

UNIVERSITAT DE LLEIDA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES



GLUTATION TRANSFERASAS
DE CLASE OMEGA
EN *Saccharomyces cerevisiae*: ESTUDIO
BIOQUÍMICO Y FUNCIONAL

Memoria para optar al Grado de Doctor por
la Universitat de Lleida presentada por
LINA PATRICIA BARRETO PARRA

Lleida, noviembre de 2006

El Director de la Tesis

Dr. Enrique Herrero Perpiñan

A

Mi familia

Adriana Esteves

Catalina

Y Toni

AGRADECIMIENTOS

No sé si alguien podrá llegar a imaginarse la importancia sentimental que tiene esta memoria, no solo para mí, también para los míos, sobre todo para quienes me han apoyado tanto a lo largo de mis estudios y en esta etapa de mi vida en particular. Esta memoria existe gracias al Dr. Enric Herrero, quien me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio y ha tenido una organización ejemplar y admirable para llevar todo este trabajo a término. Tengo mucho que agradecerle...desde su paciencia hasta la respuesta inmediata a todos los correos electrónicos que recibió de mi parte antes de venir al laboratorio. También por ir a buscarme al aeropuerto el día que llegué por primera vez a Barcelona, por llevarme a ver por primera vez la nieve y a esquiar. También por aguantar mis risas escandalosas (cosa que ya he aprendido a moderar...) durante estos cuatro estupendos años. Son detalles para mí muy importantes que tendré presentes y le agradeceré toda mi vida.

Esta aventura empezó con los libros de biología de mi madre, los que siempre me llenaron de curiosidad sobre la belleza de lo que llamamos "vida", junto con las ganas de conocer más allá de lo que se puede ver. Siempre me he sentido enormemente afortunada por haber podido estudiar y he sido conciente toda mi vida del esfuerzo que eso representó para mis padres. Para mí también representó sumarle un tanto de voluntad, además que con mucho esfuerzo, mucha dedicación y determinación procuré no tener malas notas a pesar de no ser de los brillantes de la carrera. Todo porque siempre quise aprender cada día más, porque quería ser independiente y porque siempre quise corresponder a sus esfuerzos intentando llenar las expectativas que pusieron en mí. Esta es la demostración del amor y el agradecimiento infinitos que tengo hacia ellos dos. El aspecto más duro de cumplir los sueños es que de alguna manera se tiene que sacrificar algo para hacerlos realidad y en mi caso me separé de mi familia para realizar los míos. Felizmente todo se vio compensado con amigos y encontrando el amor incondicional. A ellos, mis padres, les agradezco ese esfuerzo que han hecho por darme una buena educación, no solo en conocimientos, también unas buenas bases morales y éticas, aspectos personales que me han abierto las puertas en muchos lugares y gracias a ello también he recibido el afecto, el amor y el respeto de muchas personas a lo largo de mi vida. A mi madre le debo el apoyo que siempre he tenido para lograr lo que me propongo y que cuando todo parecía empeñarse en impedirlo, ella siempre ha estado animándome para que luche y siga adelante sin rendirme. Por eso y

por muchas cosas más te doy gracias, Mami. Mi padre ha sido mi ejemplo de dedicación y esfuerzo. Cuando estaba físicamente cansada de trabajar recordaba los años que trabajó desde muy pronto en la mañana hasta muy tarde en la madrugada y de las noches que trabajábamos juntos con mi madre y mis hermanos para entregar algún pedido en la fábrica, porque la responsabilidad nos podía más que el sueño. A mis hermanos les doy gracias por las risas que siempre me han animado, sobre todo cuando más cansada estaba y no se imaginan lo mucho que las encuentro a faltar. Y Catalina siempre ha sido el motor de mis ilusiones porque de ella recibo la alegría que ilumina mis ojos. Aunque Adriana no está ya con nosotros, a ella le doy gracias por enseñarme la fuerza y la generosidad del amor y por tener siempre esperanza en que yo podría venir a España a estudiar lo que más me gustaba. A mis tías Blanca y Judith les agradezco las bufandas y los gorritos hechos con tanto cariño y que me pongo cada invierno...son un apoyo continuo para superar lo que menos me gusta: el frío.

Y que decir de mis amigos...

Con Madelaine y Patricia siempre nos hemos apoyado en todo lo que hemos decidido durante la universidad y también en nuestra vida actual. Para ellas mi eterna gratitud por ser las mejores amigas del mundo y que a pesar de los 13.000 kilómetros que nos separan, sigo sintiéndolas tan cercanas como cuando estudiábamos en mi casa. A Inma también le agradezco muchísimo por ayudarme tanto en momentos tan difíciles y también por pasar conmigo momentos tan agradables en muchas ocasiones. Valoro enormemente la amistad incondicional que siempre me ha ofrecido y espero poder corresponderle enteramente a tanto aprecio. A mi Garceritas, mi Anita favorita le tengo un aprecio gigante porque también me ha ayudado mucho y ha tenido detalles que son muy importantes para mí, además de las risas, las cenas y los buenos ratos que hemos compartido. Me alegra tener como compeñera de laboratorio a una personita tan especial y con la que he trabajado muy a gusto. He tenido el honor de publicar con ella un par de artículos y me siento muy orgullosa de ello. Alicia, mi "champi" querida, ¡que buenos ratos hemos pasado! y es que las risas son la sal de la vida, ¿a que si? Es muy divertido trabajar contigo y gracias por tener un sentido del humor tan especial. De Lidia tengo los mejores consejos, su intuición, su manera estupenda de ver la vida y que cuando sea grande ¡quiero ser como tú! También tengo muy presente a SuperNeus Colomina y a Micala, mi Miky, con quienes he tenido conversaciones filosóficas

interesantísimas que me han servido para reflexionar sobre algunas cosas que aparentemente eran triviales, charlas que echaré mucho en falta.

Y al final de este camino tengo el apoyo de un hombre estupendo que ha decidido compartir su vida conmigo y empezar una vida nueva. Estos últimos meses tu apoyo ha sido fundamental para cerrar este capítulo de mi vida que tanto he esperado y me alegra que mi Toni esté a mi ladito para celebrar este momento tan especial. Amor mío, eres la razón para seguir luchando y ojalá pueda corresponderte con todo lo que tengo, con todo lo que te mereces. Tu amor ha sido siempre incondicional, estás dispuesto a ir y volver tan lejos como sea necesario con tal de seguir juntos y yo tengo el mismo sentimiento hacia ti. Tu paciencia y tu empeño hacen que me sienta afortunada y bendecida por tenerte...por eso le doy gracias a Dios cada día por haberme puesto en tu camino. Gracias amor mío por estar allí siempre para escucharme, animarme y apoyarme en todo lo que viene ahora... por ser el compañero incondicional del que me siento muy orgullosa, al que amo con locura y a quien quiero hacer inmensamente feliz.

RESÚMEN

Saccharomyces cerevisiae posee dos glutatión transferasas (GST) denominadas Gtt1 y Gtt2 con capacidad de conjugar una molécula de glutatión con el sustrato estándar CDNB. Estas dos enzimas no son clasificables dentro de las clases convencionales descritas con base en la estructura de las GST de eucariotas superiores, aunque guardan cierta similitud estructural con las de clase Zeta. En esta memoria se describe la caracterización de tres GST de clase Omega en *S. cerevisiae* denominadas Gto1, Gto2 y Gto3, codificadas por las ORF *YGR154c*, *YKR076w* y *YMR251w*. Las enzimas de esta clase no tienen actividad sobre CDNB, pero son activas como tiol oxidoreductasa y poseen actividad dehidroascorbato reductasa y dimetilarsenato reductasa. La primera de ellas, Gto1, es peroxisomal y posee una señal de localización de tipo PTS1 en la región C-terminal. Dicha señal es reconocida por el transportador peroxisomal Pex5, que facilita su internalización en este organelo. Por otra parte, Gto2 y Gto3 tienen localización citoplásmica. Los genes *GTO* de *S. cerevisiae* se inducen por estrés oxidativo pero con patrones distintos para los tres genes. La dependencia de esta expresión de los factores de transcripción Yap1, Msn2 y Msn4 se relaciona con la presencia de secuencias YRE y STRE en los promotores de dichos genes. El mutante $\Delta gto1$ es sensible al agente oxidante diamida y tiene una concentración intracelular de glutatión menor que la cepa silvestre. Este fenotipo se relaciona con que el triple mutante $\Delta gtt1 \Delta gtt2 \Delta gto1$ sea sensible al cadmio, indicando que las tres GST Gtt1, Gtt2 y Gto1 intervienen en la detoxificación de este metal. Otro fenotipo relevante es la dificultad del mutante $\Delta gto1$ para crecer en medios con ácido oleico como única fuente de carbono, indicando que las funciones peroxisomales en dicho mutante están afectadas. La ausencia de *GTO1* en *S. cerevisiae* causa así mismo el descenso en la expresión de varios genes involucrados en la vía de síntesis de cisteína y metionina. Como consecuencia, el mutante $\Delta gto1$ crece con dificultad en ausencia de treonina, serina o lisina. La ausencia de Gto1 en *S. cerevisiae* impide que utilice eficientemente la cisteína o la cistationina como únicas fuentes de azufre, manifestando defectos en la transulfuración, proceso que permite la síntesis de metionina a partir de cisteína. Ello sugiere que Gto1 podría estar regulando la actividad cistationina β -liasa de Str3 mediante su actividad tiol oxidoreductasa, dado que Str3 también es peroxisomal. Dado que la cisteína 387 de Str3 es importante para su actividad biológica y está conservada en las cistationina β -liasas de otras especies de hongos, este residuo podría ser diana de Gto1 para la regulación del estado redox de la proteína Str3.

RESÚMEN

Saccharomyces cerevisiae posseeix dues glutatió transferases (GST) anomenades Gtt1 i Gtt2, amb capacitat de conjugar una molècula de glutatió amb el substrat estàndar CDNB. Aquests dos enzims no són classificables dins de les classes convencionals descrites en base a l'estructura de les GST d'eucariotes superiors, encara que guarden certa similitud estructural amb els membres de la classe Zeta. En aquesta memòria es descriu la caracterització de tres GST de classe Omega en *S. cerevisiae* anomenades Gto1, Gto2 i Gto3, codificades respectivament per les ORFs *YGR154c*, *YKR076w* i *YMR251w*. Els enzims d'aquesta classe no tenen activitat sobre CDNB, però són actives com tiol oxidoreductases i posseeixen activitat dehidroascorbat reductasa i dimetilarsenat reductasa. La primera d'elles, Gto1, és peroxisomal i posseeix un senyal de localització de tipus PTS1 en la regió C-terminal. Aquest senyal és reconeguda pel transportador peroxisomal Pex5, que facilita la seva internalització en aquest organul. D'altra banda, Gto2 i Gto3 tenen localització citoplàsmica. Els gens *GTO* de *S. cerevisiae* s'indueixen per estrès oxidatiu però amb patrons distints per als tres gens. La dependència d'aquesta expressió dels factors de transcripció Yap1, Msn2 i Msn4 es relaciona amb la presència de seqüències YRE i STRE en els promotors dels gens *GTO*. El mutant $\Delta gto1$ és sensible a l'agent oxidant diàmida i té una concentració intracel·lular de glutatió menor que la soca silvestre. Aquest fenotip es relaciona amb que el triple mutant $\Delta gtt2 \Delta gtt1 \Delta gto1$ sigui sensible al cadmi, indicant que les tres GST Gtt1, Gtt2 i Gto1 intervenen en la detoxificació d'aquest metall. Altre fenotip rellevant és la dificultat del mutant $\Delta gto1$ per a créixer en medis de cultiu amb àcid oleic com única font de carboni, indicant que les funcions peroxisomals en el mutant estan afectades. L'absència de *GTO1* en *S. cerevisiae* causa així mateix el descens en l'expressió de gens involucrats en la via de síntesi de cisteïna i metionina. Com a conseqüència, el mutant $\Delta gto1$ creix amb dificultat en absència de treonina, serina o lisina. La manca de *GTO1* en *S. cerevisiae* impedeix que utilitzi eficientment la cisteïna o la cistationina com úniques fonts de sofre, manifestant defectes en la transulfuració, procés que permet la síntesi de metionina a partir de cisteïna. Això suggereix que Gto1 podria estar regulant l'activitat de cistationina β -liasa de Str3 mitjançant la seva activitat tiol oxidoreductasa, atès que Str3 també és peroxisomal. Atès que la cisteïna 387 de Str3 és important per a la seva activitat biològica i està conservada en les cistationina β -liasas d'altres espècies de fongs, aquest residu podria ser diana de Gto1 per a la regulació de l'estat redox de la proteïna Str3.

SUMMARY

Saccharomyces cerevisiae contains two glutathion transferases (GST) named Gtt1 and Gtt2, which are enzymes with glutathione conjugating activity with the standard substrate CDNB. These two enzymes are not classified into the conventional classes that have been established based on the structure of mammalian GST, although they keep certain structural similarity with Zeta class members. In this report, we describe the characterization of three *S. cerevisiae* Omega class GST named Gto1, Gto2 and Gto3, coded by ORFs *YGR154c*, *YKR076w* and *YMR251w*, respectively. The enzymes of this class do not exhibit activity with CDNB but they are active as thiol oxidoreductases, dehydroascorbate reductases and dimethylarsenate reductases. The first of them, Gto1, is located at the peroxisome and is targeted to this organelle through a C-terminal PTS1-type sequence. This sequence is recognized by the peroxisomal transporter Pex5 that facilitates peroxisomal import. On the other hand, Gto2 and Gto3 are at the cytosol. The *GTO* genes of *S. cerevisiae* are induced by oxidative stress, although the expression patterns are different for the three genes. The expression of *GTO* genes depends on Yap1, Msn2 and Msn4 transcription factors and correlates with the presence of YRE and STRE sequences in the promoters of these genes. The absence of *GTO1* causes a hypersensitivity to the oxidant diamide in *S. cerevisiae* and reduces the intracellular concentration of glutathione, compared with the wild type strain. This phenotype is related to cadmium sensitivity of the $\Delta gtt1 \Delta gtt2 \Delta gto1$ triple mutant, indicating that Gtt1, Gtt2 and Gto1 participate in the response to cadmium toxicity. Another relevant phenotype of *S. cerevisiae* cells lacking *GTO1* is the growth defect with oleic acid as the sole carbon source, indicating that the peroxisome functions are affected in the mutant. This mutant also grows deficiently in the absence of threonine, serine or lysine in the growth medium. Lack of *GTO1* function also affects negatively the expression of several genes involved in methionine and cysteine synthesis. As a consequence, the $\Delta gto1$ mutant shows defective growth in a medium with cysteine or methionine as the sole sulfur source as a consequence of defective transsulfuration, a process that allows methionine synthesis from cysteine. This suggests that Gto1 could regulate the cystathionine β -lyase activity of Str3 through its thiol oxidoreductase activity, since Str3 is also peroxisomal. As the cysteine 387 residue of Str3 is important for the biological activity of this protein and is conserved in fungal species, this residue could be a target of Gto1 for the regulation of the redox state of Str3.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. COMPUESTOS XENOBIÓTICOS Y SU CONVERSIÓN ENZIMÁTICA	3
1.2. ESTRUCTURA Y EZIMOLOGÍA DE LAS GLUTATIÓN TRANSFERASAS (GST)	6
1.2.1. ESTRUCTURA BÁSICA	6
1.2.2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA	9
1.2.2.1. SUPERFAMILIAS DE GST	9
1.2.2.2. CLASES DE GST.....	10
1.2.3. MECANISMO CATALITICO DE LA REACCIÓN	19
1.2.3.1. ACTIVACIÓN DEL GSH	20
1.2.3.2. ESPECIFICIDAD SOBRE SUSTRATOS ELECTROFÍLICOS...	23
1.2.4. LAS GST COMO GLUTATIÓN PEROXIDASAS	23
1.3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS GST	27
1.4. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS GST	27
1.5. GLUTATIÓN TRANSFERASAS A LO LARGO DE LA ESCALA EVOLUTIVA	32
1.5.1. GST BACTERIANAS	32
1.5.2. GST EN PLANTAS	34
1.5.4. GST EN INSECTOS	35
1.5.5. GST EN PARÁSITOS	37
1.6. GST EN HONGOS	40
1.6.1. DIVERSIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL	40
1.6.2. LAS PROTEÍNAS Gtt EN <i>S. cerevisiae</i>	42
1.7. RELACIÓN DE LAS GST CON LAS GLUTAREDOXINAS	44
1.7.1. RELACIONES ESTRUCTURALES	46
1.7.2. RELACIONES FUNCIONALES EN <i>S.cerevisiae</i>	48
1.8. LAS GST Y SU RELACIÓN CON LOS PEROXISOMAS	49
1.8.1. FUNCIONES DE LOS PEROXISOMAS	50
1.8.2. INTERNALIZACIÓN DE PROTEÍNAS PEROXISOMALES	52
1.8.3. LAS SEÑALES TIPO PTS1 Y SU SISTEMA DE INTERNALIZACIÓN ...	52
1.9. LA SÍNTESIS DE CISTEÍNA Y METIONINA EN <i>S. cerevisiae</i>	55
1.9.1. ASIMILACIÓN DEL AZUFRE	56
1.9.2. SÍNTESIS DE LA METIONINA	59
1.9.3. LA TRANSULFURACIÓN Y LA SÍNTESIS DE CISTEÍNA	61

1.9.4. REGULACIÓN DE LA RUTA	62
1.9.4.1. EL COMPLEJO Cbf1-Met4-Met28	63
1.9.4.2. LOS REGULADORES Met31 y Met32.....	68
2. OBJETIVOS	71
3. MATERIALES Y MÉTODOS	76
3.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	77
3.1.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	77
3.1.2. CEPAS DE <i>E. coli</i>	78
3.2. PLÁSMIDOS.....	78
3.3. MEDIOS DE CULTIVO	80
3.4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	82
3.5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	82
3.5.1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE <i>S. cerevisiae</i>	82
3.5.2. TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE	83
3.5.3. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES NULOS SIMPLES Y MÚLTIPLES DE <i>S. cerevisiae</i>	84
3.5.4. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Gto RECOMBINANTES.....	85
3.5.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN <i>S. cerevisiae</i> POR DIG NORTHERN.....	86
3.5.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA UTILIZANDO MICROORDENAMIENTOS DE DNA	91
3.5.7 AISLAMIENTO Y SUBFRACCIONAMIENTO DE MITOCONDRIAS A PARTIR DE CÉLULAS DE <i>S. cerevisiae</i>	94
3.6. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	94
3.6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE GLUTATIÓN OXIDADO Y REDUCIDO.....	94
3.6.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	95
3.7. LOCALIZACIÓN MICROSCÓPICA DE PROTEÍNAS MARCADAS CON GFP. 96	
3.8. ANÁLISIS <i>In silico</i>	96
4. RESULTADOS	97
4.1. EL GENOMA DE <i>S. cerevisiae</i> CONTIENE TRES ORF QUE CODIFICAN PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A LAS GST DE CLASE OMEGA.....	99
4.2. HOMÓLOGOS DE LOS GENES GTO EN OTROS MICROORGANISMOS..	100
4.3. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS <i>In vitro</i> E <i>In vivo</i> DE LAS PROTEÍNAS Gto103	
4.3.1. PURIFICACIÓN Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS IN VITRO DE LAS PROTEÍNAS Gto1, Gto2, Gto3 Y Gtt1	103
4.3.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS IN VIVO DE Gto1, Gto2, Gto3	107

4.3.3. LA ACTIVIDAD GLUTAREDOXINA DE Gto2 REQUIERE DEL RESÍDUO CISTEÍNA EN POSICIÓN 46	108
4.4. Gto1 SE LOCALIZA EN EL PEROXISOMA, MIENTRAS QUE Gto2 Y Gto3 ESTÁN EN EL CITOPLASMA.....	109
4.5. EXPRESIÓN DE LOS GENES GTO EN CONDICIONES OXIDANTES.....	112
4.6. DEFECTOS FENOTÍPICOS DE LOS MUTANTES QUE CARECEN DE LOS GENES GTO Y GTT EN <i>S. cerevisiae</i>	116
4.7. LA FUNCIÓN DE Gto1 Y LAS Gtt TIENEN UN EFECTO ADITIVO EN LA PROTECCIÓN FRENTE A LA TOXICIDAD DEL CADMIO.....	118
4.8. EL MUTANTE $\Delta gto1$ NO CRECE NORMALMENTE EN MEDIO CON ÁCIDO OLÉICO	119
4.9. LA MUTACIÓN DE GTO1 EN <i>S. cerevisiae</i> AFECTA EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS QUE CONTIENEN AZUFRE.....	120
4.10. RELACIÓN ENTRE EL FUNCIONAMIENTO DE LOS PEROXISOMAS Y LA VÍA DE ASIMILACIÓN DEL AZUFRE EN <i>S. cerevisiae</i>	125
5. DISCUSIÓN	131
6. CONCLUSIONES	141
7. ABREVIATURAS	145
8. BIBLIOGRAFÍA	149
9. APÉNDICE	
ARTÍCULO 1	
ARTÍCULO 2	

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

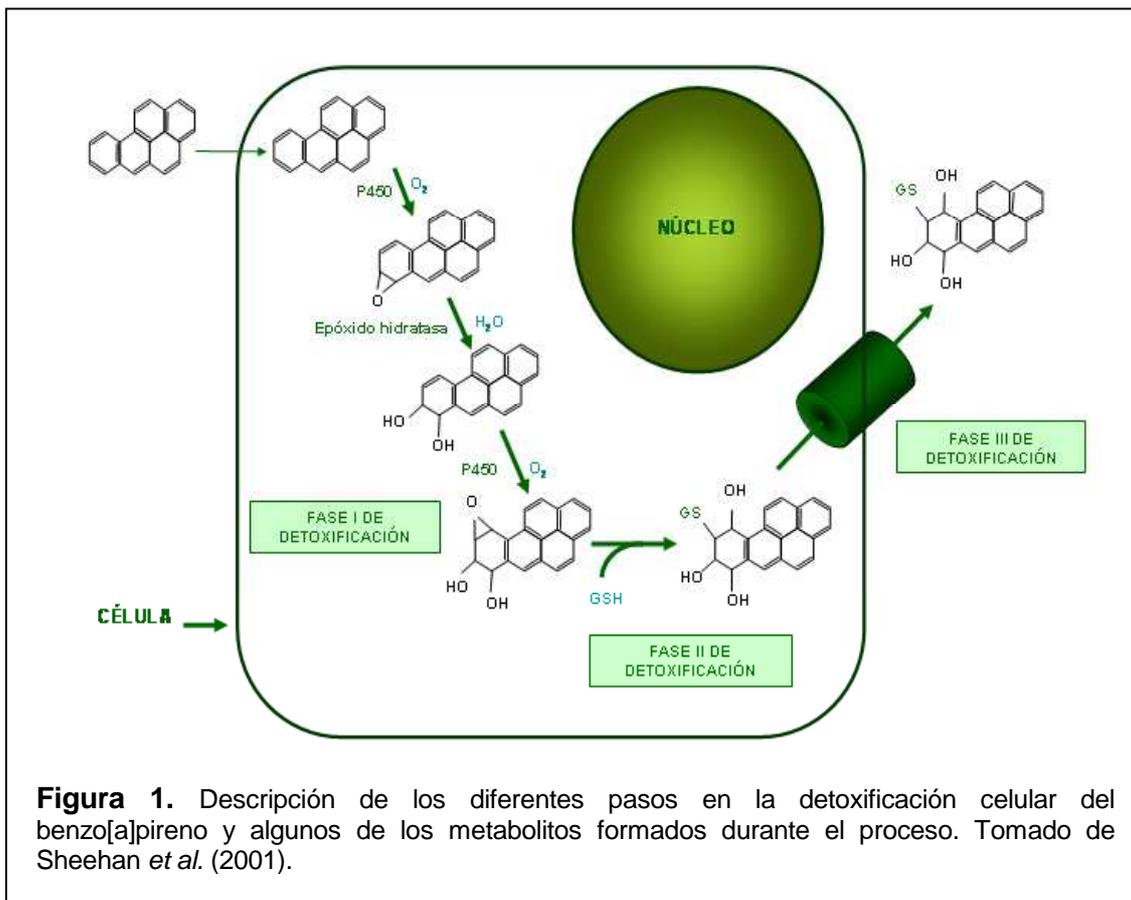
1.1. COMPUESTOS XENOBIÓTICOS Y SU CONVERSIÓN ENZIMÁTICA

Los xenobióticos son compuestos de origen no biológico, producto de las actividades humanas y de descomposición lenta. Entre ellos encontramos los fungicidas, insecticidas, fármacos, carcinógenos, y agentes mutagénicos. Los seres vivos se exponen continuamente a compuestos xenobióticos que pueden interactuar de manera deletérea con el organismo, causando efectos tóxicos y, en algunos casos, carcinogénicos. Aunque la cantidad de estos xenobióticos ha aumentado en los dos últimos siglos, los compuestos tóxicos existen desde hace tanto tiempo como la vida misma. Así, existen compuestos tóxicos naturales como los fenoles y alcaloides que producen algunas plantas, las aflatoxinas de los hongos, las especies reactivas de oxígeno originadas por el propio metabolismo aerobio, y productos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal (4-HNE).

