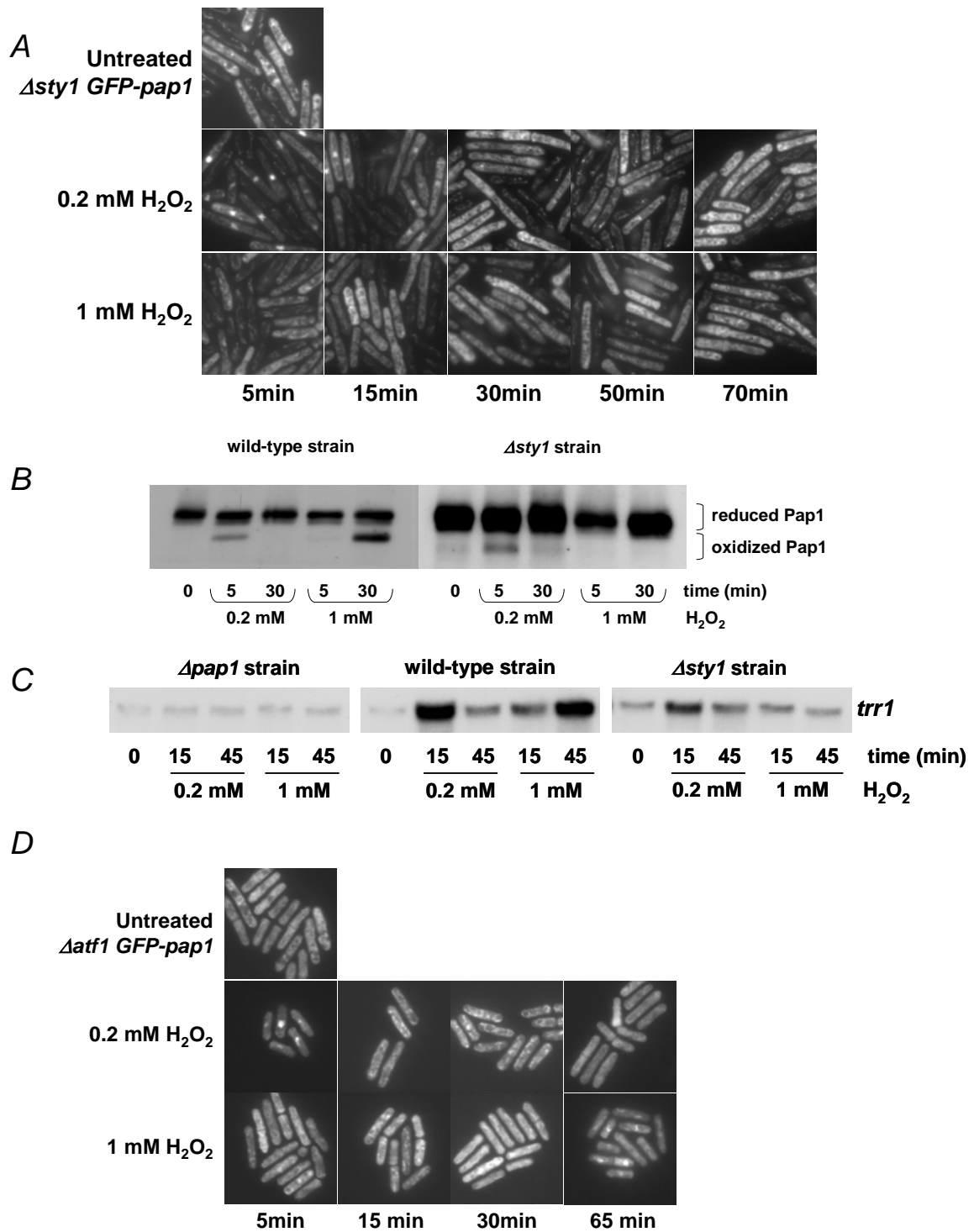


Figura 14. La cinética de activación de Pap1 depende de Sty1-Atf1 sólo tras tratamientos de elevadas concentraciones de oxidante. A. Localización subcelular de GFP-Pap1 en la cepa AV1 (cepa *Δpap1 Δsty1* que posee un alelo GFP-Pap1 integrado en el cromosoma bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂. B. Estado redox de GFP-Pap1 en las cepas EHH14 (cepa *Δpap1* que posee un alelo GFP-Pap1 integrado en el cromosoma bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) y AV1 en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂. C. Patrón de inducción del gen Pap1-dependiente *trr1* en cepas *Δpap1* (EHH108), WT (972) o *Δsty1* (NT224) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂. D. Se muestra la localización subcelular de GFP-Pap1 en la cepa AV3 (cepa *Δpap1 Δatf1* que posee un alelo GFP-Pap1 bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

1.4. La preactivación de la ruta de Sty1 o la superexpresión de *gpx1* y *ctt1* acelera la activación de Pap1 tras tratamientos de altas dosis de H₂O₂

El estrés oxidativo producido por tratamientos de 1 mM de H₂O₂ provoca la activación de Sty1 a tiempos cortos (~ 10 min después del tratamiento) (Degols *et al.* 1996). Pensamos que la activación tardía de Pap1 tras tratamientos de altas dosis de H₂O₂ debía estar relacionada con la activación de Sty1 que se da a tiempos más cortos. Para confirmar esta hipótesis, realizamos experimentos para determinar la cinética de la activación de Pap1 tras tratamiento con 1 mM H₂O₂ en células que tuvieran preactivada la vía de Sty1 (mediante estrés osmótico o falta de la fuente de carbono) o que se hallaran superexpresando los productos de los genes *gpx1* o *ctt1*. Los genes *gpx1* y *ctt1* codifican proteínas detoxificantes de H₂O₂ y forman parte de la respuesta de inducción transcripcional de Sty1-Atf1. En todos los casos, la activación de Pap1 se adelantó a cinéticas similares a las de tratamientos con bajas dosis de oxidante (Fig. 15; (Vivancos *et al.* 2004).

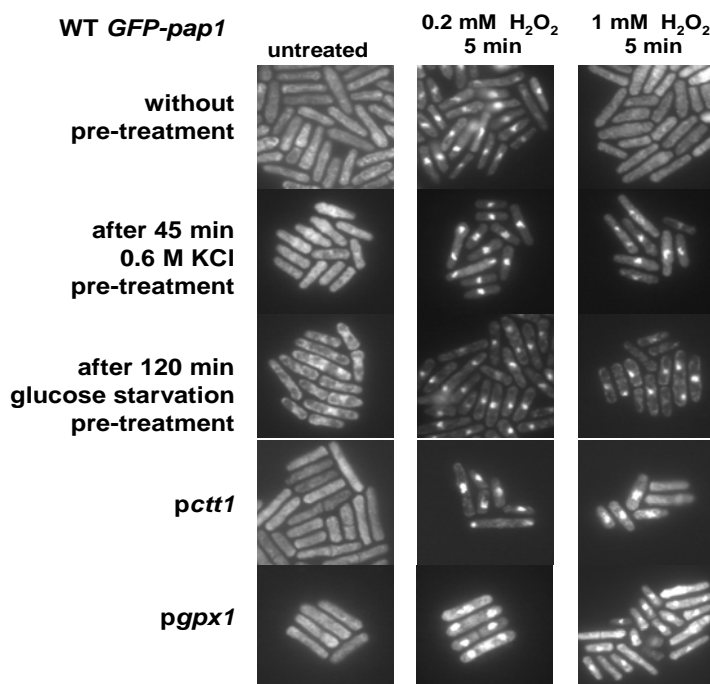


Figura 15. La cinética de activación de Pap1 tras tratamientos de elevadas concentraciones de oxidante depende de la activación de la vía de Sty1. Se muestra la localización subcelular de GFP-Pap1 en la cepa EHH14 (cepa $\Delta pap1$ que posee un alelo GFP-Pap1 bajo el control de un promotor *nmf* de fuerza intermedia) sin tratar, pretratada con estrés osmótico o falta de fuente de carbono y con elevado número de copias de los genes antioxidantes *ctt1* y *gpx1* tras tratamientos de 5 min de 0.2 mM y 1 mM de H₂O₂.

1.5. La superexpresión de Gpx1 permite recuperar sólo parcialmente la activación de Pap1 a dosis altas de H₂O₂ en una cepa $\Delta sty1$

La cepa defectiva en *sty1* es incapaz de activar a Pap1 tras altas dosis de oxidante. Si la hipótesis de trabajo era correcta, y la concentración intracelular de H₂O₂ es la que condiciona la activación de Pap1, la superexpresión de proteínas detoxificantes de este oxidante, como son Gpx1 y Ctt1, cuyos genes son diana de Sty1-Atf1, debería rescatar el fenotipo de dicha cepa. Esto fue así en el caso de Gpx1, sin embargo, Ctt1 fue incapaz de complementar la falta de Sty1. En el caso de la superexpresión de Gpx1, la reversión del fenotipo de la cepa $\Delta sty1$ fue parcial, activándose Pap1 tras tratamientos de concentración 1 mM de H₂O₂ con cinética más tardía que en la cepa salvaje (Fig. 16; (Vivancos *et al.* 2004).

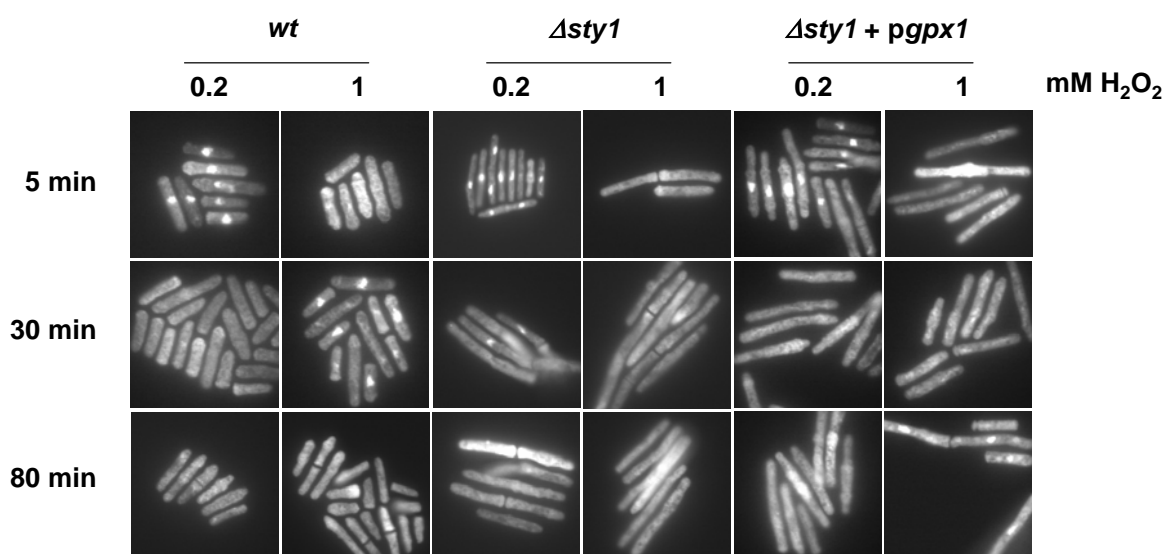


Figura 16. La superexpresión de la glutatona peroxidasa es capaz de permitir la activación de Pap1 en una cepa $\Delta sty1$ tras altas dosis de oxidante. Se muestra la localización subcelular de GFP-Pap1 en la cepa EHH14 (cepa $\Delta pap1$ que posee un alelo GFP-Pap1 bajo el control de un promotor *nmf* de fuerza intermedia), AV1 (cepa $\Delta pap1 \Delta sty1$ que posee un alelo GFP-Pap1 bajo el control de un promotor *nmf* de fuerza intermedia) y AV1 con elevado número de copias del gen antioxidante *gpx1* tras cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

La versión definitiva del artículo está publicada en <http://www.blackwell-synergy.com>:

Vivancos AP, Castillo EA, Jones N, Ayte J, Hidalgo E. *Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration.* **Molecular Microbiology**. 2004 Jun;52(5):1427-35. <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2004.04065.x>

2. PAPEL DE LA PEROXIRREDOXINA (Prx) Tpx1 COMO SENSOR DE H₂O₂ Y TRANSDUCTOR DE LA SEÑAL A Pap1.

El anterior bloque de resultados demostraba, a través de experimentos genéticos y bioquímicos que existe una dependencia en Sty1 para la activación de Pap1 sólo tras tratamientos con H₂O₂ de elevada concentración (igual o superior a 1 mM). Esta dependencia se halla relacionada con la activación de Sty1 que se produce tras estos tratamientos, así como con la respuesta de inducción transcripcional que comporta y que se halla mediada por el factor de transcripción Atf1, que induce, entre otros, genes detoxificantes de H₂O₂, como *gpx1* (glutathiona peroxidasa) o *ctt1* (catalasa). De hecho, la expresión episomal de *gpx1* es capaz de restaurar la capacidad de activar a Pap1 tras tratamientos de altas dosis de H₂O₂ en una cepa defectiva en Sty1, aunque no con cinéticas iguales a la cepa salvaje. Deben existir, por tanto, otras actividades inducidas de forma Sty1 dependiente que medien la activación de Pap1 en estas condiciones y cuya identificación es objeto en el siguiente bloque de resultados.

Este bloque de resultados presenta:

Resultados publicados en el artículo “*A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway*” Ana P. Vivancos, Esther A. Castillo, Benoît Biteau, Carine Nicot, José Ayté, Michel Toledano and Elena Hidalgo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2005) 102:8875-80.

Resultados no publicados que complementan los resultados anteriores.

2.1. La peroxirredoxina Tpx1 es requerida para la activación de Pap1

Se inició la búsqueda y caracterización de proteínas que participaran en la activación de Pap1 en situaciones de estrés por H₂O₂ en *S. pombe*. YAP1 es el homólogo a Pap1 en *Saccharomyces cerevisiae*. Responde, al igual que Pap1, a señales de estrés oxidativo de diferentes naturalezas aunque su

activación tras tratamientos con H_2O_2 muestra cinéticas diferentes a las de Pap1: dosis elevadas del oxidante no retrasan la activación de YAP1. Se describió recientemente un sensor de estrés oxidativo anterior a YAP1, GPX3 (Delaunay *et al.* 2002), una proteína con actividad peroxidasa acoplada a la glutatona celular. Quisimos, por tanto, comprobar si en *S. pombe* existía una proteína con homología funcional a GPX3.

En *S. pombe*, existen varios genes que codifican proteínas con actividad peroxidasa: *gpx1* (glutatona peroxidasa), *pmp20* (Prx de una Cys) y *tpx1* (Prx de dos Cys típica). Se construyeron cepas delecionadas en estos genes así como cepas que se hallan superexpresándolos y se comprobó su supervivencia en placa tras estrés oxidativo (Fig. 17; (Vivancos *et al.* 2005), que resultó ser idéntica a la de la cepa salvaje.

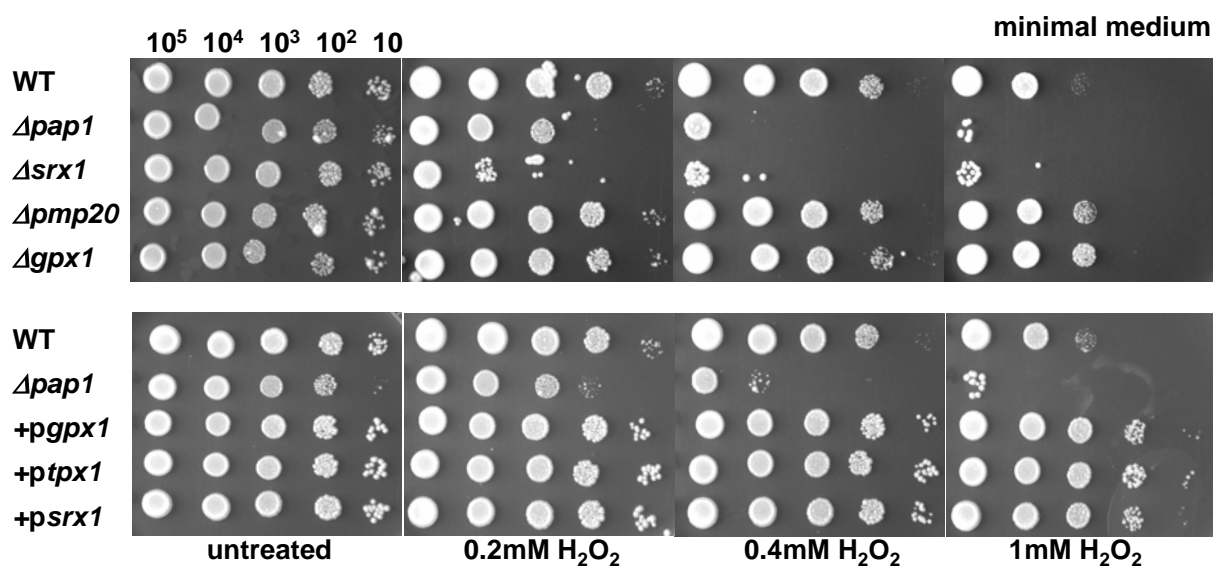


Figura 17. La falta de Pmp20 y Gpx1 no afecta a la viabilidad celular en presencia de H_2O_2 . Viabilidad de cepas HM123 (WT), AM004 ($\Delta pap1$), EA38 ($\Delta srx1$), EA49 ($\Delta pmp20$), EA37 ($\Delta gpx1$) y WT transformada con los plásmidos p101.42x (*pgpx1.42x*), p119.42x (*ptpx1.42x*) y p120.42x (*psrx1.42x*) en medio sólido mínimo en presencia o no de diferentes concentraciones de H_2O_2 .

En paralelo, se realizaron en las cepas delecionadas en *gpx1* y *pmp20*, estudios del estado redox de Pap1 en cinéticas de tiempo y concentración de H_2O_2 (Fig. 18; (Vivancos *et al.* 2005), que mostraron que Pap1 se oxida de forma igual que en la cepa salvaje.

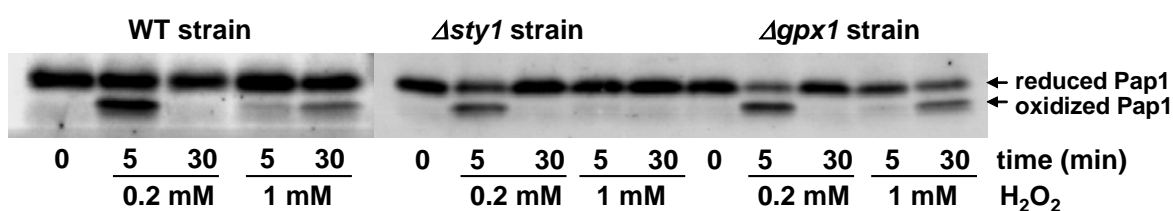


Figura 18. La activación de Pap1 no depende de Gpx1. Estado redox de Pap1 en las cepas HM123 (WT), NT224 ($\Delta sty1$) y EA37 ($\Delta gpx1$) en cinéticas de tiempo y concentración de H_2O_2 .

Fue imposible aislar la cepa $\Delta tpx1$ mediante procedimientos genéticos sencillos. Para estudiar su efecto sobre la activación de Pap1, se aisló una cepa haploide delecionada en el gen de *tpx1* pero que expresaba ectópicamente la proteína Tpx1 con un promotor reprimible por tiamina. Tras 25 h de incubación con tiamina, esta cepa no poseía Tpx1. En estas condiciones, se pudo comprobar la falta de activación de Pap1 tras estrés por H_2O_2 (Figs. 19A y B, (Vivancos *et al.* 2005). Los resultados obtenidos indican que Tpx1 es un sensor de H_2O_2 anterior a Pap1 en *S. pombe*.

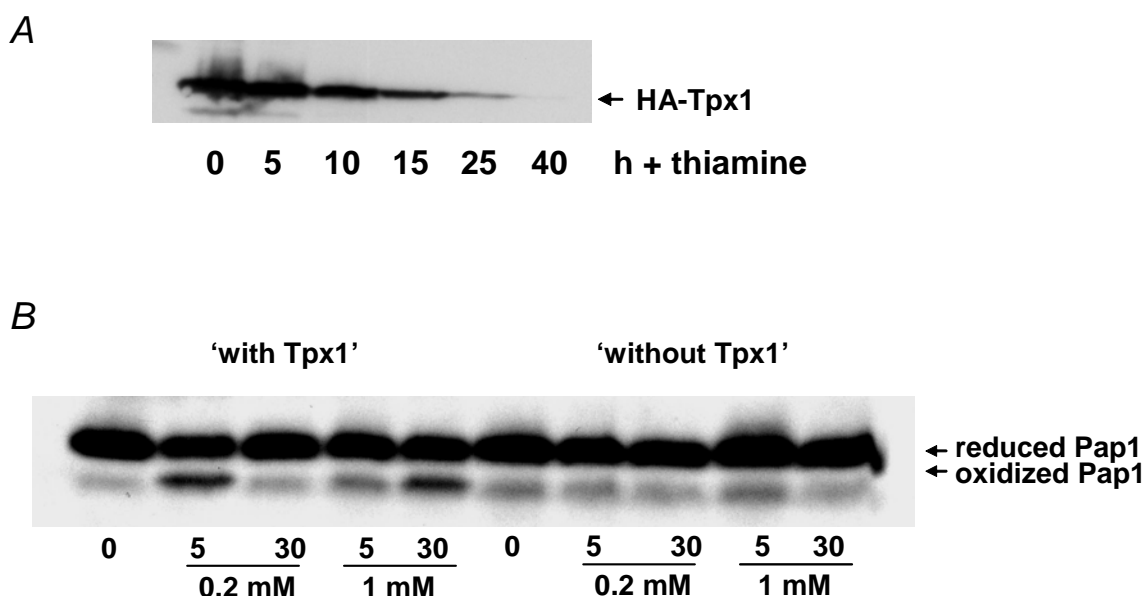


Figura 19. La activación de Pap1 depende de Tpx1. A. Cantidad de proteína HA-Tpx1 presente en la cepa hEA40 + p123.41x ($\Delta tpx1$ transformada con el plásmido *pHA-tpx1.41x*, que expresa HA-Tpx1 bajo el control del promotor *nmt* de fuerza intermedia) tras represión del promotor *nmt* con tiamina a diferentes tiempos. B. Estado redox de Pap1 en la cepa hEA40 + p123.41x ($\Delta tpx1$ transformada con el plásmido *pHA-tpx1.41x*) tratada con tiamina durante 5 h ('with Tpx1': presencia de niveles WT de HA-Tpx1) y 25 h ('without Tpx1': ausencia de HA-Tpx1) en cinéticas de tiempo y concentración de H_2O_2 .

La activación de Pap1, por tanto, está inhibida en una cepa que no posee proteína Tpx1. Sin embargo, existe la posibilidad de que la falta de la Prx provocara un aumento intracelular constitutivo de ROS que, sumado al estrés extracelular, provocara un estado redox citosólico demasiado oxidante para la activación de Pap1. Para descartar esta posibilidad, se estudió la oxidación de Pap1 en la cepa hEA40 p123.41x tras 5 o 25 h de incubación con tiamina y diferentes dosis de H₂O₂ y se vio que no había activación del factor de transcripción en ninguna de las concentraciones utilizadas en ausencia de Tpx1 (Fig. 20).

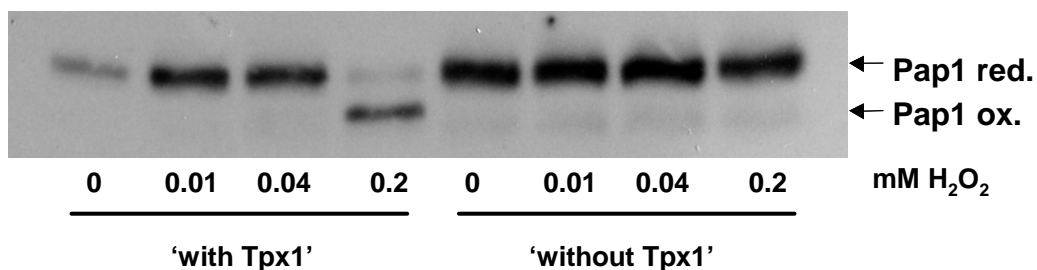
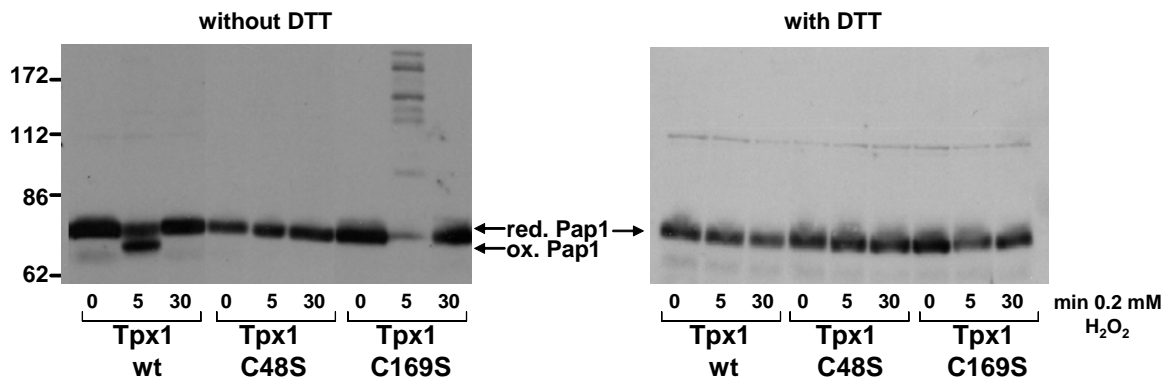


Figura 20. La activación de Pap1 depende de Tpx1 tras todas las dosis de H₂O₂. Se muestra el estado redox de Pap1 en la cepa hEA40 + p123.41x ($\Delta tpx1$ transformada con el plásmido pHA-*tpx1.41x*) tratada con tiamina durante 5 h ('with Tpx1': presencia de HA-Tpx1) y 25 h ('without Tpx1': ausencia de HA-Tpx1) en tratamientos de 5 min de cinéticas concentración de H₂O₂.

2.2. La activación de Pap1 a nivel transcripcional depende de las cisteínas 48 y 169 de Tpx1

La oxidación de Pap1 depende de la presencia de Tpx1 y de sus dos cisteínas redox: la peroxidática (Cys48) y la resolutive (Cys169), tal como aparece publicado en (Vivancos *et al.* 2005) (Fig. 21A). Faltaba, sin embargo, por confirmar que, en las cepas que expresan las formas mutantes de las cisteínas de Tpx1, Pap1 no se acumula en el núcleo y no activa la transcripción de genes dependientes. Esto se determinó a través de análisis mediante Northern blot de la inducción de un gen Pap1-dependiente, *trr1*, en células tratadas o no con H₂O₂ de cepas delecionadas en *tpx1* que expresan desde otro locus genómico las proteínas Tpx1, Tpx1.C48S ó Tpx1.C169S (Fig. 21B).

A



B

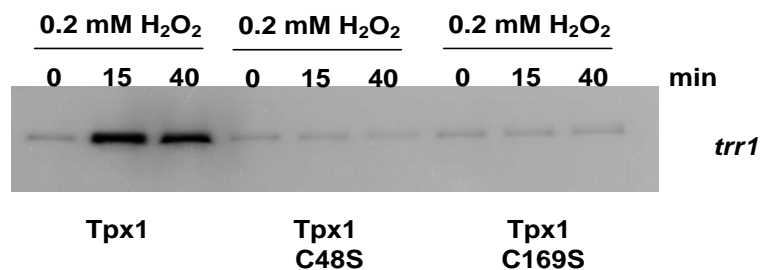


Figura 21. Las cisteínas peroxidática (Cys48) y resolutive (Cys169) de Tpx1 son esenciales para la activación de Pap1. A. Estado redox de Pap1 en cepas hAV36+ p123.42x + p145.WT/ C48S/ C169S (cepas $\Delta tpx1$ transformadas con plásmidos que expresan la proteína HA-Tpx1 desde un promotor reprimible *nmt* y la proteína Tpx1 o Tpx1.C48S o Tpx1.C169S bajo el control del promotor de *tpx1* en otro locus genómico) tratadas 25 h con tiamina (ausencia de HA-Tpx1) y en cinéticas de tiempo tras tratamiento con 0.2 mM de H_2O_2 . Las muestras de la cepa hAV36+ p123.42x + p145.C169S fueron tratadas con el agente reductor DTT. B. Se muestra el patrón de inducción del gen Pap1-dependiente *trr1* en cepas hAV36+ p123.42x + p145.WT/ C48S/ C169S (cepas $\Delta tpx1$ transformadas con plásmidos que expresan la proteína HA-Tpx1 desde un promotor reprimible *nmt* y la proteína Tpx1 o Tpx1.C48S o Tpx1.C169S bajo el control del promotor de *tpx1* en otro locus genómico) tratadas 25 h con tiamina (ausencia de HA-Tpx1) y en cinéticas de tiempo tras tratamiento con 0.2 mM de H_2O_2 .

2.3. Srx1 es requerido para la activación de Tpx1 y de Pap1 después de altas dosis de oxidante

Se sabe que las Prx se inactivan por elevadas dosis de sustrato por formación de sulfínico sobre su C_P y que pueden reactivarse por SRX1 en *S. cerevisiae* (ver apartado 2.2.3.3. de la introducción; (Biteau *et al.* 2003). Identificamos un gen homólogo a *SRX1* en *S. pombe*, *srx1*. Comprobamos la supervivencia en placa tras estrés por H_2O_2 de una cepa delecionada en *srx1* y pudimos comprobar que presenta sensibilidad similar a la de una cepa

defectiva en *pap1* (Fig. 17; (Vivancos *et al.* 2005). Se ensayó también una cepa salvaje que sobreexpresa *srx1* desde un promotor reprimible por tiamina y se determinó que poseía una supervivencia a estrés oxidativo en placa superior a la de la cepa salvaje (Fig. 17; (Vivancos *et al.* 2005). Esto sugiere un papel de Srx1 en la respuesta a estrés por H₂O₂ en *S. pombe*.

Se caracterizó el papel de Srx1 sobre Tpx1 a través de estudios del estado redox de la Prx en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂ (Fig. 22A; (Vivancos *et al.* 2005). Una cepa defectiva en *srx1* presenta una oxidación irreversible de Tpx1 tras dosis elevadas de oxidante, fenotipo similar al de una cepa $\Delta sty1$. El estado oxidado a sulfínico de Tpx1 es catalíticamente inactivo, dado que no se hallan dímeros covalentes en estas condiciones. El uso de un anticuerpo específico contra el péptido sulfinilado de Prx1 de humanos (Woo *et al.* 2003), que reconoce la forma sulfinilada de Tpx1 ha permitido la comprobación de que, efectivamente, Srx1 es responsable de la reactivación de Tpx1 tras tratamientos que provocan la superoxidación de la Prx (Fig. 22B).

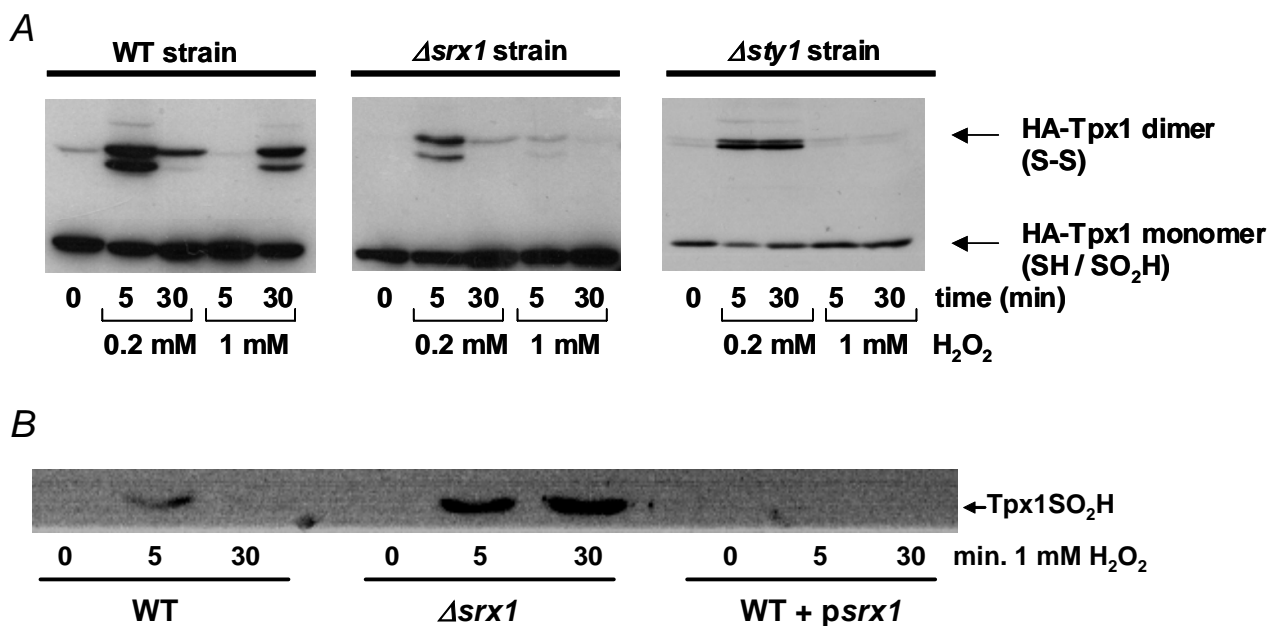


Figura 22. La sulfirredoxina Srx1 es necesaria para la reactivación de Tpx1 tras tratamientos de elevadas dosis de H₂O₂. A. Se muestra el estado redox de HA-Tpx1 expresado en las cepas HM123 (WT), AM001 ($\Delta sty1$) y EA38 ($\Delta srx1$) transformadas con p123.81x (pHA-*tpx1.41x*) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂. B. Aparición de la forma sulfinilada de Tpx1 tras tratamiento de 5 min con 1 mM de H₂O₂ en cepas EHH14 (WT: cepa $\Delta pap1$ que posee un alelo GFP-Pap1 bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia), EA36 (cepa $\Delta srx1 \Delta pap1$ que posee un alelo GFP-Pap1 bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) y EA36 transformada con el plásmido p120.42x (*psrx1.42x*).

2.4. Srx1 se expresa específicamente tras estrés oxidativo de manera Sty1-dependiente

Los experimentos del apartado anterior sugieren una relación entre Srx1 y Sty1, dado que la cepa defectiva en *sty1* es incapaz de reactivar a Tpx1 tras estrés oxidativo. Estudios de Northern blot revelaron que el gen *srx1* se induce específicamente tras estrés oxidativo de una manera Sty1-Atf1 y Pap1 dependiente (Fig. 23).

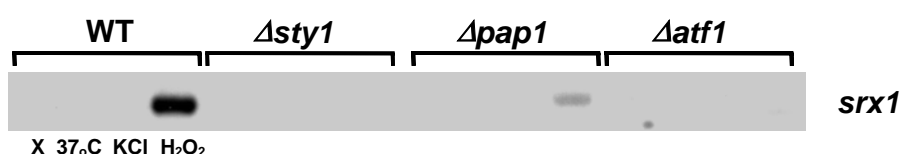


Figura 23. La expresión de Srx1 es específica tras estrés oxidativo. Patrón de inducción del gen *srx1* en cepas WT (HM123) $\Delta pap1$ (AM004), $\Delta sty1$ (AM001) y $\Delta atf1$ (JM1066) en condiciones de no tratamiento (X), estrés térmico mediante incubación de 30 min a 37°C, estrés osmótico por tratamiento durante 45 min con 0.6 M de KCl y estrés oxidativo por tratamiento durante 30 min con 0.5 mM de H₂O₂.

La falta de activación de Pap1 que se da en una cepa $\Delta sty1$ tras elevadas dosis de H₂O₂ se produce porque *srx1* no se induce en esta cepa y, por lo tanto, Tpx1 es incapaz de reactivarse y señalizar a Pap1 en estas condiciones (Fig. 24; (Vivancos *et al.* 2005).

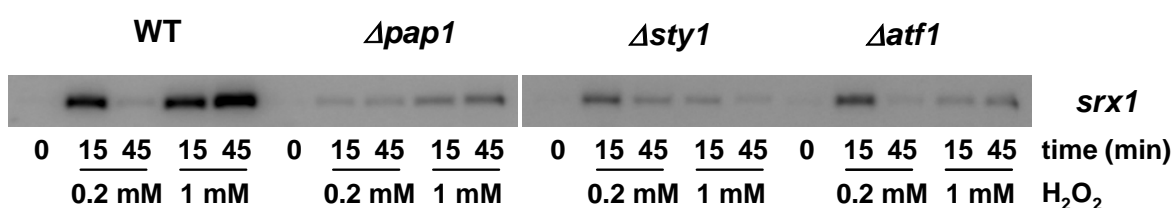


Figura 24. La expresión de Srx1 depende de Sty1-Atf1. Se muestra el patrón de inducción del gen *srx1* en cepas wt (HM123) $\Delta pap1$ (AM004), $\Delta sty1$ (AM001) y $\Delta atf1$ (JM1066) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

En efecto, la superexpresión de *srx1* es capaz de rescatar el fenotipo de la cepa $\Delta sty1$ tras elevadas dosis de H₂O₂ en cuanto a oxidación (Fig. 25A) y acumulación nuclear (Fig. 25B) de Pap1 (Vivancos *et al.* 2005).

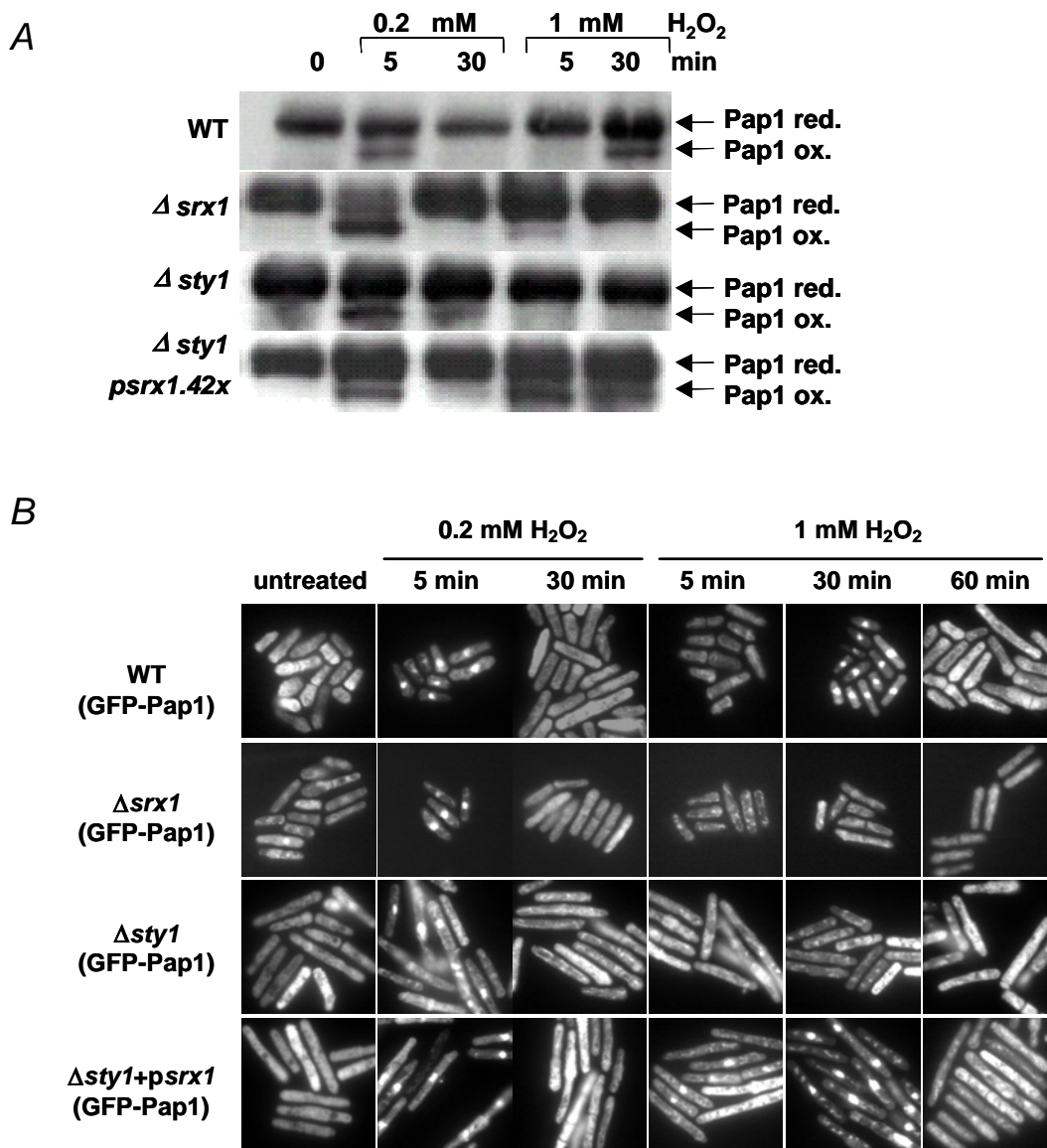


Figura 25. La activación de Pap1 tras altas dosis de H₂O₂ depende de la actividad Srx1, que se induce de forma Sty1-dependiente A. Estado redox de GFP-Pap1 en las cepas EHH14 (cepa Δ *pap1* que posee un alelo GFP-Pap1 integrado en el cromosoma bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia), EA36 (cepa Δ *pap1* Δ *srx1* que posee un alelo GFP-Pap1 bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia), AV1 (cepa Δ *pap1* Δ *sty1* que posee un alelo GFP-Pap1 integrado en el cromosoma bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) y AV1 transformada con el plásmido p120.42x (*psrx1.42x*) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂. B. Localización subcelular de GFP-Pap1 en las cepas EHH14, EA36, AV1 y AV1 transformada con el plásmido p120.42x en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

2.5. Pap1 y Tpx1 interactúan *in vivo*

Los anteriores resultados sugieren que Tpx1 es un sensor de H₂O₂. Para confirmar si esta Prx transmite directamente la señal a Pap1, se determinó que, efectivamente, Pap1 y Tpx1 interactúan *in vivo* (Fig. 26A; (Vivancos *et al.*

2005). Como vimos en el apartado 2.3, la naturaleza redox de la interacción se confirmó a través de la determinación del estado de oxidación de Pap1 en cepas que se hallaran expresando Tpx1, Tpx1.C48S o Tpx1.C169S (Fig. 21A; (Vivancos *et al.* 2005). Las dos cisteínas de Tpx1 son necesarias para la oxidación de Pap1, Cys48 inicia la reacción de Tpx1 sobre Pap1 y Cys169 resuelve la unión. Una vez demostrado que el mutante Tpx1.C169S estabilizaba la interacción con Pap1, determinamos el efecto que diferentes mutaciones en Pap1 tenían sobre dicha interacción. Realizamos extractos de TCA de células que expresan las proteínas MBP-Pap1 salvaje y mutantes en Cys278 y Cys501,523,532 además de HA-Tpx1 salvaje y mutado en Cys169 (Fig. 26B; (Vivancos *et al.* 2005).

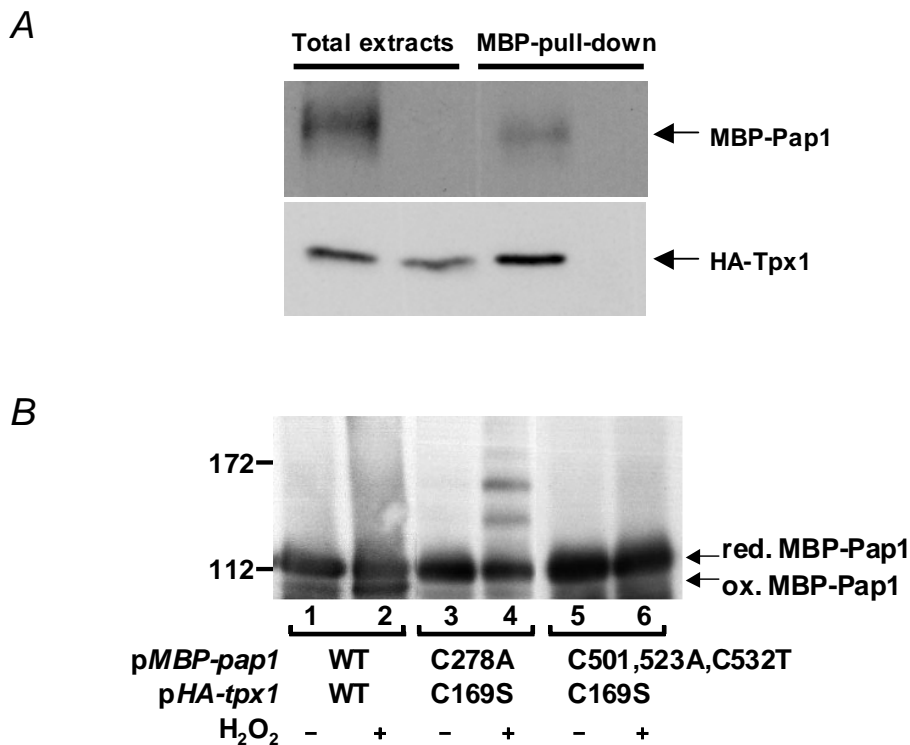


Figura 26. Pap1 y Tpx1 interaccionan *in vivo*. A. Interacción entre MBP-Pap1 y HA-Tpx1 en muestras celulares tratadas 5 min con 0.2 mM de H₂O₂ en la cepa $\Delta pap1$ (EHH108) transformada con los plásmidos p122.41x (que expresa la proteína MBP-Pap1) o el control pREP.41x junto con p123.42x (que expresa la proteína HA-Tpx1). B. Estado redox de la proteína MBP-Pap1 y de las mutantes en los residuos cisteína MBP-Pap1.C278A y MBP-pap1.C501,523A,C532T en la cepa $\Delta pap1$ (EHH108) expresadas en los plásmidos p122.41x (pMBP-Pap1.41x), p122.41x.C278A (pMBP-pap1.41x.C278A) y p122.41x.C501,523A,C532T (pMBP-pap1.41x.C501,523A,C532T) junto con p123.42x (que expresa la proteína HA-Tpx1) o p123.42x.C169S (que expresa la proteína HA-Tpx1.C169S).

En conclusión, Tpx1 transmite a través de Cys48 a las Cys501 y Cys532 de Pap1. Los mutantes en estas cisteínas no son capaces de oxidar a Pap1 ni tampoco de generar las bandas de alto peso molecular, descritas en el mutante que expresa la proteína Tpx1.C169S, de naturaleza desconocida, que probablemente consisten en aductos Pap1-Tpx1. Intentamos, pues, purificar estas formas de alto peso molecular a través de experimentos de pull-down con resina de amilosa en cepas que expresaran las proteínas mutantes Pap1.C278A y Tpx1.C169S, realizar electroforesis no reductora e inmunodetectar las bandas correspondientes al complejo Pap1-Tpx1 a la vez con anticuerpos anti-Pap1 y anti-Tpx1 (Fig. 27).

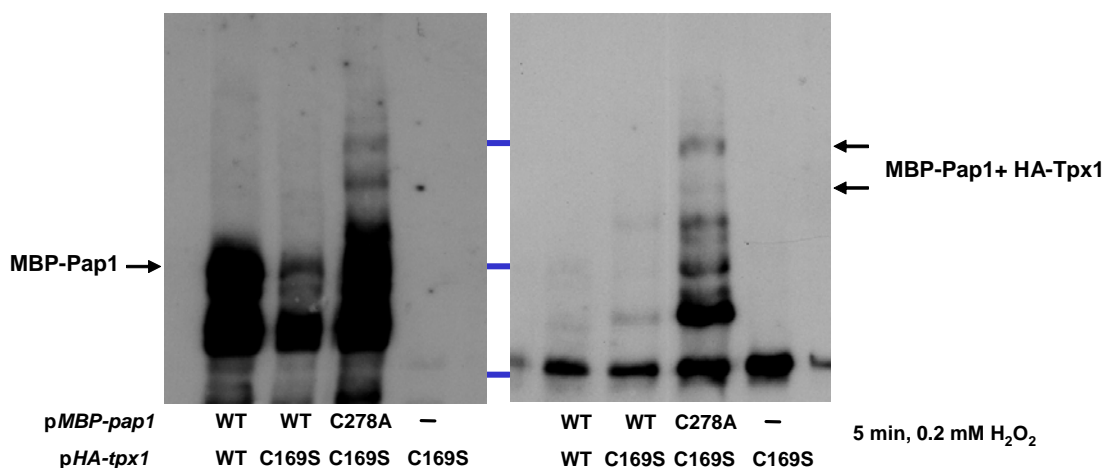


Figura 27. Pap1 y Tpx1 interactúan *in vivo* a través de una unión redox. Se muestran las bandas de elevado peso molecular debidas a la interacción entre MBP-Pap1.C278A y HA-Tpx1.C169S en muestras celulares tratadas 5 min con 0.2 mM de H₂O₂ en la cepa $\Delta pap1$ (EHH108) transformada con el plásmido p123.42x.C169S (que expresa la proteína HA-Tpx1.C169S) o con los plásmidos p122.41x (que expresa la proteína MBP-Pap1) o p122.41x.C278A (que expresa la proteína MBP-Pap1.C278A) junto con p123.42x (que expresa la proteína HA-Tpx1) o p123.42x.C169S (que expresa la proteína HA-Tpx1.C169S).

La siguiente estrategia que utilizamos para estudiar estos complejos Pap1-Tpx1 fue el uso de una proteína troncada de Pap1 que consiste en la región rica en cisteínas carboxi-terminal de Pap1 (CRD^{Pap1}) mutada en la Cys501 (contiene la otra cisteína que reacciona con Tpx1: Cys532), fusionada a MBP (MBP-CRD^{Pap1}.C501A), que esperábamos fuera capaz de interactuar con Tpx1 de manera más estable que Pap1 debido a que falta la Cys278. Se expresó MBP-CRD^{Pap1}.C501A en una cepa delecionada en *pap1* junto a la forma mutada Tpx1.C169S, que ya sabemos que estabiliza la unión con Pap1.

Las bandas purificadas por pull-down con resina de amilosa que son co-detectadas por los anticuerpos α -MBP y α -HA y que corresponden al aducto MBP-CRD^{Pap1}.C501A+HA-Tpx1.C169S son fácilmente identificadas. Se comprobó que la naturaleza de la unión es redox y consiste en un puente disulfuro intermolecular porque su formación es dependiente de agentes reductores, como el β -mercaptoetanol (Fig. 28).

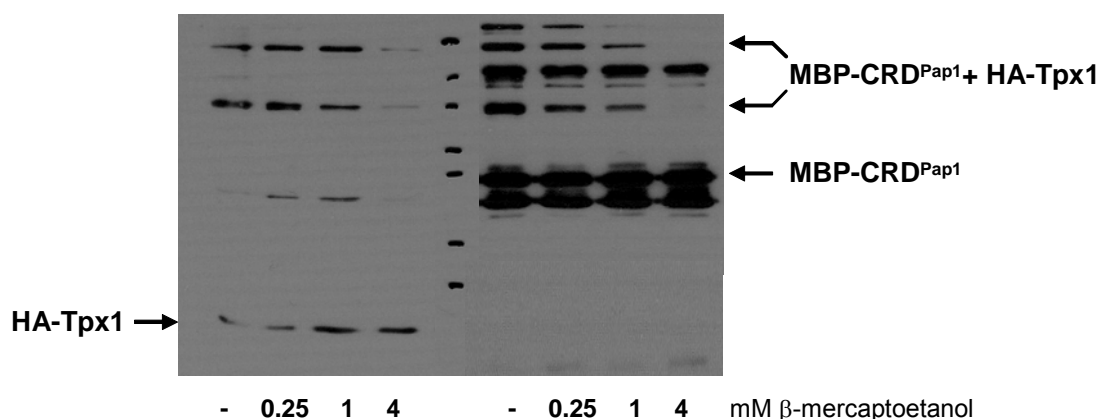


Figura 28. La interacción Pap1-Tpx1 es sensible a agentes reductores. Se muestra la sensibilidad a dosis crecientes del agente reductor β -mercaptoetanol de las bandas de elevado peso molecular debidas a la interacción entre MBP-CRD.C501A y HA-Tpx1.C169S en muestras celulares tratadas 5 min con 0.2 mM de H_2O_2 de la cepa $\Delta pap1$ (EHH108) transformada con el plásmido p162.41x.C501A (que expresa la proteína MBP-CRD.C501A correspondiente a la región rica en cisteínas CRD) junto con p123.42x.C169S (que expresa la proteína HA-Tpx1.C169S).