Las habilidades que tienen los organismos para sobrevivir a estas amenazas químicas posiblemente representan una adaptación biológica fundamental para permanecer en la naturaleza. Las células poseen un gran conjunto de enzimas capaces de transformar una amplia variedad de compuestos con diferentes estructuras químicas y funciones, reduciendo o eliminando su toxicidad. Entre estas habilidades se encuentran una serie de procesos que permiten inactivar o expulsar dichos compuestos tóxicos, entre los cuales se pueden mencionar la unión con compuestos intracelulares y la detoxificación enzimática.

La detoxificación enzimática de xenobióticos sucede en tres fases principales que funcionan de manera integrada (Sheehan *et al.*, 2001). Las fases I y II involucran la conversión de los xenobióticos hidrofóbicos o no polares en compuestos más solubles en agua y así menos tóxicos para el organismo. En la fase III el compuesto, que ahora es más soluble, puede ser eliminado fácilmente del citoplasma celular (Figura 1).

La fase I es catalizada principalmente por el sistema del citocromo P450. Esta familia de proteínas microsomales es responsable de un gran conjunto de reacciones, que implican procesos de oxidación, reducción o hidrólisis. Estas reacciones tienen como fin la introducción de un grupo funcional, lo cual se conoce como activación. De las reacciones de activación, la oxidación aparece como una de las más importantes.



Las enzimas de la fase II catalizan la conjugación de los xenobióticos activados con sustratos endógenos solubles como glutatión reducido (L- γ -glutamil-L-cystenil-glicina o GSH), ácido glucorónico-UDP, sulfato, glucosa o glicina. Dado que la concentración intracelular del glutatión es alta (hasta 10mM), muchos de los compuestos xenobióticos tienen el potencial de reaccionar espontáneamente con el grupo SH del GSH. Sin embargo, el proceso de formación de conjugados con GSH (GS-X) es mucho más eficiente cuando intervienen las glutatión transferasas o GST. Estas reacciones de conjugación incrementan el peso molecular y la solubilidad de los compuestos tóxicos y, además, dan carga negativa a la molécula. La conjugación con GSH tiene una importancia particular porque los sustratos de esta reacción frecuentemente son compuestos altamente electrofílicos y la unión de GSH evita que puedan unirse covalentemente a macromoléculas intracelulares. Este paso tiene como fin la neutralización de los sitios electrofílicos y que los compuestos tóxicos sean más solubles. Cuantitativamente, la conjugación con GSH, la cual es catalizada por las GST, es la principal reacción de la fase II en muchas especies. Aunque es difícil causar una reducción intracelular de GSH, cuando esta reducción ocurre, posteriormente se genera

un efecto tóxico dentro de la célula. Los compuestos glutationilados son metabolizados a través del corte de los residuos de glutamato y glicina, seguido de una acetilación del grupo amino del residuo cisteinil resultante para producir finalmente ácidos mercaptúricos, como los derivados S-alquilados de la N-acetilcisteína. Todos estos cambios causan que los productos de la fase II de la detoxificación tengan una permeabilidad muy baja a través de las membranas y que no puedan difundir pasivamente fuera de la célula.

El siguiente paso en la detoxificación celular es la fase III, en la cual se expulsan del citoplasma dichos compuestos glutationilados generados en las dos fases anteriores. Para ello la célula cuenta con una serie de proteínas encargadas de enviar los compuestos glutationilados fuera del citosol. En el caso de las células animales, sus membranas contienen una serie de transportadores entre los cuales se han descrito los transportadores multiespecíficos de aniones inorgánicos o MOAT (de "Multiespecific Organic Anion Transporter") (Heijn *et al.*, 1992), la dinitrofenol S-GSH ATPasa (Dnp-SG ATPasa) (Saxena *et al.*, 1992), la proteína de membrana MRP1 (de "Multidrug Resistance-associated Protein") (Cole *et al.*, 1992), la glicoproteína-P (Gottesman y Pastan, 1993) y la CFTR (de "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulador protein") (Welsh *et al.*, 1992).

En el caso de las levaduras, se han descrito dos bombas de expulsión: la bomba GS-X dependiente de ATP, Ycf1 (Ishikawa, 1992), y el transportador Bpt1 (Sharma *et al.*, 2002). Ambas son homólogas a las proteínas transportadoras MRP1 (Cole *et al.*, 1992) y CFTR (Szczyпка *et al.*, 1994) de humanos, y están localizadas en la membrana de la vacuola.

En los humanos, el hígado es el principal órgano en el que se lleva a cabo el metabolismo de compuestos químicos externos como los fármacos, compuestos tóxicos y carcinógenos. En las células hepáticas suceden los procesos de detoxificación celular que culminan con la excreción de los compuestos glutationilados a través de la bilis o al torrente sanguíneo. Finalmente los compuestos metabolizados son expulsados del cuerpo por las heces o la orina en forma de ácidos mercaptúricos. Durante varias décadas hubo una gran especulación acerca del origen de la cisteína usada para la biosíntesis de los ácidos mercaptúricos y una serie de experimentos con extractos celulares de hígado de rata y conejo dieron pistas muy importantes acerca del origen de la cisteína asociada a estos metabolitos.

En 1.959 se determinó que extractos celulares de hígado de conejo eran capaces de transformar el *p*-(clorobencil)-cloruro en *p*-(clorobencil)-glutati6n y la formaci6n posterior del 6cido mercapt6rico correspondiente se comprob6 tanto *in vivo* como *in vitro* (Bray *et al.*, 1959b; 1959a). En 1.961 se describi6 por primera vez la purificaci6n parcial y algunas propiedades de ciertas enzimas hep6ticas de rata que facilitaban la formaci6n de derivados glutationilados de varios compuestos como el 3,4-diclorobenceno y el sulfobromoftale6na s6dica (Booth, 1961; Combes y Stakelum, 1961; Al-Kassab *et al.*, 1963). En ambos casos se demostr6 la sustituci6n del ion cloruro y bromuro respectivamente por una mol6cula de GSH. Para ese momento, el nombre de las enzimas que catalizaban la reacci6n de sustituci6n del i6n electrof6lico en estos compuestos era glutationasas o glutatioquinasas. Posteriormente, en 1.963 se determin6 que estas enzimas, adem6s de sustituir iones halogenados de compuestos benc6nicos, tambi6n eran capaces de desplazar el grupo nitrato del compuesto policloronitrobenceno sustituy6ndolo por una mol6cula de GSH (Al-Kassab *et al.*, 1963).

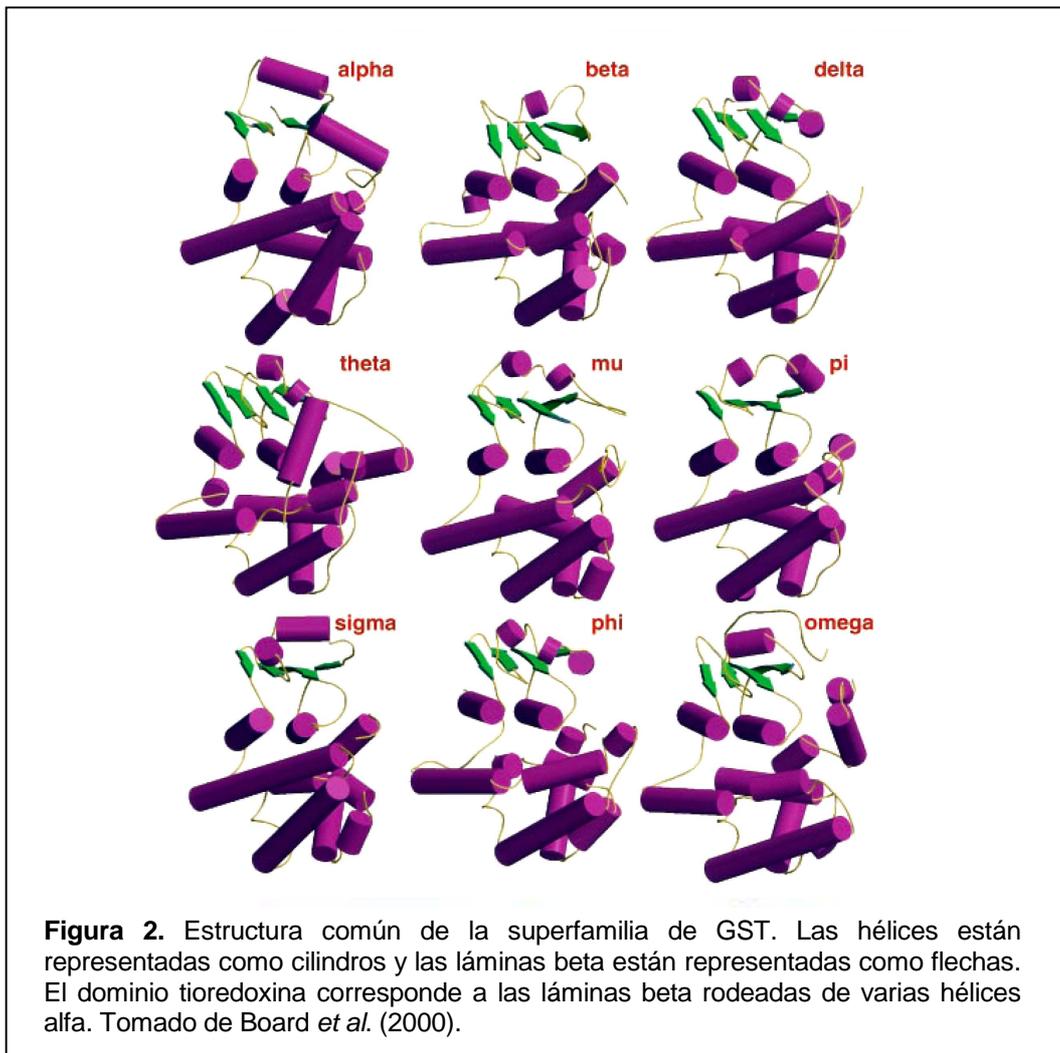
Todos estos estudios incitaron el inter6s sobre las GST, como se les conoce actualmente, que culminaron con an6lisis gen6ticos y enzimol6gicos junto con la determinaci6n de las estructuras tridimensionales de muchas de ellas. Actualmente, se considera a las GST como una superfamilia de prote6nas que catalizan el ataque nucleof6lico del 6tomo de azufre de la mol6cula de GSH sobre compuestos electrof6licos end6genos o ex6genos participando en la fase II del proceso de detoxificaci6n celular. Diversas revisiones (Pickett y Lu, 1989; Armstrong, 1997; Hayes *et al.*, 2005; Oakley, 2005) ampli6n la visi6n actual de esta superfamilia de enzimas.

1.2. ESTRUCTURA Y EZIMOLOGÍA DE LAS GLUTATI6N TRANSFERASAS (GST)

1.2.1. ESTRUCTURA B6SICA

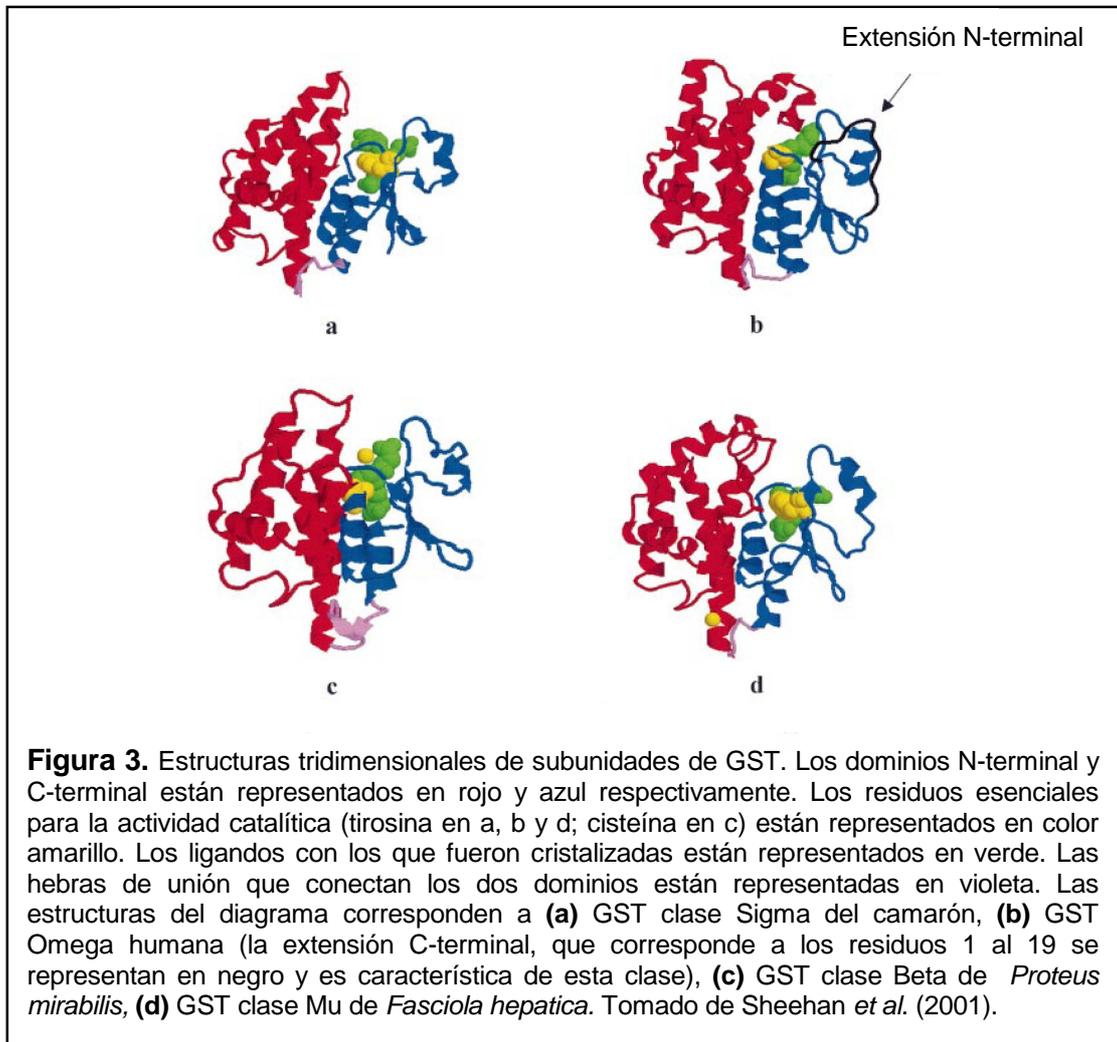
La estructura b6sica de las GST consiste en dos dominios, N y C-terminal. El dominio N-terminal tiene un plegamiento caracter6stico de la superfamilia tioredoxina (Martin, 1995), la cual incluye tambi6n como miembros a las tioredoxinas, glutaredoxinas, disulfuro isomerasas y glutati6n peroxidasas. El dominio N-terminal constituye alrededor de la tercera parte de la prote6na y consiste en una estructura β - α - β - α - β - β - α . El centro del dominio est6 compuesto de tres l6minas beta situadas entre h6lices alfa ($\alpha/\beta/\alpha$) (Figura 2). El dominio C-terminal compone los otros dos tercios

de la proteína y está constituido por varias hélices alfa. El centro del dominio consiste en la agrupación de cuatro de estas hélices (Figuras 2 y 3).



La principal función del dominio N-terminal es proporcionar el sitio de unión del GSH, el cual se localiza al final de una lámina beta, interaccionando la molécula de GSH con la proteína a través de uniones electrostáticas y puentes de hidrógeno. En el caso del sustrato, este se coloca dentro de una hendidura generada por los dos dominios N y C-terminal y realiza una serie de contactos con los residuos del dominio C-terminal, especialmente entre la hélice α_4 y el extremo final. Por lo tanto, la función del dominio C-terminal es proporcionar los elementos estructurales para el reconocimiento del sustrato y ayudar a definir la selectividad de cada tipo de GST hacia el sustrato. Otro aspecto común entre las GST es el asa que conecta a la hélice α_2 y la lámina β_3 ; esta asa contiene una prolina en conformación cis y se la conoce como el asa cis-Pro. Aunque el

asa no juega un papel directo en la actividad catalítica, es importante para mantener la proteína con una estructura adecuada para su actividad.



Respecto de la estructura cuaternaria, las GST suelen formar dímeros en los que existe una simetría C_2 , y las principales interacciones entre las subunidades suceden entre el dominio N-terminal de una subunidad con la C-terminal de la otra. No se ha descrito actividad catalítica de los monómeros de GST de mamíferos y estudios de desnaturalización proteica sugieren que el proceso ocurre en dos etapas, lo que pone en evidencia que la conformación de la estructura catalíticamente activa es dimérica (Dirr y Reinemer, 1991; Erhardt y Dirr, 1995). Estas conformaciones diméricas estabilizan la estructura terciaria de cada una de las subunidades y posiblemente la estructura de cada uno de sus dominios. Por el contrario, se han descrito unidades monoméricas activas como GST en *Arabidopsis thaliana*, las cuales componen un grupo especial de GST. Esta superfamilia de GST vegetales utilizan el GSH como co-factor o co-sustrato en su actividad catalítica y tienen una serina o una cisteína en su sitio activo

(Edwards y Dixon, 2005). Por otro lado, se han descrito las proteínas CLIC (de “intracelular Chloride Ion Channels”) que son una familia especial de proteínas solubles o integradas a las membranas citoplasmáticas o de organelos (Oakley, 2005). Estas proteínas tienen el plegamiento típico de las GST pero se encuentran como monómeros, lo que indica que el plegamiento de las GST puede ser estable como unidades independientes. Una secuencia similar al sitio activo de las glutaredoxinas monotiolicas está presente en el dominio N-terminal de las CLIC pero no se ha detectado actividad catalítica en CLIC1 humana. Sin embargo, CLIC2, que es muy similar a CLIC1, tiene una actividad GSH peroxidasa baja y es modulador de la actividad del receptor cardiaco de rianodina 2 (Oakley, 2005).

1.2.2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

1.2.2.1. SUPERFAMILIAS DE GST

La gran variedad de proteínas con actividad GST y su presencia a lo largo de toda la escala evolutiva hace que su clasificación resulte compleja e, incluso, confusa. Existen cuatro superfamilias de GST: canónicas, mitocondriales, microsomales, y fosfomicina/glioxalasa (Oakley, 2005; Pearson, 2005). La superfamilia de las canónicas es la más extensa y a ella pertenecen las enzimas solubles o citosólicas, de estructura dimérica, que están involucradas principalmente, pero no exclusivamente, en la biotransformación de los tóxicos xenobióticos o endobióticos. Las GST citosólicas están divididas a su vez en clases designadas como Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta y Omega. Esta distinción en clases se ha hecho con base en la clasificación de las GST citosólicas de mamíferos. Justo después de descubrir las GST de mamíferos, se describieron las GST vegetales, que se han considerado como una superfamilia compleja, diferenciada y que está compuesta también por un número discreto de clases. A la superfamilia de GST citosólicas se unieron nuevas clases descubiertas en plantas (Phi, Tau, Lambda DHAR y TCHQD) y también se caracterizaron otras isoenzimas que pertenecen a las clases ya descritas en mamíferos (Theta y Zeta). La caracterización y clasificación de esta superfamilia se ha hecho recientemente (Dixon *et al.*, 2002).

La superfamilia de las GST mitocondriales fueron originalmente denominadas como “clase Kappa” por una inferencia errónea en su homología con las citosólicas. Esta homología estaba basada en una similitud parcial entre secuencias de aminoácidos, longitud y estructuras diméricas. De hecho, las proteínas de la “clase

Kappa” de mamíferos no tienen una similitud de secuencia estadísticamente significativa con ninguna de las GST canónicas (Pearson, 2005). En general, las GST mitocondriales comparten una fuerte similitud con la familia de las ácido 2-hidroxicromeno-2-carboxílico isomerasas (HCCI), que son de origen procariota. Estas enzimas están implicadas en el catabolismo del naftaleno (Eaton, 1994) y de compuestos dibencílicos (Di Gregorio *et al.*, 2004). Las diferencias existentes entre las GST citosólicas y las mitocondriales sugieren que ambas tienen un origen evolutivo diferente y que las mitocondriales son más antiguas que las canónicas (Pearson, 2005).

La tercera superfamilia, las microsomales, está compuesta por enzimas de estructura probablemente trimérica que se hallan involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico. A esta superfamilia también se le conoce como MAPEG (de “Membrane-Asociated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism”). Las MAPEG difieren considerablemente en tamaño y estructura de las GST citosólicas y las mitocondriales. Las GST microsomales son cortas comparadas con las citosólicas (150-160 aminoácidos, comparadas con los 210-240 aminoácidos de las citosólicas), y en humanos se han descrito tres GST microsomales: MGST1, MGST2 y MGST3. MGST1 tiene una alta homología con la enzima prostaglandina E sintasa, mientras que MGST2 la tiene con la proteína activadora de la 5-lipoxigenasa y con la leucotrieno C4 sintasa (Bresell *et al.*, 2005).

El conjunto de las GST bacterianas se conoce como la superfamilia de las fosfomicina/glioxalasa e incluye las descritas en los géneros *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Burkholderia* y *Rhodococcus* (Vuilleumier, 1997). Las enzimas de esta superfamilia participan en la resistencia a antibióticos realizando actividades de conjugación de GSH a los mismos, además de ser capaces de unirse a las moléculas de antibiótico directamente.

1.2.2.2. CLASES DE GST

Aunque no existe un criterio claro respecto al grado de similitud en secuencia que permita clasificar a una GST en una clase en particular, en general se acepta que las enzimas de una misma clase comparten al menos un 60% de identidad, habiendo entre clases al menos un 30% de identidad. Para la clasificación se hace énfasis en la estructura primaria del extremo N-terminal ya que, entre clases, esta región tiende a estar relativamente conservada al ser parte del sitio activo. Esta región contiene un

residuo esencial, que puede ser una tirosina, serina o cisteína, que interacciona con el grupo tiol del GSH, reduciendo su pK_a de 9.0 hasta 6-7 (véase apartado 1.2.3.).

Dentro de una clase se agrupan uno o más polipéptidos, los cuales representan tipos únicos de subunidades (Mannervik *et al.*, 2005). Cada clase puede incluir hasta cinco polipéptidos que comparten entre sí una homología muy alta (hasta de un 90%). Sin embargo se ha propuesto un límite de homología alternativo del 50% para los péptidos que pertenecen a las clases de GST de mamíferos (Mannervik *et al.*, 1992). Por otra parte, también se han utilizado técnicas inmunológicas para identificar la expresión de las GST en diferentes tejidos y para determinar la relación inmunológica entre subunidades individuales. Un anticuerpo policlonal contra una clase de GST de una especie en particular puede tener una reacción cruzada con una GST de la misma clase pero de especies diferentes. Por el contrario, una reacción inmunológica cruzada no ocurre entre clases aunque se comparen GST de la misma especie (Hayes y Mantle, 1986).