2.6. Los mutantes constitutivamente nucleares de Pap1 no se oxidan en respuesta a H_2O_2

La caracterización de los residuos de cisteína de Pap1 esenciales para la señalización después de estrés por H_2O_2 a través del estudio del estado redox de la proteína Pap1 mutada en diversas cisteínas expresada en *S. pombe*, condujo a la observación de que los mutantes MBP-Pap1.C523D y MBP-Pap1.C532AC532A, que poseen las cisteínas redox 278, 501 y/o 523, no forman el puente disulfuro activador tras estrés por H_2O_2 (Fig. 29A). Estas formas mutadas de Pap1 son de localización nuclear, de manera que la posible causa de que no se oxidaran tras estrés por H_2O_2 era la imposibilidad de interactuar con Tpx1, por una cuestión de compartimentalización celular. Se

expresó GFP-Tpx1 en una cepa salvaje y se pudo determinar que esta Prx tiene localización citoplasmática con exclusión nuclear, de acuerdo con las observaciones previas (Fig. 29B).

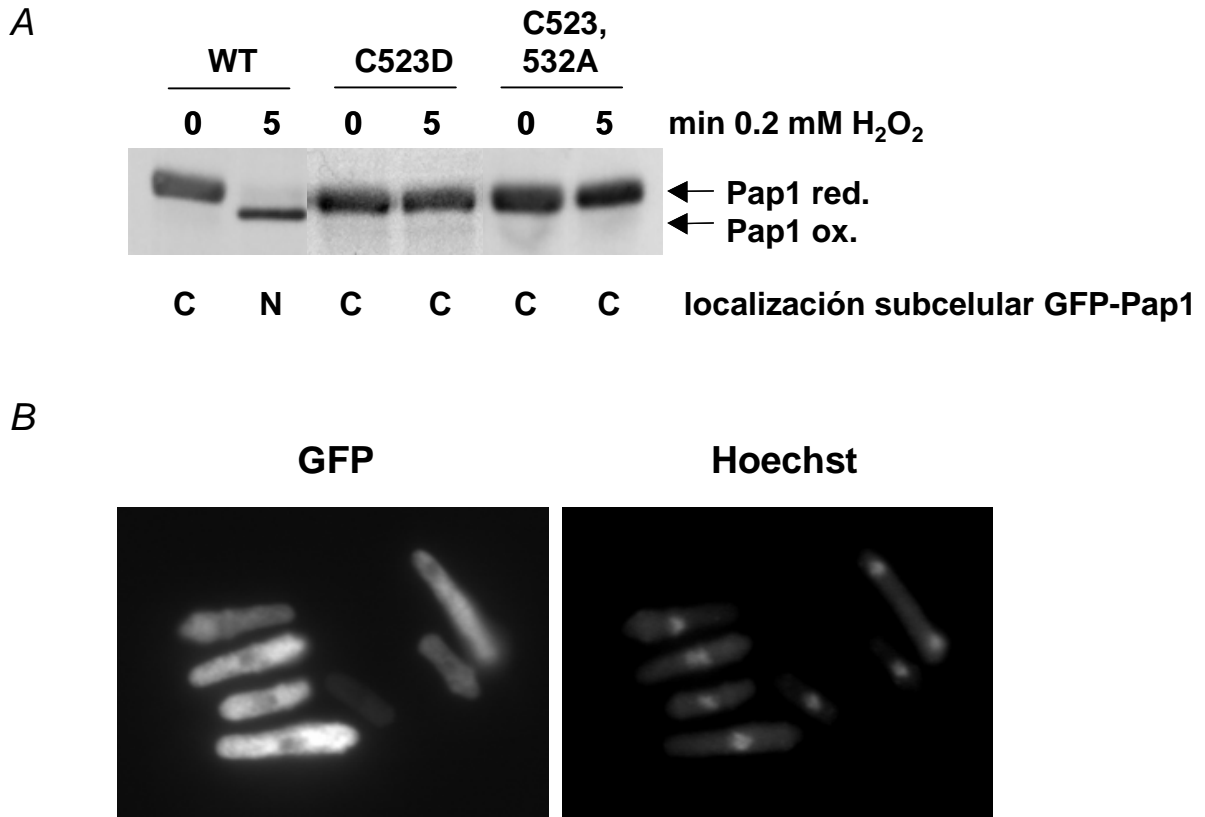


Figura 29. Tpx1 tiene localización citosólica. A. Estado redox de GFP-Pap1, GFP-Pap1.C523D y GFP-Pap1.C523,532A en las cepas EHH14 y derivadas (cepas $\Delta pap1$ que poseen un alelo GFP-Pap1 o los correspondientes mutantes de cisteína bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) tras tratamientos de 5 min con 0.2 mM de H₂O₂. B. Se muestra la localización subcelular de la proteína GFP-Tpx1 en la cepa MJ1 (cepa WT que expresa la proteína GFP-Tpx1 bajo el control del promotor reprimible *nmt* en el locus genómico del gen *leu*). También se muestra la localización de los núcleos celulares teñidos con el reactivo Hoechst.

La versión definitiva del artículo está publicada en :

Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayte J, Toledano MB, Hidalgo E. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant *Pap1* pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2005 Jun 21;102(25):8875-80.

Epub 2005 Jun 13.

<

<http://www.jbc.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=pnas&resid=102/25/8875> >

3. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA EXISTENCIA DE UNA Prx SENSIBLE A INACTIVACIÓN POR SUSTRATO EN *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Las células procariotas poseen Prx robustas, mientras que las eucariotas han seleccionado a lo largo de la evolución poseer Prx sensibles a inactivación por H₂O₂. Se cree que la razón por la cual esto es así es que, en eucariotas, la presencia de Prx sensibles, con un mecanismo de activación-inactivación-reactivación, son utilizadas en señalización.

En *S. pombe*, Tpx1, participa en sensor y transmitir la señal de estrés oxidativo por H₂O₂ a Pap1, y también se ha reportado que interviene en la activación de Sty1. Quisimos averiguar el efecto sobre las vías de Pap1 y Sty1 tras estrés oxidativo de poseer una Prx robusta en lugar de una sensible en *S. pombe* utilizando formas que no se inactivan *in vitro* por exceso de H₂O₂ y que consisten en la delección de los últimos 2 a 18 aa de Tpx1 (Koo *et al.* 2002).

3.1. Estructura de Tpx1 y relación con actividad e inactivación por sustrato

Tal como se ha demostrado en el apartado 2 de estos resultados, Tpx1 es una peroxirredoxina sensible a inactivación por H₂O₂. El significado de la presencia en células eucariotas de una Prx sensible es desconocido. En este sentido, en este trabajo se ha caracterizado una forma truncada de Tpx1 en su dominio C-terminal (Tpx1ΔCTD) que se halla descrita como resistente a inactivación por H₂O₂ (Koo *et al.* 2002) (Fig. 30).

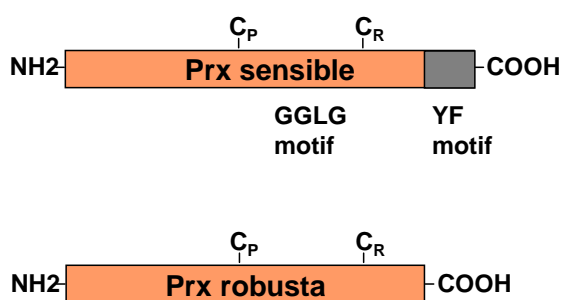


Figura 30. Estructura de las peroxirredoxinas. Esquema de las Prx robusta y sensible. En el esquema se indican las cisteínas peroxidática (C_P) y resolutiva (C_R), así como los motivos que causan una mayor sensibilidad frente a sobreoxidación por H₂O₂ a la C_P, GGLG y YF.

3.2. Estado redox de la Prx robusta en estrés oxidativo

Las Prx robustas se caracterizan por poseer resistencia a la inactivación por exceso de peróxidos. La C_P de estas Prx no se oxida a sulfínico tras elevadas concentraciones de H₂O₂ y, por lo tanto, su actividad peroxidática se mantiene. Se expresaron HA-Tpx1 y la forma robusta, HA-Tpx1ΔCTD, en una cepa $\Delta tpx1$ y, tras 5 h de incubación con tiamina, que asegura idénticos niveles de proteína Tpx1 a una cepa salvaje, se estudió su estado redox en cinéticas de tiempo y concentración de oxidante a través de extractos ácidos de TCA. En efecto, Tpx1ΔCTD forma dímeros covalentes tras tratamientos ≥ 1 mM H₂O₂, mostrando que se halla en el ciclo catalítico (Fig. 31).

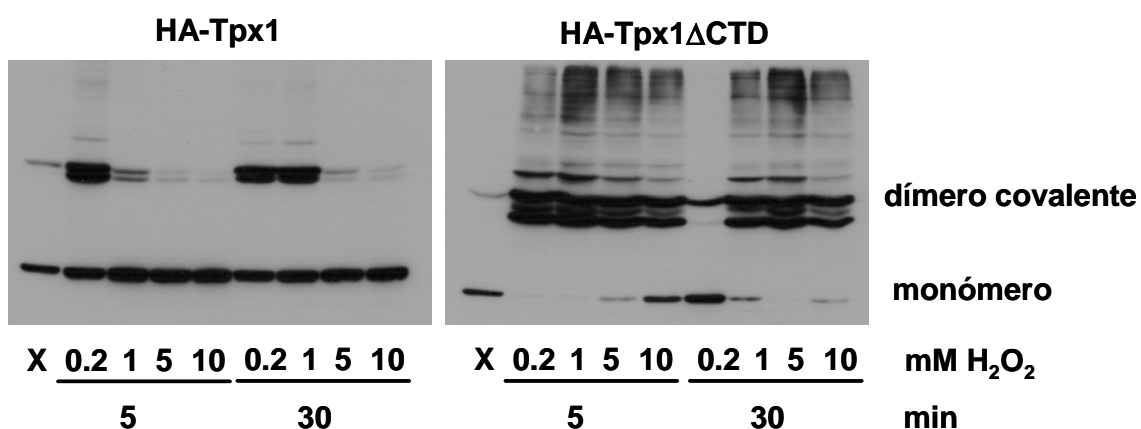


Figura 31. La forma robusta de Tpx1, Tpx1ΔCTD, no sufre inactivación por exceso de sustrato. Estado redox de HA-Tpx1 y HA-Tpx1ΔCTD, expresados en las cepas hEA40 + p123.41x ($\Delta tpx1$ transformada con el plásmido *pHA-tpx1.41x*) y hEA40 + p124.41x ($\Delta tpx1$ transformada con el plásmido *pHA-tpx1ΔCTD.41x*) tratadas durante 5 h con tiamina (presencia de niveles WT de Prx) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

Para comprobar la formación de sulfínico en Cys48 de Tpx1 y Tpx1ΔCTD, se utilizó una cepa $\Delta tpx1$ que se hallaba expresando las proteínas HA-Tpx1 o HA-Tpx1ΔCTD y, 5 h después de la adición de tiamina al medio de cultivo, se trató o no las células con 1 mM H₂O₂ durante 5 min. La forma sulfínica, de menor movilidad que la reducida, no apareció en la proteína HA-Tpx1ΔCTD (Fig. 32). Resultados similares se obtuvieron utilizando una cepa que posee integrado *tpx1ΔCTD* en el locus cromosómico de *tpx1* (ver apartado 3.6 de estos resultados).

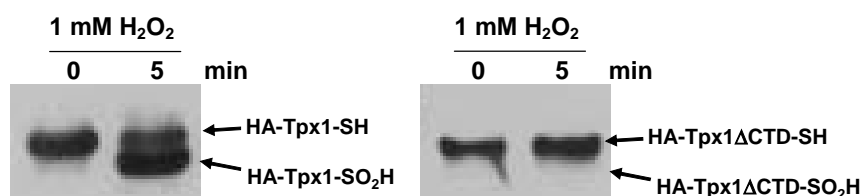


Figura 32. Tpx1 Δ CTD no sufre oxidación a sulfínico de su Cys48 tras estrés oxidativo de dosis severa. Se muestra la formación de una banda modificada con AMS correspondiente a la forma sulfínica de la Cys48 de Tpx1 en las cepas hEA40 + p123.41x (*pHA-tpx1 Δ CTD.41x*) y hEA40 + p124.41x (*pHA-tpx1 Δ CTD.41x*) tratadas durante 5 h con tiamina (presencia de niveles WT de Prx) tras tratamiento de 0 min y 5 min con 1 mM de H₂O₂.

3.3. La forma robusta de Tpx1 es independiente de Srx1

El experimento anterior indica que la forma robusta de Tpx1 no se inactiva por exceso de peróxido. La falta de aparición de sulfínico en su cisteína peroxidática, que constituye el mecanismo de inactivación en Tpx1, así como el hecho de que forme dímeros covalentes tras tratamientos con elevadas dosis de H₂O₂, así lo indican. Otra prueba de su naturaleza robusta es su independencia de Srx1. Se utilizaron cepas salvaje o Δ *srx1* que expresaban las proteínas HA-Tpx1 o HA-Tpx1 Δ CTD y, 5 h después de la adición de tiamina al medio de cultivo, se efectuó una cinética de tiempo y concentración de H₂O₂. Tras dosis de 1 mM de oxidante, la forma robusta de Tpx1 forma dímeros covalentes a tiempos cortos, indicando que no se halla inactivada (Fig. 33).

Esta Prx no sufre sulfinilización sobre su Cys48 y, por tanto, no necesita de la actividad Srx1. De acuerdo con esto, tratamientos de dosis severas de H₂O₂ (≥ 1 mM) no inactivan su capacidad peroxidasa.

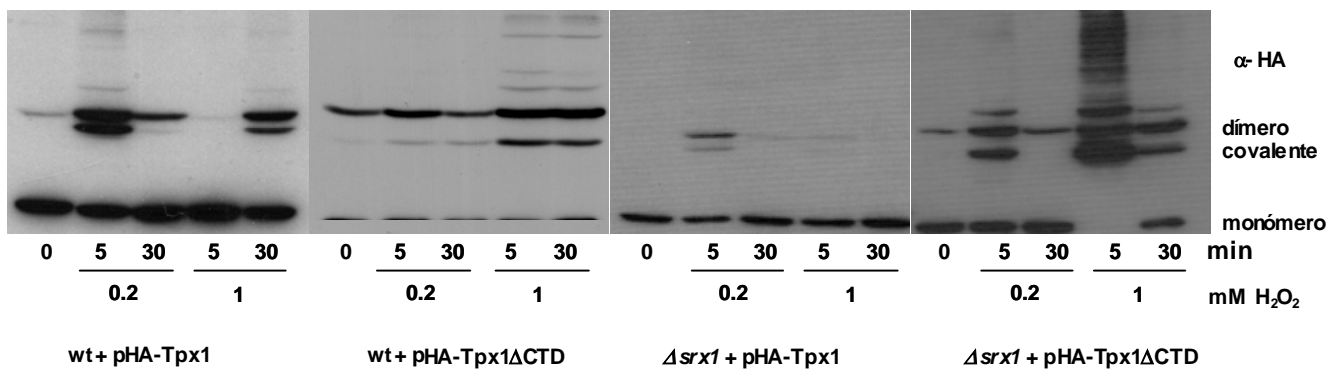


Figura 33. La forma robusta de Tpx1, Tpx1ΔCTD, no depende de Srx1 tras dosis elevadas de oxidante. Se muestra el estado redox de HA-Tpx1 y HA-Tpx1ΔCTD, expresados en las cepas WT+ p123.81x (HM123 transformada con el plásmido *pHA-tpx1.41x*), WT + p124.41x (HM123 transformada con el plásmido *pHA-tpx1ΔCTD.41x*), Δ*srx1*+ p123.81x (EA38 transformada con el plásmido *pHA-tpx1.41x*), Δ*srx1* + p124.41x (EA38 transformada con el plásmido *pHA-tpx1ΔCTD.41x*), tratadas durante 5 h con tiamina (presencia de niveles WT de Prx) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

3.4. Efecto de la presencia de una peroxirredoxina robusta sobre la activación de Pap1

Tal como se ha demostrado a través de los experimentos anteriores, la forma robusta de Tpx1 es resistente a tratamientos de altas dosis de oxidante. La siguiente cuestión que se estudió fue la activación de Pap1, que sabemos depende de Tpx1, en una cepa cuya copia cromosómica del gen de *tpx1* se ha substituido por la forma robusta *tpx1ΔCTD*. La oxidación de Pap1 en esta cepa se da a tiempo corto tras tratamientos de concentraciones de hasta 25 mM de H₂O₂ (Fig. 34A), coincidiendo con la cinética de formación de dímeros covalentes en Tpx1ΔCTD (Fig. 36).

Se estudió la activación de Pap1 en una cepa Δ*srx1* que se hallara expresando las formas sensible y robusta de la Prx (Fig. 34B). Pap1, en presencia de Tpx1ΔCTD, se oxida a tiempos cortos después del tratamiento con 1 mM H₂O₂, de forma Srx1 independiente.

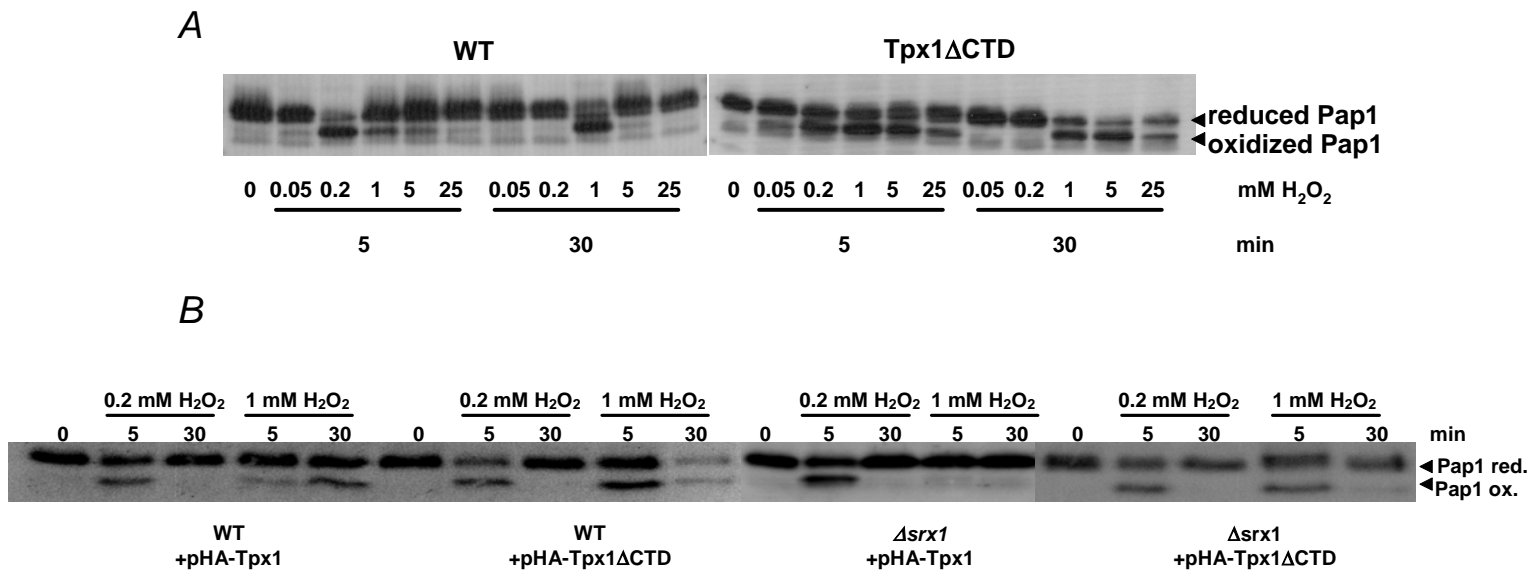


Figura 34. La forma robusta de Tpx1, Tpx1ΔCTD, activa a Pap1 a tiempos cortos tras dosis elevadas de oxidante y lo hace de forma Srx1-independiente. A. Estado redox de Pap1 en las cepas JA212 (WT) y AV33 (expresa la proteína Tpx1ΔCTD desde el locus genómico del gen *tpx1*) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂. B. Estado redox de Pap1 en las cepas WT+ p123.81x (HM123 transformada con el plásmido *pHA-tpx1.41x*), WT + p124.41x (HM123 transformada con el plásmido *pHA-tpx1ΔCTD.41x*), Δ*srx1*+ p123.81x (EA38 transformada con el plásmido *pHA-tpx1.41x*), Δ*srx1* + p124.41x (EA38 transformada con el plásmido *pHA-tpx1ΔCTD.41x*), tratadas durante 5 h con tiamina (presencia de niveles WT de Prx) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

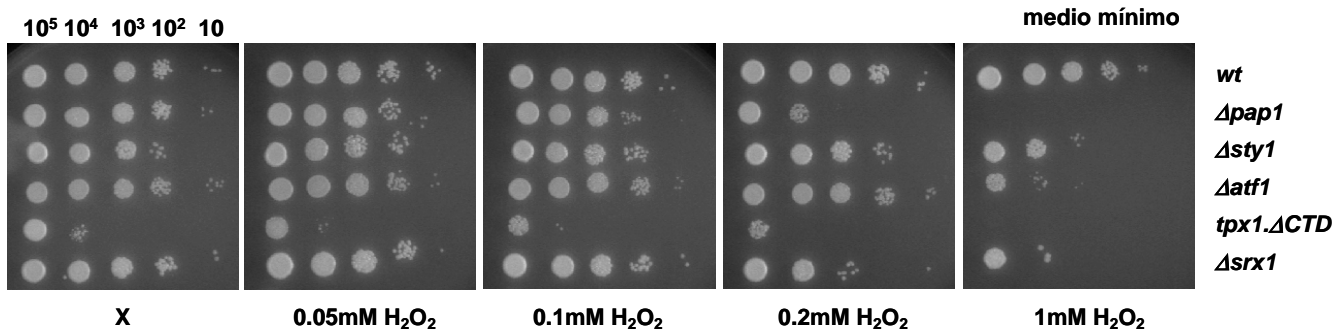
3.5. La forma resistente de Tpx1 provoca sensibilidad a oxidantes *in vivo*

A partir de los datos anteriores, era lógico suponer que la presencia en *S. pombe* de una Prx robusta en lugar de una sensible debía ser beneficioso en situaciones de estrés oxidativo, en que no se hallaría inactivada. Para comprobar esta hipótesis, se utilizaron cepas que poseyeran la forma robusta de Tpx1 en el locus cromosómico de *tpx1* y se ensayó la viabilidad en placa tras tratamientos de H₂O₂ de estas cepas comparadas a la salvaje, Δ*pap1*, Δ*sty1*, Δ*atf1* y Δ*srx1* (Fig. 35A). La cepa que se halla expresando la forma robusta de la Prx presenta fenotipo de tamaño menor de colonia en ausencia de oxidante y menor supervivencia en presencia del mismo.

Para averiguar si dicho fenotipo en ausencia de H₂O₂ es debido al estrés oxidativo creado por el crecimiento en condiciones de aerobiosis, se realizó un experimento de viabilidad en placa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en

paralelo (Fig. 35B). Los resultados indican que la cepa que expresa la proteína Tpx1 Δ CTD sufre estrés oxidativo en su estado basal, probablemente debido a que esta Prx no es capaz de detoxificar los ROS a estas concentraciones. El tipo de medio en que se realice el experimento condiciona la severidad del fenotipo, siendo éste más acentuado en el medio mínimo.

A



B

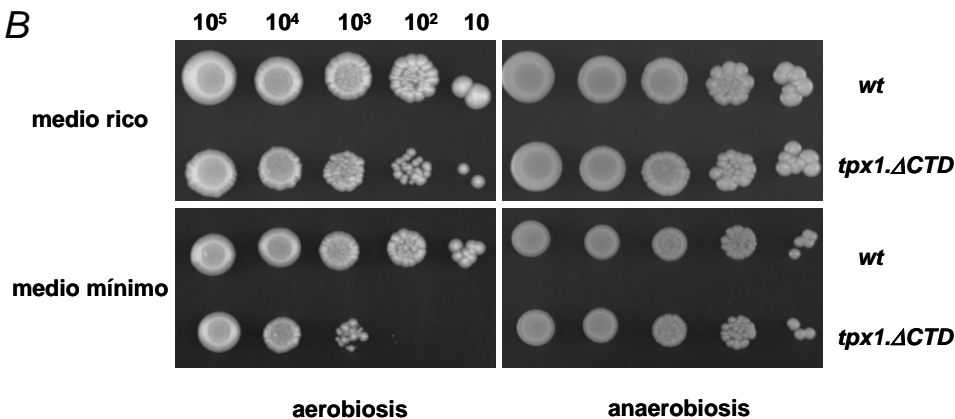


Figura 35. La forma robusta de Tpx1 provoca sensibilidad a estrés oxidativo en *Schizosaccharomyces pombe*. A. Supervivencia de las cepas 972 (WT), AV25 ($\Delta pap1$), AV18 ($\Delta sty1$), AV25 ($\Delta atf1$), AV33 (expresa la proteína Tpx1 Δ CTD desde el locus genómico del gen *tpx1*) y EA38 ($\Delta srx1$) en medio sólido mínimo en presencia o no de diferentes concentraciones de H₂O₂. B. Supervivencia de las cepas JA212 (WT) y AV33 (expresa la proteína Tpx1 Δ CTD desde el locus genómico del gen *tpx1*) en medio sólido mínimo y rico en condiciones de crecimiento aeróbicas y anaeróbicas.

3.6. Determinación de la actividad catalítica de Tpx1 Δ CTD

Los experimentos anteriormente expuestos revelan que la forma robusta de Tpx1 es, en efecto, resistente a la inactivación por elevadas dosis de H₂O₂

debido a la falta de formación de sulfínico sobre su C_P y que, de acuerdo con esto último, se comporta de manera independiente de Srx1. Por otra parte, la sensibilidad a estrés oxidativo, incluso al que provoca el crecimiento aeróbico, sugiere que quizás esta Prx no se halle detoxificando correctamente a concentraciones muy bajas de sustrato y que sea esto causa de acumulación de ROS intracelular. Para comprobar este fenómeno *in vivo*, se realizó un estudio del estado redox en cinética de concentraciones extracelulares de oxidante en las cepas que expresan la forma salvaje y la Δ CTD de Tpx1 desde su locus genómico. Se comprobó que, en efecto, la forma salvaje de Tpx1 es capaz de detoxificar H₂O₂, y, por lo tanto, de formar dímeros tras concentraciones extracelulares del oxidante de 0.01 mM, mientras que la forma robusta lo hace tras dosis de 0.1mM (Fig. 36).

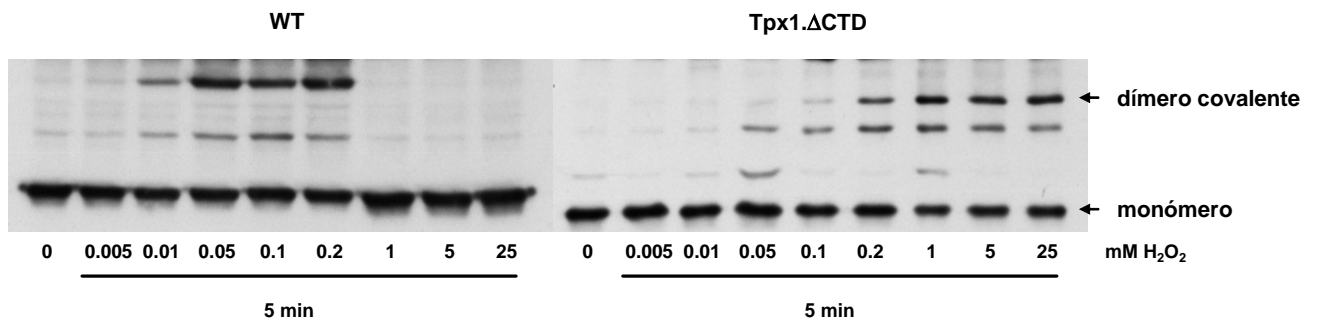


Figura 36. La forma robusta de Tpx1, Tpx1 Δ CTD, es menos sensible a H₂O₂ que la forma sensible. Se muestra el estado redox de Tpx1 en muestras de extractos ácidos de TCA de las cepas JA212 (WT) y AV33 (expresa la proteína Tpx1 Δ CTD desde el locus genómico del gen *tpx1*) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

La oxidación de Pap1 (Fig. 37), estudiada en paralelo, muestra una cinética muy similar en ambos fondos genéticos, reflejando una posible menor sensibilidad en la técnica de detección o la necesidad de poseer un determinado porcentaje de moléculas de Tpx1 en el ciclo catalítico para señalar correctamente al factor de transcripción.

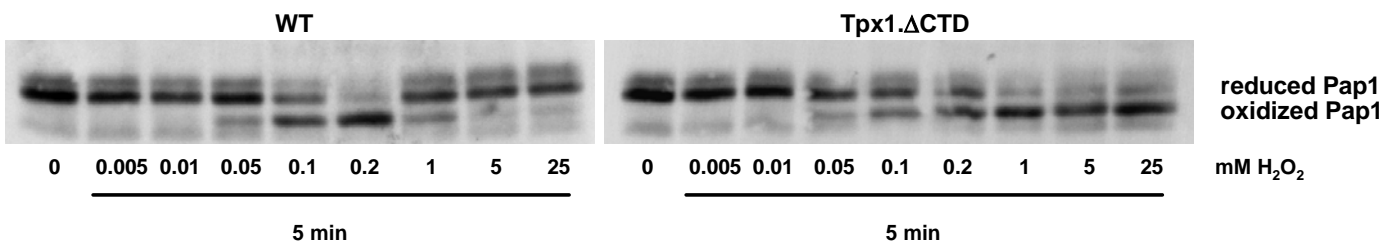


Figura 37. Pap1 se oxida a tiempos cortos tras dosis elevadas de H₂O₂ en la cepa que expresa la Prx robusta. Estado redox de Pap1 en muestras de extractos ácidos de TCA de las

cepas JA212 (WT) y AV33 (expresa la proteína Tpx1 Δ CTD desde el locus genómico del gen *tpx1*) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

La forma robusta de Tpx1 es capaz de formar dímeros covalentes a tiempos cortos tras tratamientos de hasta 100 mM de H₂O₂ (Vivancos AP; resultados no mostrados). El uso de un anticuerpo específico contra el péptido sulfínado de Prxl de humanos (Woo *et al.* 2003), nos ha permitido comprobar que, efectivamente, no se da superoxidación de Tpx1 Δ CTD a tiempos cortos en cinéticas de concentración de H₂O₂ (Fig. 38). El uso de muestras no reducidas, mostró la aparición de una forma dimérica covalente de Tpx1 que posee un monómero oxidado a sulfínico a tiempo corto tras estrés de 0.2 mM de H₂O₂.

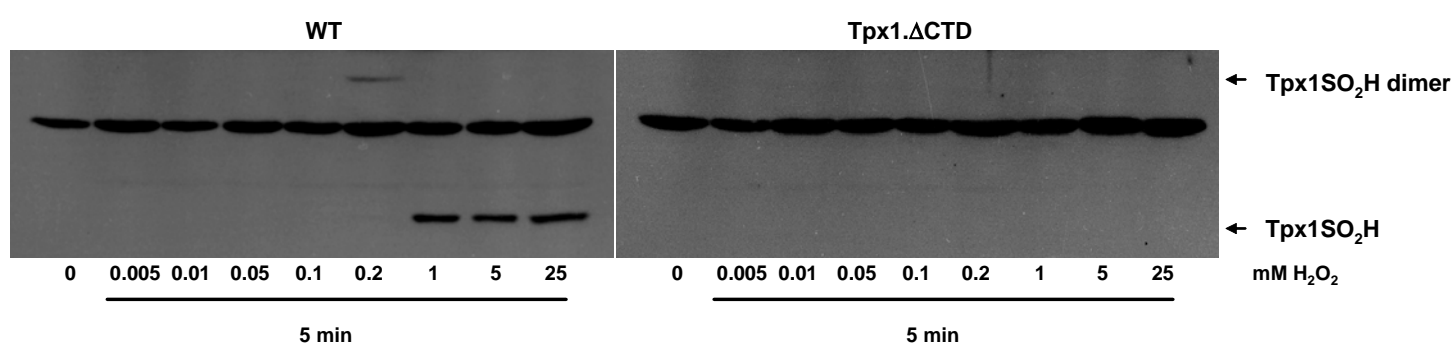


Figura 38. La forma robusta de Tpx1, Tpx1 Δ CTD, no forma sulfínico sobre su Cys48. Detección de las formas superoxidadas de Tpx1 y Tpx1 Δ CTD en muestras de extractos ácidos de TCA de las cepas JA212 (WT) y AV33 (expresa la proteína Tpx1 Δ CTD desde el locus genómico del gen *tpx1*) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

Quisimos estudiar la respuesta transcripcional Pap1 y Sty1-Atf1 dependiente en la cepa que expresa la proteína Tpx1 Δ CTD (Fig. 39). Pudimos comprobar que se mantiene el perfil de expresión de los genes Sty1-Atf1 dependientes (*gpd1*) así como de los que dependen de Pap1 y Sty1-Atf1 (*ctt1* y *srx1*). Los genes dependientes de Pap1 (*trr1*) sufren una inducción a tiempos cortos tras tratamientos de 1 mM H₂O₂, de acuerdo con la oxidación de Pap1 que se da en esta cepa (Fig. 37).

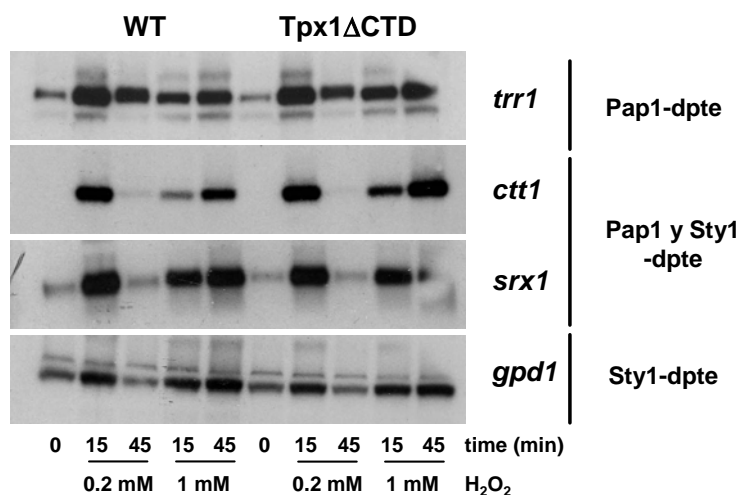


Figura 39. Inducción tras estrés oxidativo de los genes dependientes de las vías Pap1 y Sty1-Atf1 en presencia de la forma robusta de Tpx1. Se muestra el patrón de inducción de los genes *trr1*, *ctt1*, *srx1* y *gpd1* en las cepas salvaje JA212 (WT) y que expresa la forma robusta de Tpx1, Tpx1 Δ CTD (AV33) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

4. ESTUDIO DEL PAPEL DE Tpx1 EN EL CRECIMIENTO AERÓBICO DE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Tpx1 es esencial en *S. pombe*, tal como indican los resultados de los apartados 2 y 3 de estos resultados. Por una parte, fue imposible aislar una cepa $\Delta tpx1$ en condiciones aeróbicas y, por otra, fue imposible mantener viva una cepa $\Delta tpx1$ que expresa Tpx1 desde un plásmido episomal, bajo el control del promotor reprimible por tiamina *nmt*, que tuviera reprimida la expresión ectópica de Tpx1. El siguiente bloque de resultados pretende ayudarnos a determinar si Tpx1 es esencial durante el crecimiento aeróbico de *S. pombe* debido a : (i) su actividad antioxidante, (ii) su actividad chaperona, (iii) su papel en vías de transmisión de la señal de estrés oxidativo a Pap1 y Sty1.

4.1. Aislamiento de una cepa $\Delta tpx1$ en anaerobiosis

A partir de la cepa dAV36 ($h^+/h^- leu1/leu1 ura4/ura4 ade6-M210/ade6-M276 tpx1::kanMX6 / tpx1$) fue posible aislar una cepa haploide $\Delta tpx1$ a través de la germinación de sus esporas en placas de medio rico en condiciones de anaerobiosis. Una vez germinadas las esporas, se seleccionaron las resistentes a kannamicina a través de *replica plating*. Las colonias resultantes fueron comprobadas a través de PCR y Western blot. Se aisló de esta manera la cepa AV42 ($h^+ leu1 ura4 ade6-M210 tpx1::kanMX6$).

Se comprobó que la cepa AV42 era incapaz de crecer en presencia de O_2 y que, efectivamente, Pap1 no se activaba tras estrés oxidativo por H_2O_2 (Fig. 40A). Sin embargo, y en contra de lo publicado anteriormente (Veal *et al.* 2004), pudimos determinar que no existe dependencia de Sty1 en Tpx1, ya que la cepa $\Delta tpx1$ induce, tras tratamientos con H_2O_2 , los genes dependientes de Sty1, *gpx1* y *SPAC139.05*, de manera similar a la salvaje (Fig. 40B).

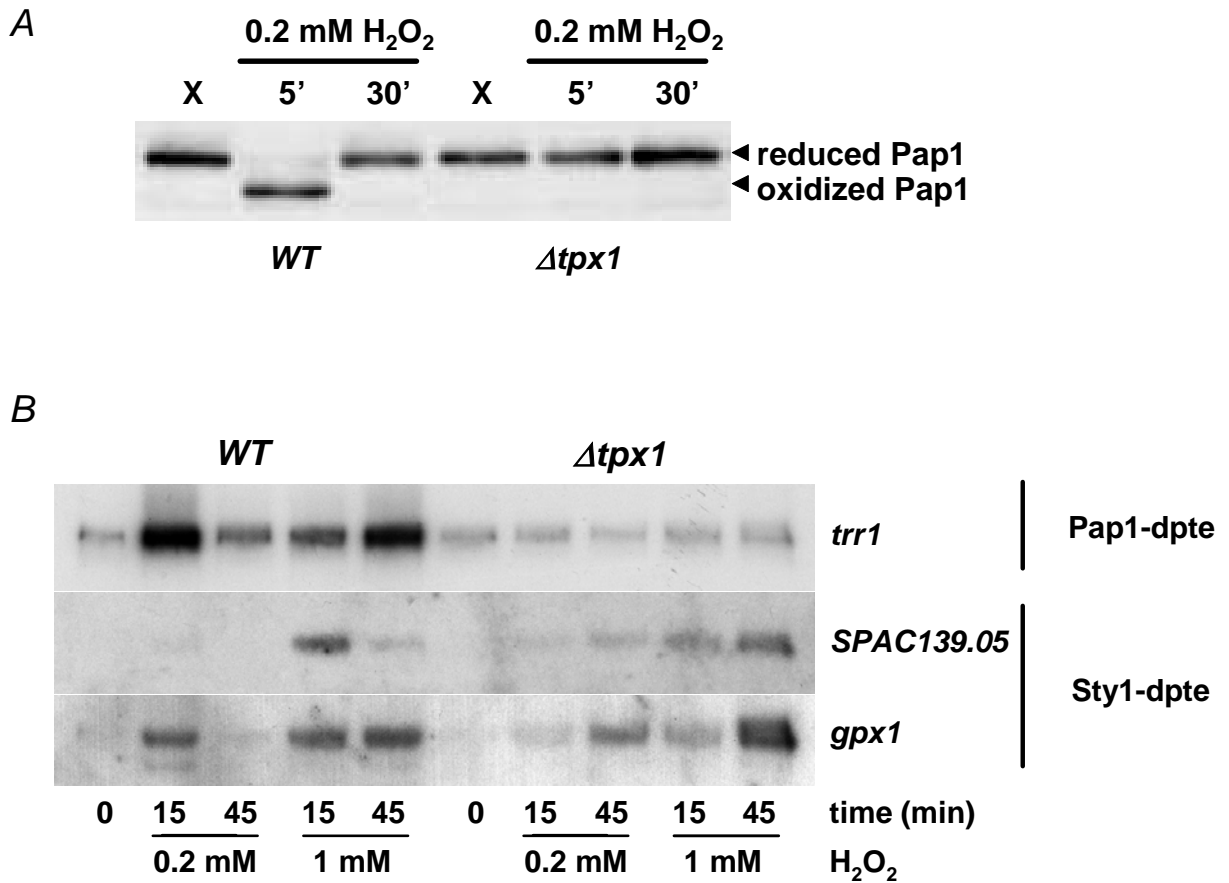


Figura 40. Tpx1 es necesario para la activación de Pap1 pero no de Sty1. A. Estado redox de Pap1 en las cepas 972 (WT) y AV42 ($\Delta tpx1$) en cinéticas de tiempo tras tratamiento de 0.2 mM de H₂O₂. B. Se muestra el patrón de inducción de los genes *trr1*, *SPAC139.05* y *gpx1* en cepas wt (HM123) y $\Delta tpx1$ (AV42) en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂.

4.2. Tpx1 es esencial en aerobiosis

La posibilidad de aislar una cepa $\Delta tpx1$ en anaerobiosis indicó que Tpx1 es esencial sólo en condiciones aeróbicas, durante las que se generan ROS. Por ello, se realizaron experimentos de supervivencia en placa en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, así como de tratamientos de H₂O₂ en cepas salvaje y $\Delta tpx1$ (Figs. 41A y B). La cepa $\Delta tpx1$ resultó ser sensible al estrés oxidativo provocado por el crecimiento en condiciones de aerobiosis así como a la presencia de H₂O₂.

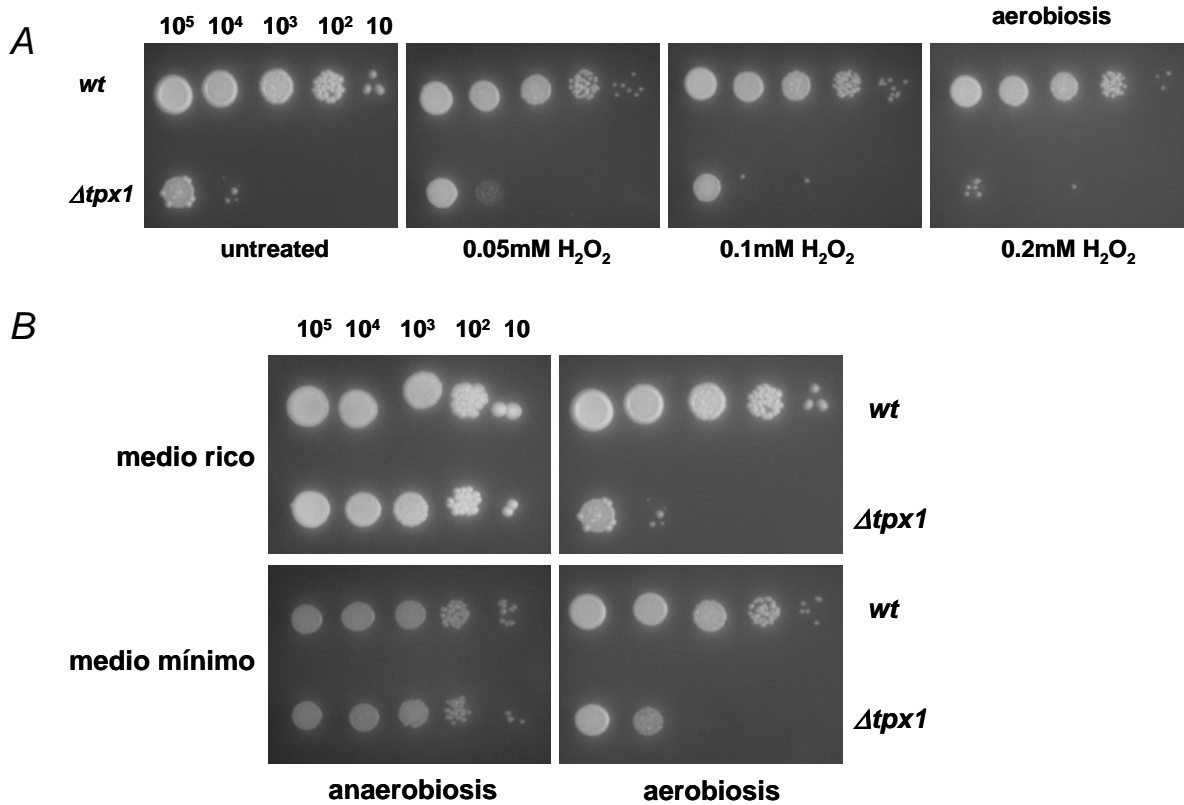


Figura 41. La ausencia de Tpx1 provoca sensibilidad a estrés oxidativo en *S. pombe*. A. Supervivencia de las cepas 972 (WT) y AV42 ($\Delta tpx1$) en medio sólido rico en presencia o no de diferentes concentraciones de H₂O₂. B. Supervivencia de las cepas 972 (WT) y AV42 ($\Delta tpx1$) en medio sólido mínimo y rico en condiciones de crecimiento aeróbicas y anaeróbicas.

Por otra, parte, se determinó el estado de carbonilación en estado basal aeróbico de cepas salvaje, $\Delta sod1$ y $\Delta tpx1$ como reflejo del estrés oxidativo intracelular (Fig. 42).

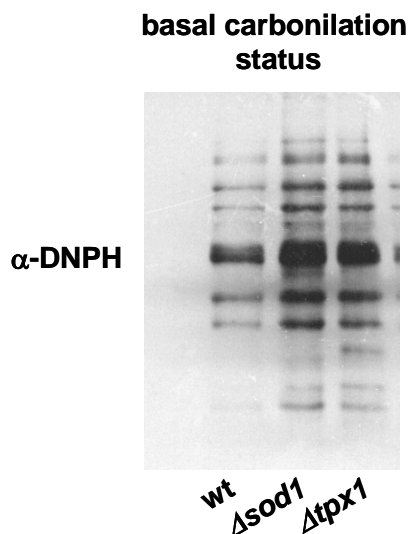


Figura 42. La cepa defectiva en *tpx1* sufre daños por estrés oxidativo en aerobiosis. Patrón de carbonilación proteica por modificación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) en muestras de células en crecimiento logarítmico aeróbico en medio mínimo de las cepas 972 (WT), MS1 ($\Delta sod1$) y AV42 ($\Delta tpx1$). Para este experimento, las cepas WT, $\Delta sod1$ y $\Delta tpx1$, se crecieron en condiciones de anaerobiosis y fueron incubadas en condiciones aeróbicas durante 12h inmediatamente anteriores a la determinación del patrón de carbonilación proteico.

Confirmamos, por tanto, que la cepa delecionada en *tpx1* posee niveles de ROS basales elevados comparables a los de una cepa defectiva en *sod1* y respecto a una cepa salvaje. Este experimento muestra que Tpx1 detoxifica los niveles basales de H₂O₂ durante el crecimiento aeróbico.

4.3. Efecto de los residuos cisteína esenciales para la actividad peroxidasa de Tpx1 en *S. pombe*

La bibliografía existente aporta pruebas de que la actividad peroxidasa de las Prx de 2-Cys reside en sus cisteínas conservadas C_P y C_R, al menos *in vitro* (Chae and Rhee 1994). Para verificar en *S. pombe* el requerimiento de ambas cisteínas de Tpx1, Cys48 ó C_P y Cys169 ó C_R, en aerobiosis, se utilizaron cepas que expresan las proteínas salvaje y mutantes en ambas cisteínas de la Prx. Se ensayó en estas cepas la capacidad de sobrevivir en aerobiosis, dependiente de su actividad peroxidasa (Fig. 43).

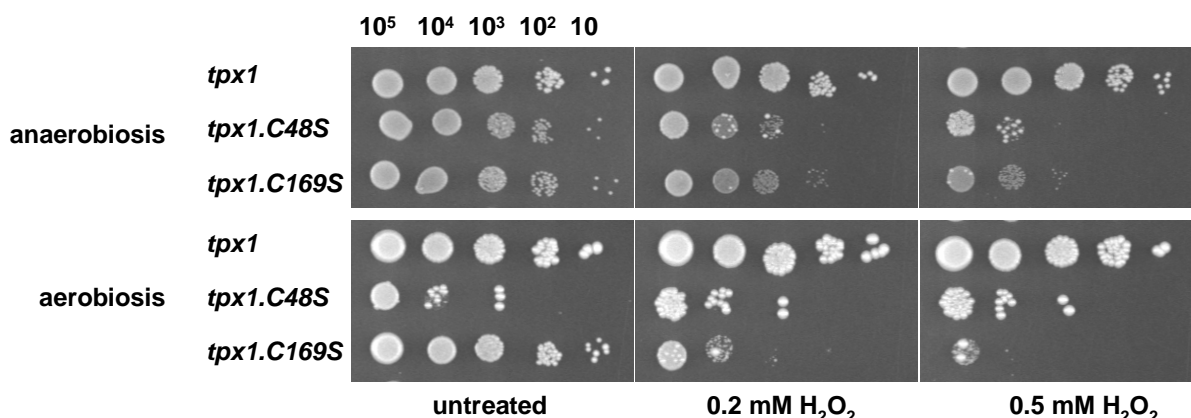


Figura 43. La C_P de Tpx1 es esencial en aerobiosis. Supervivencia de las cepas AV42 p145 (expresa la proteína Tpx1 desde el locus genómico del gen *tpx1*), AV42 p145.C48S (expresa la proteína Tpx1.C48S desde el locus genómico del gen *tpx1*) y AV42 p145.C169S (expresa la proteína Tpx1.C169S desde el locus genómico del gen *tpx1*) en medio sólido rico en condiciones de crecimiento aeróbicas y anaeróbicas y en presencia o no de diferentes concentraciones de H₂O₂.

Los resultados obtenidos indican que la cepa que expresa la proteína Tpx1.C169S es capaz de sobrevivir en crecimiento aeróbico. Sin embargo, pierde viabilidad en presencia de H₂O₂. Esto nos hace pensar que puede poseer una cierta actividad peroxidasa que no es capaz de detoxificar concentraciones de ROS superiores a la del estado basal aeróbico. La

identidad de la cisteína que es capaz de llevar a cabo el ciclo catalítico peroxidasa con la C_P de Tpx1 en *S. pombe* es desconocida y motivo de futuro trabajo.

Las proteínas mutantes Tpx1.C48S y Tpx1.C169S expresadas en *S. pombe* muestran fenotipos distintos. A través de extractos ácidos de TCA, se determinó el estado redox de estas proteínas en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂. Ninguno de los mutantes forma dímeros covalentes, como lo hace la proteína WT. Tpx1.C48S muestra reactividad nula, mientras que Tpx1.C169S, en presencia de oxidante, forma complejos de elevado peso molecular aparente (Fig. 44A).

Sabemos que Tpx1 debe hallarse en su ciclo catalítico para poder ser superoxidado (Yang *et al.* 2002). Para comprobar que, en efecto, la proteína Tpx1.C169S se halla involucrada en un ciclo catalítico *in vivo*, determinamos que, en presencia de 1 mM H₂O₂, la Cys48 de Tpx1.C169S, sufre superoxidación, al igual que Tpx1 (Fig. 44B).