Las propiedades cinéticas, como especificidad de sustrato y sensibilidades a inhibidores, se pueden usar para distinguir diferentes isoenzimas. Sin embargo, algunos de estos valores se superponen o tienden a ser muy similares entre clases, lo cual no permite que este método se utilice para hacer una distinción definitiva entre las clases de GST. En cambio, esta distinción es posible hacerla tomando como base las secuencias o los análisis inmunológicos. Comparando las GST de mamíferos, las propiedades de actividad enzimática son útiles únicamente cuando la similitud entre las secuencias es baja y generan mejores resultados cuando se llevan a cabo análisis multivariados, es decir, utilizando varios sustratos dentro de un mismo análisis. A pesar de esto, las actividades enzimáticas son un método pobre de clasificación de las GST de mamíferos y no es útil extenderlo hacia la clasificación de GST de otros organismos diferentes como plantas, procariotas o insectos. El 1-cloro-2,4-dinitrobenceno o CDNB era considerado el sustrato universal de las GST pero varias de las clases descritas no son activas frente a este sustrato, como es el caso de la clase Omega. Por consiguiente, no es posible utilizarlo como referencia de clasificación respecto de la actividad enzimática, aunque pueda tenerse en cuenta como una característica particular.

De acuerdo con los criterios descritos anteriormente, las GST de mamíferos se clasifican dentro de las clases Alpha, Kappa, Mu, Pi, Phi, Sigma, Theta, Zeta y Omega. Con base en ellas se ha hecho la clasificación de GST de otros organismos y además

se han descrito clases nuevas como es el caso de las Lambda, Tau y DHAR (de “Active glutathione-dependent DeHidroascorbate Reductases”) que actualmente son exclusivas de plantas. Además, existen otras clases caracterizadas en helmintos, insectos, hongos y bacterias.

Así pues, la nomenclatura de estas enzimas se ha llevado a cabo atendiendo fundamentalmente a las GST humanas citosólicas (Mannervik *et al.*, 1992), lo cual en principio es aplicable para todas las GST de vertebrados y extensible a las de otros organismos. Las GST humanas se han nombrado respecto de la clase en la que pueden estar contenidas (A, M, P, T y O para Alpha, Mu, Pi, Theta y Omega respectivamente), acompañado de la cantidad de subunidades que la componen o el tipo de isoenzima, que se designa con números arábigos. Por ejemplo, un homodímero de tipo Mu se denomina M1-1 y los heterodímeros de tipo Alpha se denominan A1-2. Además, la nomenclatura puede ir acompañada de la especificación de las variaciones alélicas: M1a-1b. Cuando es necesario distinguir GST de diferentes especies biológicas, se agregan prefijos. Por ejemplo mGST A1-1 y rGST A1-1 se refieren a enzimas de la clase Alpha de ratón (mouse GST) y de rata (rat GST) respectivamente. Esta distinción puede ser importante porque no existe una correspondencia estricta entre las subunidades de diferentes especies y permite identificar los ortólogos.

Clase Alpha, Mu y Pi:

Respecto de las características, la interfase entre las subunidades de las clases Alpha, Mu y Pi tienen una conformación hidrofóbica de “esfera-bolsillo”. Esta se establece entre la cadena lateral de la fenilalanina (F52, Alpha; F56, Mu; F47, Pi), que sobresale del asa formada entre la hélice α_2 y la lámina β_3 del dominio N-terminal de un monómero, con el “bolsillo” localizado entre las hélices α_4 y α_5 del dominio N-terminal del otro monómero (Figura 4) (Sheehan *et al.*, 2001). Esta interacción tan particular no se observa en las clases Sigma y Theta, ya que los residuos fenilalanina del asa y el “bolsillo” en donde encajan no existen en ellas. La base estructural para el reconocimiento de las subunidades entre las clases más cercanas (Alpha, Mu, Sigma y Pi) parece estar relacionada con la rotación de ambos dominios en las subunidades que interaccionan. Los dos dominios tienen orientaciones bastante diferentes en estas tres clases, en las cuales la superficie de una clase no es completamente compatible con la otra, lo cual se evidenció comparando la estructura de la clase Alpha con las clases Mu y Pi (Sinning *et al.*, 1993). Por otro lado, las tres clases poseen una tirosina en el

dominio N-terminal (localizada en la lámina $\beta 1$) que es importante para su actividad catalítica. Las enzimas de la clase Mu tienen en su estructura un asa característica (Mu-loop) que se encuentra entre $\beta 2$ y $\alpha 2$. El dominio C-terminal de la clase Alpha contiene una α -hélice extra ($\alpha 9$) que se incluye en la parte hidrofóbica del sitio de unión del sustrato, lo que resulta en un bolsillo mucho más hidrofóbico comparado con la misma región de las clases Mu y Pi. Esta hélice extra es importante para la estabilidad del dímero y para la unión de ligandos que son transportados por ellas. Además, afecta a la tasa de unión del GSH y el estado de ionización de la Tyr9, que es esencial para la actividad catalítica.

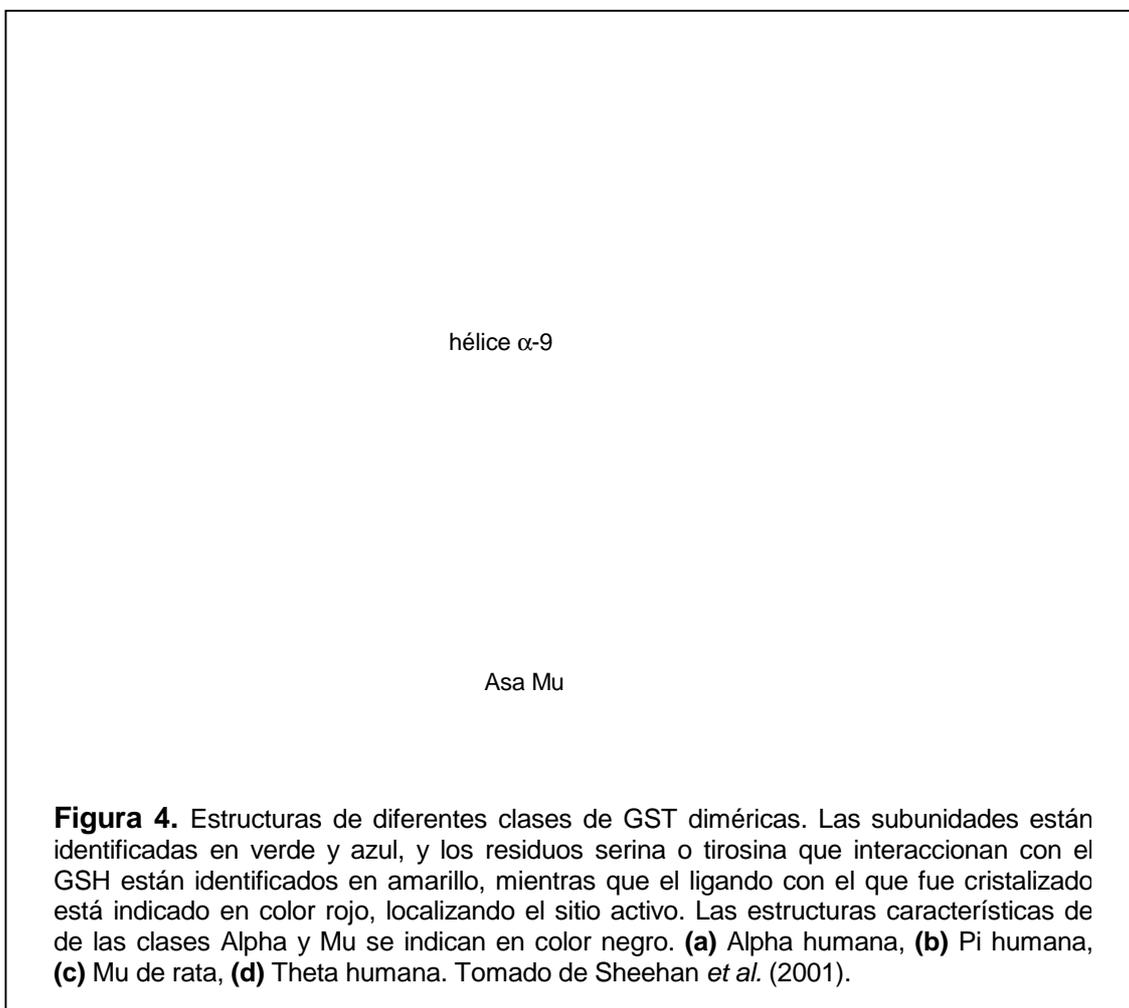
Clase Theta:

Las enzimas de la clase Theta en mamíferos se descubrieron de manera tardía, ya que no se unen por afinidad a matrices como GSH-agarosa o S-hexil-GSH-agarosa. Esta clase sólo guarda un 7% de identidad con las clases Alpha, Mu y Pi. Sus miembros tienen especificidad por un único sustrato y no todas las enzimas que pertenecen a esta clase son activas sobre el sustrato CDNB. A diferencia de las Alpha, Mu y Pi, la clase Theta tiene una serina en el sitio activo de la región N-terminal en lugar de una tirosina. Esta clase está ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentra en plantas, bacterias, insectos y en otros organismos. En humanos se han descrito dos homodímeros (hGST T1-1 y hGST T2-2), en los que las dos subunidades solo comparten un 50% de similitud (Pemble *et al.*, 1994; Schroder *et al.*, 1996).

Clase Sigma:

Respecto de las enzimas de la clase Sigma, éstas están relacionadas con la síntesis de prostaglandina y en parásitos estimulan la síntesis endógena de este compuesto. Los homólogos en vertebrados, que también pertenecen a esta clase, tienen una actividad muy alta como prostaglandina D sintasa y se han identificado en rata, ratón, pollo y humanos (Sheehan *et al.*, 2001). Cuando se analiza su estructura, no todas las enzimas de esta clase tienen la interfase “bolsillo-esfera” de las clases Alpha, Mu, y Pi. El tipo de interfase que existe en los dímeros estabiliza las dos subunidades y las interacciones que se generan allí son importantes para el sitio activo. Por esta razón, ésta no es una característica definitiva para la distinción de las enzimas de la clase Sigma. Por ejemplo, la enzima purificada de calamar, la cual fue clasificada dentro de esta clase, no tiene este tipo de interfase en su sitio activo (Harris *et al.*, 1991; Tomarev

et al., 1993). Por el contrario, la enzima hematopoyética humana, la prostaglandina D sintasa, que es una enzima de clase Sigma, tiene una interfase de tipo “esfera-bolsillo” similar a la de las clases Alpha, Mu y Pi (Kanaoka *et al.*, 1997).



Clase Zeta:

En referencia a la clase Zeta, es una de las clases filogenéticamente más conservadas, estando sus miembros ampliamente distribuidos en la naturaleza, desde plantas hasta humanos. Las enzimas de la clase Zeta tiene actividad maleilacetato isomerasa. Esta enzima hace parte del catabolismo de la tirosina convirtiendo maleilacetato en fumarilacetato, y maleilacetona en fumarilacetona. Ambos sustratos son agentes alquilantes y se ha demostrado que estas enzimas son inactivadas por el ácido dicloroacético, lo cual resulta en la acumulación de maleilacetona. Al igual que para las clases Alpha, Mu y Pi, se han encontrado polimorfismos en la población humana, lo cual explica las diferencias individuales en el

metabolismo del dicloroacetato y del fluoroacetato (Fernandez-Canon y Penalva, 1998; Cornett *et al.*, 1999; Tzeng *et al.*, 2000).

Clases Delta y Epsilon:

Se han descrito además citosólicas en insectos que corresponden a las clases Delta y Epsilon. Ambas clases se han identificado en *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti* (Ranson y Hemingway, 2005; Tu y Akgul, 2005). Las enzimas de la clase Delta se expresan en niveles muy altos en insectos, sobre todo en los estados larvales iniciales, aunque se pueden obtener también a partir de extractos celulares de ejemplares adultos. La clase Epsilon está implicada en la detoxificación de insecticidas y, además, sus miembros tienen actividad peroxidasa, lo cual los hace importantes en la protección contra efectos secundarios del estrés oxidativo.

Clase Omega:

La clase Omega es una de las descritas más recientemente y fue hallada por análisis bioinformáticos de las bases de datos de secuencias humanas (Board *et al.*, 2000). Se han descrito y caracterizado dos genes que se transcriben activamente en humanos y se les ha denominado *hGSTO1* (Board *et al.*, 2000) y *hGSTO2* (Wang *et al.*, 2005). Se ha identificado también un pseudogen humano al que se le ha denominado *hGSTO3*, estando localizado en el cromosoma 3 (Whitbread *et al.*, 2003). Se han descrito ortólogos en cerdo (Rouimi *et al.*, 2001), ratón (Ishikawa *et al.*, 1998), rata (Ishikawa *et al.*, 1998), *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al.*, 1994), *Schistosoma mansoni* (Girardini *et al.*, 2002), *D. melanogaster* (Tu y Akgul, 2005) y en el nematodo *Onchocerca volvulus* (Kampkotter *et al.*, 2003).

Las principales características de esta clase de GST se determinaron a partir de la estructura cristalizada de *hGSTO1-1* (Board *et al.*, 2000). En esta estructura se observa el plegamiento típico de las GST canónicas y además comparten un 20 % de homología con los miembros de otras clases. Analizando el sitio de unión del sustrato en *hGSTO1-1* se observa que es más abierto comparado con las GST de otras clases y expone de manera lineal una serie de residuos polares haciendo que el bolsillo de unión del sustrato sea menos hidrofóbico (Board *et al.*, 2000). Este hecho, y que la apertura entre las dos subunidades sea mayor comparada con otras GST, sugiere que el sustrato

natural o de unión de la hGSTO1-1 no sea particularmente hidrofóbico y que la enzima activa pueda tratarse de una o varias subunidades (Board *et al.*, 2000; Whitbread *et al.*, 2005). Por otro lado, las enzimas de esta clase tienen una región rica en prolinas en posición N-terminal que es inusual en las demás clases.

Respecto de la estructura primaria de GSTO2-2, una característica importante de las subunidades de esta enzima es su alto contenido de cisteínas. Existen 11 cisteínas en hGSTO2-2 y 15 en mGSTO2-2 en contraste con las 5 y 4 de hGSTO1-1 y mGSTO1-1 respectivamente (Whitbread *et al.*, 2005). El alto contenido de cisteínas recuerda a proteínas estructurales como las queratinas, en donde sus propiedades estructurales están dadas por este contenido de cisteínas. Aunque el papel estructural de las subunidades de las GSTO2 no está determinado únicamente por esta característica, es importante anotar que otras GST juegan un papel estructural importante en los cristalinos de los cefalópodos (Tomarev *et al.*, 1993).

Otro aspecto importante en la secuencia de las subunidades de esta clase es la presencia en su sitio activo de una cisteína en vez de una tirosina o una serina (Board *et al.*, 2000). Esta cisteína interactúa con el GSH formando un disulfuro mixto en su sitio activo. Esta característica puede relacionarse con la actividad tiol transferasa de la molécula, en la que se eliminan aductos S-tiolados formados entre las cisteínas de las proteínas y el GSH en respuesta a estrés oxidativo (Listowsky, 2005). Todo esto pone en evidencia la importancia que tienen este residuo cisteína y la formación del enlace disulfuro en la actividad catalítica de las GST de clase Omega (Board *et al.*, 2000). Acerca de la estructura cuaternaria, se ha demostrado que la hGSTO1-1 forma homodímeros (Board *et al.*, 2000), lo cual es consistente con la estructura cuaternaria de muchas GST citosólicas.

Dada la presencia de la Cys32 en el sitio activo de las GSTO, las enzimas de esta clase tienen un amplio rango de actividades enzimáticas que son distintas a las presentes en otras GTS de mamíferos, mientras que algunas de las actividades típicas de las GST citosólicas no existen en esta clase. Por ejemplo, las GSTO no son activas frente al diclorometano y al ácido etacrínico. Además, la hGSTO1-1 y otras GST de esta clase tienen una actividad muy baja sobre el CDNB, excepto GSTO2-2 la cual tiene actividad alta sobre este sustrato (Wang *et al.*, 2005). Sorprendentemente, la mutación de la Cys32 por alanina en hGSTO1-1 aumenta la actividad sobre CDNB (Board *et al.*, 2000; Whitbread *et al.*, 2005).

Dentro de las actividades enzimáticas descritas en la clase Omega están la tiol transferasa, dehidroascorbato reductasa (DHAR) y monometilarsenato reductasa. Todas estas reacciones son tiol dependientes de GSH o reacciones de reducción. En el caso de la actividad tiol transferasa, tanto hGSTO1-1 como hGSTO2-2 catalizan este tipo de reacciones (Board *et al.*, 2000; Schmuck *et al.*, 2005). Se han descrito varios métodos para medir la actividad tiol transferasa y uno de los sustratos usados es el 2-hidroxi-etil-disulfuro (HED). Este ensayo mide la tasa de formación de GSH oxidado (GSSG) acoplado a la actividad de la GSH reductasa y a la oxidación de NADPH (Holmgren y Aslund, 1995). Otra característica de la sustitución de la Cys32 por alanina en hGSTO1-1 es la pérdida de la actividad tiol transferasa de esta proteína (Whitbread *et al.*, 2005).

Otra de las actividades enzimáticas detectadas en las GST de clase Omega es la actividad DHAR. Esta actividad enzimática también depende de la presencia de la cisteína del centro activo y es característica de las glutaredoxinas (Washburn y Wells, 1999). Las GSTO catalizan la reducción dependiente de GSH del dehidroascorbato a ascorbato. A nivel biológico, este paso enzimático es vital para el reciclaje de la vitamina C (Whitbread *et al.*, 2003). Aunque los estudios de Board *et al.* (2000) demuestran que hGSTO1-1 tiene actividad DHAR, estudios recientes han demostrado que hGSTO2-2 tiene 70 a 100 veces más actividad a este nivel que hGSTO1-1 (Schmuck *et al.*, 2005). Esta actividad enzimática también se ha detectado en la GSTO de cerdo (Rouimi *et al.*, 2001) y de rata (Board *et al.*, 2000). Estudios inmunohistoquímicos y funcionales de la enzima GSTO1-1 en ratas sugieren que tiene un papel importante en el mantenimiento de los niveles de ascorbato en el cerebro (Fornai *et al.*, 2001). El papel más importante del ascorbato en este órgano parece ser el secuestro de los radicales libres y las ROS generadas en las células cerebrales (Rice, 2000). Esta actividad sugiere que las GSTO protegen de los procesos oxidativos que pueden estar implicados en las patologías de las enfermedades neurodegenerativas (Mattson, 2004). Se han realizado estudios en los que se pretendía determinar si existía una asociación entre los polimorfismos de las hGSTO y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, pero los resultados son contradictorios (Li *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004; Ozturk *et al.*, 2005).

Se ha examinado también la actividad DHAR de otras clases (Alpha, Mu, Pi, Theta, y Zeta) y con excepción de la GSTM2-2, la cual tiene una actividad muy baja sobre el dehidroascorbato, las demás se consideran esencialmente inactivas (Board *et al.*, 2000).

Aparte de las actividades tiol transferasa y DHAR de hGSTO1-1 y hGSTO2-2, se ha reportado que además tienen actividad monometilarsenato reductasa (Zakharyan *et al.*, 2001; Schmuck *et al.*, 2005). Por otro lado, se considera a hGSTO1-1 como la enzima limitante de la vía de biometilación en el metabolismo del arsénico inorgánico (Zakharyan *et al.*, 2001). La actividad monometilarsenato reductasa consiste en la reducción enzimática del metilarsenato o del ácido dimetilarsínico a costa de la oxidación de GSH a GSSG. La oxidación del GSH se sigue espectrofotométricamente ligando su reducción por la GSH reductasa y la oxidación de NADPH (Denton *et al.*, 2004). El aspecto importante de esta actividad enzimática radica en la capacidad que tienen las células para metabolizar los compuestos inorgánicos del arsénico. Uno de ellos es el tóxico de arsénico, el cual es usado en el tratamiento de la leucemia promielocítica. En algunos pacientes se observan reacciones adversas al tratamiento con este óxido, lo cual sugiere que existe un componente genético que determina las diferencias en la capacidad para metabolizar el arsénico (Schmuck *et al.*, 2005). Estudios recientes sugieren que el polimorfismo en hGSTO1-1 está asociado con un perfil inusual de excreción de arsénico por vía urinaria en pacientes expuestos a altas concentraciones de arsénico (Marnell *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha determinado la actividad monometilarsenato reductasa en las diferentes variantes de hGSTO1-1 (Schmuck *et al.*, 2005).

Estas actividades enzimáticas descritas en las GSTO tienen relación con otras funciones biológicas. La hGSTO1-1 está relacionada con la modulación de los receptores de rianodina, los cuales son canales de calcio del retículo endoplásmico (RE). El mecanismo por el cual la hGSTO1-1 regula estos canales es desconocido, pero es importante anotar que la mutación de la Cys32 a alanina causa pérdida de este mecanismo de regulación (Dulhunty *et al.*, 2001). Aunque no se conoce el papel fisiológico del mismo, se ha observado que hGSTO1-1 se sobreexpresa en líneas celulares de linfomas resistentes a la radiación terapéutica, lo que reduce la apoptosis y genera una movilización de calcio a través de los receptores de rianodina. Adicionalmente, hGSTO1-1 puede modular la respuesta inmune que depende de un incremento en la concentración de Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina de los linfocitos B y T (Xu *et al.*, 1996; Whitbread *et al.*, 2005).

Otra de las funciones adicionales que tiene la hGSTO1-1 es la interacción con fármacos inhibidores de la liberación de citoquinas. La interleucina-1 (IL-1) es un mediador proinflamatorio producido en los monocitos activados y en los macrófagos

(Dinarelo, 1998). IL-1 no se libera constitutivamente y es necesario que ocurra un procesamiento postransduccional antes de ser liberada. Varias diarilsulfonilureas actúan como fármacos inhibidores de la liberación de citoquinas o CRIDs (de “Cytokine Release Inhibitory Drugs”) (Perregaux *et al.*, 1992). Estas CRIDs inhiben el procesamiento post transcripcional de la IL-1 β en los monocitos humanos activados. Estudios recientes describen que las CRIDs se unen a la hGSTO1-1 de los monocitos, y esta interacción puede determinar el mecanismo por el cual las CRIDs detienen el procesamiento postranscripcional de las IL-1 β (Laliberte *et al.*, 2003). La interacción entre CRIDs y hGSTO1-1 requiere la presencia de la Cys32 pero el papel exacto que la hGSTO1-1 tiene en este proceso no está determinado. Se especula que puede estar mediando la formación de canales de calcio ya que el procesamiento de la interleucina-1 β está asociado con cambios significativos de la homeostasis iónica celular (Laliberte *et al.*, 2003). Otra posibilidad es que hGSTO1-1 esté mediando el procesamiento de la interleucina-1 β a través de su actividad tiol transferasa, ya que la activación de los monocitos puede alterar el balance del estado redox y alterar el potencial de glutationilación de las proteínas. La glutationilación puede modular potencialmente la función de las proteínas a través del bloqueo de tioles funcionalmente importantes (Laliberte *et al.*, 2003), y la actividad tiol transferasa, vía deglutationilación, podría regular el estado redox de estos grupos tiol.

1.2.3. MECANISMO CATALITICO DE LA REACCIÓN

Las GST se pueden encontrar como monómeros, homodímeros o heterodímeros y las unidades que componen estas últimas siempre pertenecen a la misma clase. Hasta ahora no se ha descrito actividad catalítica de monómeros en mamíferos, pero en plantas se han descrito GST activas como monomeros en las clases Lambda y DHAR (Edwards y Dixon, 2005).