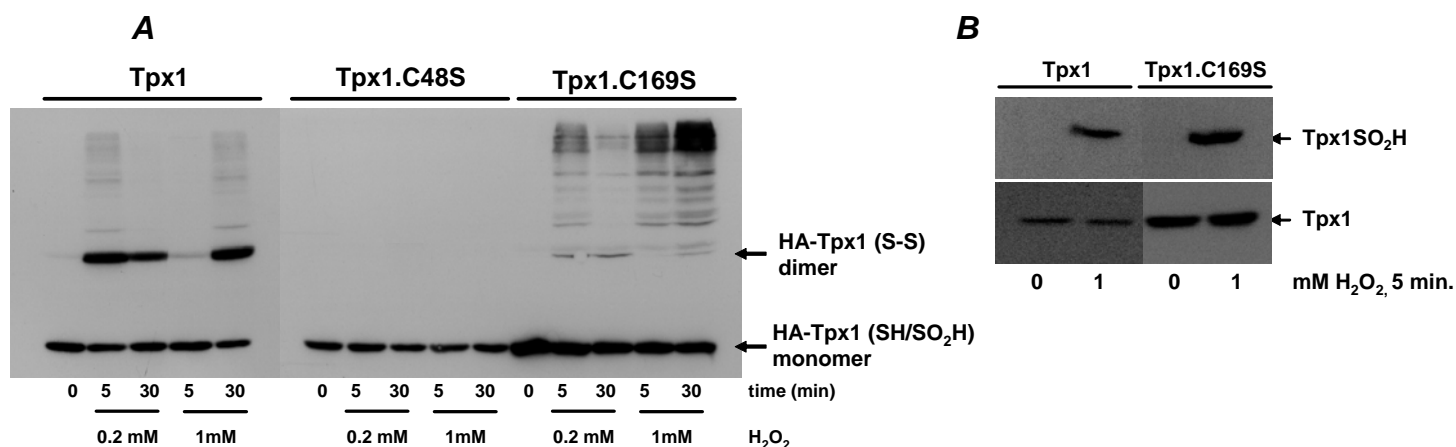


Fig. 44. Estado redox de las proteínas mutantes Tpx1.C48S y Tpx1.C169S *in vivo*. A. El estado redox (monómero versus dímero covalente) de HA-Tpx1, HA-Tpx1.C48S y HA-Tpx1.C169S se determinó en extractos ácidos de TCA de células tratadas o no con H₂O₂ en los tiempos indicados. Realizamos SDS/PAGE no reductor y Western blot utilizando anticuerpo α -HA. Las cepas utilizadas fueron wild-type HM123 (WT) transformada con los plásmidos p123.81x (pHA-*tpx1*), p123.81x.C48S (pHA-*tpx1.C48S*) y p123.81x.C169S (pHA-*tpx1.C169S*). B. Las cepas 972 (WT) y AV42 p145.C169S (cepa Δ *tpx1* transformada con plásmido integrado en el locus genómico *leu* que expresa la proteína Tpx1.C169S bajo el control del promotor de *tpx1*) fueron tratadas o no durante 5 min. con 1 mM de H₂O₂. Extractos ácidos de TCA de estas muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE no reductor e inmunodetectados con anticuerpos específicos contra Tpx1 y la forma sulfinilada de Tpx1 (Tpx1SO₂H).

4.4. La activación de las rutas de Pap1 o de Sty1 no constituyen la base del carácter esencial de Tpx1 en aerobiosis en *S. pombe*

Tal como aparece publicado en (Vivancos *et al.* 2005), Tpx1 es responsable de transmitir la señal a Pap1. En los resultados previos (v. apartados 3 y 4 de estos resultados), se ha determinado que Tpx1 es esencial para la supervivencia de *S. pombe* en condiciones aeróbicas. Quisimos, de manera complementaria, determinar el papel de una Prx robusta, AhpC de *Escherichia coli*, en el sistema de *S. pombe*. Para ello, se caracterizó, en un fondo genético $\Delta tpx1$, el efecto de la expresión de la proteína AhpC, mediante la supervivencia en placa a condiciones de aerobiosis (Figs. 45A y B).

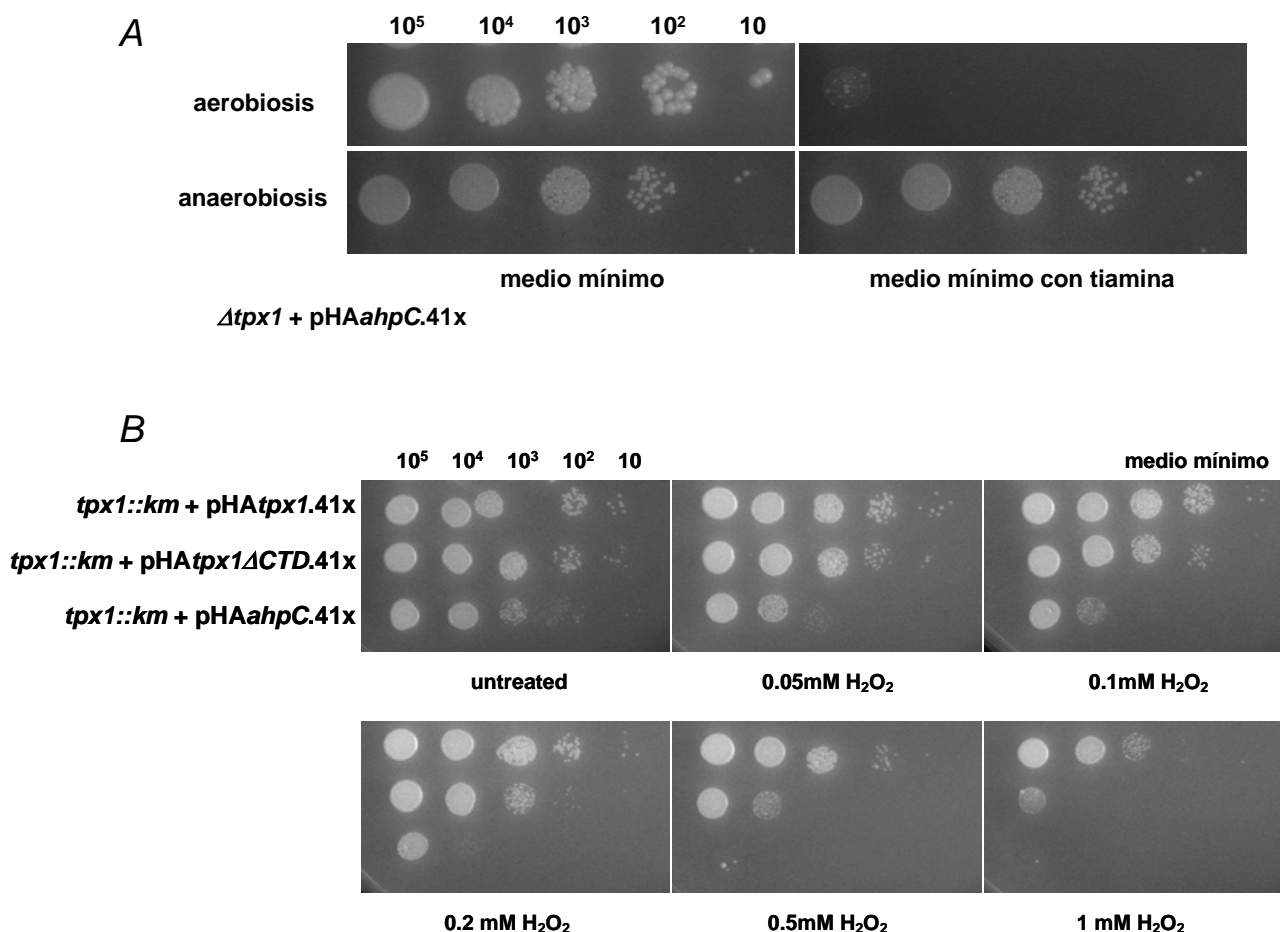


Figura 45. La peroxirredoxina de *E. coli*, AhpC, complementa la falta de Tpx1 en aerobiosis pero no en situación de estrés oxidativo de mayor severidad. A. Supervivencia de la cepa hEA40 + p169.41x (*pHA-AhpC.41x*) en medio sólido mínimo y rico en condiciones de crecimiento aeróbicas y anaeróbicas. **B.** Supervivencia de cepas hEA40 + p123.41x (*pHA-tpx1.41x*) y hEA40 + p124.41x (*pHA-tpx1ΔCTD.41x*) y hEA40 + p169.41x (*pHA-AhpC.41x*) en medio sólido mínimo en presencia o no de diferentes concentraciones de H₂O₂.

La presencia de proteína AhpC permite a las células de *S. pombe* sobrevivir a la presencia de O_2 en el medio. Teniendo en cuenta los resultados mostrados previamente (ver apartado 3 de estos resultados), AhpC debe poseer actividad peroxidática en *S. pombe*. La presencia en placa de H_2O_2 , sin embargo, provoca una pérdida de viabilidad de la cepa, siendo este fenotipo debido a que se trata de una Prx robusta o a que AhpC no se halla detoxificando correctamente. Para averiguar cuál de las posibilidades era la real, se realizaron cinéticas de concentración de H_2O_2 y se comprobó el estado redox de AhpC en comparación con Tpx1 (Fig. 46). La Prx robusta de *E. coli* es capaz de formar dímeros covalentes tras estrés por H_2O_2 en un rango de concentraciones de 0.05 a 10 mM.

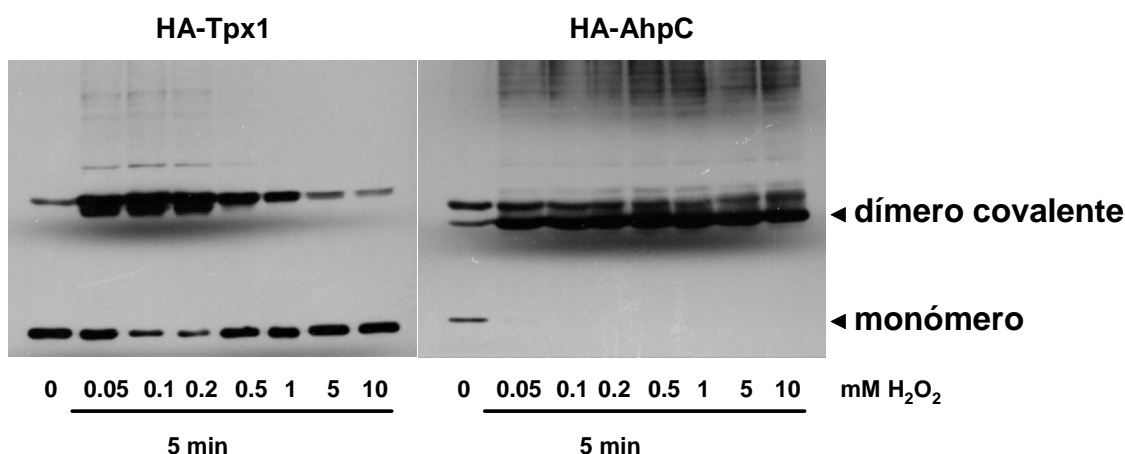
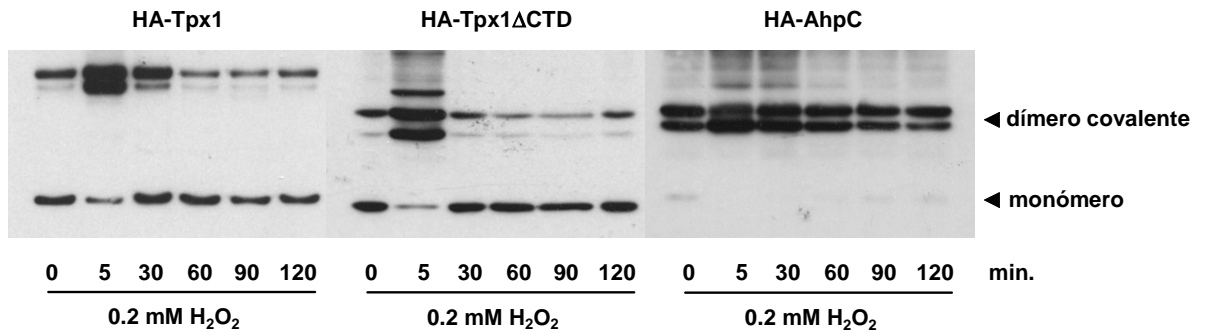


Figura 46. La peroxirredoxina de *E. coli*, AhpC forma dímeros covalentes a tiempos cortos tras dosis elevadas de H_2O_2 . Estado redox de HA-Tpx1 y HA-AhpC en las cepas hEA40 + p123.41x (*pHA-tpx1.41x*) y hEA40 + p169.41x (*pHA-AhpC.41x*) en cinéticas de concentración de H_2O_2 tras 5 min de tratamiento. Las cepas fueron tratadas durante 5 h con tiamina (presencia de niveles WT de Prx).

La forma monomérica de AhpC desaparece en su totalidad al formarse los dímeros covalentes, sugiriendo una falta de reducción de éstos e implicando que no se da una reducción cíclica, sino unidireccional. Se realizó una cinética de tiempo tras la incubación de las células con tiamina durante 2h, para evitar la aparición de moléculas reducidas de AhpC *de novo* (Fig. 47A) y se comprobó que esta Prx, aunque capaz de oxidarse para formar dímeros covalentes, no puede reciclarse, o de forma muy pobre, por la actividad tiorredoxina reductasa. Se comprobó, finalmente, que Pap1 no era activado por AhpC tras ninguna concentración de H_2O_2 extracelular (Fig. 47B). Esto puede

ser debido a que esta Prx no se halle en un ciclo catalítico o a que no posea la capacidad de interaccionar con el factor de transcripción.

A



B

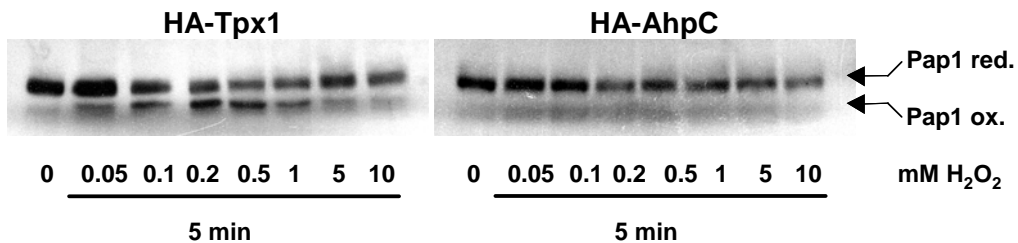


Figura 47. AhpC no se recicla en *S. pombe* y no es capaz de activar a Pap1. A. Estado redox de HA-Tpx1, HA-Tpx1 Δ CTD y HA-AhpC en las cepas hEA40 + p123.41x (*pHA-tpx1.41x*), hEA40 + p124.41x (*pHA-tpx1 Δ CTD.41x*) y hEA40 + p169.41x (*pHA-AhpC.41x*) tratadas durante 2 h con tiamina (inhibición de la síntesis *de novo* de HA-Tpx1, HA-Tpx1 Δ CTD y HA-AhpC) en cinéticas de tiempo tras tratamiento con concentración 0.2 mM de H₂O₂. B. Estado redox de Pap1 en las cepas hEA40 + p123.41x (*pHA-tpx1.41x*) y hEA40 + p169.41x (*pHA-AhpC.41x*) en cinéticas de concentración de H₂O₂ tras 5 min de tratamiento.

5. METODOLOGÍA

Se incluyen las cepas y técnicas experimentales utilizadas para la obtención de los resultados presentados.

5.1. Cepas y plásmidos

Cepas y plásmidos utilizados en el apartado 1

Se utilizaron las cepas EHH14, EHH14.C278A, EHH14.C501A, EHH14.C532A, EHH14.C532T y EHH14.C523,532A que expresan la proteína GFP-Pap1 y los mutantes de cisteína GFP-Pap1.C278A, GFP-Pap1.C501A, GFP-Pap1.C532A, GFP-Pap1.C532T y GFP-Pap1.C523,532A, respectivamente. Estas cepas fueron obtenidas por integración de los plásmidos p85.41x, p85.41x.C278A, p85.41x.C501A, p85.41x.C532A, p85.41x.C532T y p85.41x.C523,532A, respectivamente, en una cepa $\Delta pap1$.

Tabla I. Cepas utilizadas

Nombre	Genotipo	Procedencia
EHH14	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP: Pap1::leu1+</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C278A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP: Pap1.C278A::leu1+</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C501A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP: Pap1.C501A::leu1+</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C532A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP: Pap1.C532A::leu1+</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C532T	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP: Pap1.C532T::leu1+</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C523,532A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP: Pap1.C523,532A::leu1+</i>	Castillo et al., 2002

Tabla II. Plásmidos utilizados

Nombre	Descripción	Procedencia
p85.41x	<i>pnmt41x.GFP-Pap1</i>	Castillo et al., 2002
p85.41x.C278A	<i>pnmt41x.GFP-Pap1.C278A</i>	Castillo et al., 2002
p85.41x.C501A	<i>pnmt41x.GFP-Pap1.C501A</i>	Castillo et al., 2002
p85.41x.C532A	<i>pnmt41x.GFP-Pap1.C532A</i>	Castillo et al., 2002
p85.41x.C532T	<i>pnmt41x.GFP-Pap1.C532T</i>	Castillo et al., 2002
p85.41x.C523,532A	<i>pnmt41x.GFP-Pap1.C523,532A</i>	Castillo et al., 2002

Cepas y plásmidos utilizados en el apartado 2

Los genotipos de las cepas utilizadas aparecen en la tabla III. Se utilizaron las cepas salvaje HM123, $\Delta pap1$ EHH108, $\Delta sty1$ NT224, $\Delta atf1$ JM1066. Se utilizaron las cepas delecionadas en el gen *tpx1*, hEA40 p123.41x y hAV36 p123.42x. También se utilizaron las cepas MJ1, EHH14, EHH14.C523D y EHH14.C523,532A que expresan las proteínas GFP-Tpx1, GFP-Pap1, GFP-Pap1.C523D y GFP-Pap1.C523,532A, respectivamente.

Los plásmidos utilizados aparecen en la Tabla IV. Se utilizaron los plásmidos p123.42x, p123.41x y p123.42x.C169S que codifican para las proteínas de fusión HA-Tpx1 y HA-Tpx1.C169S, respectivamente. A partir del plásmido pJK148, se construyeron los plásmidos p145, p145C48S y p145C169S, que contienen 1 kb del promotor del gen *tpx1* fusionada al ORF de las formas salvaje, C48S y C169S de Tpx1. Se utilizaron también los plásmidos p122.41x y p122.42x.C278A que codifican para las proteínas de fusión MBP-Pap1 y MBP-Pap1C278A, respectivamente. A partir del plásmido p122.41x se generó el plásmido p162.41x.C501A, que codifica para la proteína de fusión MBP-CRD.C501A. Se utilizaron los plásmidos p85.41x, p85.41x.C523D y p85.41xC523,532A que expresan las proteínas de fusión GFP-Pap1, GFP-Pap1.C523D y GFP-Pap1C523,532A, así como el plásmido p177.41x, que expresa la proteína GFP-Tpx1.

Tabla III. Cepas utilizadas

Nombre	Genotipo	Procedencia
HM123	<i>h- leu1</i>	
NT224	<i>h- leu1 ura4 sty1-1</i>	
EHH108	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4-</i>	Castillo et al., 2002
JM1066	<i>h- leu1 ura4 atf1::ura4+</i>	
EHH14	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP:Pap1::leu1+</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C523D	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP:Pap1.C532D::leu1+</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C523,532A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4- nmt::GFP:Pap1.C523,532A::leu1+</i>	Castillo et al., 2002
MJ1	<i>h- leu1 nmt::GFP-Tpx1::leu1+</i>	Este trabajo
hEA40 p123.41x	<i>h- leu1 adeM210 tpx1::kanMX6 pHA.Tpx1.41x</i>	Vivancos et al., 2005
hAV36 p123.42x	<i>h+ leu1 adeM210 ura4 tpx1::kanMX6 pHA.Tpx1.42x</i>	Vivancos et al., 2005

Tabla IV. Plásmidos utilizados		
Nombre	Descripción	Procedencia
p123.41x	<i>pnmt41x</i> .HA-Tpx1	Vivancos et al., 2005
p123.42x	<i>pnmt42x</i> .HA-Tpx1	Vivancos et al., 2005
p123.42x.C169S	<i>pnmt42x</i> .HA-Tpx1.C169S	Vivancos et al., 2005
p145	<i>tpx1'</i> :: <i>tpx1</i>	Vivancos et al., 2005
p145.C48S	<i>tpx1'</i> :: <i>tpx1</i> .C48S	Vivancos et al., 2005
p145.C169S	<i>tpx1'</i> :: <i>tpx1</i> .C169S	Vivancos et al., 2005
p162.41x.C501A	<i>pnmt41x</i> .MBP-CRD.C501A	Este trabajo
p177.41x	<i>pnmt41x</i> .GFP-Tpx1	Este trabajo
p122.42x	<i>pnmt42x</i> .MBP-Pap1	Vivancos et al., 2005
p122.42x.C278A	<i>pnmt42x</i> .MBP-Pap1.C278A	Vivancos et al., 2005
p85.41x	<i>pnmt41x</i> .GFP-Pap1	Castillo et al., 2002
p85.41x.C523D	<i>pnmt41x</i> .GFP-Pap1.C523D	Castillo et al., 2002
p85.41x.C523,532A	<i>pnmt41x</i> .GFP-Pap1.C523,532A	Castillo et al., 2002

Cepas y plásmidos utilizados en el apartado 3

En este trabajo, tal como aparece en la tabla V, se utilizaron las cepas salvajes 972, HM123 y JA212, $\Delta pap1$ AV25, $\Delta sty1$ AV18, $\Delta atf1$ AV15, $\Delta srx1$ EA38 así como la cepa $\Delta tpx1$ complementada con plásmidos episomales que expresan las proteínas HA-Tpx1 y HA-Tpx1 Δ CTD. Se construyó una cepa, derivada de la salvaje JA212, que expresa la forma truncada en los últimos 18 aa del extremo C-terminal de Tpx1 en el locus de *tpx1*, AV33.

Los plásmidos utilizados (tabla VI) fueron p123.41x y p124.41x que expresan, desde un promotor reprimible *nmt* de fuerza intermedia, las proteínas HA-Tpx1 y HA-Tpx1 Δ CTD.

Tabla V. Cepas utilizadas		
Nombre	Genotipo	Procedencia
HM123	<i>h- leu1</i>	
EA38	<i>h- leu1 srx1::kanMX6</i>	Vivancos et al., 2005
JA212	<i>h+ leu1</i>	
AV33	<i>h+ leu1 tpx1::tpx1ΔCTD</i>	Este trabajo
972	<i>h-</i>	
AV25	<i>h- pap1::kanMX6</i>	Este trabajo
AV18	<i>h- sty1::kanMX6</i>	Este trabajo
AV15	<i>h- atf1::kanMX6</i>	Este trabajo
hEA40 p123.42x	<i>h- leu1 adeM210 tpx1::kanMX6 pHA.Tpx1.41x</i>	Vivancos et al., 2005
hEA40 p124.41x	<i>h+ leu1 adeM210 ura4 tpx1::kanMX6 pHA.Tpx1ΔCTD.42x</i>	Este trabajo

Tabla VI. Plásmidos utilizados		
Nombre	Descripción	Procedencia
p123.41x	<i>pnm41x.HA-Tpx1</i>	Vivancos et al., 2005
p124.41x	<i>pnm41x.HA-Tpx1ΔCTD</i>	Este trabajo

Cepas y plásmidos utilizados en el apartado 4

Tal como se muestra en la tabla VII, se utilizaron las cepas salvaje HM123, *tpx1ΔCTD* AV33, Δ *sod1* MS1, Δ *tpx1* AV42 así como la cepa Δ *tpx1* complementada con plásmidos episomales que expresan las proteínas HA-Tpx1, HA-Tpx1 Δ CTD y HA-AhpC. Se construyeron cepas que expresan las Tpx1, Tpx1.C48S y Tpx1.C169S; AV42 p145, AV42 p145.C48S y AV42.C169S, respectivamente.

Los plásmidos utilizados (tabla VIII) fueron p123.41x, p124.41x y p169.41x que expresan, desde un promotor reprimible *nmt* de fuerza intermedia, las proteínas HA-Tpx1, HA-Tpx1 Δ CTD y HA-AhpC. Asimismo, se utilizaron los plásmidos p145, p145C48S y p145C169S integrativos en el locus *leu*, que

contienen 1 kb del promotor del gen *tpx1* fusionada al ORF de *tpx1*, *tpx1.C48S* y *tpx1.C169S*, respectivamente.

Tabla VII. Cepas utilizadas

Nombre	Genotipo	Procedencia
HM123	<i>h- leu1</i>	
AV42	<i>h+ leu1 ura4 ade6-M210 tpx1::kanMX6</i>	Este trabajo
AV42 p145	<i>h+ leu1 ura4 ade6-M210 tpx1::kanMX6 ptpx1':tpx1</i>	Este trabajo
AV42 p145.C48S	<i>h+ leu1 ura4 ade6-M210 tpx1::kanMX6 ptpx1':tpx1C48S</i>	Este trabajo
AV42 p145.C169S	<i>h+ leu1 ura4 ade6-M210 tpx1::kanMX6 ptpx1':tpx1C169S</i>	Este trabajo
AV33	<i>h+ leu1 tpx1::tpx1ΔCTD</i>	Este trabajo
MS1	<i>h+ leu1 ura4 sod1::lacZ:kanMX6</i>	Miriam Sansó
hEA40 p169.41x	<i>h- leu1 adeM210 tpx1::kanMX6 pHA.AhpC.41x</i>	Este trabajo
hEA40 p123.41x	<i>h- leu1 adeM210 tpx1::kanMX6 pHA.Tpx1.41x</i>	Vivancos et al., 2005
hEA40 p124.41x	<i>h- leu1 adeM210 tpx1::kanMX6 pHA.Tpx1ΔCTD.41x</i>	Este trabajo

Tabla VIII. Plásmidos utilizados

Nombre	Descripción	Procedencia
p145	<i>ptpx1':tpx1</i>	Vivancos et al., 2005
p145.C48S	<i>ptpx1':tpx1.C48S</i>	Vivancos et al., 2005
p145.C169S	<i>ptpx1':tpx1.C169S</i>	Vivancos et al., 2005
p123.41x	<i>pnmt41x.HA-Tpx1</i>	Vivancos et al., 2005
p124.41x	<i>pnmt41x.HA-Tpx1ΔCTD</i>	Este trabajo
p169.41x	<i>pnmt41x.HA-AhpC</i>	Este trabajo

5.2. Técnicas experimentales

Microscopía de fluorescencia

La expresión de las proteínas de fusión GFP-Pap1 y GFP-Tpx1 fueron inducidas tras 17-20 h de crecimiento de las células en medio de cultivo sin tiamina. 25 μ l de cultivo celular en fase exponencial fueron cargados en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina. Tras eliminar por aspiración las células no fijadas en el vidrio, se añadieron 2.5 μ l de glicerol 50% o 3 μ l de Hoescht (1 μ g/ml en 50% glicerol) y se cubrió con un cubreobjetos. Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E600 a 100X aumentos y se capturaron las imágenes utilizando una cámara Orca II Dual Scan Cooled CCD Camera y el programa Hamamatsu AquaCosmos 2.0 (Hamamatsu).

Purificación y electroforesis de proteínas unidas a MBP

500 ml de cultivos a OD600 de 1 de *S. pombe* que expresaban las proteínas MBP-Pap1, MBP-Pap1.C278A, MBP-CRD.C501A, y/o HA-Tpx1, HA-Tpx1.C169S fueron tratados con 0.2 mM H₂O₂ durante 5 min. Las células fueron centrifugadas, resuspendidas en 2 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 120 mM KCl, 5 mM EDTA pH=8.0, 0.1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 2 mM PMSF, 0.16 mg/ml aprotinina, cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma), 4 mM NaF, 0.1 mM vanadato sódico) y fueron lisadas por acción mecánica de bolas de vidrio en un *bead beater*. Se centrifugaron las muestras para eliminar las células no lisadas y los restos celulares y se purificó la proteína unida a MBP con una resina de amilosa comercial (*New England Biolabs*). Las diferencias de tamaño entre las diferentes muestras de proteína unida a MBP fueron observadas por separación electroforética en un gel desnaturizante no reductor de poliacrilamida y posterior inmunodetección con anticuerpos específicos contra HA, Pap1, MBP o Tpx1.

Extractos de TCA para la determinación del estado redox *in vivo*

5 ml de células creciendo a OD₆₀₀ de 0.5 se trataron o no, según indicado, con H₂O₂. Tras los tratamientos, se añadió al cultivo 0.55 ml de TCA 100% (en concentración final 10%) y se recogieron las células por centrifugación. El precipitado celular fue transferido a un eppendorf mediante resuspensión en 1 ml de TCA al 20% de concentración, que se eliminó tras una centrifugación durante 30" a 13200 rpm. Se resuspendieron las células en TCA en concentración 12.5% y se disrumpieron por acción mecánica de bolas de vidrio en un *bead beater*. Tras la obtención de los extractos celulares, se precipitaron las proteínas por centrifugación durante 20' a 13200 rpm a 4°C y, posteriormente, se eliminaron los restos de TCA mediante lavado del precipitado proteico con 1 ml de acetona. Tras la evaporación de la acetona, se resuspendió el precipitado en tampón de alquilación (0.1 M Tris-HCl pH=8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS) al que se añadió yodoacetamida en concentración 75 mM y se incubó 15 min a 25°C para permitir la alquilación de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas. Posteriormente, se diluyeron las muestras 1:5 en tampón de defosforilación hasta una concentración final de 80 mM Tris-HCl, pH 9.5, 0.08 mM EDTA y se trataron con 0.04 U/μl de fosfatasa alcalina durante 1 h a 37°C para evitar la aparición de bandas difusas en la electroforesis. Se añadió tampón de carga, se hirvieron las muestras y se realizó una electroforesis desnaturalizante no reductora en geles de poliacrilamida, transferencia a membrana de nitrocelulosa y posterior inmunodetección con anticuerpos específicos.

Análisis de RNA

Se centrifugaron cultivos de 30 ml de *S. pombe* a OD 600 de 0.5 a 3000 rpm durante 3 min, se lavó el precipitado celular con H₂O y se congelaron las células a -20°C. El precipitado se resuspendió en 0.4 ml de tampón AE (50 mM acetato sódico pH5.3, 10 mM EDTA pH8.0) y se le añadió SDS a una concentración final del 1%. Las proteínas y el DNA se extrajeron por adición de 0.3 ml de fenol ácido e incubación a 65°C durante 5 min. Tras enfriar las muestras, se añadió 0.3 ml de cloroformo y se separaron las fases acuosa y

orgánica mediante centrifugación a 13200 rpm durante 2 min. Se recuperó la fase acuosa y se procedió a una nueva extracción con 0.3 ml de cloroformo, seguida de una nueva centrifugación. El RNA de la fase acuosa se precipitó con etanol. Tras la resuspensión en H₂O, se cuantificó el RNA de cada muestra a OD 260 y se cargaron 10 µl en un gel de agarosa con formaldehído (Sambrook and Gething 1989). Se comprobó la cantidad de RNA ribosomal de las muestras como reflejo de la carga de las mismas y se transfirió el RNA a membranas de nylon cargadas positivamente GeneScreen Plus (NEN Life Science Products). Se hibridó la membrana con sondas específicas para los genes *trr1*, *srx1*, *SPAC139.05* o *gpx1* marcadas con α -³²P-dCTP a través de un sistema de *random priming* (Roche).

Derivatización con AMS

5 ml de células OD 0.5 de *S. pombe* se trataron o no durante diferentes tiempos con una concentración de 0.2 mM de H₂O₂. Tras los tratamientos, se añadió al cultivo 0.55ml de TCA 100% (en concentración final 10%) y se recogieron las células por centrifugación. Se resuspendieron las células en TCA en concentración 12.5% y se disrumpieron por acción mecánica de bolas de vidrio en un *bead beater*. Tras la obtención de los extractos celulares, se precipitaron las proteínas por centrifugación durante 20' a 13200 rpm a 4°C y, posteriormente, se eliminaron los restos de TCA mediante un lavado del precipitado proteico con 1 ml de acetona. Tras la evaporación de la acetona, se resuspendió el precipitado en tampón A (100 mM Tris-HCl pH=8.0, 1% SDS, 1 mM EDTA) con DTT en concentración 50 mM y se incubó 1 h a 37°C para reducir todos los estados redox de las cisteínas celulares a sulfhidrilos, a excepción del estado sulfínico, que no sufre modificación. Posteriormente, se reprecipitaron las proteínas por centrifugación durante 20' a 13200 rpm a 4°C tras la adición de TCA 100% en concentración final 12.5% y, posteriormente, se eliminaron los restos de TCA mediante un lavado del precipitado proteico con 1 ml de acetona. Tras la evaporación de la acetona, se resuspendió el precipitado en tampón A con AMS en concentración 15 mM y se incubó 2 h a 37°C. Se añadió tampón de carga, se hirvieron las muestras y se realizó una

electroforesis desnaturalizante no reductora en geles al 20% de poliacrilamida y posterior inmunodetección con anticuerpos anti-HA.

Determinación de la supervivencia en medio sólido

Las cepas de *S. pombe* necesarias en cada caso fueron crecidas en medio mínimo líquido hasta una OD 600 de 0.5. Se diluyeron las células en H₂O y se depositó una gota de 4 μl conteniendo el número de células indicado en una placa de medio mínimo sólido en presencia o no de H₂O₂. Se permitió la evaporación del H₂O y se crecieron las placas durante 3-4 días a 30°C.

Crecimiento en condiciones de anaerobiosis

La condición de anaerobiosis se consiguió a través del uso de placas Anaerocult (Merck), prehumedecidas con 30 ml de H₂O milli-Q en contacto con las placas y aisladas del ambiente a través de un contenedor cerrado.

Determinación del estado de carbonilación proteica

Se centrifugaron cultivos de 30 ml de *S. pombe* a OD 600 de 0.5 a 3000 rpm durante 3 min. Se lavó el precipitado celular con H₂O y se resuspendió en 0.25 ml de carbonilation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.05% NP-40, 1 mM PMSF, 5 mM Benzamidina, 5 mg/ml Aprotinina). Se añadieron glass beads y se procedió a la disrupción mecánica de las células en un *bead beater* (3 ciclos de ruptura, intensidad 4.5, tiempo 25"). Se obtuvo el extracto crudo separándolo del debris celular por centrifugación a 13200 rpm durante 10 min y aspiración del sobrenadante. Se cuantificó la proteína total del extracto a través del método Bradford. Se añadió 1 volumen de SDS 12% hasta una concentración final del 6% a 10 μg de proteína total (1 volumen) y se hirvió a 100°C durante 3 min. Se añadió 1 volumen de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM en TFA 10% y se dejó reaccionar durante 10 min a 25°C. La reacción fue interrumpida mediante la adición de 1 volumen de 2 M Tris base, 30% glicerol, 15% β-mercaptoetanol, observándose un viraje de color amarillo a naranja, debido al cambio de pH.

Las muestras se resolvieron en geles de acrilamida al 10% mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se hibridaron con un anticuerpo anti-DNPH (Sigma D 9656).

DISCUSIÓN

1. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Pap1 SE ACTIVA, A TRAVÉS DE Tpx1, EN RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO POR H₂O₂ DE SEVERIDAD MODERADA

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las tasas de formación y degradación de ROS que conduce a su acumulación en concentraciones tóxicas. En la situación modelo que estudiamos, se provoca un estrés oxidativo intracelular a través de un aporte extracelular de H₂O₂. La cantidad de estrés oxidativo intracelular inicial es proporcional a la concentración de oxidante en el medio extracelular. A nivel celular existen diferentes vías de respuesta al estrés oxidativo que se activan de forma diferente en función de la severidad y la naturaleza del insulto.

El hecho de que Tpx1, una proteína detoxificante de H₂O₂, sea el sensor del estrés oxidativo y transmisor de la señal sugiere que la célula mide su estado de estrés oxidativo en función de una actividad antioxidante. Las razones por las que este enzima es idóneo para llevar a cabo este papel serán discutidas más adelante (ver apartado 3 de esta discusión). Hemos demostrado que la oxidación de Pap1 se da sólo cuando Tpx1 se halla en su ciclo catalítico (Figs. 36 y 37), existiendo un máximo de activación de Pap1 (que se refleja por el porcentaje de forma oxidada respecto a la reducida) a tiempo corto tras dosis de 0.2 mM de H₂O₂. Tratamientos de concentración 0.1 mM de H₂O₂ a tiempo corto provocan también la oxidación de Pap1, sin embargo, esta oxidación se produce en menor proporción. Por otra parte, el mismo tipo de cinéticas muestran que el máximo de formación de dímeros covalentes en Tpx1 se halla en el rango 0.05 - 0.2 mM. La velocidad enzimática de Tpx1 no se puede medir a través de esta aproximación, sin embargo, medidas *in vitro* de la actividad de Tpx1 muestran que cumple la ley de Michaelis-Menten en la ventana de concentraciones de H₂O₂ que no provocan su inactivación por formación de sulfinico en su Cys48 (Koo *et al.* 2002), (Jara M y Hidalgo E, resultados no publicados). Esto nos induce a pensar que *in vivo* este enzima aumenta su velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato dentro de la ventana 0.05 - 0.2 mM extracelular de H₂O₂. Por lo tanto, la diferencia entre los tratamientos de 0.05 y 0.2 mM de H₂O₂ es la velocidad de catálisis enzimática de Tpx1. Las dosis superiores a 0.2 mM, debido a las características

particulares de Tpx1, provocan que su cisteína catalítica se superoxide y, por tanto, se inactive el enzima (Fig. 38). Este hecho sugiere que Tpx1 transmite la señal a Pap1 en función de su velocidad enzimática, siendo esto función de la cantidad de estrés oxidativo intracelular.

Pap1 es un factor de transcripción que se activa en respuesta a H₂O₂ mediante la formación de un puente disulfuro intramolecular que implica a sus residuos cisteína 278 y 501 ó 532. La mutación de, por una parte, la Cys278 o, por otra, las Cys501 y 532, impide la formación del puente disulfuro intramolecular y, con ello, la activación de Pap1 (Fig. 13B). Esta modificación post-traducciona l tampoco tiene lugar en ausencia de Tpx1, lo que indica que esta peroxirredoxina es la responsable de transmitir la señal al factor de transcripción (Figs. 19 y 20). La naturaleza redox de la interacción Tpx1-Pap1 se evidencia por la falta de activación de este último en presencia de las formas mutadas de Tpx1 en sus cisteínas peroxidática (Cys48) o resolutive (Cys169) (Fig. 21A). La proteína Tpx1.C48S no muestra ningún tipo de reactividad en experimentos con extractos ácidos de TCA, que revelan su estado redox (Fig. 44A), y las células que la expresan presentan un fenotipo similar al de una cepa $\Delta tpx1$ (Fig. 43), lo que indica que es la oxidación de este residuo de cisteína lo que provoca que Tpx1 sea capaz de iniciar ataques nucleofílicos contra otras subunidades del propio Tpx1 o contra otras proteínas como Pap1. La mutación del residuo Cys169 provoca, sin embargo, un efecto diferente sobre Tpx1; estudios similares a los anteriores indican que, aunque no forma dímeros covalentes, es capaz de reaccionar con sus proteínas diana (Fig. 44A). En efecto, Pap1 muestra cambios de migración hacia mayores tamaños moleculares aparentes en presencia de Tpx1.C169S (Fig. 21A), sugiriendo que se ha iniciado la reacción que permite la transmisión de la señal por parte de Tpx1 pero no se ha resuelto.

Tpx1 es un homodímero obligado, con lo que se presenta una cierta problemática para explicar su interacción redox con otras proteínas, como Pap1. Resulta difícil concebir que la cisteína peroxidática de un homodímero oxide una cisteína más alejada que la Cys169 de la otra molécula del dímero. Existe la posibilidad de que existan, en situación basal, heterodímeros de Tpx1 con Pap1, pero esto no se ha determinado todavía.

2. Sty1 ES REQUERIDO PARA LA REACTIVACIÓN DE Tpx1 MEDIADA POR Srx1

La MAPK Sty1 se activa en respuesta a estrés oxidativo por dosis elevadas de H₂O₂. Esta vía se activa también en situaciones de estrés osmótico, por temperatura, por metales pesados, por agentes mutagénicos o por privación de nutrientes.

Análisis de microarrays han demostrado que una parte de la respuesta que media Sty1 a nivel transcripcional (a través de la activación del factor de transcripción Atf1, principalmente), conocida como la respuesta general a estrés, consiste en la inducción de un mismo grupo de genes (CESR: core environmental stress response) en todas las situaciones que activan la vía (Chen *et al.* 2003). Estos genes CESR se hallan agrupados funcionalmente en categorías, tales como metabolismo de carbohidratos, señalización y regulación transcripcional, metabolismo de lípidos y ácidos grasos, antioxidantes, reparación del DNA, transportadores, mantenimiento del plegamiento y degradación proteicos. Estudios similares en *S. cerevisiae* revelan que existe una respuesta tipo CESR conservada, aunque los efectores en cada situación de estrés son diferentes. Existe otra parte de la respuesta, de tipo específico, mediada por Sty1, así como por otros factores, en cada tipo de estrés. Esta respuesta transcripcional es conocida como SESR (SESR: specific environmental stress response). La existencia de la respuesta CESR sugiere que las células adoptan una estrategia de protección común ante cualquier situación de estrés que se completa con la respuesta específica para cada tipo de insulto.

Los genes CESR relacionados con la actividad antioxidante sean *trx2* (tioredoxina), *cta1* (catalasa), *gpx1* (glutaciona peroxidasa) y *tpx1* (tioredoxina peroxidasa), entre otros. Todos ellos sufren la mayor inducción en condiciones de estrés oxidativo por H₂O₂. Estas actividades celulares son, por tanto, las responsables de detoxificar el H₂O₂ cuando éste se encuentra en dosis elevadas y su inducción depende de Sty1-Atf1.

Sabemos que Tpx1 se halla inactivado en las condiciones que activan a Sty1 (Figs. 22 y 32). Existen otras actividades celulares, como catalasa,

glutationa peroxidasa o peroxirredoxinas que no se inactivan por exceso de sustrato, capaces de trabajar a dichas dosis de ROS. Sus K_M , superiores a la de Tpx1, no les permite disminuir los ROS hasta la concentración basal inocua para las estructuras celulares. Es por ello que se hace necesario reactivar la actividad peroxidasa de Tpx1 tras la detoxificación llevada a cabo por estas actividades.

La reactivación de Tpx1 podría darse únicamente a través de una síntesis *de novo*, sin embargo, teniendo en cuenta la cantidad de Tpx1 presente en la célula y la vida media de la proteína, esto sería muy costoso en tiempo y recursos (sistemas de degradación del enzima dañado, maquinaria de transcripción y traducción, proteínas chaperona...). El gen *tpx1* se induce, de una forma Sty1-dependiente, 6 veces tras tratamiento de 0.5 mM de H_2O_2 , por tanto, este mecanismo es utilizado por la célula, además de la reducción catalizada por la sulfirredoxina Srx1, tal como hemos demostrado.

Srx1 es una proteína cuya actividad consiste en reducir a tiol el grupo sulfínico de la Cys48 de Tpx1. Con ello, esa molécula es capaz de volver a entrar en el ciclo catalítico detoxificante. Esta reacción consume ATP y depende de la presencia de Mg^{2+} . Esta actividad está conservada en todos los organismos que poseen 2-Cys Prx sensibles y parece que son éstos sus únicos sustratos (Woo *et al.* 2005). El análisis cristalográfico de Srx1 revela que posee una estructura terciaria que le permite unirse a las formas decaméricas de las Prx sensibles (Jonsson *et al.* 2005).

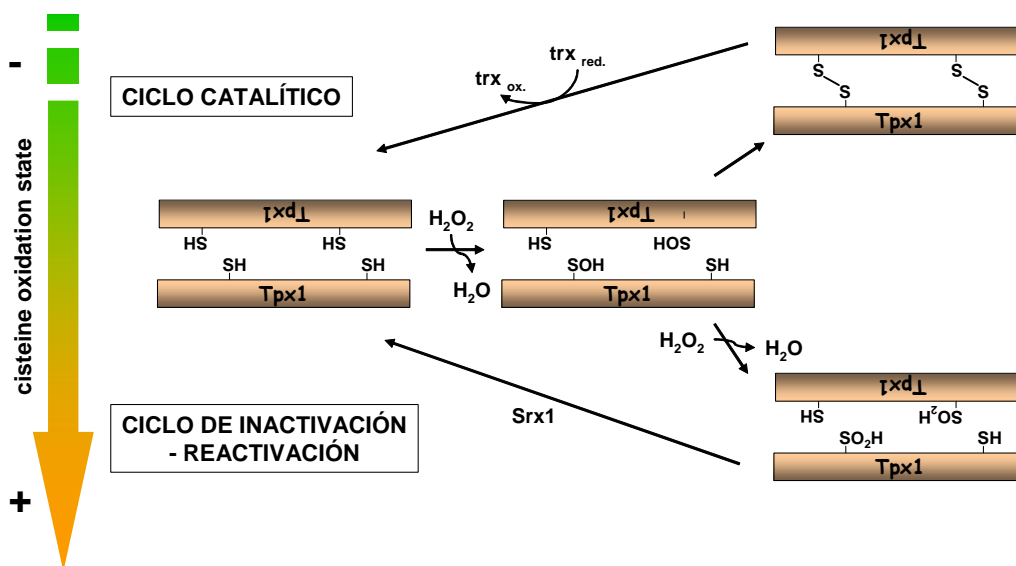


Figura 48. Ciclos catalítico y de inactivación-reactivación de Tpx1.

Estudios de los niveles de RNA mensajero de *srx1* a través de técnicas de Northern blot revelan que no se halla de forma detectable en la situación basal celular. El gen *srx1* se induce de manera específica tras estrés oxidativo (Fig. 23). Experimentos de cinéticas de tiempo a concentraciones moderadas y severas de oxidante mostraron que el patrón de inducción de *srx1* era concomitante a la activación de Pap1 tras dosis moderadas así como a la de Sty1-Atf1 tras dosis severas (Fig. 24). La inducción de *srx1* tras estreses moderados que no provocan la inactivación de Tpx1 puede indicar que existe un cierto grado de formación de sulfínico sobre la Prx. Experimentos en nuestro laboratorio muestran la aparición de un dímero covalente sulfínado en condiciones de estrés moderado por H₂O₂ (Fig. 27). La proporción de moléculas de Tpx1 superoxidadas en estas condiciones probablemente no compromete la función antioxidante de Tpx1.

La inducción de *srx1* que se da tras estrés oxidativo es dependiente de Pap1 y de Sty1-Atf1. Se requiere la presencia de Pap1, Sty1 y Atf1 para la correcta inducción de *srx1* en cualquier situación de estrés por H₂O₂ (Fig. 24). Este hecho indica que el promotor de *srx1*, que posee lugares de unión de Pap1 y de Atf1, puede necesitar la presencia de moléculas de Pap1 y Atf1 para reclutar de forma más eficaz los complejos de iniciación de la transcripción. Este hecho es sorprendente, dado que las dos vías de respuesta se activan de forma separada en *S. pombe*. Experimentos de ChIP (chromatin immunoprecipitation) indican que Pap1 sólo aparece unido a sus promotores diana tras situaciones de estrés que conducen a su activación (Sansó M y Hidalgo E, resultados no publicados). De momento, no hay una explicación satisfactoria sobre el papel de Pap1 en la inducción de *srx1* a tiempos cortos tras tratamientos severos de H₂O₂.

En conclusión, el tratamiento con dosis elevadas de H₂O₂ provoca la inactivación de Tpx1, que resulta en la falta de oxidación de Pap1. En paralelo, se activa Sty1 y, con ello, Atf1. Se produce la inducción de una batería de genes, entre los cuales, actividades antioxidantes que incluyen a *srx1*. Esta respuesta está orientada a la restitución de los niveles basales de ROS así como a reparar los daños producidos por el aumento severo en los niveles de éstos. La actividad Srx1 media la reactivación de Tpx1, que se da a tiempos más largos en la respuesta y, con ello, la activación de Pap1. Este mecanismo

explica la relación entre las vías de Sty1 y Pap1 en la repuesta a H₂O₂ (Fig. 49).

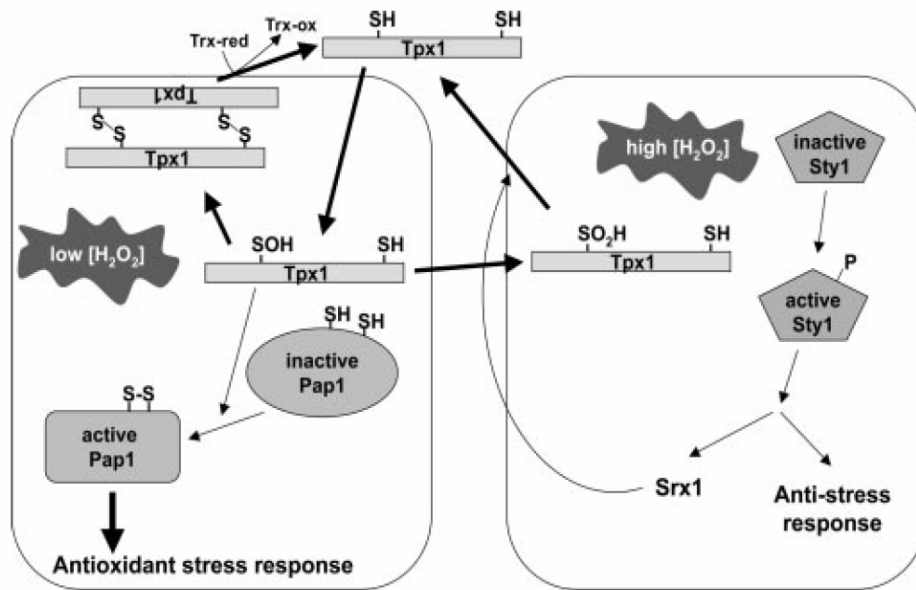


Figura 49. Modelo de la activación de Pap1 en respuesta a dosis bajas y elevadas de H₂O₂.

Una cepa defectiva en Sty1 no activa a Pap1 tras estrés oxidativo severo. La causa, ya discutida, es la falta de inducción de Srx1. Sin embargo, una actividad Gpx1 aumentada en la cepa $\Delta sty1$ es capaz de mediar la oxidación de Pap1 en condiciones de estrés severo por H₂O₂, aunque con una cinética retrasada respecto a la cepa salvaje (Fig. 16). Es probable que la K_M de Gpx1 sea lo suficientemente baja como para que, en elevada cantidad, este enzima sea capaz de detoxificar los ROS hasta alcanzar un potencial redox intracelular que permita que las moléculas de Tpx1 traducidas *de novo* no sufran oxidación a sulfínico en sus centros activos y, por lo tanto, entren en ciclo catalítico y sean capaces de activar a Pap1.

3. Tpx1 ES ESENCIAL EN AEROBIOSIS

La vida aeróbica conlleva la aparición de ROS, dado que el metabolismo se orienta a la obtención de energía a expensas de la reducción de O₂ a H₂O. La reducción parcial del O₂ durante la respiración produce la aparición de ROS.

Las principales actividades intracelulares que detoxifican H_2O_2 son catalasa, glutatona peroxidasa (GPx) y peroxirredoxina (Prx). A continuación, se discutirá sobre su posible contribución a la homeostasis del estado redox basal en aerobiosis.

La catalasa es un enzima de localización peroxisomal. Su sustrato proviene de la β -oxidación de los ácidos grasos, que tiene lugar en los peroxisomas, o bien de la difusión de moléculas desde otros compartimentos celulares. En el caso de que catalasa fuera la responsable del mantenimiento de los niveles basales de H_2O_2 , esto conllevaría muchos daños debidos a ROS que difundieran hacia otros lugares de la célula. Por otra parte, este enzima requiere la unión de dos moléculas de H_2O_2 para llevar a cabo un ciclo catalítico detoxificante, con lo que se dificulta todavía más la detoxificación de niveles bajos de oxidante.