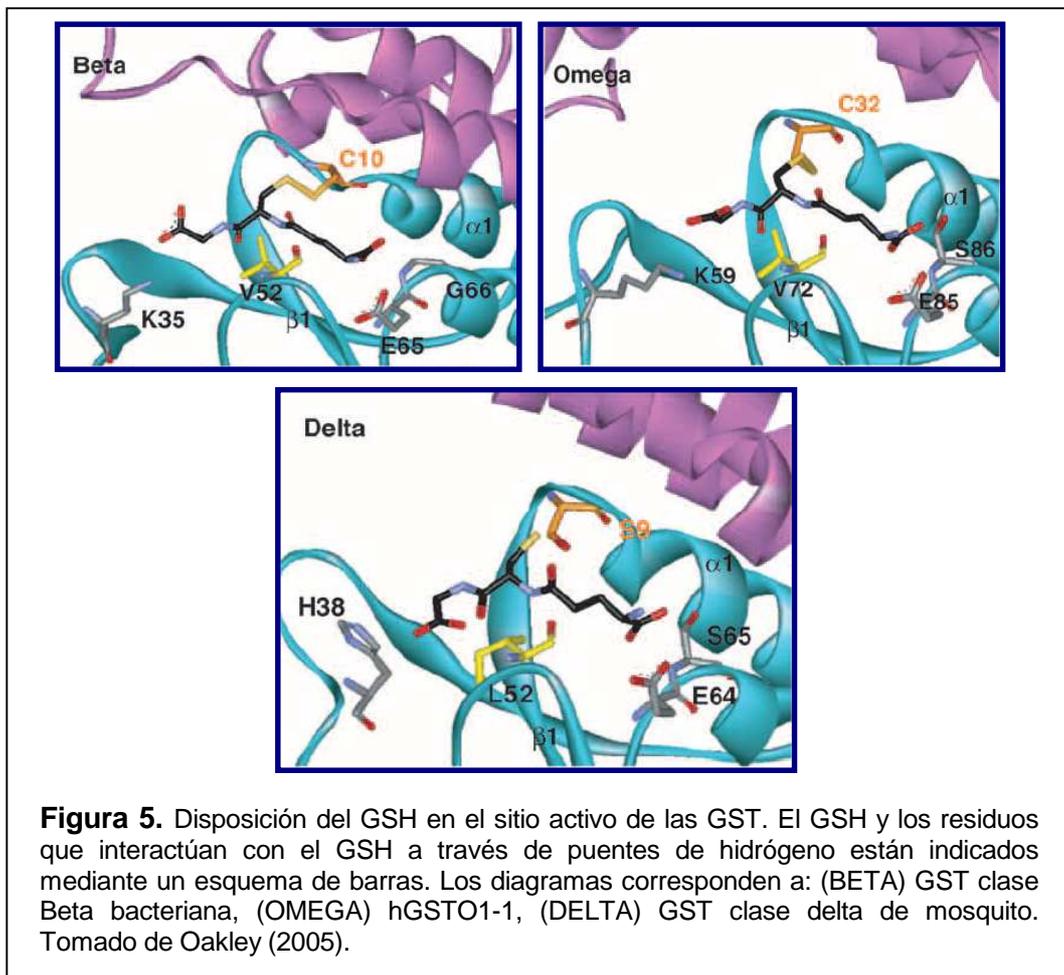
Las GST catalizan la siguiente reacción general:



Respecto del funcionamiento de estas enzimas se deben abordar dos cuestiones importantes: ¿cuál es el mecanismo que le permite a la enzima reconocer y activar al GSH para el ataque nucleofílico? y ¿de qué manera las GST reconocen específicamente los sustratos electrofílicos?

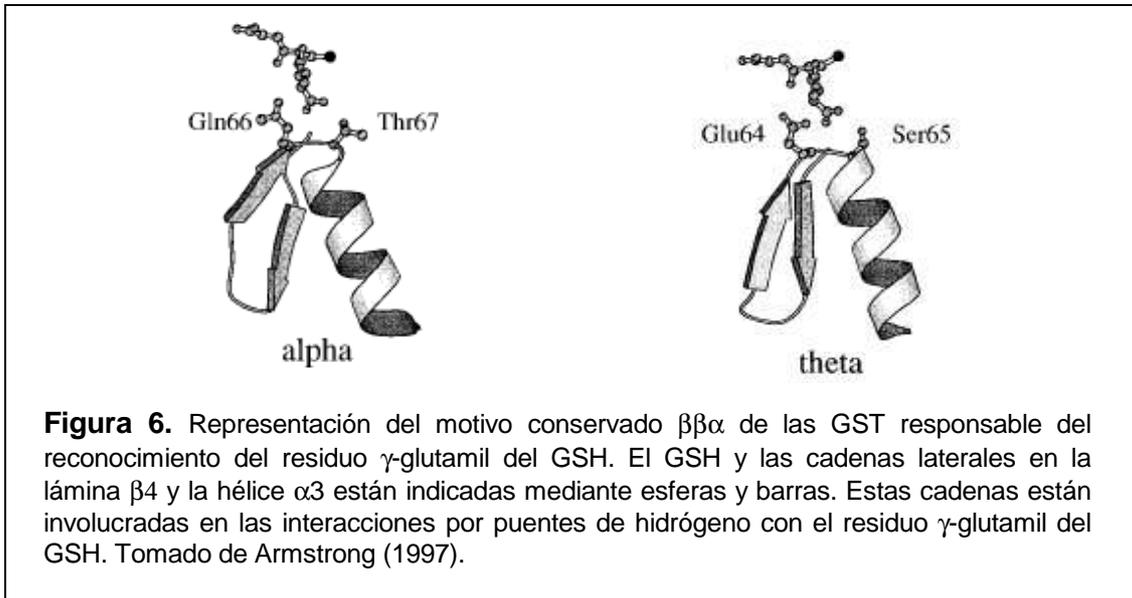
1.2.3.1. ACTIVACIÓN DEL GSH

Uno de los aspectos fundamentales del mecanismo catalítico de las GST es la manera en que estas enzimas usan las interacciones con el GSH para activar el átomo de azufre de esta molécula y así iniciar el ataque nucleofílico. El tripéptido GSH está unido en una conformación extendida, donde el residuo γ -glutamil está dirigido hacia la interfase del dímero GST, mientras que el azufre del residuo cisteinil apunta hacia la subunidad a la cual está unido y se localiza cerca de la superficie de la proteína (Figura 5).

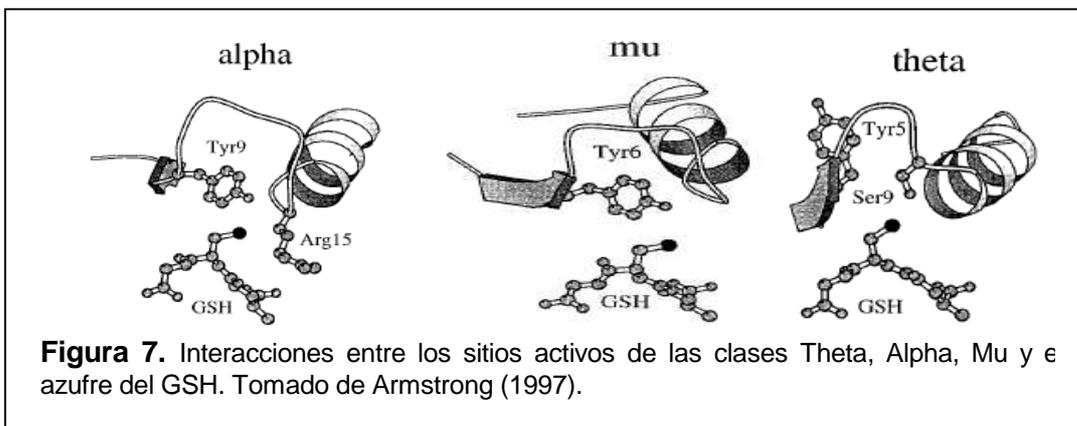


La región más conservada estructuralmente en todas las enzimas GST citosólicas es el motivo $\beta\beta\alpha$ del centro activo, el cual se encarga de reconocer la porción γ -glutamil del GSH. Este elemento estructural de las GST empieza con un residuo *cis*-prolil que está justo antes de la lámina $\beta 3$ y que continúa con la hélice $\alpha 3$. La función de este residuo es permitir que se mantenga el plegamiento total del dominio. Existen dos residuos localizados entre la lámina $\beta 4$ y la hélice $\alpha 3$ que están directamente

relacionados con este reconocimiento: un residuo glutamato o glutamina seguido de un residuo serina, treonina o cisteína (Figura 6).

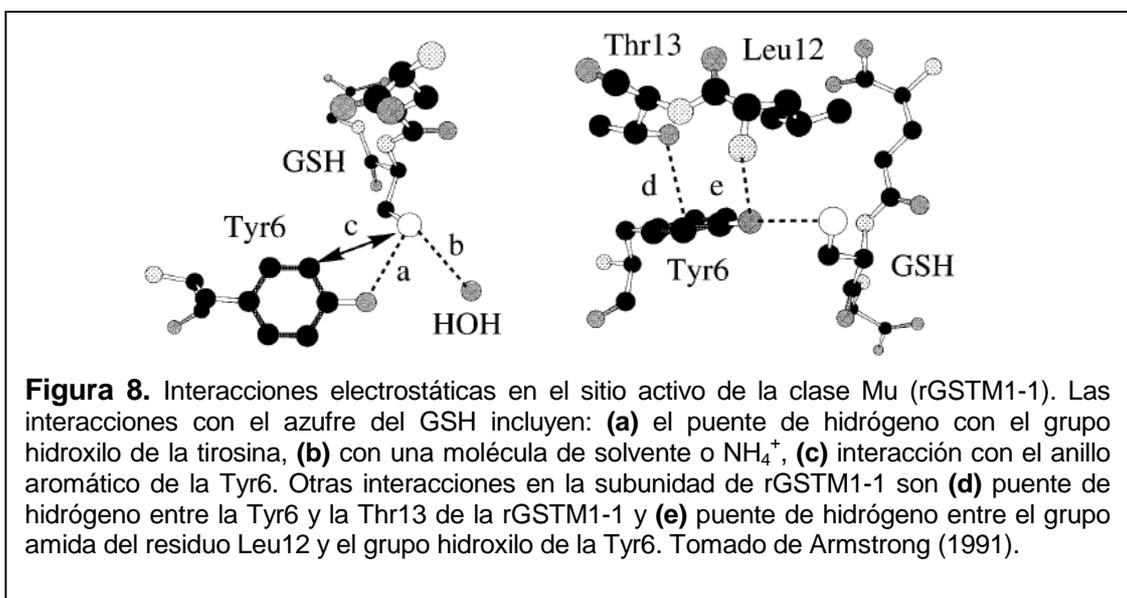


Las enzimas de la clase Theta, la cual es considerada el precursor de las clases Alpha, Mu, Pi y Sigma, utiliza el grupo hidroxilo del residuo serina localizado cerca del dominio N-terminal del polipéptido para activar el átomo de azufre del GSH. Por otro lado, las clases Alpha, Mu, Pi y Sigma hacen esta misma interacción pero con el grupo hidroxilo de una tirosina que está en una posición ligeramente diferente a la serina de la clase Theta. El aminoácido hidroxilado actúa como donador de hidrógeno para el azufre, lo cual baja el pK_a del tiol en el complejo E·GSH. Esto genera la ionización del complejo, lo que ocurre predominantemente a pH fisiológico. En la clase Alpha existen dos residuos relacionados con el enlace E·GSH: el residuo Tyr19 y la Arg15 (Armstrong, 1997) (Figura 7).



En resumen, la especie reactiva de los complejos binarios formados entre las GST de cualquier clase y el GSH es probablemente el ion tiolato (GS^-), el cual forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo de la serina o de la tirosina de las GST. En el caso de la familia Alpha, este enlace se estabiliza con la carga positiva de la Arg15.

Otro aspecto importante en la actividad catalítica es el papel que pueden tener otros residuos en la estabilidad del ion tiolato. Estos residuos pueden generar interacciones que aumentan la estabilidad de los puentes de hidrógeno del sitio activo o contribuir a crear un ambiente electropositivo cerca del ion tiolato, permitiendo así que disminuya el $\text{p}K_a$ y que aumente la estabilidad del sustrato electrofílico dentro de la enzima. Por ejemplo, se ha descrito el microdipolo generado por el puente de hidrógeno entre el NH del GSH y el grupo hidroxilo de la Tyr6 en la clase Mu (Figura 8).



Este puente de hidrógeno disminuye la afinidad por protones del grupo hidroxilo y aumenta la estabilidad del puente de hidrógeno con el azufre del GSH (Armstrong, 1991). Otro ejemplo en la clase Mu es el puente de hidrógeno formado entre el grupo hidroxilo de la Tyr13 y la Tyr6. En principio, este puente de hidrógeno disminuye la afinidad por protones del grupo hidroxilo de la tirosina haciendo que sea mejor donador de protones para el tiolato y que disminuya el $\text{p}K_a$ del ácido conjugado (Armstrong, 1991).

1.2.3.2. ESPECIFICIDAD SOBRE SUSTRATOS ELECTROFÍLICOS

La especificidad del sustrato que tiene cualquier enzima es función de la eficiencia de ésta para disminuir las barreras de activación de un proceso particular. Para entender completamente la especificidad catalítica de las GST es necesario conocer la naturaleza de los intermediarios y los estados de transición que se coordinan en la reacción. Estos intermediarios pueden variar en función del sustrato. Los grupos funcionales más electronegativos (F⁻ y Cl⁻) forman rápidamente los compuestos intermedios de la conjugación pero los procesos posteriores para descomponer el sustrato conjugado son más complejos (Armstrong, 1991).

El dominio C-terminal es el encargado de alojar el sustrato electrofílico y está formado básicamente por hélices α . El número de estas hélices varía entre clases de GST y las hélices 4α y 5α proporcionan un ambiente hidrofóbico para la estabilidad del sustrato dentro del dominio. Respecto de la posición del sustrato electrofílico dentro de la subunidad, éste se coloca sobre la estructura formada por la lámina $\beta 1$ y la hélice $\alpha 1$ del dominio C-terminal. Estas dos estructuras dan forma a la base de la cavidad del dominio y los laterales o paredes están formados por hélices α y por la extensión final del dominio C-terminal. La forma de esta cavidad varía de una clase a otra, lo cual determina la variabilidad de sustratos que pueden ser transformados por estas enzimas. En muchas clases de GST la presencia de hélices o de asas en el dominio C-terminal contribuye a que el dominio tenga una plasticidad estructural variada. Por ejemplo, la hélice $\alpha 9$, que es característica de la clase Alpha, forma una base-soporte para el sustrato electrofílico en el dominio C-terminal. La clase Sigma tiene esta región más corta y eso trae como consecuencia que su sitio activo sea más abierto y las enzimas de tipo Mu tienen el asa característica de esta clase (Figura 1) (Armstrong, 1991).

1.2.4. LAS GST COMO GLUTATIÓN PEROXIDASAS

La producción de especies reactivas de oxígeno o ROS (de Reactive Oxigen Species) a partir de la reducción parcial del O₂ es una consecuencia inevitable de la respiración aeróbica. Estas ROS son el anión superóxido O₂⁻, el peróxido de hidrógeno H₂O₂, y el radical hidroxilo (OH·). Dichas especies químicas se producen principalmente en la fosforilación oxidativa, así como en las reacciones catalizadas por la 5-lipoxigenasa, ciclooxigenasa, las enzimas del sistema del citocromo P450 y la xanteno oxidasa, entre otras (Hayes y McLellan, 1999). Las ROS son metabolizadas por la

actividad catalítica de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, GPx y, de manera no enzimática, por el α -tocoferol, ácido ascórbico, GSH y bilirrubina. A pesar de estas defensas antioxidantes, las ROS causan daños en las membranas lipídicas, en el DNA, en las proteínas y en los carbohidratos. La oxidación de estas macromoléculas genera productos de degradación citotóxicos y mutagénicos (Marnett *et al.*, 2003). Así, aunque el radical superóxido puede dañar directamente el DNA, también lo puede hacer de manera indirecta a través de la producción de metabolitos secundarios reactivos, lo cual hace parte de la amplificación del daño celular que causan los radicales libres. Un problema particular que generan los radicales libres es la peroxidación lipídica de los ácidos grasos polinsaturados, los cuales hacen parte de las membranas de los organelos y las membranas celulares. Esta peroxidación lipídica resulta de una reacción en cadena que a su vez amplifica el daño celular. El proceso produce peróxidos lipídicos que son autocatalíticos y se transforman en compuestos electrofílicos secundarios como los epoxialdehídos, 2-alquenes, 4-hidroxi-2-alquenes y ketoaldehídos, algunos de los cuales son genotóxicos (Marnett *et al.*, 2003). El 4-hidroxi-2-alquenal (HNE) es uno de los 4-hidroxi-2-alquenes más importantes y su producción celular aumenta bajo estrés oxidativo (Awasthi *et al.*, 2004).

La acción y descontrol de la peroxidación lipídica causa daños celulares irreversibles que inducen la apoptosis (Yang *et al.*, 2001). Algunos de los sistemas que protegen contra los productos generados a partir del estrés oxidativo son la aldehído deshidrogenasa, la alcohol deshidrogenasa, la aldo-ceto reductasa, las GPx dependientes de selenio y las GST (Hayes *et al.*, 2005).

Algunas clases de GST, además de su actividad transferasa dependiente de GSH, también tienen actividad GPx independiente de Se y pueden catalizar la reducción dependiente de GSH de hidroperóxidos de ácidos grasos (FA-OOH, de "Fatty Acid hydroperoxides"), hidroperóxidos de fosfolípidos (PL-OOH, de "PhosphoLipid hydroxyperoxides") y de hidroperóxidos orgánicos no fisiológicos como el hidroperóxido de cumeno (CU-OOH) (Zhao *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001). Sin embargo, a diferencia de las GPx dependientes de Se, las GST no usan el peróxido de hidrógeno como sustrato para su actividad GPx (Yang *et al.*, 2001). Se han descrito una serie de actividades enzimáticas que indican la relación entre la actividad de las GST, la reducción de los hidroperóxidos lipídicos (actividad GPx independiente de Se) y la protección que estas enzimas proporcionan a través de su actividad GST contra un rango de compuestos electrofílicos, los cuales se generan durante el daño oxidativo de

las membranas celulares (Armstrong, 1997; Hurst *et al.*, 1998; Prabhu *et al.*, 2004).

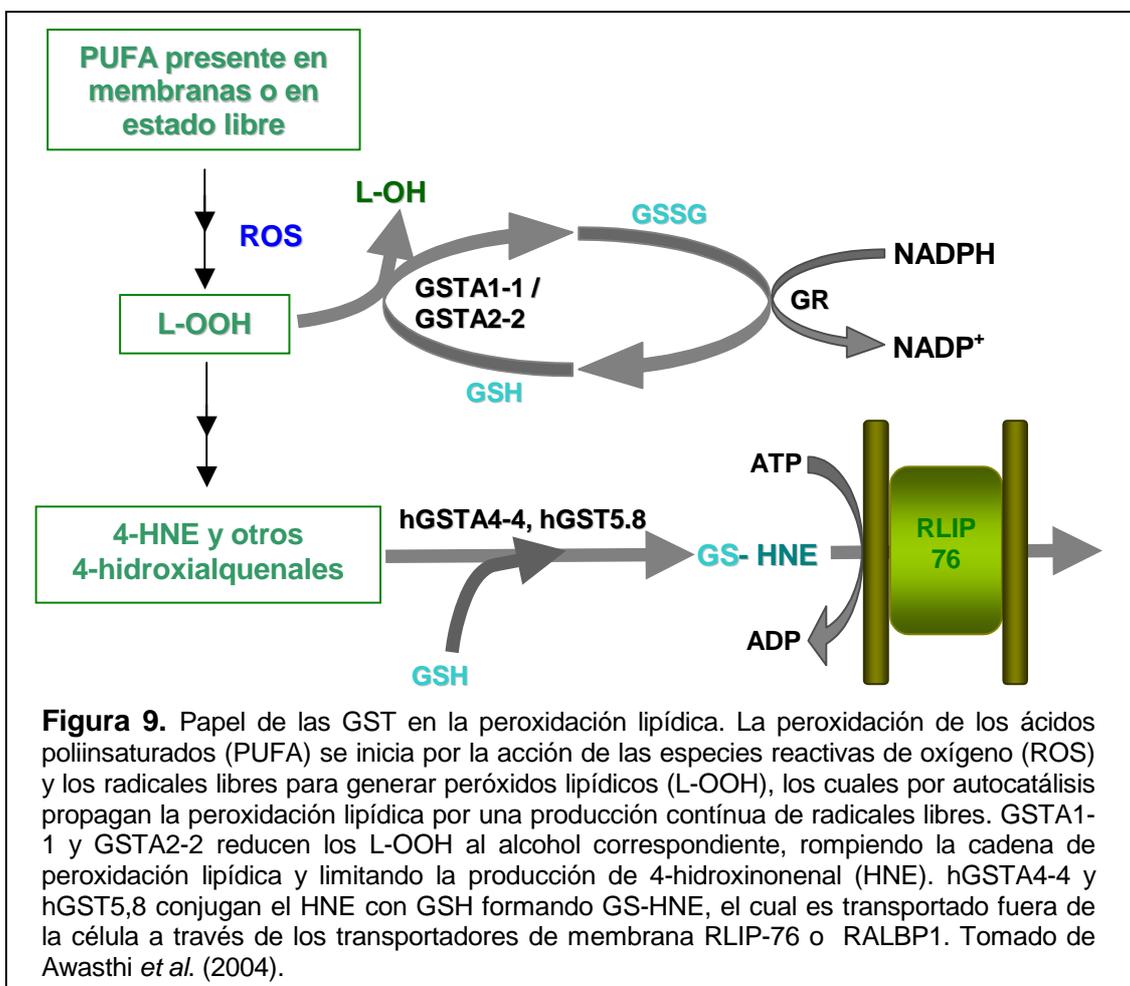
En humanos, rata y ratones la actividad GPx de las GST está asociada principalmente a la clase Alpha. También se ha purificado una GST de esta clase a partir de extractos de hígado de oveja y tiene actividad tanto GST como GPx independiente de Se (Prabhu *et al.*, 2001). Se ha descrito que las clases Mu y Theta también tienen actividad GPx sobre PL-OOH (Hurst *et al.*, 1998). Se ha demostrado que las enzimas hGSTA1-1 y hGSTA2-2 tienen una actividad alta como GPx sobre hidroperóxidos lipídicos, específicamente sobre FA-OOH y PL-OOH (Yang *et al.*, 2001), y que la sobreexpresión de hGSTA2-2 en la línea celular K562 protege a las células contra la apoptosis inducida por peróxidos lipídicos e inhibe tanto a JNK como la activación de las caspasas (Yang *et al.*, 2001). Además, la clase Alpha tiene una expresión alta en órganos con tasas metabólicas elevadas como es el caso del hígado, que está continuamente expuesto a ROS. El significado fisiológico de esta actividad GPx de la clase Alpha puede estar asociado con la localización celular, ya que del 3 al 5% del total de las proteínas solubles del hígado son GST y muchas de ellas pertenecen a la clase Alpha (Awasthi *et al.*, 2004).

En las reacciones que catalizan las hGSTA1-1/2-2, los peróxidos lipídicos son reducidos a los alcoholes correspondientes a costa de la oxidación del GSH (GSSG) y la formación de agua:



Los hidroperóxidos lipídicos son el principal producto de la peroxidación lipídica y son los que inician la propagación de una cadena autocatalítica. Esta cadena consiste en la autocatálisis del peróxido lipídico que genera compuestos electrofílicos como 4-hidroxi-alquenos y más radicales libres. Estos radicales libres oxidarán otros ácidos grasos potenciando así la cadena de propagación de la reacción. Como se ha mencionado antes, la formación de HNE se incrementa durante el estrés oxidativo celular y se ha demostrado que las células que sobreexpresan hGSTA1-1 o hGSTA2-2 no incrementan la formación de HNE bajo estrés oxidativo (Yang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002). Aunque estos estudios se han llevado a cabo *in vitro*, también se ha demostrado que los procesos de regulación y control del estrés oxidativo también

ocurren *in vivo* en el hígado de ratones, ratas y humanos (Yang *et al.*, 2001). Considerando que las GST aumentan su expresión bajo exposición a compuestos electrofílicos, estas enzimas pueden proteger a las células bajo condiciones fisiológicas normales o bajo estrés oxidativo, siempre y cuando la disponibilidad de GSH y de NADPH (necesario para el reciclaje del GSSG a GSH) no sea un factor limitante.