GPx es un enzima con actividad peroxidasa, al igual que las Prx. Su $V_{m\acute{a}x.}$ es elevada, mayor que la de las Prx. Sin embargo, este factor no es de vital importancia en presencia de bajas dosis de H_2O_2 . Su actividad se halla ligada a la glutatona, que posee un potencial redox superior al de la Trx, ligada a las Prx. Esto implica que la Trx, como cofactor, es capaz de oxidarse con mayor facilidad a dosis bajas de ROS que la GSH, con lo que es más reactiva que esta última en estas condiciones. Se cree que la actividad Gpx debe participar de manera importante en la detoxificación de peróxidos, sin embargo, la falta de fenotipo a nivel basal de mutantes que carecen de esta actividad, tanto en células de levadura como de mamífero, sugieren un papel en la respuesta a dosis elevadas de oxidantes. En procariontes no existe una actividad Gpx.

Se ha reportado que las 2-Cys Prx son enzimas antioxidantes con una K_M de valor muy bajo, es decir, de muy elevada afinidad por sus sustratos, los peróxidos. El valor de su $V_{m\acute{a}x.}$ es moderado, en comparación al de catalasa y GPx. En condiciones basales, en que la concentración de sustrato es muy baja, el enzima se halla trabajando a velocidades muy inferiores a la $V_{m\acute{a}x.}$ y que dependen linealmente de la concentración de peróxidos intracelulares. Las Prx son, además, proteínas muy abundantes, con lo que se multiplica su capacidad para la detoxificación de concentraciones muy pequeñas de H_2O_2 . Estas son las razones por las que se considera que las Prx son de gran importancia en el

mantenimiento del estado redox basal intracelular en aerobiosis de células eucariotas inferiores y superiores. En la levadura *S. cerevisiae* se ha observado un fenotipo de sensibilidad a dosis moderadas y severas de H₂O₂ al delecionar TSA1, homólogo a Tpx1. En organismos procariontes, tales como *E. coli*, se ha descrito que la principal actividad responsable de la detoxificación de H₂O₂ producido a nivel endógeno es AhpC, la 2-Cys Prx robusta (Seaver and Imlay 2001). Parece que las Prx son, en efecto, las mejores candidatas a ser las responsables del mantenimiento de los niveles basales de H₂O₂.

En *S. pombe*, la falta de Tpx1 provoca la muerte celular en condiciones de crecimiento aeróbico, tal como demuestran los experimentos de supervivencia en medio sólido en las cepas salvaje y $\Delta tpx1$ (Fig. 41B). Por otra parte, y en este mismo sentido, fue imposible aislar en un entorno aeróbico la cepa delecionada en el gen de *tpx1*. Estas evidencias muestran el requerimiento que existe de la presencia de Tpx1 para sobrevivir a las condiciones de aerobiosis.

Una cepa que posee una mutación en el residuo de cisteína crítico para la actividad peroxidasa de la Prx, la Cys48, muestra un fenotipo de muerte en condiciones aeróbicas idéntico a la de una cepa delecionada en *tpx1* (Fig. 43). En condiciones de anaerobiosis y en presencia de H₂O₂, la cepa que expresa Tpx1.C48S pierde viabilidad de una manera dependiente de concentración. Esto significa que la muerte que se da en aerobiosis tiene que ver con el estrés oxidativo que se produce y con la actividad peroxidasa de Tpx1. Tpx1 debe ser responsable, por tanto, del mantenimiento del estado basal de H₂O₂ intracelular.

Se estudió el efecto de la mutación de los residuos Cys48 y Cys169 en Tpx1. Tal como ya se ha discutido, la cisteína catalítica, Cys48, es esencial en aerobiosis debido a su papel en la actividad peroxidasa de Tpx1. La mutación de Cys169 muestra un fenotipo diferente al de Cys48, y plantea nuevas e interesantes cuestiones sobre Tpx1. La cepa que expresa la proteína mutada Tpx1.C169S es viable en aerobiosis, lo que implica que posee actividad peroxidasa. Esta cepa muestra, sin embargo, una elevada sensibilidad al estrés oxidativo moderado o severo (Fig. 43).

Tpx.C169S entra en ciclos catalíticos *in vivo*, dado que se forma sulfínico sobre Cys48 en presencia de H₂O₂ (Fig. 44B). Es requisito indispensable para

la superoxidación de la cisteína peroxidática que la Prx se halle detoxificando H_2O_2 (Yang *et al.* 2002). Este hecho indica, por tanto, que esta proteína es capaz de llevar a cabo ciclos catalíticos. La identidad del grupo tiol responsable de la actividad peroxidasa de Tpx1.C169S en *S. pombe* es todavía desconocida, y será objeto de futuro trabajo. Este fenómeno se identifica por primera vez *in vivo*. Medidas de actividad *in vitro* con la proteína Prx1, homóloga a Tpx1 en células humanas, determinaron que la forma mutante en la cisteína resolutive es capaz de degradar H_2O_2 sólo si se acopla a equivalentes reductores provenientes del DTT. Durante la reacción *in vitro*, se forma sulfínico sobre la Cys48 (Chae *et al.*, 1994).

4. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA EXISTENCIA DE UNA Prx SENSIBLE EN *S. pombe*

Las Prx se hallan conservadas a lo largo de toda la escala evolutiva. Los procariontes poseen sólo formas robustas de 2-Cys Prx, es decir, que no sufren inactivación por exceso de H_2O_2 . Los eucariotes, unicelulares y pluricelulares, han seleccionado la presencia de Prx sensibles, como es Tpx1 en *S. pombe*, TSA1 en *S. cerevisiae* o Prx I-IV en humanos. Esto conlleva que los eucariotes deben expresar una actividad sulfirredoxina, específica para Prx sensibles (Woo *et al.*, 2004), lo cual supone un gasto energético en forma de ATP y de equivalentes reductores. El significado de la existencia de Prx sensibles no se entiende todavía, aunque existe la teoría de que su inactivación temporal permite el aumento puntual de los ROS, que funcionan como segundos mensajeros intracelulares, y, con ello, la posibilidad de la activación de rutas de transmisión de señal, como sucede en el caso de la fosfatasa PTEN (Kwon *et al.*, 2004). Los organismos unicelulares no utilizan los ROS como segundos mensajeros, aunque sí que hemos demostrado en *S. pombe* que Tpx1 interviene en la vía de transmisión de Pap1 (Figs. 19 y 20) (Vivancos *et al.* 2005). La vía de Sty1 se activa en respuesta a altas dosis de H_2O_2 , cuando Tpx1 se halla inactivado. Se ha publicado que Tpx1 transmite directamente la señal a Sty1 (Veal *et al.* 2004), aunque nosotros no hemos podido reproducir estos experimentos. De hecho, una cepa $\Delta tpx1$ activa los genes Sty1-Atf1 dependientes en respuesta a tratamientos con H_2O_2 (Fig. 40). Creemos que la

inactivación temporal de Tpx1 tras estrés oxidativo severo permite separar en el tiempo las respuestas de Sty1 (que se da a tiempo corto) y de Pap1 (que se da a tiempo largo).

Hemos sido capaces de diseñar una cepa de *S. pombe* que expresa una Prx robusta (Tpx1 Δ CTD), y hemos comparado su fenotipo respecto a una cepa que sólo expresa una Prx sensible (Tpx1).

En primer lugar, determinamos que, efectivamente, Tpx1 Δ CTD es un enzima robusto. Forma dímeros covalentes, que reflejan su actividad peroxidasa, en cinéticas de concentración de H₂O₂ a tiempo corto (5 min) hasta valores de 25 mM de oxidante, mientras que la Prx sensible se inactiva y deja de formar estos dímeros a concentración 1 mM (Fig. 36). Cinéticas de tiempo a concentración 0.2 mM de H₂O₂ demuestran que la forma robusta se recicla con una cinética similar a la sensible (Fig. 47A). Por tanto, Tpx1 Δ CTD es funcional como peroxidasa en *S. pombe* y no se inactiva por exceso de sustrato. De acuerdo con este punto, Tpx1 forma sulfínico sobre la Cys48 en concentraciones superiores o iguales a 1 mM H₂O₂ mientras que Tpx1 Δ CTD no lo hace en concentraciones de hasta 25 mM H₂O₂ (Fig. 38).

Por otra parte, hemos diseñado un modelo funcional de Tpx1 robusto, a través de la superexpresión de Srx1 en presencia de Tpx1 sensible. Un elevado nivel constitutivo de Srx1 impide la inactivación de Tpx1 en presencia de altas dosis de H₂O₂, tal como demuestra el patrón de oxidación/activación de Pap1 (Fig. 25). Esto se demuestra por la formación de dímeros covalentes así como la falta de superoxidación de Cys48 en esta cepa tras tratamientos de 1 mM H₂O₂ (Fig. 22B).

Una forma robusta de Tpx1 debería ser beneficiosa para la célula, dado que es capaz de detoxificar H₂O₂ en elevadas concentraciones. A nivel fenotípico, esperábamos que los dos modelos de Prx robusta en *S. pombe* condujeran a una resistencia a tratamientos con H₂O₂ superior a la de la Prx sensible. Sin embargo, esta hipótesis fue correcta sólo en el caso de la superexpresión de Srx1 (Fig. 17). La presencia de Tpx1 Δ CTD conduce a la disminución de la viabilidad de *S. pombe* no sólo en presencia de cualquier concentración de H₂O₂, sino también en crecimiento aeróbico (Fig. 35A). En anaerobiosis, la cepa que expresa Tpx1 Δ CTD crece igual que la que posee

Tpx1, con lo que el fenotipo anterior tiene que ver con la actividad antioxidante del enzima (Fig. 35B). Estos resultados conducen a la hipótesis de que, por una parte, es beneficioso para *S. pombe* el hecho de mantener la actividad Tpx1 mediada por la reactivación Srx1-dependiente y, por otra, que los enzimas Tpx1 y Tpx1 Δ CTD deben ser diferentes también en presencia de dosis bajas de H₂O₂.

Estudiamos la actividad peroxidasa de las formas sensible y robusta de Tpx1, analizando la formación de dímeros covalentes a diferentes concentraciones de H₂O₂. En efecto, Tpx1 Δ CTD se oxida mucho peor que Tpx1, con una diferencia de hasta 20 veces (Fig. 36). Esto indica que Tpx1 Δ CTD no es capaz de detoxificar correctamente el H₂O₂ producido durante el metabolismo oxidativo y sea esto la causa de que la cepa que la posee no pueda crecer aeróbicamente. Este fenotipo es muy similar al de la delección de *tpx1* y al de la mutación en la Cys48 de Tpx1. En conclusión, la actividad peroxidasa Tpx1-dependiente a dosis bajas de ROS sostiene el crecimiento aeróbico.

Nuestro laboratorio trabaja con una delección C-terminal de 17 aminoácidos, aunque hemos caracterizado la delección de los 9 últimos y podido ver que conduce al mismo efecto (Vivancos A y Hidalgo E, resultados no publicados). (Koo *et al.* 2002) demostraron *in vitro* que la sola delección de los 2 últimos residuos de Tpx1 (Tpx1 Δ 191) es suficiente para generar un enzima robusto a inactivación por exceso de H₂O₂. Esta forma posee los motivos GGLG e YF que se han propuesto como característicos de todas las Prx sensibles y que condicionan el entorno de la Cys48, de forma que la hacen accesible a la entrada de una segunda molécula de H₂O₂ que provoca su sulfonilación (Wood *et al.* 2003b). Ambas formas de Tpx1 delecionadas en el extremo C-terminal muestran *in vitro* una mayor K_M que la forma salvaje (Jara M y Hidalgo E, resultados no publicados), de acuerdo con nuestras observaciones *in vivo*. Esto indica que *S. pombe* debe mantener intacto el extremo C-terminal de Tpx1 para poder mantener bajo el valor de su K_M. Estos estudios y nuestras observaciones sugieren que la inactivación de Tpx1 no es una limitación del enzima sino una característica probablemente necesaria para obtener una actividad peroxidasa de tan elevada afinidad por el sustrato.

La superexpresión de Srx1 provoca la reactivación rápida de Tpx1 tras dosis elevadas de H₂O₂ intracelular, lo que se traduce en una mayor viabilidad de las células ante estos tratamientos. El mismo efecto tiene lugar si se superexpresa Tpx1 (Fig. 17).

La transmisión de la señal de estrés oxidativo a Pap1 se da por parte de Tpx1 cuando se halla formando dímeros covalentes, lo que viene condicionado por el estado redox intracelular. En el caso Tpx1 Δ CTD, esto se da en concentraciones ≥ 1 mM H₂O₂, que provocan la inactivación de Tpx1. Hemos determinado que Pap1 se activa en la cepa que expresa la proteína Tpx1 Δ CTD a tiempos cortos después de dosis elevadas de H₂O₂, en paralelo a la formación de dímeros covalentes (Figs. 36 y 37)). Lo mismo sucede en el caso de la superexpresión de Srx1, en que Tpx1 se encuentra en el ciclo catalítico tras dosis ≥ 1 mM H₂O₂ (Fig. 25). Estas dos cepas presentan, por tanto, activación de las vías de Sty1-Atf1 y Pap1 a la vez tras dosis elevadas de H₂O₂. Este hecho podría resultar en un efecto tóxico, por ejemplo, por modificación de la respuesta transcripcional dependiente de estas vías. La cepa que expresa la proteína Tpx1 Δ CTD muestra, en cinéticas de tiempo y concentración de H₂O₂, una respuesta transcripcional similar a la cepa que expresa Tpx1 (Fig. 39). Se estudiaron genes que dependen únicamente Sty1-Atf1 (*gpx1*) y de ambas vías (*srx1*, *ctt1*). Los genes dependientes de Pap1 (*trr1*) se comportan de manera diferente respecto a la cepa salvaje ya que se inducen con cinéticas adelantadas en dosis elevadas de oxidante. Esto no parece ser tóxico para la célula, dado que la cepa que superexpresa Srx1 posee este mismo fenotipo para los genes Pap1-dependientes (Castillo E y Hidalgo E, resultados no publicados) y, sin embargo, es resistente a la presencia de oxidante en el medio (Fig. 17). Es posible, sin embargo, que este efecto sobre la respuesta Pap1 dependiente, en caso de que sea tóxico, sea compensado por el mantenimiento del ciclo antioxidante de Tpx1, mediado por la actividad Srx1.

La expresión de la Prx robusta de *E. coli*, AhpC, en *S. pombe* es otra aproximación para determinar el papel de la inactivación de Tpx1 *in vivo*. Los resultados obtenidos de la caracterización de AhpC sugieren que esta Prx no se recicla por la actividad tiorredoxina reductasa en *S. pombe* y que, por tanto, detoxifica H₂O₂ de un modo unidireccional; la proteína sintetizada *de novo* es

capaz de reducir 2 equivalentes de oxidante a cambio de formar un dímero covalente con 2 puentes disulfuro intramoleculares. La inhibición de la transcripción del gen *ahpC* provoca que, en presencia de dosis bajas de H₂O₂, los dímeros formados se mantengan a tiempos largos y no aparezca ningún monómero como resultado de su reducción (Fig. 47A).

Sin embargo, la presencia de AhpC, expresado de forma ectópica en concentración similar a la de Tpx1, es suficiente para la supervivencia de *S. pombe* en condiciones de aerobiosis (Fig. 45). La expresión diez veces menor de AhpC, desde un promotor *nmf* de menor fuerza, no permitió aislar la cepa delecionada en *tpx1* que expresara AhpC en nuestro laboratorio (Diz A y Hidalgo E, resultados no publicados), indicando la importancia de la dosis de la proteína para la supervivencia en condiciones aeróbicas. Estas observaciones indican, por una parte, que la K_M de AhpC en *S. pombe* es similar a la de Tpx1 y, por otra, que no es necesario mantener un ciclo detoxificante activo por parte de Tpx1 para poder detoxificar los niveles de ROS debidos a la vida en presencia de O₂. Todo ello nos lleva a creer que Tpx1 es esencial en aerobiosis debido a que su elevada afinidad por el sustrato y su alta concentración le permiten detoxificar niveles muy bajos de H₂O₂.

Se ha reportado, además, que TSA1, homólogo a Tpx1 en *S. cerevisiae*, realiza función de chaperona tras estreses térmico y oxidativo por H₂O₂ (Jang *et al.* 2004). En el caso de *S. pombe*, comprobamos si Tpx1 realiza una función similar. La cepa delecionada en *tpx1* no muestra sensibilidad al crecimiento a 37°C, que constituye un estrés térmico. Este experimento se llevó a cabo en condiciones de anaerobiosis (Vivancos A y Hidalgo E, resultados no publicados). Concluimos que Tpx1 no lleva a cabo una función similar a TSA1 de chaperona molecular.

5. Niveles de ROS en *S. pombe* y vías de respuesta a estrés oxidativo

Los datos aportados en esta tesis nos llevan a pensar que existen tres niveles de ROS en *S. pombe*. Estos niveles se definen porque *S. pombe* maneja de manera diferente tres situaciones de potencial redox intracelular a través de sistemas de señalización así como de detoxificación de los ROS.

Estos niveles de ROS intracelulares pueden ser bajos, moderados y severos. Los dos últimos son situaciones de estrés.

Los niveles de ROS debidos a la vida aeróbica, que no parecen constituir una situación de estrés dado que no existe una vía de transmisión y respuesta, constituyen un nivel bajo de ROS. Estos ROS son detoxificados por la actividad peroxidasa de Tpx1. El potencial redox intracelular es más oxidante que en el crecimiento anaeróbico, tal y como indica el requerimiento de la actividad peroxidasa de Tpx1 (Fig. 41). De acuerdo con esto, el perfil de carbonilación proteica de la cepa $\Delta tpx1$ en aerobiosis es superior al de la cepa salvaje (Fig. 42).

El crecimiento anaeróbico es aquél que se da en ausencia de O₂. En anaerobiosis, no se producen niveles apreciables de ROS debido a que su fuente principal, la cadena de transporte electrónico, no se halla funcional. De hecho, las proteínas que integran la cadena de transporte electrónico, como es el caso de la ubiquinona, no se expresan en células crecidas en condiciones anaeróbicas. La obtención de energía a partir de glucosa se lleva a cabo por fermentación. En estas condiciones, el gen *tpx1* se expresa (Vivancos A y Hidalgo E, resultados no publicados), aunque sabemos que la presencia de la proteína no es esencial para la supervivencia celular. La vida aeróbica conlleva al aparición de ROS, cuya eliminación, en base a nuestros resultados experimentales, depende de la actividad Tpx1. Dado que mutantes en las dos vías de señalización de estrés oxidativo, Pap1 y Sty1, no muestran fenotipo en aerobiosis, no parece que esta situación constituya un estrés (Castillo *et al.* 2003).

El paso de crecimiento anaeróbico a aeróbico genera una situación en que deben inducirse los genes que codifican para componentes de la cadena respiratoria. La proteína Tpx1 presente en el citoplasma celular de las células anaeróbicas probablemente tiene por función la detoxificación de los ROS que se producen al iniciarse el metabolismo oxidativo. Se ha descrito que existe una ruta de señalización en respuesta al paso de crecimiento aeróbico a anaeróbico, formada por Sre1, factor de transcripción anclado al retículo endoplasmático SREBP (sterol regulatory element binding protein), y Scp1, la proteína SCAP (SREBP cleavage activating protein) que regula la liberación del factor de transcripción activo al citoplasma, que viaja al núcleo celular y

provoca la inducción de genes que codifican proteínas que poseen grupos hemo así como genes cuyos productos están implicados en las rutas biosintéticas de esteroides (Hughes *et al.* 2005). La forma activa de Sre1 consiste en el producto de proteólisis del factor inactivo, que se produce en respuesta a una disminución de la síntesis de esteroides dependiente de O₂. Se trata, pues, de una respuesta a hipoxia celular. Las cepas delecionadas en *sre1* y *scp1* son inviables en el crecimiento anaeróbico pero no muestran fenotipo en aerobiosis, de manera que no parece que deban estar implicadas en el estrés oxidativo que se da en el paso de anaerobiosis a aerobiosis. La existencia de esta vía de transmisión de señal muestra que, en efecto, existen cambios transcripcionales agudos en respuesta a hipoxia, mostrando la importancia de la presencia o ausencia de O₂ en *S. pombe*.

Las dos vías de respuesta a estrés oxidativo en *S. pombe*, que responden a diferentes niveles de severidad del mismo, definen dos situaciones intracelulares distintas, que son manejadas por la célula también de manera distinta. Ambos niveles de ROS se constituyen como situaciones de estrés y, tal como se ha demostrado en esta tesis, uno de ellos corresponde al nivel moderado de estrés oxidativo por H₂O₂ donde Tpx1-Pap1 es la ruta de transmisión de señal y el otro al nivel severo de estrés por este oxidante, en que es la vía de la MAPK Sty1 la responsable de transmitir y mediar la respuesta.

La activación de Pap1 se da como respuesta a niveles moderados de ROS intracelulares (Vivancos *et al.* 2004; Vivancos *et al.* 2005). El factor de transcripción regula, a través de la respuesta génica que activa, la detoxificación de estos niveles moderados a niveles basales aeróbicos de ROS. Pap1 induce la transcripción de genes relacionados con la actividad de Tpx1: el propio *tpx1*, *trr1*, *trx1* y *srx1*. Asimismo, Pap1 induce la actividad catalasa, cuya función antioxidante es complementaria a la de Tpx1 ya que posee una V_{máx.} muy superior pero su K_M es mucho mayor. De esta manera, la activación de Pap1 consigue disminuir los ROS intracelulares en base a una actividad de baja afinidad pero elevada velocidad y otra de elevadísima afinidad pero moderada velocidad. Es probable que la actividad catalasa contribuya cuantitativamente en la primera fase de la detoxificación, en que la concentración de oxidante es lo suficientemente alta como para que funcione a

elevada velocidad. Creemos que Tpx1 finalmente disminuye los niveles de ROS hasta las concentraciones basales.

Los insultos severos de H_2O_2 provocan la activación de Sty1, que a su vez fosforila y activa, entre otros, al factor de transcripción Atf1. Atf1 media una respuesta transcripcional que, en el caso del estrés oxidativo, abarca unos 300 genes, implicados en diversas funciones celulares, entre ellas las antioxidantes, tal y como se ha discutido en el apartado 2 de esta discusión. Sty1-Atf1 promueve una respuesta encargada de detoxificar los niveles severos de ROS intracelulares, a través principalmente de las actividades catalasa y glutatióna peroxidasa, ambas de elevada $V_{m\acute{a}x}$ y moderada afinidad por el sustrato. Existe una parte de la respuesta génica que es común a la de Pap1; la actividad catalasa y las actividades relacionadas con el mantenimiento de la actividad Tpx1 (tioredoxina, TR, Tpx1, Srx1). La activación de Sty1 induce estos genes de forma cuantitativamente superior a Pap1, dado que existe una mayor concentración de ROS a detoxificar.

Tras estrés oxidativo severo, Tpx1 sufre una inactivación por exceso de sustrato (Fig. 38). La activación de Sty1 promueve su reactivación posterior y, con ello, se activa Pap1. Se ha demostrado, a través de aproximaciones genéticas y bioquímicas que Pap1 se activa siempre después de Sty1 en respuesta a dosis elevadas de oxidante (Fig. 12). La respuesta de Sty1 es más duradera y potente a mayor severidad del insulto, provocando que la activación de Pap1 se dé de forma más tardía. Esto implica que, una vez alcanzado el potencial redox adecuado, se produce la activación de Pap1 que, a su vez, genera una nueva respuesta, encaminada a disminuir los niveles de ROS hasta valores basales.

El significado de la activación tardía de Pap1 tras la respuesta de Sty1 es desconocido, pudiendo ser un accidente debido a que necesariamente durante la detoxificación se alcanzan los niveles moderados de ROS que provocan la oxidación del factor de transcripción. Es posible, por otra parte, que la respuesta a niveles severos de ROS incluya la activación secuencial de ambas vías, especializada cada una de ellas en detoxificar el H_2O_2 en ventanas de concentración diferentes, aunque parcialmente solapantes (entorno a los niveles moderados de ROS y mediados por las actividades comunes a ambas respuestas).

El significado de que no se active Pap1 durante la fase inicial de la respuesta a estrés severo por H_2O_2 no se comprende. Pap1 es responsable de la inducción génica de actividades implicadas en la detoxificación de ROS, como proteínas transportadoras de membrana que actúan exportando drogas al medio extracelular o la TR o el propio Tpx1. Parece, por tanto, que su activación podría resultar en un beneficio para la célula que se halla en situación de estrés oxidativo severo. Se ha propuesto que la inactivación de Tpx1 permite un aumento puntual de la concentración de H_2O_2 intracelular y que éste mecanismo permite la activación de vías de respuesta al estrés, en este caso la de Sty1. La falta de activación de Pap1 sería entonces un accidente colateral, debido a la dependencia que tiene de la actividad de Tpx1. Podría resultar que las dos vías de señal, Pap1 y Sty1, fueran tóxicas al ser activadas a la vez, y que fuera necesario ordenar ambas respuestas. Sin embargo, no tenemos ningún indicio en este sentido tal como se ha discutido en el apartado 4 de esta discusión. Es posible que la falta de activación de Pap1 sea un mecanismo de ahorro celular, dado que la respuesta que genera está dirigida a restaurar los niveles basales de ROS y no a detoxificar concentraciones tan elevadas. En este sentido, las vías de respuesta estarían especializadas para responder a insultos de diferente severidad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. Pap1 se activa sólo en respuesta a dosis moderadas de H₂O₂ intracelular.
2. Pruebas bioquímicas indican que, en respuesta a H₂O₂ se induce la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 278 y 501/532 de Pap1.
3. Tpx1 es sensor de H₂O₂ y transmisor de la señal de estrés oxidativo a Pap1.
4. La inactivación de Tpx1 en presencia de dosis elevadas de H₂O₂ es la razón por la que no se produce activación de Pap1 en estas condiciones.
5. La inactivación de Tpx1 en presencia de dosis elevadas de H₂O₂ es revertida por Srx1.
6. Tras estrés oxidativo severo por H₂O₂, se activa la MAPK Sty1. Sty1 promueve una respuesta antioxidante que incluye la inducción transcripcional de *srx1*.
7. Tpx1 es esencial en aerobiosis debido a que detoxifica los niveles de H₂O₂ que se generan en el metabolismo aeróbico.
8. Tpx1.C169S es capaz de llevar a cabo ciclos catalíticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Monge, R., F. Navarro-Garcia, E. Roman, A.I. Negredo, B. Eisman, C. Nombela, and J. Pla. 2003. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2: 351-61.
- Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R.J. Imbra, H.J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, and M. Karin. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49: 729-39.
- Apontoweil, P. and W. Berends. 1975. Isolation and initial characterization of glutathione-deficient mutants of *Escherichia coli* K 12. *Biochim Biophys Acta* 399: 10-22.
- Aslund, F., M. Zheng, J. Beckwith, and G. Storz. 1999. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6161-5.
- Azevedo, D., F. Tacnet, A. Delaunay, C. Rodrigues-Pousada, and M.B. Toledano. 2003. Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med* 35: 889-900.
- Babior, B.M. 2000. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life* 50: 267-9.
- Babior, B.M. 2002. The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J* 4: 1023-4.
- Baeuerle, P.A. and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-79.
- Benov, L. and I. Fridovich. 1997. Superoxide imposes leakage of sulfite from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 347: 271-4.
- Benov, L. and I. Fridovich. 1999. Why superoxide imposes an aromatic amino acid auxotrophy on *Escherichia coli*. The transketolase connection. *J Biol Chem* 274: 4202-6.
- Benov, L., N.M. Kredich, and I. Fridovich. 1996. The mechanism of the auxotrophy for sulfur-containing amino acids imposed upon *Escherichia coli* by superoxide. *J Biol Chem* 271: 21037-40.

- Biteau, B., J. Labarre, and M.B. Toledano. 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425: 980-4.
- Brown, J.L., H. Bussey, and R.C. Stewart. 1994. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *Embo J* 13: 5186-94.
- Budanov, A.V., A.A. Sablina, E. Feinstein, E.V. Koonin, and P.M. Chumakov. 2004. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304: 596-600.
- Bulavin, D.V., Y. Higashimoto, I.J. Popoff, W.A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella, and A.J. Fornace, Jr. 2001. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411: 102-7.
- Bushweller, J.H., F. Aslund, K. Wuthrich, and A. Holmgren. 1992. Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* 31: 9288-93.
- Cadenas, E. and K.J. Davies. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29: 222-30.
- Carmel-Harel, O. and G. Storz. 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* 54: 439-61.
- Casagrande, S., V. Bonetto, M. Fratelli, E. Gianazza, I. Eberini, T. Massignan, M. Salmona, G. Chang, A. Holmgren, and P. Ghezzi. 2002. Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9745-9.
- Castillo, E.A., J. Ayte, C. Chiva, A. Moldon, M. Carrascal, J. Abian, N. Jones, and E. Hidalgo. 2002. Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol Microbiol* 45: 243-54.
- Castillo, E.A., A.P. Vivancos, N. Jones, J. Ayte, and E. Hidalgo. 2003. *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking the Ran-binding protein Hba1 show a multidrug resistance phenotype due to constitutive nuclear accumulation of Pap1. *J Biol Chem* 278: 40565-72.
- Chae, H.Z., H.J. Kim, S.W. Kang, and S.G. Rhee. 1999. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* 45: 101-12.
- Chae, H.Z. and S.G. Rhee. 1994. A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *Biofactors* 4: 177-80.

- Chai, Y.C., S.S. Ashraf, K. Rokutan, R.B. Johnston, Jr., and J.A. Thomas. 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys* 310: 273-81.
- Chance, B., B. Schoener, R. Oshino, F. Itshak, and Y. Nakase. 1979. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem* 254: 4764-71.
- Chang, L. and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40.
- Chang, T.S., W. Jeong, S.Y. Choi, S. Yu, S.W. Kang, and S.G. Rhee. 2002. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 25370-6.
- Chang, T.S., W. Jeong, H.A. Woo, S.M. Lee, S. Park, and S.G. Rhee. 2004. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem* 279: 50994-1001.
- Chen, D., W.M. Toone, J. Mata, R. Lyne, G. Burns, K. Kivinen, A. Brazma, N. Jones, and J. Bahler. 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14: 214-29.
- Chinenov, Y. and T.K. Kerppola. 2001. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20: 2438-52.
- Choi, H., S. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J. Woo, G. Storz, and S. Ryu. 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105: 103-13.
- Ciorba, M.A., S.H. Heinemann, H. Weissbach, N. Brot, and T. Hoshi. 1997. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9932-7.
- Claiborne, A., J.I. Yeh, T.C. Mallett, J. Luba, E.J. Crane, 3rd, V. Charrier, and D. Parsonage. 1999. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* 38: 15407-16.
- Collinson, E.J., G.L. Wheeler, E.O. Garrido, A.M. Avery, S.V. Avery, and C.M. Grant. 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 277: 16712-7.
- Coon, M.J., X.X. Ding, S.J. Pernecky, and A.D. Vaz. 1992. Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb J* 6: 669-73.
- Cotgreave, I.A. and R.G. Gerdes. 1998. Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link

- between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 242: 1-9.
- Cussioli, J.R., S.V. Alves, M.A. de Oliveira, and L.E. Netto. 2003. Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J Biol Chem* 278: 11570-8.
- Dafre, A.L., H. Sies, and T. Akerboom. 1996. Protein S-thiolation and regulation of microsomal glutathione transferase activity by the glutathione redox couple. *Arch Biochem Biophys* 332: 288-94.
- Degols, G. and P. Russell. 1997. Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 17: 3356-63.
- Degols, G., K. Shiozaki, and P. Russell. 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16: 2870-7.
- Delaunay, A., A.D. Isnard, and M.B. Toledano. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* 19: 5157-66.
- Delaunay, A., D. Pflieger, M.B. Barrault, J. Vinh, and M.B. Toledano. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111: 471-81.
- Dizdaroglu, M. 1991. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 10: 225-42.
- Drahota, Z., S.K. Chowdhury, D. Floryk, T. Mracek, J. Wilhelm, H. Rauchova, G. Lenaz, and J. Houstek. 2002. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *J Bioenerg Biomembr* 34: 105-13.
- Eaton, P. and M.J. Shattock. 2002. Purification of proteins susceptible to oxidation at cysteine residues: identification of malate dehydrogenase as a target for S-glutathiolation. *Ann N Y Acad Sci* 973: 529-32.
- Ellis, H.R. and L.B. Poole. 1997a. Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* 36: 15013-8.
- Ellis, H.R. and L.B. Poole. 1997b. Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36: 13349-56.
- Enjalbert, B., D.A. Smith, M.J. Cornell, I. Alam, S. Nicholls, A.J. Brown, and J. Quinn. 2006. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in

the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 17: 1018-32.

- Fang, D., C. Elly, B. Gao, N. Fang, Y. Altman, C. Joazeiro, T. Hunter, N. Copeland, N. Jenkins, and Y.C. Liu. 2002. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol* 3: 281-7.
- Finkel, T. and N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-47.
- Flint, D.H., E. Smyk-Randall, J.F. Tuminello, B. Draczynska-Lusiak, and O.R. Brown. 1993a. The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *J Biol Chem* 268: 25547-52.
- Flint, D.H., J.F. Tuminello, and M.H. Emptage. 1993b. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268: 22369-76.
- Freshney, N.W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, and J. Saklatvala. 1994. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78: 1039-49.
- Fuangthong, M., S. Atichartpongkul, S. Mongkolsuk, and J.D. Helmann. 2001. OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183: 4134-41.
- Fuangthong, M. and J.D. Helmann. 2002. The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6690-5.
- Fuchs, J.A. and H.R. Warner. 1975. Isolation of an *Escherichia coli* mutant deficient in glutathione synthesis. *J Bacteriol* 124: 140-8.
- Gardner, P.R. and I. Fridovich. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem* 266: 19328-33.
- Georgiou, G. and L. Masip. 2003. Biochemistry. An overoxidation journey with a return ticket. *Science* 300: 592-4.
- Ghosh, S. and M. Karin. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl: S81-96.
- Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.
- Gilbert, H.F. 1984. Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol* 107: 330-51.

- Gonzalez-Flecha, B. and B. Demple. 1997. Transcriptional regulation of the *Escherichia coli* oxyR gene as a function of cell growth. *J Bacteriol* 179: 6181-6.
- Grant, C.M., F.H. MacIver, and I.W. Dawes. 1996. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29: 511-5.
- Greenall, A., A.P. Hadcroft, P. Malakasi, N. Jones, B.A. Morgan, C.S. Hoffman, and S.K. Whitehall. 2002. Role of fission yeast Tup1-like repressors and Prr1 transcription factor in response to salt stress. *Mol Biol Cell* 13: 2977-89.
- Greenberg, J.T. and B. Demple. 1986. Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for resistance to H₂O₂ and gamma radiation. *J Bacteriol* 168: 1026-9.
- Guengerich, F.P. 2002. Cytochrome P450 enzymes in the generation of commercial products. *Nat Rev Drug Discov* 1: 359-66.
- Gupta, S., T. Barrett, A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H.K. Sluss, B. Derijard, and R.J. Davis. 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* 15: 2760-70.
- Gutteridge, J.M. and B. Halliwell. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 899: 136-47.
- Halliwell, B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31: 261-72.
- Han, J., J.D. Lee, L. Bibbs, and R.J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-11.
- Hauptmann, N., J. Grimsby, J.C. Shih, and E. Cadenas. 1996. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 335: 295-304.
- Herbig, A.F. and J.D. Helmann. 2001. Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* 41: 849-59.
- Hidalgo, E., J.M. Bollinger, Jr., T.M. Bradley, C.T. Walsh, and B. Demple. 1995. Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *J Biol Chem* 270: 20908-14.
- Hirata, D., K. Yano, and T. Miyakawa. 1994. Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun

- family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 242: 250-6.
- Hirota, K., M. Matsui, S. Iwata, A. Nishiyama, K. Mori, and J. Yodoi. 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3633-8.
- Hirotsu, S., Y. Abe, K. Okada, N. Nagahara, H. Hori, T. Nishino, and T. Hakoshima. 1999. Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12333-8.
- Hofmann, B., H.J. Hecht, and L. Flohe. 2002. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383: 347-64.
- Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 300-72.
- Hong, M., M. Fuangthong, J.D. Helmann, and R.G. Brennan. 2005. Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Mol Cell* 20: 131-41.
- Hughes, A.L., B.L. Todd, and P.J. Espenshade. 2005. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell* 120: 831-42.
- Hutchinson, F. 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32: 115-54.
- Imlay, J.A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57: 395-418.
- Inoue, Y., T. Matsuda, K. Sugiyama, S. Izawa, and A. Kimura. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 27002-9.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J.D. Engel, and M. Yamamoto. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13: 76-86.
- Izawa, S., Y. Inoue, and A. Kimura. 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 368: 73-6.
- Jamieson, D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511-27.
- Jang, H.H., K.O. Lee, Y.H. Chi, B.G. Jung, S.K. Park, J.H. Park, J.R. Lee, S.S. Lee, J.C. Moon, J.W. Yun, Y.O. Choi, W.Y. Kim, J.S. Kang, G.W. Cheong, D.J. Yun, S.G. Rhee, M.J. Cho, and S.Y. Lee. 2004. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-

dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117: 625-35.

- Jonsson, T.J., M.S. Murray, L.C. Johnson, L.B. Poole, and W.T. Lowther. 2005. Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin. *Biochemistry* 44: 8634-42.
- Jung, C.H. and J.A. Thomas. 1996. S-glutathiolated hepatocyte proteins and insulin disulfides as substrates for reduction by glutaredoxin, thioredoxin, protein disulfide isomerase, and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 335: 61-72.
- Kang, S.W., I.C. Baines, and S.G. Rhee. 1998. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem* 273: 6303-11.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270: 16483-6.
- Karin, M. and M. Delhase. 2000. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* 12: 85-98.
- Kato, T., Jr., K. Okazaki, H. Murakami, S. Stettler, P.A. Fantes, and H. Okayama. 1996. Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett* 378: 207-12.
- Ketela, T., J.L. Brown, R.C. Stewart, and H. Bussey. 1998. Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Mol Gen Genet* 259: 372-8.
- Klatt, P. and S. Lamas. 2000. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 267: 4928-44.
- Klatt, P., E.P. Molina, M.G. De Lacoba, C.A. Padilla, E. Martinez-Galesteo, J.A. Barcena, and S. Lamas. 1999. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *Faseb J* 13: 1481-90.
- Koo, K.H., S. Lee, S.Y. Jeong, E.T. Kim, H.J. Kim, K. Kim, K. Song, and H.Z. Chae. 2002. Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch Biochem Biophys* 397: 312-8.
- Koo, M.S., J.H. Lee, S.Y. Rah, W.S. Yeo, J.W. Lee, K.L. Lee, Y.S. Koh, S.O. Kang, and J.H. Roe. 2003. A reducing system of the superoxide sensor SoxR in Escherichia coli. *Embo J* 22: 2614-22.
- Krems, B., C. Charizanis, and K.D. Entian. 1996. The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of Saccharomyces cerevisiae is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet* 29: 327-34.

- Kuge, S. and N. Jones. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *Embo J* 13: 655-64.
- Kuge, S., N. Jones, and A. Nomoto. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* 16: 1710-20.
- Kumada, K., M. Yanagida, and T. Toda. 1996. Caffeine-resistance in fission yeast is caused by mutations in a single essential gene, *crm1+*. *Mol Gen Genet* 250: 59-68.
- Kwak, M.K., N. Wakabayashi, J.L. Greenlaw, M. Yamamoto, and T.W. Kensler. 2003. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 23: 8786-94.
- Kwon, J., S.R. Lee, K.S. Yang, Y. Ahn, Y.J. Kim, E.R. Stadtman, and S.G. Rhee. 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16419-24.
- Kyriakis, J.M. and J. Avruch. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-69.
- Lee, C., S.M. Lee, P. Mukhopadhyay, S.J. Kim, S.C. Lee, W.S. Ahn, M.H. Yu, G. Storz, and S.E. Ryu. 2004. Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1179-85.
- Lee, J., C. Godon, G. Lagniel, D. Spector, J. Garin, J. Labarre, and M.B. Toledano. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274: 16040-6.
- Lee, J.W. and J.D. Helmann. 2006. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440: 363-7.
- Lesniak, J., W.A. Barton, and D.B. Nikolov. 2002. Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr. *Embo J* 21: 6649-59.
- Levine, R.L., L. Mosoni, B.S. Berlett, and E.R. Stadtman. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15036-40.
- Lind, C., R. Gerdes, I. Schuppe-Koistinen, and I.A. Cotgreave. 1998. Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 481-6.

- Link, A.J., K. Robison, and G.M. Church. 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* 18: 1259-313.
- Liochev, S.I. and I. Fridovich. 1993. Modulation of the fumarases of *Escherichia coli* in response to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 301: 379-84.
- Lopez-Aviles, S., M. Grande, M. Gonzalez, A.L. Helgesen, V. Alemany, M. Sanchez-Piris, O. Bachs, J.B. Millar, and R. Aligue. 2005. Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol Cell* 17: 49-59.
- Matthews, J.R., N. Wakasugi, J.L. Virelizier, J. Yodoi, and R.T. Hay. 1992. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20: 3821-30.
- Meyer, M., H.L. Pahl, and P.A. Baeuerle. 1994. Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chem Biol Interact* 91: 91-100.
- Millar, J.B., V. Buck, and M.G. Wilkinson. 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* 9: 2117-30.
- Miller, A.F. 2004. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol* 8: 162-8.
- Moore, R.B. and S.K. Shriver. 1997. Protein 7.2b of human erythrocyte membranes binds to calpromotin. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 294-7.
- Morgan, B.A., G.R. Banks, W.M. Toone, D. Raitt, S. Kuge, and L.H. Johnston. 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 16: 1035-44.
- Morgan, B.A., N. Bouquin, G.F. Merrill, and L.H. Johnston. 1995. A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *Embo J* 14: 5679-89.
- Muller, E.G. 1996. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell* 7: 1805-13.
- Nagao, K., Y. Taguchi, M. Arioka, H. Kadokura, A. Takatsuki, K. Yoda, and M. Yamasaki. 1995. bfr1+, a novel gene of *Schizosaccharomyces pombe* which confers brefeldin A resistance, is structurally related to the ATP-binding cassette superfamily. *J Bacteriol* 177: 1536-43.

- Nguyen, D.T., A.M. Alarco, and M. Raymond. 2001. Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem* 276: 1138-45.
- Nguyen, T., P.J. Sherratt, P. Nioi, C.S. Yang, and C.B. Pickett. 2005. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* 280: 32485-92.
- Nguyen, T., P.J. Sherratt, and C.B. Pickett. 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 233-60.
- Nishi, K., M. Yoshida, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1993. Mating of the fission yeast occurs independently of pmd1+ gene product, a structural homologue of budding yeast STE6 and mammalian P-glycoproteins. *Arch Microbiol* 160: 162-5.
- Obin, M., F. Shang, X. Gong, G. Handelman, J. Blumberg, and A. Taylor. 1998. Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *Faseb J* 12: 561-9.
- Ohmiya, R., C. Kato, H. Yamada, H. Aiba, and T. Mizuno. 1999. A fission yeast gene (prr1(+)) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *J Biochem (Tokyo)* 125: 1061-6.
- Ohmiya, R., H. Yamada, C. Kato, H. Aiba, and T. Mizuno. 2000. The Prr1 response regulator is essential for transcription of ste11+ and for sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet* 264: 441-51.
- Ohtake, Y. and S. Yabuuchi. 1991. Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 953-61.
- Poole, L.B., C.M. Reynolds, Z.A. Wood, P.A. Karplus, H.R. Ellis, and M. Li Calzi. 2000. AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267: 6126-33.
- Quinn, J., V.J. Findlay, K. Dawson, J.B. Millar, N. Jones, B.A. Morgan, and W.M. Toone. 2002. Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13: 805-16.
- Raitt, D.C., A.L. Johnson, A.M. Erkin, K. Makino, B. Morgan, D.S. Gross, and L.H. Johnston. 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 11: 2335-47.

- Reichard, P. 1993. The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268: 8383-6.
- Rhee, S.G., K.S. Yang, S.W. Kang, H.A. Woo, and T.S. Chang. 2005. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal* 7: 619-26.
- Rodriguez-Gabriel, M.A., G. Burns, W.H. McDonald, V. Martin, J.R. Yates, 3rd, J. Bahler, and P. Russell. 2003. RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *Embo J* 22: 6256-66.
- Roux, P.P. and J. Blenis. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-44.
- Sambrook, J. and M.J. Gething. 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342: 224-5.
- Samejima, I., S. Mackie, and P.A. Fantes. 1997. Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *Embo J* 16: 6162-70.
- San Jose, C., R.A. Monge, R. Perez-Diaz, J. Pla, and C. Nombela. 1996. The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* 178: 5850-2.
- Sanchez-Piris, M., F. Posas, V. Alemany, I. Winge, E. Hidalgo, O. Bachs, and R. Aligue. 2002. The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *J Biol Chem* 277: 17722-7.
- Sapone, A., A. Affatato, D. Canistro, M. Broccoli, S. Trespidi, L. Pozzetti, G.L. Biagi, G. Cantelli-Forti, and M. Paolini. 2003. Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice. *Mutat Res* 527: 67-80.
- Schroder, E., J.A. Littlechild, A.A. Lebedev, N. Errington, A.A. Vagin, and M.N. Isupov. 2000. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure* 8: 605-15.
- Seaver, L.C. and J.A. Imlay. 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 7173-81.
- Seo, M.S., S.W. Kang, K. Kim, I.C. Baines, T.H. Lee, and S.G. Rhee. 2000. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms

- an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* 275: 20346-54.
- Shaulian, E. and M. Karin. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20: 2390-400.
- Shieh, J.C., M.G. Wilkinson, V. Buck, B.A. Morgan, K. Makino, and J.B. Millar. 1997. The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev* 11: 1008-22.
- Shiozaki, K. and P. Russell. 1995. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *Embo J* 14: 492-502.
- Shiozaki, K. and P. Russell. 1996. Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* 10: 2276-88.
- Shiozaki, K., M. Shiozaki, and P. Russell. 1997. Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell* 8: 409-19.
- Shiozaki, K., M. Shiozaki, and P. Russell. 1998. Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 9: 1339-49.
- Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown. 1994. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10: 405-55.
- Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27: 916-21.
- Sies, H., L.O. Klotz, V.S. Sharov, A. Assmann, and K. Briviba. 1998. Protection against peroxynitrite by selenoproteins. *Z Naturforsch [C]* 53: 228-32.
- Smith, D.A., S. Nicholls, B.A. Morgan, A.J. Brown, and J. Quinn. 2004. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 15: 4179-90.
- Stephen, D.W. and D.J. Jamieson. 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 141: 207-12.
- Stephen, D.W. and D.J. Jamieson. 1997. Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 23: 203-10.
- Storz, G. and J.A. Imlay. 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2: 188-94.

- Takeuchi, T., K. Miyahara, D. Hirata, and T. Miyakawa. 1997. Mutational analysis of Yap1 protein, an AP-1-like transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 416: 339-43.
- Toda, T., M. Shimanuki, Y. Saka, H. Yamano, Y. Adachi, M. Shirakawa, Y. Kyogoku, and M. Yanagida. 1992. Fission yeast pap1-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, crm1. *Mol Cell Biol* 12: 5474-84.
- Toda, T., M. Shimanuki, and M. Yanagida. 1991. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* 5: 60-73.
- Toone, W.M., S. Kuge, M. Samuels, B.A. Morgan, T. Toda, and N. Jones. 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev* 12: 1453-63.
- Turi, T.G., P. Webster, and J.K. Rose. 1994. Brefeldin A sensitivity and resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. Isolation of multiple genes conferring resistance. *J Biol Chem* 269: 24229-36.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-44.
- Ueno, M., H. Masutani, R.J. Arai, A. Yamauchi, K. Hirota, T. Sakai, T. Inamoto, Y. Yamaoka, J. Yodoi, and T. Nikaido. 1999. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 274: 35809-15.
- Ursini, F., M. Maiorino, R. Brigelius-Flohe, K.D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg, and L. Flohe. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252: 38-53.
- Varghese, S., Y. Tang, and J.A. Imlay. 2003. Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *J Bacteriol* 185: 221-30.
- Veal, E.A., V.J. Findlay, A.M. Day, S.M. Bozonet, J.M. Evans, J. Quinn, and B.A. Morgan. 2004. A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol Cell* 15: 129-39.
- Vido, K., D. Spector, G. Lagniel, S. Lopez, M.B. Toledano, and J. Labarre. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276: 8469-74.
- Vignais, P.V. 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59: 1428-59.

- Vivancos, A.P., E.A. Castillo, B. Biteau, C. Nicot, J. Ayte, M.B. Toledano, and E. Hidalgo. 2005. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8875-80.
- Vivancos, A.P., E.A. Castillo, N. Jones, J. Ayte, and E. Hidalgo. 2004. Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol* 52: 1427-35.
- Vlami-Gardikas, A. and A. Holmgren. 2002. Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzymol* 347: 286-96.
- Wagner, E.F. 2001. AP-1--Introductory remarks. *Oncogene* 20: 2334-5.
- Wakabayashi, N., A.T. Dinkova-Kostova, W.D. Holtzclaw, M.I. Kang, A. Kobayashi, M. Yamamoto, T.W. Kensler, and P. Talalay. 2004. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2040-5.
- Wang, X., C.H. McGowan, M. Zhao, L. He, J.S. Downey, C. Fearn, Y. Wang, S. Huang, and J. Han. 2000. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 20: 4543-52.
- Wemmie, J.A., A.L. Wu, K.D. Harshman, C.S. Parker, and W.S. Moye-Rowley. 1994. Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem* 269: 14690-7.
- Westwater, J., N.F. McLaren, U.H. Dormer, and D.J. Jamieson. 2002. The adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to mercury exposure. *Yeast* 19: 233-9.
- Wiatrowski, H.A. and M. Carlson. 2003. Yap1 accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2: 19-26.
- Woo, H.A., W. Jeong, T.S. Chang, K.J. Park, S.J. Park, J.S. Yang, and S.G. Rhee. 2005. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J Biol Chem* 280: 3125-8.
- Woo, H.A., S.W. Kang, H.K. Kim, K.S. Yang, H.Z. Chae, and S.G. Rhee. 2003. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J Biol Chem* 278: 47361-4.
- Wood, M.J., E.C. Andrade, and G. Storz. 2003a. The redox domain of the Yap1p transcription factor contains two disulfide bonds. *Biochemistry* 42: 11982-91.

- Wood, M.J., G. Storz, and N. Tjandra. 2004. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* 430: 917-21.
- Wood, V. *et al.* 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871-80.
- Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus. 2003b. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300: 650-3.
- Wu, A., J.A. Wemmie, N.P. Edgington, M. Goebel, J.L. Guevara, and W.S. Moye-Rowley. 1993. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem* 268: 18850-8.
- Wu, D., S.N. Meydani, J. Sastre, M. Hayek, and M. Meydani. 1994. In vitro glutathione supplementation enhances interleukin-2 production and mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from young and old subjects. *J Nutr* 124: 655-63.
- Wu, J., W.R. Dunham, and B. Weiss. 1995. Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 10323-7.
- Yan, C., L.H. Lee, and L.I. Davis. 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J* 17: 7416-29.
- Yang, K.S., S.W. Kang, H.A. Woo, S.C. Hwang, H.Z. Chae, K. Kim, and S.G. Rhee. 2002. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem* 277: 38029-36.
- Zhang, D.D., S.C. Lo, J.V. Cross, D.J. Templeton, and M. Hannink. 2004. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* 24: 10941-53.
- Zhang, G. and S. Ghosh. 2001. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107: 13-9.
- Zhang, X., M. De Micheli, S.T. Coleman, D. Sanglard, and W.S. Moye-Rowley. 2000. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol Microbiol* 36: 618-29.
- Zhang, Y., O. Marcillat, C. Giulivi, L. Ernster, and K.J. Davies. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 265: 16330-6.

- Zheng, M., F. Aslund, and G. Storz. 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279: 1718-21.
- Zheng, M., B. Doan, T.D. Schneider, and G. Storz. 1999. OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* 181: 4639-43.
- Ziegler, D.M. 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 54: 305-29.