Las GST también pueden regular la concentración del HNE por conjugación con GSH. Aunque el HNE es lo suficientemente electrofílico como para reaccionar espontáneamente con el GSH, las GST potencian la tasa de reacción (Alin *et al.*, 1985). En humanos, ratones y ratas, se ha caracterizado la preferencia de las diferentes isoenzimas de la clase Alpha por los siguientes sustratos: PL-OOH, FA-OOH y el HNE (Awasthi *et al.*, 2004). Esta caracterización permite especificar el papel de cada una de las isoenzimas de la clase Alpha durante el proceso que atenúa los efectos de la peroxidación lipídica (Figura 9). En resumen, los ácidos polinsaturados de las membranas celulares son oxidados por las ROS formando los peróxidos lipídicos. Estos

compuestos se autocatalizan generando más ROS y propagando así la peroxidación lipídica. GSTA1-1/2-2 reducen los peróxidos lipídicos al alcohol correspondiente, rompiendo la cadena de peroxidación lipídica y limitando la producción de HNE. hGSTA4-4 y hGST5,8 conjugan el HNE con GSH formando GSH-HNE, el cual es transportado fuera de la célula por las bombas RLIP76 o RALBP1 (Barrera *et al.*, 1991).

1.3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS GST

La localización celular de las GST puede variar a pesar que la mayoría de ellas son solubles. Las mayoría se han descrito en el citoplasma pero algunas están presentes en el núcleo (Soboll *et al.*, 1995), los peroxisomas (Morel *et al.*, 2004) y la mitocondria (Raza *et al.*, 2002), donde pueden tener funciones peculiares para la integridad de estos organelos. Por ejemplo, GSTP1-1 en el núcleo puede estar asociada con la protección del DNA frente al daño inducido por la doxorubicina, causando la adquisición de resistencia a medicamentos usados en el tratamiento contra células tumorales (Goto *et al.*, 2001). Se sabe también que las GST presentes en la mitocondria (GSTA1-1, GSTA4-4 y GSTM1-1) pueden tener un papel importante en la defensa frente al estrés químico y oxidativo (Raza *et al.*, 2002). En el caso de la GST peroxisomal, hGSTK1-1, se ha clasificado dentro de la clase Kappa ya que comparte similitud de secuencia con este grupo de GST (69% con mGSTK1-1 y 71% con rGSTK1-1) así como por su localización exclusivamente peroxisomal y mitocondrial (Morel *et al.*, 2004). Es importante anotar que algunas proteínas localizadas en RE y en mitocondria también se han detectado abundantemente en los peroxisomas de los fibroblastos de ratón (Islinger *et al.*, 2006). Esta observación resulta importante, ya que estaría indicando una relación física entre estos tres organelos y una relación funcional entre las proteínas allí localizadas (Islinger *et al.*, 2006).

1.4. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS GST

Una de las características más importantes de la superfamilia de las GST es la diversidad en la actividad enzimática, lo cual les permite participar en procesos metabólicos y enzimáticos diversos, como ya se indicó anteriormente. Esta diversidad enzimática las hace especialmente interesantes desde el punto de vista terapéutico y farmacológico, ya que algunas de sus actividades pueden relacionarse con aspectos puntuales del tratamiento de algunas enfermedades. Aunque el papel farmacológico de las GST en el metabolismo y detoxificación de xenobióticos está ampliamente descrito,

el significado de la conjugación catalizada por las GST de compuestos endógenos no se entiende por completo. Se ha descrito que los compuestos endógenos que tienen carbonos α , β -insaturados son sustratos potenciales de las GST. Algunos de los compuestos endógenos, particularmente aquellos que se han formado durante los procesos de degradación oxidativa de componentes celulares, son objeto de especial atención por su capacidad de atacar moléculas nucleofílicas, que pueden convertirse posteriormente en compuestos tóxicos (Awasthi *et al.*, 2005). Las GST pueden catalizar la conjugación con GSH de compuestos endógenos alquénil α , β -insaturados como HNE, malonaldehído, acroleína, y bases propenales como citosina propenal, timina propenal y uracil propenal. Este proceso de conjugación con GSH protege contra la actividad de estos tóxicos potenciales (Alin *et al.*, 1985; Berhane *et al.*, 1994). Dada su naturaleza electrofílica, estos compuestos pueden reaccionar espontáneamente con el GSH pero la reacción es de 500 a 600 veces más rápida en presencia de las GST (Awasthi *et al.*, 2005).

También se considera la relación existente entre la patogénesis de algunas enfermedades y la actividad de las GST en el metabolismo de los productos de la peroxidación lipídica. Una de las hipótesis sobre la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer o AD es la relación que existe entre los niveles elevados de marcadores para estrés oxidativo y la degeneración neuronal (Markesbery, 1997). Este nivel elevado de estrés oxidativo en el cerebro de los pacientes con AD se caracteriza por un aumento en la peroxidación lipídica, proteínas oxidadas y DNA oxidado. Además, se ha detectado una reducción en la cantidad de ácidos grasos poli-insaturados en los cerebros de pacientes con AD (Smith *et al.*, 1991; Mecocci *et al.*, 1994; Hensley *et al.*, 1995; Lovell *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta todos estos aspectos, posiblemente el HNE tiene un papel importante en la patogénesis de AD como producto de la peroxidación lipídica, ya que los niveles de este compuesto están también elevados en el cerebro de pacientes con AD (Markesbery y Lovell, 1998). Las GST pueden estar cumpliendo un papel protector frente al HNE, ya que el pretratamiento de cultivos primarios de células de hipocampo de ratón con GST y la posterior exposición a concentraciones tóxicas de HNE aumenta la supervivencia celular comparado con células no pretratadas (Xie *et al.*, 1998). La actividad peroxidasa de las GST de clase Alpha también está relacionada con la protección frente a estrés oxidativo, ya que actúan sobre los hidroperóxidos de fosfolípidos. Se ha demostrado que la sobreexpresión de hGSTA1-1 en la línea celular K562 atenúa la peroxidación lipídica en condiciones normales y bajo estrés oxidativo generado por exposición a peróxido de hidrógeno (Yang *et al.*, 2001).

El HNE, además de ser un producto de la peroxidación lipídica, también se considera como una molécula de señalización intracelular (Awasthi *et al.*, 2003; Eghtay *et al.*, 2003; Uchida, 2003) y su conjugación con GSH catalizada por las GST puede influir en algunas vías metabólicas. El HNE está involucrado en una serie de enfermedades degenerativas como AD (Montine *et al.*, 1997; Sayre *et al.*, 1997), arteriosclerosis (Yang *et al.*, 2004), cataratas (Awasthi *et al.*, 1996) y también en cáncer (Zarkovic *et al.*, 1995). Algunos estudios sugieren que el HNE puede afectar el ciclo celular, inducir apoptosis y diferenciación celular, modular el crecimiento celular y afectar varias vías de transducción de señal (Awasthi *et al.*, 2005).

Otro aspecto importante de los efectos del estrés oxidativo en las células cerebrales es el nivel de ascorbato intracelular y su relación con enfermedades neurodegenerativas como AD o Parkinson. Como se ha mencionado en el apartado 1.2.2.2., el ascorbato es considerado como un antioxidante importante en las células cerebrales y se ha implicado en la patogénesis de ambas enfermedades. Sumado a esto, la actividad DHAR, presente tanto en GSTO1-1 como en GSTO2-2, está relacionada con el reciclaje de la vitamina C, lo cual hace pensar que la variación de la expresión de las GSTO en determinado tipo de células cerebrales puede ser un factor importante en estos desórdenes neurológicos. Por otro lado, se ha observado que la expresión de rGSTO1-1 es abundante en tejidos cerebrales como el cerebelo e hipocampo y particularmente en las células afectadas en la enfermedad de Parkinson (Fornai *et al.*, 2001), y se ha propuesto que su actividad DHAR representa el 65% de la actividad total en el cerebro (Fornai *et al.*, 1999).

Es especialmente relevante la posibilidad de considerar a las GST como dianas terapéuticas dada su relación con algunas enfermedades como el asma o la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos del cáncer. Como se ha mencionado anteriormente, hGSTM2-2 es homóloga de la enzima leucotrieno C₄ sintasa, la cual se considera también una GST (Piper, 1984; Ford-Hutchinson, 1990). Los leucotrienos y peptidoleucotrienos, como el LTD₄, son importantes en la patogénesis de enfermedades como el asma por lo que la inhibición de la síntesis de LTD₄ o de sus receptores representa una aproximación terapéutica importante en el tratamiento de esta enfermedad (Rushmore y Pickett, 1993). Los leucotrienos son derivados del ácido araquidónico, que son liberados de la célula como araquidonatos y luego convertidos en un epóxido inestable, el leucotrieno A₄ o LTA₄. Este compuesto es metabolizado de dos maneras diferentes, una por hidratación, generando LTB₄ y otra por conjugación con

GSH, que es catalizada por la leucotrieno C4 sintasa. De hecho, los antagonistas de LTD₄ y los inhibidores de la síntesis de leucotrieno han sido eficaces en el tratamiento del asma bronquial, y los datos sugieren que la leucotrieno C4 sintasa es la única GST necesaria para la producción de peptidoleucotrienos, lo cual la convierte en una diana terapéutica importante en la inhibición de la síntesis de estos compuestos (Rushmore y Pickett, 1993). Otro producto del metabolismo del ácido araquidónico es la prostaglandina H₂ (PGH₂). Las GST de la familia MAPEG catalizan la isomerización del PGH₂ a prostaglandina E₂ (PGE₂) y prostaglandina D₂ (PGD₂), o la reducción a PGF_{2α} (Hayes *et al.*, 2005). Las GST citosólicas que se expresan en el cerebro humano tienen actividad PGE₂ sintasa (Beuckmann *et al.*, 2000) y las enzimas que pertenecen a la familia de las MAPEG contribuyen mayoritariamente a la producción de PGE₂ (Nakashima *et al.*, 2003). La actividad de las GST en el metabolismo de este tipo de mediadores lipídicos endógenos como las prostaglandinas clásicas (PGD₂, PGE₂ y PGF_{2α}), influye en vías de señalización celular y esto tiene consecuencias a nivel biológico. El efecto más estudiado es el generado por el 15d-PGJ₂. Este compuesto se produce a partir del metabolismo del PGD₂, y su principal propiedad es funcionar como ligando activador del factor de transcripción PPARγ (de "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ). Este factor de transcripción es un regulador crítico en la diferenciación de los adipocitos y también representa una diana molecular para medicamentos relacionados con la sensibilización a insulina. La sobreexpresión de las GST puede disminuir la transactivación de la expresión génica mediada por PPARγ a través de la conjugación de la prostaglandina con GSH, la cual es catalizada por las GST (Paumi *et al.*, 2004). La habilidad de las GST para afectar la síntesis o la eliminación del PGD₂, las coloca en el punto central de la regulación de este compuesto.

En el caso de la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos del cáncer, uno de los mecanismos que se ha propuesto para explicar este efecto es el incremento y/o expresión diferencial de una o más GST en las células tumorales resistentes. Un ejemplo de ello es la expresión diferencial en las células tumorales de pulmón, colon, hígado, ovario, esófago, y estómago (Procopio *et al.*, 2005). Otro ejemplo es el aumento de la actividad GST en las líneas celulares provenientes de cáncer de mama, las cuales son resistentes a la adriamicina, atribuyéndose el 90% de esta actividad a GST de clase Pi (Batist *et al.*, 1986). Los cambios en el sistema GSH/GST también se relacionan con la resistencia a los fármacos alquilantes utilizados en el tratamiento del cáncer, presumiblemente porque aceleran la detoxificación de estos compuestos antineoplásicos. Los compuestos alquilantes alteran la replicación del DNA causando

roturas en el DNA de cadena sencilla o doble, o generando entrecruzamientos. A pesar del éxito que tienen en el tratamiento contra el cáncer, uno de los problemas que presentan es la resistencia de algunos tipos celulares. La resistencia es de dos tipos, intrínseca o adquirida. Esta última aparece por alteraciones celulares que resultan de la exposición continua al fármaco, proporcionando a las células ventajas selectivas de supervivencia (Procopio *et al.*, 2005). La resistencia se ha atribuido a múltiples factores, entre los cuales se incluyen la prevención de la entrada del fármaco en la célula, la alteración de los niveles de GSH y alteraciones en la expresión de algunas GST. En efecto, algunas GST catalizan la conjugación con GSH de agentes antineoplásicos específicos como el melfalán, clorambucil, ciclofosfamida, BCNU y mecloretamina, entre otros (Procopio *et al.*, 2005). Un estudio sobre dos líneas celulares de adenocarcinoma de ovario, provenientes de una paciente antes y después de la aparición de resistencia a la quimioterapia, mostró que la actividad GST de las dos líneas era diferente. La línea obtenida después de la aparición de la resistencia tiene una actividad GST tres veces mayor que la línea obtenida al inicio del tratamiento quimioterapéutico (Lewis *et al.*, 1988). Por lo tanto, conocer la estructura cristalina de las GST y su sitio de unión del GSH, junto con el desarrollo de análogos del GSH, proporciona las bases para el desarrollo de competidores e inhibidores intracelulares que permitan evitar la acción de estas enzimas en los tejidos tumorales y mejorar la acción de los compuestos alquilantes en el tratamiento del cáncer (Procopio *et al.*, 2005).

En otros casos, la sobreexpresión de algunas GST protege las células de la acción de metabolitos tóxicos. Un ejemplo de ello es la sobreexpresión de hGSTP1-1 en una línea celular sensible a adriamicina. Esta línea celular tiene una actividad GST baja y no expresa isoenzimas de la clase Pi. Las células transfectadas son resistentes al benzo(a)pireno y al metabolito tóxico benzo(a)pireno-anti-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido comparadas con las células normales. Por otro lado, esta sobreexpresión también puede proteger de la acción de compuestos endógenos potencialmente tóxicos (Rushmore y Pickett, 1993).

Otro de los procesos celulares en los que intervienen las GST es la degradación de compuestos aromáticos. En mamíferos la fenilalanina es degradada a acetoacetato y ácido fumárico. Entre los intermediarios de esta degradación están la tirosina, el maleilacetoacetato y fumarilacetoacetato. Como se mencionó en el apartado 1.2.2.2., las GST de clase Zeta son maleilacetoacetato isomerasas, por lo cual catalizan

el penúltimo paso del catabolismo de la fenilalalina y la tirosina (Fernandez-Canon y Penalva, 1998; Hayes *et al.*, 2005).

En la síntesis de hormonas esteroides, las GST también cumplen un papel activo. La progesterona y la testosterona se sintetizan a partir del metabolito del colesterol 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona. Dentro de los pasos de síntesis de ambas hormonas, las isoenzimas de GSTA catalizan la isomerización de uno de los intermediarios, comportándose como 3-keto- Δ^4 -esteroide isomerasas (Pettersson y Mannervik, 2001).

1.5. GLUTATIÓN TRANSFERASAS A LO LARGO DE LA ESCALA EVOLUTIVA

1.5.1. GST BACTERIANAS

Las cianobacterias, proteobacterias, bacterias fotosintéticas y algunas bacterias grampositivas son los únicos procariontes conocidos que sintetizan GSH (Fahey y Sundquist, 1991; Newton *et al.*, 1996). Sin embargo, no se ha podido determinar la presencia de este tripéptido en muchos géneros bacterianos y, además, existen variaciones significativas en el contenido de GSH entre especies del mismo género (Fahey y Sundquist, 1991). El hecho que en las cianobacterias, productoras de oxígeno en la fotosíntesis, y en las bacterias purpúreas, que usan el oxígeno como último aceptor de electrones, se hayan detectado altos niveles de GSH apunta a que el metabolismo del glutatión apareció paralelamente a las condiciones aeróbicas iniciales en la tierra. En *Escherichia coli* y otras proteobacterias el GSH y las enzimas dependientes de este, como las GST, están involucradas en varios procesos metabólicos centrados en la protección frente a estrés oxidativo y también aseguran el funcionamiento correcto de procesos como plegamiento, síntesis, regulación y degradación de enzimas y de complejos multienzimáticos (Penninckx y Elskens, 1993; Koonin *et al.*, 1994).

Una característica importante de la estructura primaria de las GST bacterianas es que los residuos altamente conservados en las GST citosólicas de mamíferos no se encuentran en aquellas, lo cual indica la tolerancia del conjunto de las GST a la variación en la secuencia proteica que conlleva a la diversidad en actividades enzimáticas (Vuilleumier, 1997). Inicialmente el estudio de la actividad de las GST bacterianas se realizó usando el CDNB como sustrato, pero esta actividad es rara en

bacterias y donde fue posible detectarla los niveles fueron muy bajos (Fahey y Sundquist, 1991; Penninckx y Elskens, 1993). A pesar de ello fue posible purificar varias GST bacterianas, e incluso varias de ellas presentan actividad sobre sustratos como ácido etacrínico, hidroperóxido de cumeno, 1,2-dicloro-4-nitrobenzono, 1,2-epoxi-3-*p*-nitrofenil fosfato, nitrobenzil cloruro, tetracloro-*p*-hidroquinona y tricloro-*p*-hidroquinona (Vuilleumier, 1997).

El papel fisiológico de las GST bacterianas activas frente a CDNB no está claro, ya que no son enzimas abundantes en la célula (Iizuka *et al.*, 1989; Piccolomini *et al.*, 1989); sin embargo se les asocia con resistencia a antibióticos (Perito *et al.*, 1996) y con respuestas a estrés oxidativo dado que algunas tienen actividad alquil peroxidasa (Piccolomini *et al.*, 1989). Por otro lado está la familia de las fosfomicina/glioxalasa, las cuales generan resistencia a la fosfomicina, un antibiótico de amplio espectro producido por cepas de *Streptomyces*, que inactiva a una de las enzimas encargada de catalizar el primer paso de la biosíntesis del peptidoglicano (Kahan *et al.*, 1974).

En *Proteus mirabilis* se han descrito tres GST y una de ellas, la isoforma PmGST B1-1, es activa frente a hidroperóxido de cumeno, ácido etacrínico y 1,2-epoxi-3-*p*-nitrofenoxipropano, los cuales son sustratos de algunas GST de eucariotas (Di Ilio *et al.*, 1988). La expresión del gen que codifica para esta proteína aumenta cuando la bacteria se somete a estreses por CDNB, H₂O₂, fosfomicina o tetraciclina. La viabilidad del mutante para este gen se reduce cuando se expone a estrés oxidativo causado por H₂O₂ (Allocati *et al.*, 2003). Esto sugiere que PmGSTB1-1 está involucrada en la protección frente a estrés oxidativo y en la detoxificación de agentes antimicrobianos.

Otras secuencias de posibles GST se han detectado en otros géneros bacterianos pero su función aún es desconocida. Algunas se relacionan con la degradación de compuestos halogenados, como el producto del gen Bphk de *Pseudomonas sp.* que hace parte del operón relacionado con la degradación de bifeniles (Hofer *et al.*, 1994) o sus homólogos en *Cycloclasticus oligotrophus*. Dicho gen está relacionado con el metabolismo de hidrocarburos aromáticos (Wang *et al.*, 1996). Otro ejemplo es el gen *orf3* de *Burkholderia cepacia*, que codifica para otra GST putativa pero de función desconocida, aunque podría estar relacionada con la mineralización del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético. Sin embargo, no se detectó actividad de esta proteína sobre CDNB cuando se expresó en *E. coli* (Daubaras *et al.*, 1995). Está claro que las GST de estos operones no son esenciales para la supervivencia de

las bacterias en condiciones de crecimiento con base en los correspondientes compuestos aromáticos, y posiblemente tienen algún papel en rutas metabólicas específicas.

Como se mencionó anteriormente, las fosfomicin/glioxilasas están relacionadas con la degradación de la fosfomicina [ácido-(1R,2S)-epoxipropilfosfónico]. La resistencia a este antibiótico en la familia Enterobacteriaceae está mediada por un plásmido que codifica una proteína conocida como FosA la cual cataliza la adición de GSH a la molécula de antibiótico convirtiéndolo en un compuesto inactivo (Arca *et al.*, 1990b). Esta GST es una metaloproteína dependiente de Mn(II) que requiere K⁺ para su óptima actividad catalítica (Arca *et al.*, 1988; Arca *et al.*, 1990a; Arca *et al.*, 1990b) y por homología de secuencia se han encontrado y caracterizado genes de este mismo tipo en especies como *Pseudomonas aeruginosa* los cuales confieren resistencia a la fosfomicina cuando se expresan en *E. coli* (Rife *et al.*, 2002; Rigsby *et al.*, 2004; Beharry y Palzkill, 2005). En los genomas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* se ha detectado la secuencia de una proteína similar a FosA pero con una homología menor (FosB). Estas proteínas se encargan de agregar L-cisteína en vez de GSH a la molécula de fosfomicina, aunque no necesita de K⁺ o de otro catión monovalente para su actividad óptima (Cao *et al.*, 2001). Está claro además que la ramificación en la evolución de esta enzima está dada por la incapacidad de estas especies bacterianas grampositivas para sintetizar GSH, aunque la concentración de L-cisteína en ellos se considera baja (Rigsby *et al.*, 2005). También se ha descrito una tercera clase de proteínas, la FosX, que tiene actividad fosfomicina hidrolasa. Esta enzima es sintetizada en cepas de *Mesorhizobium loti* y *Listeria monocitogenes* y ha sido descrita con detalle en cuanto a su estructura y mecanismo bioquímico, el cual es muy parecido al de FosA y FosB (Fillgrove *et al.*, 2003).

1.5.2. GST EN PLANTAS

Las GST vegetales se clasifican en ocho clases diferentes (Edwards y Dixon, 2005). Las clases Phi y Tau son específicas de plantas; representan las dos clases dominantes de la superfamilia y comparten similitudes funcionales con las GST que metabolizan fármacos en animales. Las enzimas que pertenecen a estas clases son diméricas y catalizan la conjugación de un rango amplio de xenobióticos dentro de los cuales se encuentran los herbicidas. Las enzimas de las clases Zeta y Theta encontradas en plantas también son diméricas y tienen homólogos en animales y

hongos. La clase Theta de plantas tiene actividad limitada sobre xenobióticos pero es muy activa como GPx catalizando la reducción de hidroperóxidos lipídicos a los monohidroalcoholes respectivos. Esta es una actividad antioxidante importante en plantas, habiéndose comparado las GST de la clase Theta de plantas con las GPx de mamíferos que participan en la tolerancia al estrés (Edwards y Dixon, 2005). Recientemente se han descrito las clases Lambda y DHAR, que también son específicas de plantas y difieren de las demás GST vegetales en que son diméricas y actúan como tiol-oxidoreductasas dependientes de GSH, además de ser enzimas conjugantes. Finalmente, las plantas también contienen genes que codifican para GST microsomales y, aunque no están relacionadas estructuralmente con la superfamilia de GST del mismo nombre, comparten su actividad GST. En *A. thaliana* se ha descrito sólo un gen para GST microsomal, pero otras especies de plantas pueden tener más genes. Sin embargo, no se ha descrito ningún trabajo sobre la caracterización de estas enzimas microsomales en plantas (Edwards y Dixon, 2005).

1.5.4. GST EN INSECTOS

Dentro del reino animal, las especies que pertenecen a la clase *Insecta* han evolucionado de manera independiente y con una alta diversidad. Algunos insectos resultan ser un problema considerable para el desarrollo de la agricultura, ya sea por dañar directamente los cultivos o por ser vectores de diversos fitopatógenos. Hace más de cincuenta años se introdujeron rápidamente en la naturaleza compuestos sintéticos para el control de los insectos en las cosechas y esta introducción rápida hizo que ellos desarrollaran mecanismos de defensa bastante eficientes frente a estos compuestos químicos. La rapidez con la que los insectos ganan resistencia resulta ser un campo de interés en la industria agroalimentaria con el fin de desarrollar estrategias que permitan combatir a las especies fitopatógenas emergentes. Por otra parte, el control de los insectos también tiene una importancia biomédica y veterinaria, ya que algunas especies son vectores de parásitos o bacterias que afectan considerablemente la salud de los mamíferos.

La resistencia causada por la metabolización de los insecticidas puede involucrar una o la combinación de varias enzimas, como pueden ser el sistema del citocromo P450, las GST, las carboxiesterasas y otras enzimas de las fases I o II de la detoxificación (Ketterman *et al.*, 1991). Se han purificado GST en más de 24 especies diferentes de insectos; estas proteínas se expresan en niveles altos y en diferentes

etapas del desarrollo (Zhou y Syvanen, 1997). Otro aspecto importante es que la expresión de estas enzimas es alta en especies resistentes a insecticidas como el DTT (Fournier *et al.*, 1992; Tang y Tu, 1994; Ranson *et al.*, 1997b; Brogdon y McAllister, 1998; Hemingway, 2000; Hemingway y Ranson, 2000) y la conjugación con GSH es un mecanismo secundario en la resistencia a los insecticidas del grupo de los organofosfatos (Hemingway, 2000).

Las GST de insectos se han clasificado en dos grupos inmunológicamente diferenciados (I y II), teniendo algunas homología con las clases Omega, Zeta, Sigma y Theta (Ranson y Hemingway, 2005). Las clases Delta y Epsilon están compuestas por enzimas que se encuentran exclusivamente en insectos. En contraste, no se han encontrado enzimas de las clases Alpha, Mu y Pi en las especies de insectos analizadas. Las GST de clase I o Delta, antes clasificadas en la clase Theta, se han identificado en especies como *Musca domestica*, *D. melanogaster*, *Anopheles gambiae* (Ranson *et al.*, 1997a), *Anopheles dirus* y *Lucilia cuprina* (Wilce *et al.*, 1995). La clase II se ha identificado en *Manduca sexta* y *D. melanogaster* y son similares a las enzimas de la clase Sigma (Beall *et al.*, 1992; Snyder y Maddison, 1997). Las enzimas de la clase Epsilon tienen actividad baja sobre CDNB y se han relacionado con la detoxificación de insecticidas (Huang *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2001; Ortelli *et al.*, 2003). En las clases Delta, Epsilon y Sigma se detectó actividad peroxidasa sobre el sustrato hidroperóxido de cumeno (Singh *et al.*, 2001), lo cual puede ser importante en la protección frente a estrés oxidativo (Ortelli *et al.*, 2003; Lumjuan *et al.*, 2005).

Las GST de diferentes especies de mosquitos también han sido estudiadas, sobre todo las del vector de la malaria *A. gambiae* (Ranson *et al.*, 1997a). Varias GST se identificaron también en el genoma de *Aedes aegypti*, algunas de las cuales ya han sido caracterizadas (Lumjuan *et al.*, 2005).

Se conoce muy poco acerca de los sustratos endógenos de este conjunto de enzimas en el metabolismo de los insectos. Se especula que participan en el transporte intracelular, vías de señalización, vías de biosíntesis o en el metabolismo de algunos componentes de su dieta como los compuestos aleloquímicos (Ranson y Hemingway, 2005), que son sustancias naturales encargadas de transmitir información entre individuos de especies distintas determinando una respuesta de comportamiento o fisiológica (Pickett *et al.*, 1999). Se ha identificado una GST expresada específicamente en las antenas de *M. sexta*, la cual participa en la detección de feromonas sexuales.

Estas moléculas de olor o señales olfativas deben ser degradadas para iniciar la respuesta sensorial o de comportamiento de los insectos (Rogers *et al.*, 1999).

Por otra parte, los mosquitos que se alimentan de sangre humana tienen que enfrentarse a estrés oxidativo durante la digestión de la hemoglobina, ya que durante este proceso se generan cantidades considerables de ROS y esto indicaría la importancia de la actividad peroxidasa de las GST en dichos insectos (Ranson y Hemingway, 2005). También es importante el estado redox de las células del mosquito para la supervivencia del parásito que puedan transportar. Es el caso del *Plasmodium*, causante de la malaria, el cual utiliza las glándulas salivales del mosquito para llevar a cabo una parte de su reproducción sexual. La respuesta inmune del mosquito involucra una respuesta oxidativa y las especies que están bajo un estrés oxidativo crónico son incapaces de permitir el desarrollo del parásito (Kumar *et al.*, 2003). Este mecanismo de defensa del insecto contra el parásito requiere el balance de las enzimas antioxidantes para prevenir el daño tisular de las glándulas salivales y no queda claro si los mosquitos con alta actividad GST son mejores vectores de la malaria (Ranson y Hemingway, 2005).

1.5.5. GST EN PARÁSITOS

Parásitos como *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* y *Ascaris lumbricoides* son helmintos que afectan la salud humana. Estos parásitos se caracterizan por tener sistemas de detoxificación limitados y carecer de las reacciones de detoxificación del sistema del citocromo P450 (Precious y Barrett, 1989), por lo que tienen una actividad GST alta en la fase II de detoxificación celular y además aumentan su expresión en respuesta al tratamiento con fármacos (Brophy y Barrett, 1990). Por otra parte, se ha propuesto que los sistemas antioxidantes son esenciales en los helmintos para defenderse de las ROS generadas por los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos del huésped (Callahan *et al.*, 1988), además de las funciones normales de un organismo aerobio. Por lo tanto, las GST son dianas interesantes para el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos y de vacunas.

A. lumbricoides es un gusano que infecta a más de mil millones de personas en el mundo. Aunque no es fatal a corto plazo, tiene efectos debilitantes sobre todo en niños, causando condiciones clínicas serias. Aunque no se ha descrito en esta especie,

a partir de *Ascaris suum* se clonó y secuenció una GST similar a la clase Pi aunque con una homología limitada (entre el 34 y 37%) (Liebau *et al.*, 1997).

El género *Schistosoma* está constituido por un grupo de helmintos causantes de la esquistosomiasis que afecta a más de 275 millones de personas en el mundo. Las GST de este género se han estudiado con cierto detalle, ya que se les atribuye la resistencia al praziquantel, el medicamento más usado en el tratamiento de esta parasitosis. El mecanismo de resistencia se debe principalmente a la unión directa de las GST con el compuesto químico, lo cual recuerda la unión de los esteroides con la rGSTA1-1 (Barycki y Colman, 1997). En *S. mansoni* se han descrito cinco GST (SmGST-1 hasta SmGST-5). SmGST-5 se caracteriza por su inestabilidad y por catalizar la conjugación de epóxidos y de diclorovos, la forma activa del metrifonato. (O'Leary y Tracy, 1991). Posteriormente se caracterizó con detalle una GST de la clase Omega con baja actividad sobre CDNB y con actividad tiol transferasa y DHAR. Esta última actividad pone en evidencia la existencia de una vía del ácido ascórbico en este parásito (Girardini *et al.*, 2002).

Las filarias son otra clase de nemátodos que causan la filariasis, que también afecta a unos mil millones de personas de cuatro continentes. La filariasis linfática es propagada por la picadura de mosquitos vectores hembras que transportan los nemátodos de una persona a otra y pueden permanecer en el cuerpo humano o de los mamíferos durante muchos años. Como consecuencia pueden dejar ceguera, atrofia de las extremidades inferiores por oclusión de las vías linfáticas o atrofia dérmica. La presencia de estos parásitos genera también una eosinofilia muy alta comparada con otras infecciones por helmintos (Gupta y Srivastava, 2006). Uno de los mecanismos importantes para la supervivencia de estos parásitos es el metabolismo del GSH y dado que en esta vía intervienen un número considerable de enzimas, entre ellas las GST, se le considera un punto de ataque para el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la filariasis. A partir del cDNA de *Onchocerca volvulus* se han purificado y caracterizado tres GST (Liebau *et al.*, 1994b; 1994a; Kampkotter *et al.*, 2003). Las filarias adultas sobreviven a la respuesta inmune directa que genera el huésped; se ha propuesto que las GST pueden contribuir a esta persistencia en el organismo (Liebau *et al.*, 1994b), teniendo en cuenta que Ov-GST3 se induce bajo estrés oxidativo (Kampkotter *et al.*, 2003). La inhibición de ambas GST en el parásito le priva del mayor sistema de defensa contra el estrés oxidativo causado por el sistema inmunológico, lo

cual no le permite sobrevivir (Sharp *et al.*, 1991; van Bladeren y van Ommen, 1991; Brophy y Pritchard, 1994; Liebau *et al.*, 1994b).

También se han identificado cuatro GST en *Fasciola hepatica* (Fh-1, -7, -47 y -51), otro helminto que obstruye las vías biliares y que afecta en mayor proporción a animales herbívoros y en menor proporción al hombre. Se conoce la estructura de Fh-47, la cual es similar a la estructura de *Schistosoma japonicum* (Rossjohn *et al.*, 1997). Las cuatro proteínas Fh tienen diferencias en sus estructuras, lo cual se manifiesta en diferencias inmunológicas y de unión al sustrato (Salvatore *et al.*, 1995).

El género *Taenia* pertenece al grupo de los céstodos, tratándose de parásitos obligados permanentes que pueden colonizar el intestino (teniasis intestinal) o causar cisticercosis. Se han purificado varias GST de diferentes especies de tenias (*T. solium*, *T. saginata*, *T. taeniaeformis*, y *T. crassiceps*) y los anticuerpos generados contra ellas no tienen reacción cruzada con las GST de mamíferos ni con la presente en *S. japonicum* (Vibanco-Perez *et al.*, 1999).

Otra especie de parásito en el que se ha aislado una GST es *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. A partir de cDNA de epimastigotes (una de las etapas de desarrollo del parásito) se identificó la secuencia TcAc2 homóloga a la GST27 de *D. melanogaster* (Schoneck *et al.*, 1994). Dada esta similitud, se presume que este gen es importante para la adaptación de *T. cruzi* al microambiente sanguíneo.

Otro parásito de gran interés es *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria y de 2 millones de muertes humanas al año. Esta enfermedad emergente está aumentando su distribución geográfica y el parásito ha desarrollado mecanismos de resistencia contra los fármacos actualmente disponibles. El genoma completo de esta especie está secuenciado y a partir de esta información se identificó y caracterizó una única GST, denominada PfGST (Schoneck *et al.*, 1994; Burmeister *et al.*, 2003; Hiller *et al.*, 2006). Esta enzima resulta de gran interés por dos razones: i) ciertos fármacos antimaláricos como la cloroquina y el azul de metileno posiblemente influyen en el metabolismo del GSH en el parásito donde la PfGST está involucrada; ii) PfGST posiblemente juega un papel importante en la resistencia a los fármacos antimaláricos ya que su expresión está elevada en cepas resistentes a la cloroquina (Srivastava *et al.*, 1999). Esta enzima no tiene similitud estructural con ninguna de las clases de GST descritas y la mayor diferencia se observa en el dominio C-terminal de unión al sustrato.

Esta GST resulta ser una diana terapéutica interesante ya que la inhibición de la actividad de la enzima podría crear un desequilibrio en la detoxificación mediada por GHS, incrementar los niveles de peróxidos citotóxicos y finalmente incrementar la concentración de tóxicos intracelulares en el parásito (Deponte y Becker, 2005). PfGST tiene actividad sobre CDNB, DCNB, bromosulfoftaleína, ácido etacrínico, se une a la hemin/ferritoproporfirina IX y tiene actividad peroxidasa sobre hidroperóxido de cumeno (Hiller *et al.*, 2006). Esta última actividad resulta útil en el microambiente del eritrocito dado que el parásito consume cantidades importantes de hemoglobina y está expuesto continuamente a un ambiente oxidante dentro del eritrocito (Becker *et al.*, 2004).

1.6. GST EN HONGOS

1.6.1. DIVERSIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

Se conoce relativamente poco acerca de la presencia y papel biológico de las GST en los hongos. Sin embargo se conocen isoformas y existen estudios sobre estas enzimas en *S. cerevisiae* (Choi *et al.*, 1998), *Schizosaccharomyces pombe* (Kim *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002; Veal *et al.*, 2002), *Aspergillus nidulans* (Fraser *et al.*, 2002), *Aspergillus fumigatus* (Burns *et al.*, 2005), *Issatchenkia orientalis* (Tamaki *et al.*, 1999), *Yarrowia lipolytica* (Foley y Sheehan, 1998; McGoldrick *et al.*, 2005a), *Cunninghamella elegans* (Cha *et al.*, 2001), *Mucor circinelloides* (Dowd y Sheehan, 1999), *Mucor mucedo* (Hamed *et al.*, 2005) y *Phanerochaete chysosporium* (Dowd *et al.*, 1997).

Las GST de hongos tienen patrones de expresión diferentes y algunas isoformas se expresan en presencia de xenobióticos o bajo estrés oxidativo. Por ejemplo, en las dos GST de *I. orientalis* solo una se expresa constitutivamente y ambas se inducen en presencia de *o*-dinitrobenceno (*o*-DNB) (Tamaki *et al.*, 1999). Por otra parte, *A. fumigatus* tiene tres genes que codifican para GST, *gstA-C* (Burns *et al.*, 2005). Los genes *gstA* y *gstC* tienen una expresión basal baja pero se sobreexpresan en presencia de CDNB y peróxido de hidrógeno, mientras que *gstB* sólo se expresa en presencia de CDNB. Además, las proteínas que codifican estos genes tienen actividad GST sobre el sustrato CDNB y GPx sobre peróxido de hidrógeno. *A. nidulans* también expresa una GST denominada GstA. Esta GST también se sobreexpresa en presencia de CDNB o peróxido de hidrógeno y tiene un papel importante en la resistencia a metales pesados (Fraser *et al.*, 2002). En *S. pombe* las tres GST se inducen bajo estrés oxidativo y son codificadas respectivamente por los genes *gst1* y *gst2* o *gst3*. Los

mutantes simples para estos tres genes son más sensibles al antifúngico fluconazol (Veal *et al.*, 2002), indicando así el papel de las GST en la tolerancia a los fármacos.

Muchas de estas GST no se pueden clasificar en ninguna de las clases caracterizadas por criterios inmunológicos, estructurales o catalíticos. Adicionalmente se han encontrado por análisis bioinformático otras 67 secuencias similares a GST en 21 especies diferentes de hongos (McGoldrick *et al.*, 2005b). Estas secuencias fueron comparadas y clasificadas dentro de cinco grupos diferentes: 1, 2, EF1B γ , MAK16 y Ure2. En el grupo 1 se incluye Gst3 de *Schizosaccharomyces pombe*, Gtt1 de *S. cerevisiae*, una GST de *Kluyveromyces lactis*, dos GST de *Debaromyces hansenii*, y dos secuencias de *Candida albicans*. En el grupo 2 están las GST de *Y. lipolitica*, Gst1 de *Botyrotinia fuckelinia*, GstA de *A. nidulans* y una secuencia de *D. hansenii*. El grupo de EF1B γ consiste en enzimas que tienen similitud estructural con esta subunidad del factor de elongación eEF1 de *S. cerevisiae*. eEF1 es un complejo responsable de la elongación en la síntesis proteica y en él están incluidas EF-1A, que une los aminoacil-tRNAs a la subunidad 80S del ribosoma, y EF-1B. A su vez, EF-1B está compuesta por dos subunidades: EF-1B α y EF-1B γ . Esta última tiene homología en su extremo N-terminal con las GST y está codificada en el gen *TEF3* (Koonin *et al.*, 1994). Aunque todas las EF-1B γ de hongos tienen este dominio N-terminal, el dominio C-terminal es de tamaños variados en cada especie. Por ejemplo, *A. nidulans* sólo tiene el dominio N-terminal GST (Koonin *et al.*, 1994). Esto indicaría que la funcionalidad de estas proteínas estaría en el dominio homólogo con las GST y una evidencia de ello es la actividad CDNB de EF-1B γ de *Oryza sativa* expresada en *E. coli* (Kobayashi *et al.*, 2001). Adicionalmente se ha determinado la estructura cristalina del dominio N-terminal de la proteína EF-1B γ , codificada por el gen *TEF3* en *S. cerevisiae*. Se ha observado que esta proteína tiene la estructura común de las GST y hace parte de un complejo que se une al promotor del gen *MSRA* en *S. cerevisiae*, el cual codifica para la metionin sulfóxido reductasa (Jeppesen *et al.*, 2003). Esto sugiere que Tef3 puede tener un papel regulador en la expresión de la metionin sulfóxido reductasa y por ende, participar en la respuesta a estrés oxidativo (Hanbauer *et al.*, 2003). Una explicación para esta relación posiblemente está en que Tef3 protege la síntesis proteica del estrés oxidativo (McGoldrick *et al.*, 2005b).

Mak16 es una proteína nuclear importante en la progresión del ciclo celular y en la biogénesis de las subunidades ribosomales 60S. Se ha relacionado esta proteína con las GST ya que los anticuerpos contra la GST de *S. mansoni* tienen una reacción

cruzada con la Mak16 de esta misma especie y además comparte un 43% de identidad y un 66% de similitud con su homóloga en *S. cerevisiae* (Wickner *et al.*, 1987; Milhon *et al.*, 2000). Todas las proteínas de este grupo tienen un dominio MAK16 conservado pero muestran una identidad del 30% con las GST microsomales humanas, lo que puede estar indicando que componen un grupo distinto de GST en hongos y levaduras, y que pueden estar relacionadas con la superfamilia de las MAPEG y la clase Kappa (McGoldrick *et al.*, 2005b).

La proteína Ure2 es un factor de transcripción presente en *S. cerevisiae* involucrado en la represión dependiente de nitrógeno de la vía de utilización del ureidosuccinato y que tiene similitud estructural con las GST en su extremo C-terminal (Bousset *et al.*, 2001). La relación entre Ure2 y las GST no se ha determinado, pero Ure2 tiene actividad peroxidasa, tanto en su forma nativa como en la forma fibrilar amiloide, a pesar de la ausencia de residuos activadores de GSH (Bai *et al.*, 2004). El papel conocido de Ure2 es prevenir que el factor de transcripción Gln3 entre en el núcleo, pero la naturaleza de esta interacción es hasta ahora desconocida.

Todos los estudios anteriores sugieren que las secuencias similares a las GST están ampliamente distribuidas en los hongos, y que posiblemente tienen funciones diversas (McGoldrick *et al.*, 2005b).

1.6.2. LAS PROTEÍNAS Gtt EN *S. cerevisiae*

Además de las secuencias homólogas a las GST mencionadas anteriormente, se han caracterizado dos genes denominados *GTT1* y *GTT2* en *S. cerevisiae*, los cuales codifican para dos GST funcionales (Choi *et al.*, 1998). Estas proteínas sólo comparten aproximadamente un 50% de similitud con las GST de otros organismos y tienen actividad GST sobre el sustrato CDNB. Utilizando el sistema de doble híbrido se comprobó que ambas proteínas forman homodímeros y no heterodímeros (Choi *et al.*, 1998). Por fraccionamiento celular se determinó que Gtt1 está asociada al RE, ya que Gtt1 y la proteína dolicol-fosfato sintasa, un marcador del retículo endoplásmico, se encontraban siempre en la misma fracción y que la distribución de los demás marcadores celulares era claramente diferente.

La expresión de *GTT1* y *GTT2* se induce en el cambio diáxico durante el crecimiento poblacional y se mantiene en niveles altos durante la fase estacionaria. Los

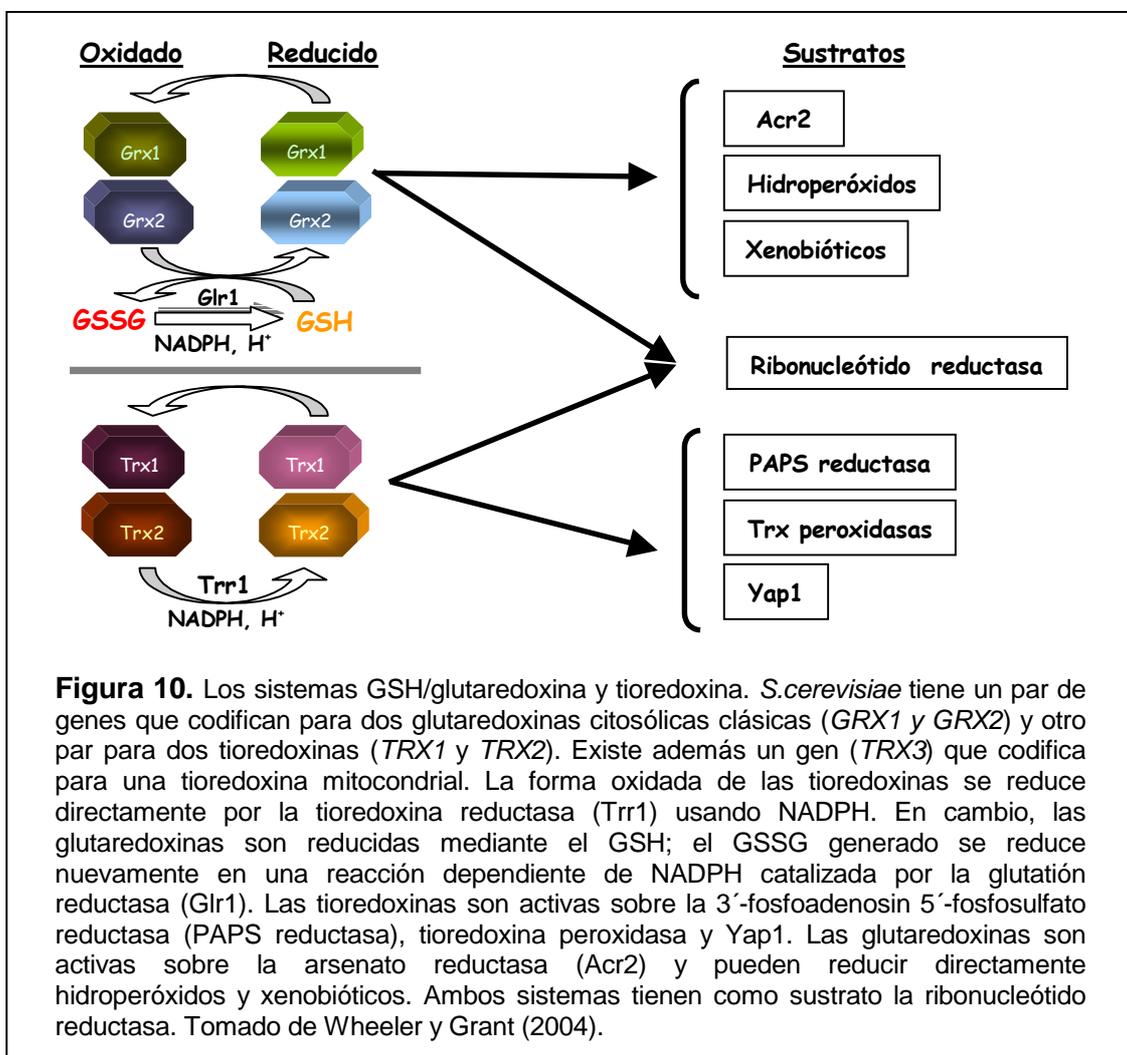
mutantes simples y el doble son viables, demostrando que no son genes indispensables para la supervivencia de la levadura. Sin embargo, los mutantes simples son sensibles al choque térmico durante la fase estacionaria, crecen de manera limitada a 39°C y la doble mutación no tiene un efecto aditivo sobre el choque térmico o la exposición al CDNB (Choi *et al.*, 1998). Esto indica que Gtt1 y Gtt2 tienen una función solapante durante la fase estacionaria.

Aunque la homología de Gtt1 respecto a las GST de otros organismos es limitada, la actividad GST de Gtt1 y Gtt2 se manifiesta *in vitro* e *in vivo*, y esta última se detecta tanto en lisados de levaduras como de *E. coli* que sobreexpresan la forma recombinante. La K_m sobre GSH y CDNB es de 0,6 y 3,3 mM respectivamente, con una V_{max} de 500 nmol/min·mg. Por otro lado, la actividad de Gtt2 es menor comparada con Gtt1; los valores en este caso son: K_m de 0,2 mM para CDNB y 5 mM para GSH con una V_{max} de 340 nmol/mg·min (Choi *et al.*, 1998). La región promotora de *GTT1* contiene un elemento de respuesta a xenobióticos (XRE) el cual es común en los genes GST de mamíferos (Paulson *et al.*, 1990). Otras secuencias que están repetidas varias veces en este promotor son el elemento de respuesta a estrés (STRE) (Rushmore *et al.*, 1991; Schuller *et al.*, 1994; Martinez-Pastor *et al.*, 1996) y el elemento de cambio postdiáuxico (PDS) (Boorstein y Craig, 1990), que son reconocidos respectivamente por los factores de transcripción Msn2/4 y Yap1 (Hasan *et al.*, 2002; Toledano, 2003). Dada la sobreexpresión de *GTT1* durante el cambio diáuxico, las secuencias PDS del promotor son funcionales y regularían la sobreexpresión durante la fase estacionaria.

La inducción de *GTT1* y *GTT2* durante el cambio diáuxico y la sensibilidad al choque térmico de las cepas que carecen de uno o ambos genes demuestra que la función de las proteínas correspondientes está relacionada con la respuesta a estrés oxidativo y que aquellas son importantes durante la fase estacionaria; posiblemente la actividad GST de ambas proteínas es importante en la eliminación de los metabolitos que se acumulan durante la fase estacionaria o durante el estrés oxidativo. Otra alternativa es que Gtt1 y Gtt2 aumenten la estabilidad de otras proteínas bajo condiciones de estrés, y que el daño de algunas proteínas sea la principal causa de toxicidad y letalidad durante el choque térmico y otras condiciones de estrés en el mutante carente de Gtt1 y Gtt2 (Choi *et al.*, 1998).

1.7. RELACIÓN DE LAS GST CON LAS GLUTAREDOXINAS

Como se ha mencionado anteriormente, todos los organismos aerobios están expuestos a las ROS durante los procesos metabólicos normales o después de ser tratados con compuestos generadores de radicales libres. Para protegerse del daño oxidativo, las células cuentan con mecanismos de defensa efectivos que incluyen enzimas antioxidantes y secuestrantes de radicales libres (Yu, 1994). Dentro de los mecanismos de defensa de *S. cerevisiae* que se activan contra las ROS están los no enzimáticos como el glutatión y el ácido ascórbico, y los enzimáticos como las tioredoxinas (Trx), glutaredoxinas (Grx) y Gpx, entre otros (Wheeler y Grant, 2004).



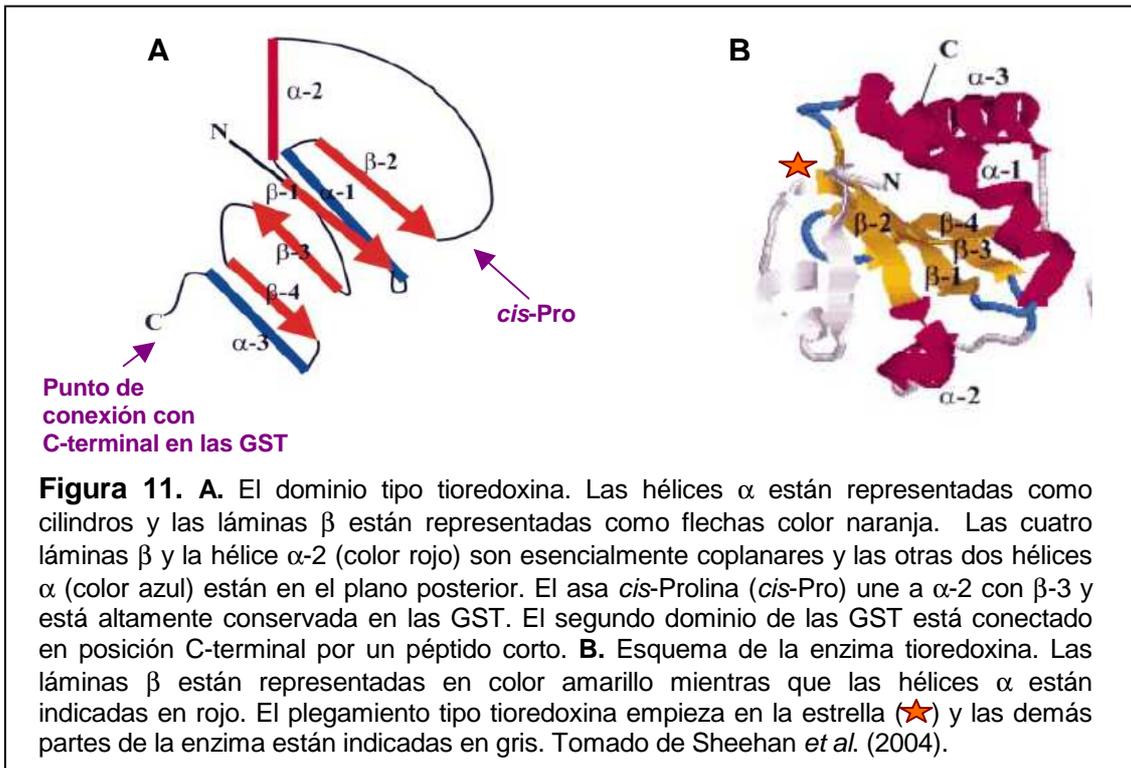
Las Trx son tiorredoxinas de pequeño tamaño que utilizan el NADPH para reducir las proteínas que han sido oxidadas por la acción de las ROS. Las Trx, el NADPH y la tioredoxina reductasa (Trr) forman el sistema tioredoxina.

Las Grx son oxidoreductasas que junto con NADPH, GSH y la glutatión reductasa (Glr) forman el sistema glutaredoxina. Estas oxidoreductasas transfieren electrones desde el NADPH a través del GSH. El GSH pasa a su forma oxidada (GSSG) y vuelve a su forma reducida por la acción de la glutatión reductasa (Glr) (Holmgren, 1989) (Figura 8). Las Grx catalizan la reducción de los puentes disulfuro formados entre los grupos tiol de una proteína (actividad proteína disulfuro reductasa) o los formados entre las proteínas y el GSH (actividad glutatión disulfuro oxidoreductasa) (Yang y Wells, 1991; Bushweller *et al.*, 1992). Dependiendo de la presencia de una o dos cisteínas en su centro activo, las Grx se clasifican en monotiólicas (Cys-Gly-Phe-Ser en su centro activo) y ditiólicas (Cys-Pro-Tyr-Cys en su centro activo) (Luikenhuis *et al.*, 1998; Fernandes y Holmgren, 2004). Las glutaredoxinas también catalizan la formación de disulfuros mixtos con GSH, un proceso llamado glutationilación, el cual juega un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo o en la regulación funcional de las proteínas en la transducción de señal (Cotgreave y Gerdes, 1998). Adicionalmente, las Grx en mamíferos tienen una lista creciente de funciones dentro de las cuales están la reducción del ácido dehidroascórbico, proliferación celular o la regulación de la actividad de factores de transcripción (Bandyopadhyay *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1999; Fernandes y Holmgren, 2004).

1.7.1. RELACIONES ESTRUCTURALES

Las GST comparten similitudes estructurales con las Trx y las Grx, lo cual se refleja en algunas actividades enzimáticas específicas. Con base en la similitud de la estructura terciaria del dominio N-terminal de las GST citosólicas, se deduce que el plegamiento presente en este dominio posiblemente ha evolucionado a partir de un progenitor común de las Trx y Grx (Armstrong, 1997). El dominio N-terminal de las GST adopta una topología similar al dominio tioredoxina, que consiste en cuatro láminas β rodeadas de hélices α . Este tipo de plegamiento está presente en varias familias de proteínas con una identidad de secuencia limitada, las cuales parecen haber evolucionado para permitir la unión de cisteína o GSH. Ejemplos de ello son la DsbA (enzima bacteriana equivalente a la disulfuro isomerasa), las Grx y las Gpx (Martin, 1995; Sheehan *et al.*, 2001) (Figura 11).

Se ha propuesto que las GST canónicas habrían evolucionado por la adición del dominio helicoidal de unión al sustrato al dominio tioredoxina. Sin embargo, la estructura de las GST mitocondriales parece indicar que este grupo en particular tuvo una vía de evolución paralela ya que la inserción del dominio de unión al sustrato ocurrió en medio del dominio tioredoxina (Hayes *et al.*, 2005) (Figura 11).



Teniendo en cuenta estas similitudes, resultan interesantes las características estructurales y enzimáticas de Grx2 de *E. coli* (Xia *et al.*, 2001). Esta enzima no reduce el ribonucleótido reductasa como generalmente lo hacen otras Grx o Trx, pero tiene una alta capacidad catalítica en la reducción de disulfuros mixtos de alto y bajo peso molecular. Un ejemplo de esto es la reducción de la arsenato reductasa, donde Grx2 es 100 veces más eficiente que Grx1 y Grx3 en *E. coli* (Shi *et al.*, 1999). Estructuralmente Grx2 tiene dos dominios: el dominio N-terminal con un plegamiento típico de las tioredoxinas y el dominio C-terminal que está unido covalentemente con el dominio N-terminal a través de 11 residuos. El dominio C-terminal está compuesto por seis hélices α conectadas por asas y ambos dominios son necesarios para el plegamiento y la actividad de la proteína.

Al comparar la estructura reducida de Grx2 con las GST Theta y Omega humanas resultan ser similares (Xia *et al.*, 2001). Grx2 y las GST cuentan con una

prolina antes de la lámina β_3 , que está muy conservada tanto en Trx/Grx como en las GST. Como se mencionó en el apartado 1.2.3.1., esta prolina es la parte inicial del elemento estructural de las GST que reconoce la porción γ -glutamil del GSH y es importante para mantener el plegamiento total del dominio N-terminal. En las Trx/Grx, este residuo es especialmente importante en la dinámica de las formas oxidada y reducida (Kelley y Richards, 1987).

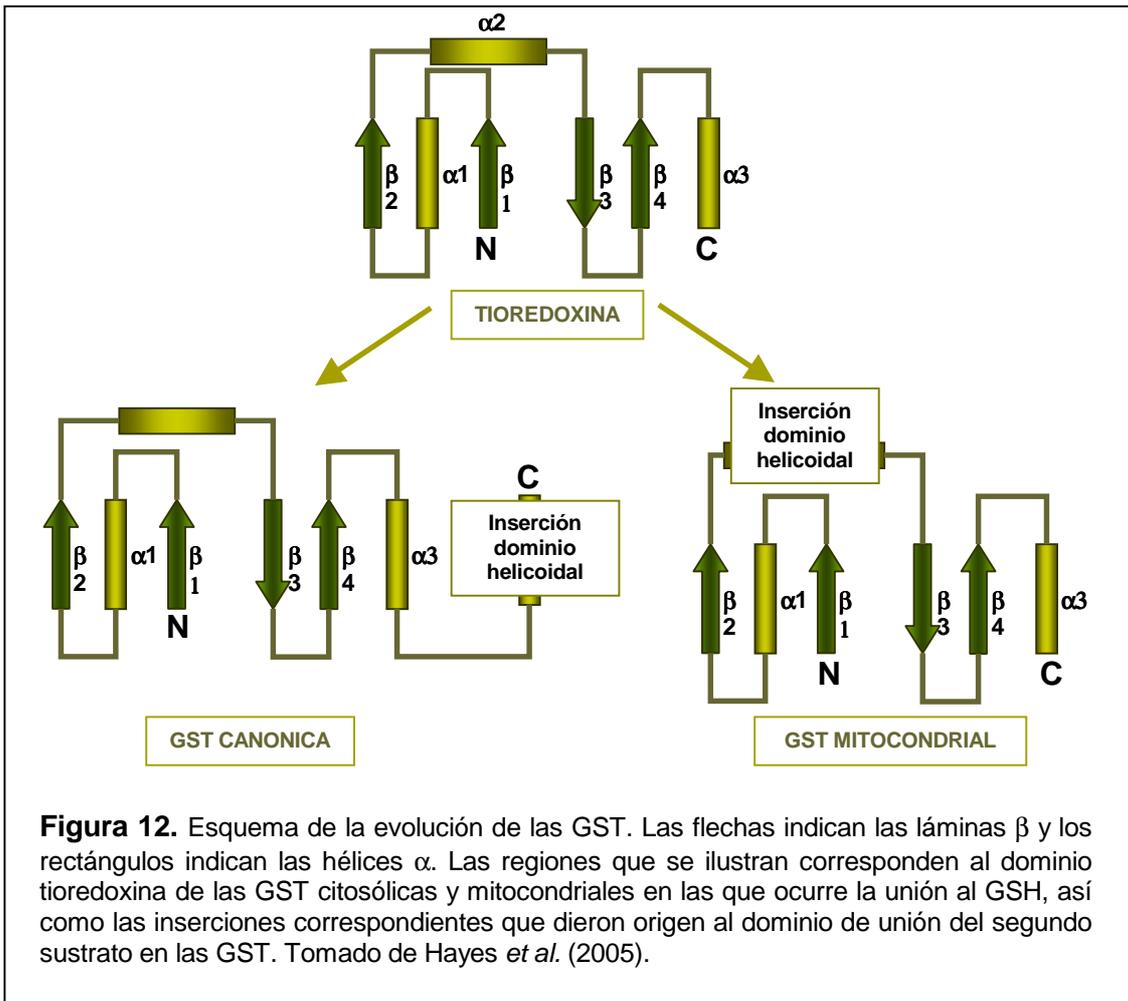
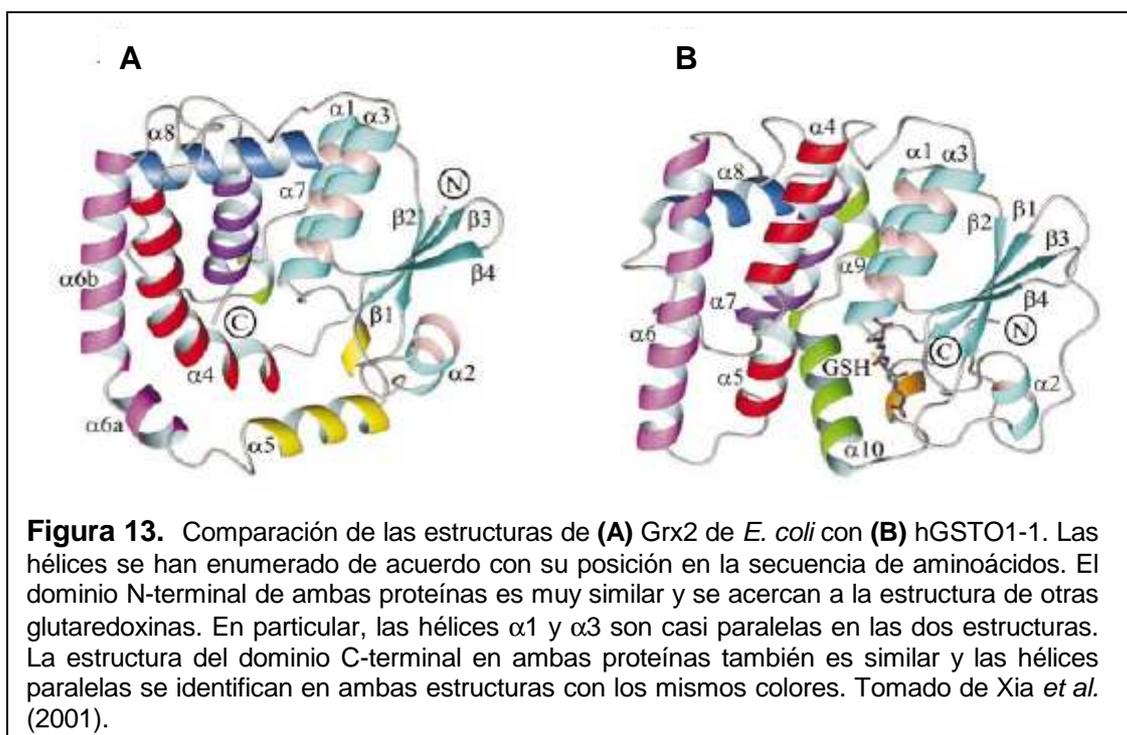


Figura 12. Esquema de la evolución de las GST. Las flechas indican las láminas β y los rectángulos indican las hélices α . Las regiones que se ilustran corresponden al dominio tioredoxina de las GST citosólicas y mitocondriales en las que ocurre la unión al GSH, así como las inserciones correspondientes que dieron origen al dominio de unión del segundo sustrato en las GST. Tomado de Hayes *et al.* (2005).

La similitud estructural entre las GST y Grx2 sugiere que sus funciones están relacionadas: las GST clásicas participan en reacciones donde el GSH es covalentemente conjugado con compuestos carcinogénicos, quimioterapéuticos o productos de estrés oxidativo, mientras que Grx2 forma o elimina los disulfuros mixtos con GSH, protegiendo o interrumpiendo la actividad enzimática de las proteínas durante el estrés oxidativo. La similitud entre las GST y la familia de Trx/Grx se nota particularmente comparando la estructura de Grx2 y hGSTO1-1 (Xia *et al.*, 2001) (Figura 13).



1.7.2. RELACIONES FUNCIONALES EN *S.cerevisiae*

En *S. cerevisiae* se han descrito dos glutaredoxinas ditiólicas (Grx1 y Grx2) (Luikenhuis *et al.*, 1998), y tres monotiólicas (Grx3, Grx4 y Grx5) (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Esta clasificación se hace de acuerdo con la estructura de su centro activo, específicamente por la presencia de una o dos cisteínas en esta parte de la proteína. Las glutaredoxinas ditiólicas son enzimas multifuncionales que son necesarias para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo. Grx1 y Grx2 reducen los disulfuros mixtos formados entre GSH y HED, tienen actividad Gpx, reducen directamente los hidroperóxidos y tienen actividad GST sobre los sustratos cloro-dinitrobenceno (CDNB) y DCNB, siendo estas dos últimas actividades muy similares entre sí (Collinson *et al.*, 2002; Collinson y Grant, 2003). Por el contrario, Grx5 no tiene actividad glutaredoxina sobre el sustrato HED, y tampoco se detectó en ella actividad dehidroascorbato reductasa o Gpx (Tamarit *et al.*, 2003).

Estas características bioquímicas de Grx1 y Grx2 demuestran que tienen una actividad solapante con Gtt1 y Gtt2, lo que se manifiesta en el aumento de la sensibilidad del múltiple mutante a condiciones de estrés tales como exposición a xenobióticos o agentes oxidantes y choque térmico (Collinson y Grant, 2003). Curiosamente, el doble mutante *gtt1 gtt2* no muestra mayor sensibilidad al CDBN, lo que

sugiere que existe un sistema de detoxificación alternativo a las Gtt en *S. cerevisiae* (Choi *et al.*, 1998).

El análisis de las secuencias de Grx1 y Grx2 de *S. cerevisiae* y su comparación con hGSTO1-1 y SmGSTO muestra que hay cierta similitud entre ellas (Collinson y Grant, 2003). En esta comparación se identificaron residuos conservados localizados principalmente en el dominio N-terminal incluyendo la secuencia *cis*-Pro común en todas las GST. Además, el sitio de unión del GSH en hGSTO1-1 incluye a los residuos Pro-33 y Phe-31 que rodean a la Cys-32 del sitio activo, los cuales son equivalentes a Pro-28 y Tyr-26 en Grx1 y Grx2. Cabe recordar que las GTS de clase Omega tienen actividades oxidoreductasa dependiente de glutatión y DHAR, las cuales son características de las Grx clásicas (Board *et al.*, 2000; Whitbread *et al.*, 2005).

1.8. LAS GST Y SU RELACIÓN CON LOS PEROXISOMAS

Como se ha descrito en el apartado 1.3., las GST están localizadas en diferentes organelos celulares como núcleo, mitocondria y peroxisoma. En este último se han localizado GST de clase Kappa en humanos así como en ratón y rata (Morel *et al.*, 2004; Islinger *et al.*, 2006). La localización de estas proteínas en el peroxisoma lleva a la pregunta sobre su función y sus posibles sustratos. Muchas de las funciones del peroxisoma están relacionadas con el metabolismo de los lípidos, lo que incluye la α y β -oxidación de ácidos grasos y la producción final de acetil-CoA y acil-CoA (Wanders *et al.*, 2000). Se ha demostrado que las GST de clase Alpha son capaces de unirse al acil-CoA y a las moléculas xenobiotico-CoA (Silva *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta esta observación, la hipótesis planteada es que las GST peroxisomales podrían estar involucradas en el sistema regulador del acil-CoA o xenobiótico-CoA (Morel *et al.*, 2004).

Un aspecto importante de los peroxisomas es la producción de peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y otros radicales libres como consecuencia de las actividades metabólicas que allí se llevan a cabo (Moldovan y Moldovan, 2004). Aunque los peroxisomas contienen enzimas antioxidantes (como catalasa y superóxido dismutasa), los radicales libres representan la principal fuente de peroxidación lipídica que lleva a efectos deletéreos en la estabilidad de la membrana peroxisomal y a efectos directos en su función. Teniendo en cuenta esta característica y que hGSTK1-1 tiene actividad peroxidasa sobre los sustratos *tert*-butil hidroperóxido, hidroperóxido de cumeno y ácido 15-S-hidroxiperoxi-5,8,11,13-eicosatetraenóico, se podría establecer

una relación entre hGSTK1-1 y la detoxificación de los peróxidos lipídicos generados dentro del peroxisoma (Morel *et al.*, 2004).

Por otra parte, en células hepáticas de rata, se ha detectado la presencia de una misma GST en tres organelos diferentes: RE, mitocondria y peroxisoma, encontrándose en menor proporción en este último (Islinger *et al.*, 2006). Una característica importante de esta GST microsomal es la señal de localización al RE. Se sabe que esta señal se encuentra en C-terminal, ya que al construir proteínas de fusión colocando secuencias peptídicas como *myc* o FLAG en este extremo, esta señal se enmascara y la proteína se dirige entonces al peroxisoma. Sin embargo se desconoce la naturaleza de ambas señales y la función de esta mGST (Islinger *et al.*, 2006).

La importancia del peroxisoma en la salud humana se relaciona con la descripción de más de veinte enfermedades por anomalías peroxisomales. Las alteraciones en la biogénesis peroxisomal son causadas por mutaciones autosómicas recesivas que provocan un grupo de enfermedades genéticamente heterogéneas, y que se caracterizan por la deficiencia en múltiples funciones peroxisomales; muchas de estas deficiencias están relacionadas con la imposibilidad de importar proteínas en dicho organelo (Schrader y Fahimi, 2004). Las deficiencias en la biogénesis de los peroxisomas se caracterizan clínicamente por un déficit en el funcionamiento de ciertas rutas metabólicas como la regulación de los ácidos grasos de cadena larga y la síntesis de sales biliares o plasmalógenos (Sacksteder y Gould, 2000). Las enfermedades de origen peroxisomal están relacionadas con al menos 12 genes y se agrupan en dos categorías clínicas. La primera categoría es el espectro Zellweger compuesto por el síndrome de Zellweger, la adrenoleucodistrofia neonatal y la enfermedad infantil de Refsum; en la segunda categoría está la condrodisplasia punctata rizomélica clásica (Sacksteder y Gould, 2000). Estas enfermedades se manifiestan por problemas en el desarrollo y en algunos casos los pacientes solo viven algunos años después de nacer. También hay problemas neurológicos severos, como retardo mental e hipotonía, y los afectados pueden sufrir aberraciones oculares (Wanders, 2006).

1.8.1. FUNCIONES DE LOS PEROXISOMAS

Los peroxisomas son organelos comunes en muchas células eucarióticas, limitados por la típica bicapa lipídica y que alojan a más de 60 proteínas que catalizan diversas reacciones catabólicas o anabólicas (Reddy y Mannaerts, 1994). Dos de las

funciones de los peroxisomas conservadas a lo largo de la escala evolutiva son la β -oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de compuestos como el peróxido de hidrógeno y otras ROS, los cuales son generados por las oxidasas peroxisomales (Purdue y Lazarow, 2001).

Las demás funciones de los peroxisomas varían de acuerdo con el organismo y el tipo celular. En los peroxisomas de mamíferos se llevan a cabo procesos como la biosíntesis de lípidos (plasmalógenos, ácidos biliares, colesterol, dolicol y elongación de ácidos grasos), α -oxidación de ácidos grasos (ácido fitánico) y compuestos xenobióticos, procesos catabólicos (catabolismo de aminoácidos, poliaminas y purinas), metabolismo de glioxilato y la vía de la hexosa monofosfato (Schrader y Fahimi, 2004). En los peroxisomas de plantas también se lleva a cabo el metabolismo del glioxilato y la fotorespiración, mientras que los tripanosomas llevan a cabo allí la glicólisis. En el caso de las levaduras, procesos como la oxidación del metanol y la asimilación y oxidación de las aminas tienen lugar en este organelo (Purdue y Lazarow, 2001). Por lo que respecta a la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que en levaduras y plantas este proceso ocurre exclusivamente en los peroxisomas, en mamíferos y otros eucariotas superiores sucede tanto en peroxisomas como en mitocondrias (Wanders y Waterham, 2006). Se ha demostrado también que una parte de la vía de síntesis de la lisina se lleva a cabo en el peroxisoma de *S. cerevisiae* (Breitling *et al.*, 2002). La deficiencia de peroxisomas afecta la síntesis de lisina durante la fase de crecimiento exponencial de las levaduras en medio de cultivo completo, lo cual se relaciona con la sobreexpresión de varios genes implicados en esta ruta metabólica. En consonancia con ellos se han identificado señales de localización peroxisomal en varias de las proteínas que intervienen en la síntesis de la lisina, como son Lys1, Lys4 y Lys12 (Breitling *et al.*, 2002).

Las aproximaciones moleculares clásicas y bioinformáticas, junto con los análisis filogenéticos masivos de los proteómas peroxisomales de levadura y rata, han hecho posible desarrollar hipótesis sobre el origen y la evolución del proteóma de los peroxisomas (Gabaldón *et al.*, 2006). Al igual que las mitocondrias y los cloroplastos, los peroxisomas tienen la capacidad de internalizar proteínas postranscripcionalmente y multiplicarse a partir de los preexistentes durante la división celular. Con estas características se afirmó en un principio que los peroxisomas tienen un origen endosimbiótico, pero las evidencias actuales no son suficientes para sostener esta teoría (Gabaldón *et al.*, 2006). Además, se tienen evidencias claras sobre la formación de nuevos peroxisomas a partir del RE (Hoepfner *et al.*, 2005).

1.8.2. INTERNALIZACIÓN DE PROTEÍNAS PEROXISOMALES

La identificación y caracterización de los mutantes de *S. cerevisiae* defectuosos en la biogénesis de peroxisomas ha resuelto la mayor parte de las dudas sobre los procesos necesarios para llevar a cabo este proceso, lo cual incluye la identificación de las señales de localización peroxisomal (Wanders y Waterham, 2006). La información sobre las señales de localización peroxisomal se ha usado para buscar otras proteínas similares y sus correspondientes ortólogos en mamíferos. Esta estrategia, junto con los estudios clásicos de clonación y purificación de proteínas, ha permitido la identificación de muchas proteínas peroxisomales y su relación con los procesos metabólicos que allí se llevan a cabo (Wanders y Waterham, 2006).

Muchas de las proteínas peroxisomales de membrana y de matriz son sintetizadas en polisomas libres en el citoplasma y posteriormente son transportadas hasta este organelo (Lazarow y Fujiki, 1985). Muchas de las peroxinas o proteínas involucradas en la biogénesis de los peroxisomas (Pexp) están relacionadas con el importe de las proteínas de matriz y con la formación de la maquinaria que permite el paso del complejo de importe a través de la membrana peroxisomal (Purdue y Lazarow, 2001). Las proteínas de la matriz peroxisomal son internalizadas a través de dos receptores que reconocen dos señales de localización (PTS1 y PTS2). Las señales tipo PTS1 son tripéptidos localizados en el extremo C-terminal de la proteína y son reconocidas por Pex5, mientras que las señales tipo PTS2 están en la región N-terminal y son reconocidas por Pex7 (Subramani, 1996; Heiland y Erdmann, 2005). Por el contrario, las proteínas de membrana peroxisomal no tienen ninguna de estas dos señales y cuentan con una combinación de aminoácido básicos y uno o más dominios transmembranales que permiten la correcta inserción de estas proteínas en la membrana peroxisomal (Purdue y Lazarow, 2001). Al contrario que las proteínas importadas en el RE o en la mitocondria, se asume además que los receptores que acompañan a la proteína importada son reciclados y regresan al citosol (Gould y Collins, 2002).

1.8.3. LAS SEÑALES TIPO PTS1 Y SU SISTEMA DE INTERNALIZACIÓN

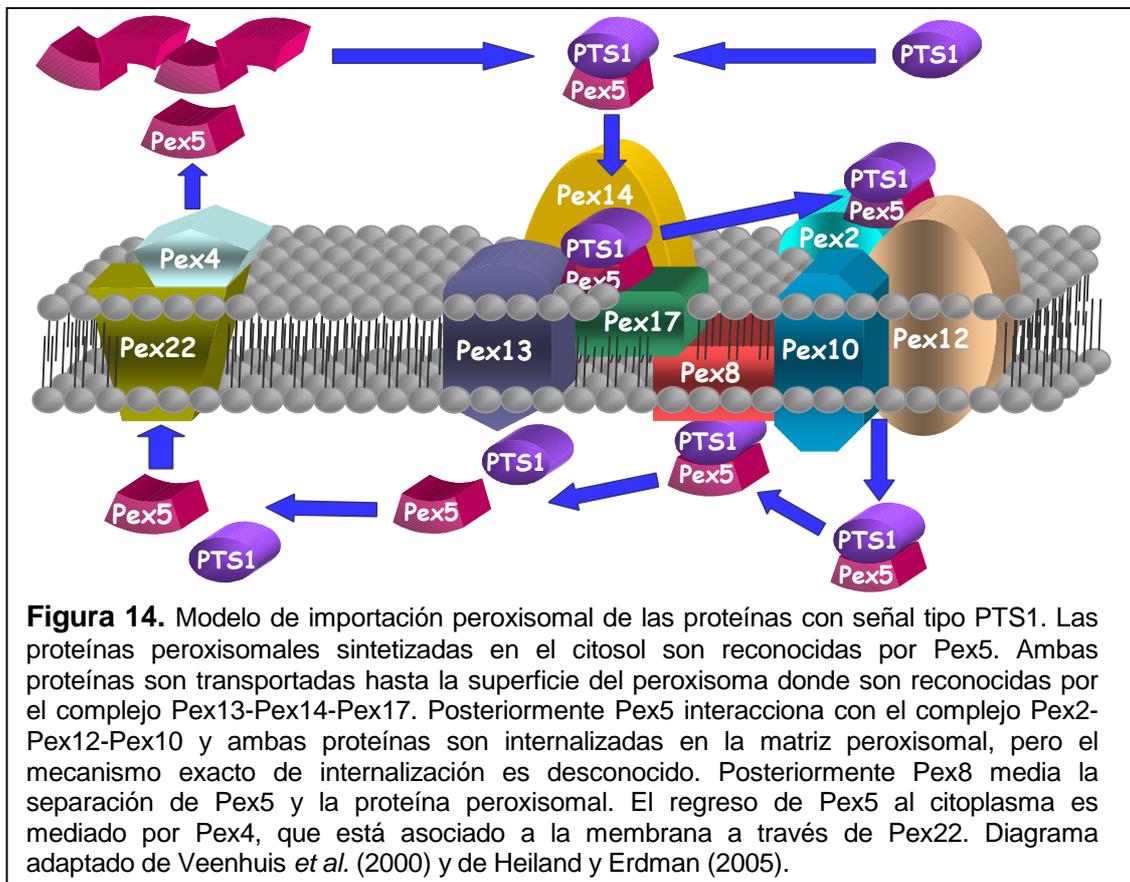
El proceso de internalización y las proteínas que intervienen en el mismo se han descrito en *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*

y en mamíferos (Sacksteder y Gould, 2000; Veenhuis *et al.*, 2000; Gould y Collins, 2002; Agne *et al.*, 2003). El mecanismo se describe en la Figura 12.

La señal consenso de localización tipo PTS1 se ha descrito como (S/A)-(K/R)-(L-M), pero no todas las variaciones son funcionales en todas las especies (Neuberger *et al.*, 2003). Esta señal de localización es reconocida por la proteína receptora Pex5. Esta proteína contiene un dominio de siete repeticiones tetratricopeptídicas o TPR que interactúan directamente con el tripéptido PTS1, siendo estas repeticiones necesarias para la internalización de la proteína diana (Klein *et al.*, 2001). Cuando Pex5 se une a la proteína diana, se despolimeriza y este complejo proteína(PTS1)-Pex5 es transportado hasta la superficie del peroxisoma para interactuar con Pex14 y Pex13, que a su vez están asociadas de manera independiente a Pex17 y Pex8 (Gould y Collins, 2002; Heiland y Erdmann, 2005). Posteriormente, este conjunto interactúa con el complejo Pex2-Pex10-Pex12 para internalizar Pex5 junto con la proteína diana. Una vez dentro del peroxisoma sucede la interacción con Pex8, que facilita la disociación de la proteína diana y Pex5. El regreso de Pex5 al citoplasma depende de Pex4, la cual está asociada a la membrana peroxisomal a través de Pex22. Aunque se ha demostrado que Pex5 se acumula en el interior de los peroxisomas de los mutantes para Pex4 de *H. polymorpha*, no se ha demostrado la relación directa entre el complejo Pex4-Pex22 y la salida de Pex5 del peroxisoma (Veenhuis *et al.*, 2000).

Actualmente se sabe poco acerca del mecanismo de internalización de las proteínas peroxisomales con señal tipo PTS2, pero se conoce la proteína con la que deben interactuar para llegar al interior del organelo. Las señales de localización peroxisomal tipo PTS2 se encuentran en la región N-terminal de la proteína diana y corresponden a la secuencia consenso (R/K)-(L/V/I)-(XXXXX)-(H/Q)-(L/A/F). Esta es reconocida por Pex7, una proteína citosólica que se caracteriza por tener una región de seis repeticiones triptófano-ácido aspártico dentro de un dominio conservado, el cual alcanza una longitud de 40 aminoácidos (Heiland y Erdmann, 2005). Este dominio es común en las proteínas de la familia WD-40, las cuales interactúan con los dominios TPR de algunas proteínas. Por otro lado, Pex7 interactúa con las proteínas Pex13/Pex14 (Albertini *et al.*, 1997) y Pex18/Pex21 (Purdue *et al.*, 1998). Estas dos últimas proteínas tienen una vida media de 10 minutos durante la biogénesis del peroxisoma y su interacción con Pex7 permite liberar la proteína diana en el interior del peroxisoma. (Purdue y Lazarow, 2001). La capacidad que tiene Pex7 para reconocer los dominios TPR de algunas proteínas hace pensar que ambas señales de localización

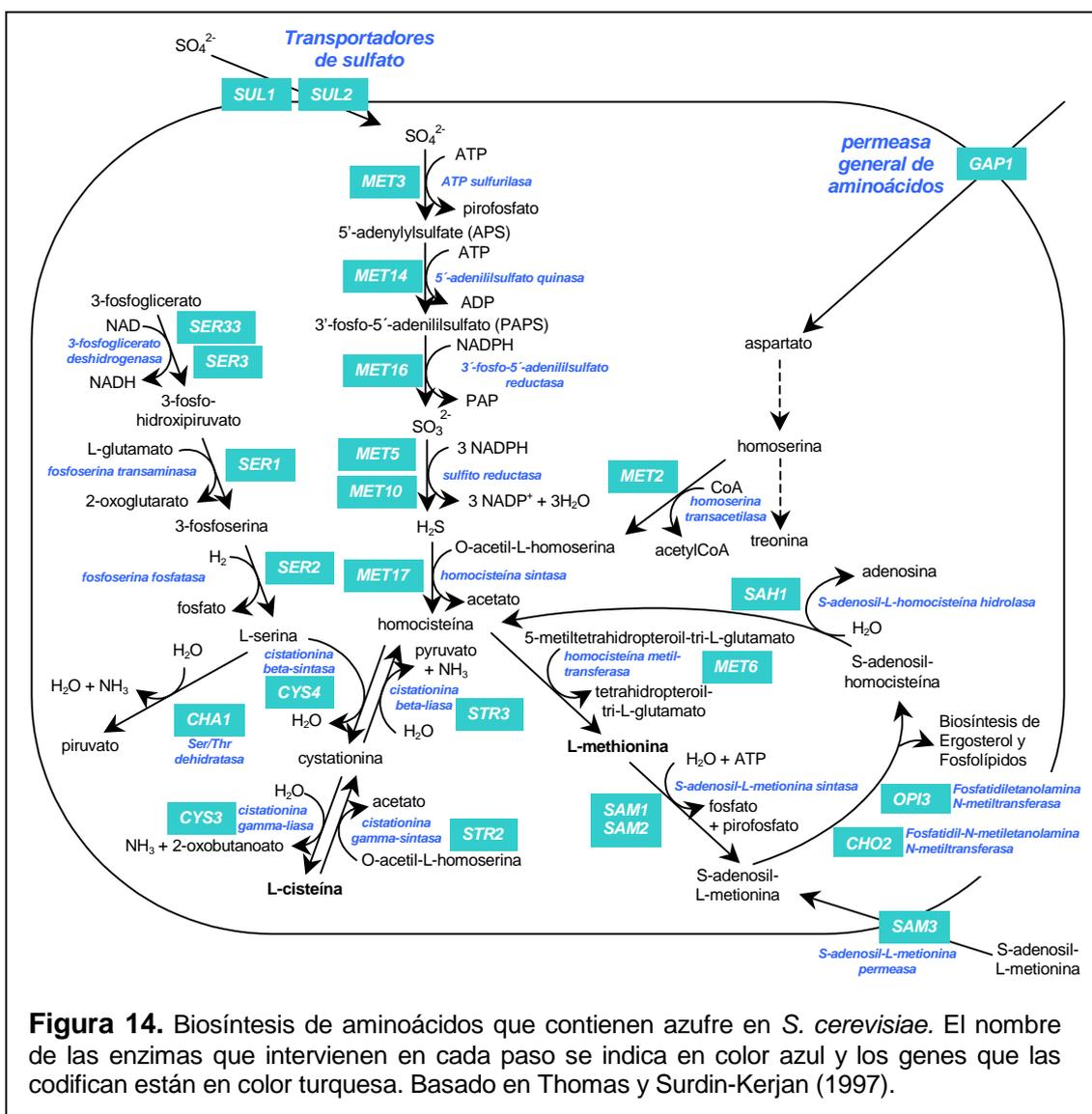
pueden utilizar la misma maquinaria de internalización peroxisomal (Sacksteder y Gould, 2000; Veenhuis *et al.*, 2000; Heiland y Erdmann, 2005).



Existen evidencias sobre otro tipo de señal de localización peroxisomal en *S. cerevisiae* y en *Candida tropicalis*. La enzima acil-CoA oxidasa de ambas especies carece de señales de localización tipo PTS1 o PTS2 y aún así entra en la matriz peroxisomal (Purdue y Lazarow, 2001). Otro ejemplo es la catalasa A de *S. cerevisiae*, que posee una señal interna de localización en el peroxisoma además de la señal PTS1 (Kragler *et al.*, 1993). A este tipo de señal se le ha denominado PTS3 y también es reconocida por Pex5, aunque no hay evidencia de la misma situación en mamíferos o en *P. pastoris* (Purdue y Lazarow, 2001). Pex5 y la acil-CoA oxidasa de *S. cerevisiae* interactúan en ensayos de doble híbrido e *in vitro*, específicamente a través de la región comprendida entre los residuos 136-292 de Pex5, la cual no incluye la región TPR. Esto indica que el sitio de interacción entre Pex5-PTS1 y Pex5-acil-coA oxidasa es completamente diferente uno del otro y que Pex5 es un receptor multifuncional aunque no se conozca el mecanismo de este tipo de interacción (Purdue y Lazarow, 2001)

1.9. LA SÍNTESIS DE CISTEÍNA Y METIONINA EN *S. cerevisiae*

Como se ha mencionado en el apartado anterior, el peroxisoma participa en diversas vías metabólicas que no sólo se relacionan con la transformación de ácidos grasos de cadena larga. Un ejemplo es la relación entre los peroxisomas de *S. cerevisiae* y la síntesis de la lisina (Breitling *et al.*, 2002). Adicionalmente, otros estudios han descrito en los peroxisomas de *S. cerevisiae* la presencia de Str3, una proteína con actividad cistationina β-liasa implicada en el proceso de transulfuración, el cual se describirá más adelante (Schafer *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2002).



S. cerevisiae posee varios sistemas enzimáticos que le permiten metabolizar los compuestos inorgánicos azufrados que se encuentran en la litosfera. Uno de los sistemas que mejor se ha caracterizado es el sistema reductor del sulfato, el cual le

permite utilizar los iones sulfato y sulfito como fuentes de azufre (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). Una característica de esta levadura es que puede crecer en presencia de cisteína o metionina como únicas fuentes de azufre, a diferencia de bacterias como *E. coli* y otros hongos como *Neurospora crassa* o *A. nidulans* que solo pueden usar cisteína. Esto se debe a que *S. cerevisiae* tiene dos sistemas que catalizan la interconversión de homocisteína (precursor de la cisteína y la metionina) a cisteína. Como consecuencia, muchos de los genes estructurales que codifican para componentes de la vía del azufre se identificaron inicialmente por la auxotrofia para metionina que poseen sus respectivos mutantes (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). Las reacciones de la síntesis de metionina y de cisteína están descritas ampliamente y se han identificado los genes que intervienen en dicha vía metabólica en *S. cerevisiae*, la cual se muestra en la figura 14.

1.9.1. ASIMILACIÓN DEL AZUFRE

Inicialmente *S. cerevisiae* toma del medio el azufre en forma de sulfato y en este mecanismo intervienen Sul1, Sul2 y Sul3 (Cherest *et al.*, 1997). Los mutantes simples para los tres genes correspondientes tienen una tasa de transporte de sulfato similar a la cepa parental, lo que indica que pertenecen a sistemas de transporte independientes. Sul1 y Sul2 tienen 11 y 10 dominios transmembranales respectivamente y la tasa de transporte de sulfato es prácticamente nula en los mutantes dobles *sul1 sul2* y *sul1 sul3*. A partir de estudios de expresión se determinó que Sul3 está relacionada con la regulación de la expresión de *SUL2* (Cherest *et al.*, 1997).

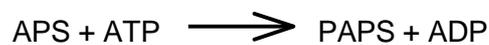
Una vez el sulfato ha entrado en la célula, todos los organismos se enfrentan con un problema aparentemente complicado en el momento de asimilar el azufre, el cual se relaciona con el estado de oxidación. El ion SO_4^{2-} es bastante estable y su reducción directa a sulfito resulta ser una reacción endérgica. Para asimilar el azufre que se encuentra en este estado se recurre a la activación de los iones sulfato a través de la adenilación. En levaduras este paso se divide en dos etapas: en la primera, se transfiere el grupo adenosil fosforil del ATP al sulfato formando adenil-sulfato o APS; en la segunda etapa, el APS es fosforilado para formar fosfoadenil-sulfato o PAPS:



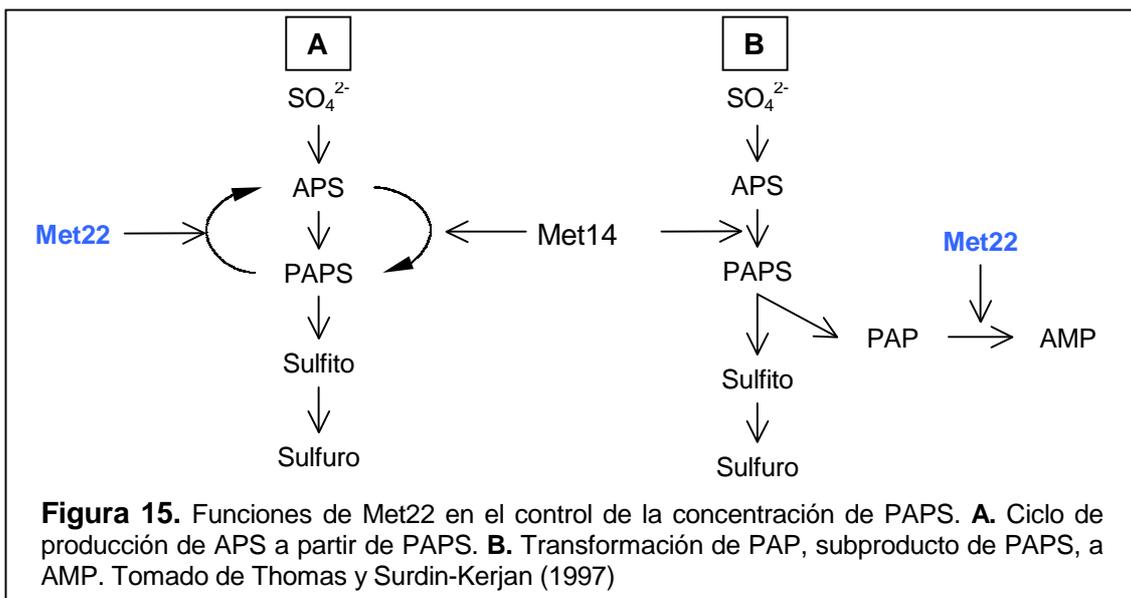
Esta primera reacción es catalizada por la ATP sulfurilasa, la cual es codificada por el gen *MET3* en *S. cerevisiae* (Cherest *et al.*, 1987). El mutante respectivo no puede

crecer en sulfato como única fuente de azufre, pero si lo puede hacer cuando la fuente es sulfito, sulfuro, tiosulfato, así como compuestos orgánicos que contienen azufre. Es importante anotar que esta reacción tiene una constante de equilibrio desfavorable para la formación de APS complicando aún más la adquisición de sulfato activado. El mecanismo por el cual los microorganismos evaden este problema está aún por determinar. Sin embargo, la ausencia total de APS causa que las células de levadura no sobrevivan a un choque térmico, lo cual se relaciona con un efecto protector de este compuesto durante cambios térmicos fuertes (Jakubowski y Goldman, 1993).

Posteriormente, en la segunda etapa de la activación, el APS es fosforilado nuevamente a costa de una molécula de ATP formando PAPS:



Esta reacción es catalizada por la APS quinasa codificada por *MET14* en *S. cerevisiae*; una característica de esta enzima es su activación *in vitro* por el sistema tioredoxina (Schriek y Schwenn, 1986). Existen evidencias sobre la alta toxicidad de PAPS, de modo que los organismos han desarrollado mecanismos para controlar la concentración intracelular de este compuesto. Posiblemente, formando parte de esta regulación se encuentre *MET22*. La ausencia de este gen causa auxotrofia para metionina, existiendo dos hipótesis acerca de su función (Figura 15).



Después de la activación del sulfato, ocurre una reducción en dos pasos sucesivos que llevan finalmente a la formación de sulfuro (Figura 15). La síntesis de sulfito a partir de PAPS es catalizada por la PAPS reductasa codificada por *MET16*. Los productos de esta reacción son PAP (transformado posteriormente por *Met22* en AMP), sulfito, NADP^+ y H^+ . Para este paso es indispensable la presencia de las tioredoxinas ya que la reductasa se une primero a ellas y luego al sustrato, lo cual explica la auxotrofia para metionina que presenta el doble mutante *trx1 trx2* (Schwenn *et al.*, 1988). El sulfito es un metabolito tóxico para *S. cerevisiae* como lo es para otros microorganismos y una de las razones para ello es su alta capacidad reductora. La capacidad que tiene este compuesto para inhibir el crecimiento de los microorganismos no se conoce con claridad pero se relaciona con la producción de compuestos como los acetaldehídos. Además, es un compuesto deseado en la fabricación de cerveza y vino ya que estabiliza los sabores y los aromas formando aductos con los aldehídos, propiedad que no posee el sulfuro.

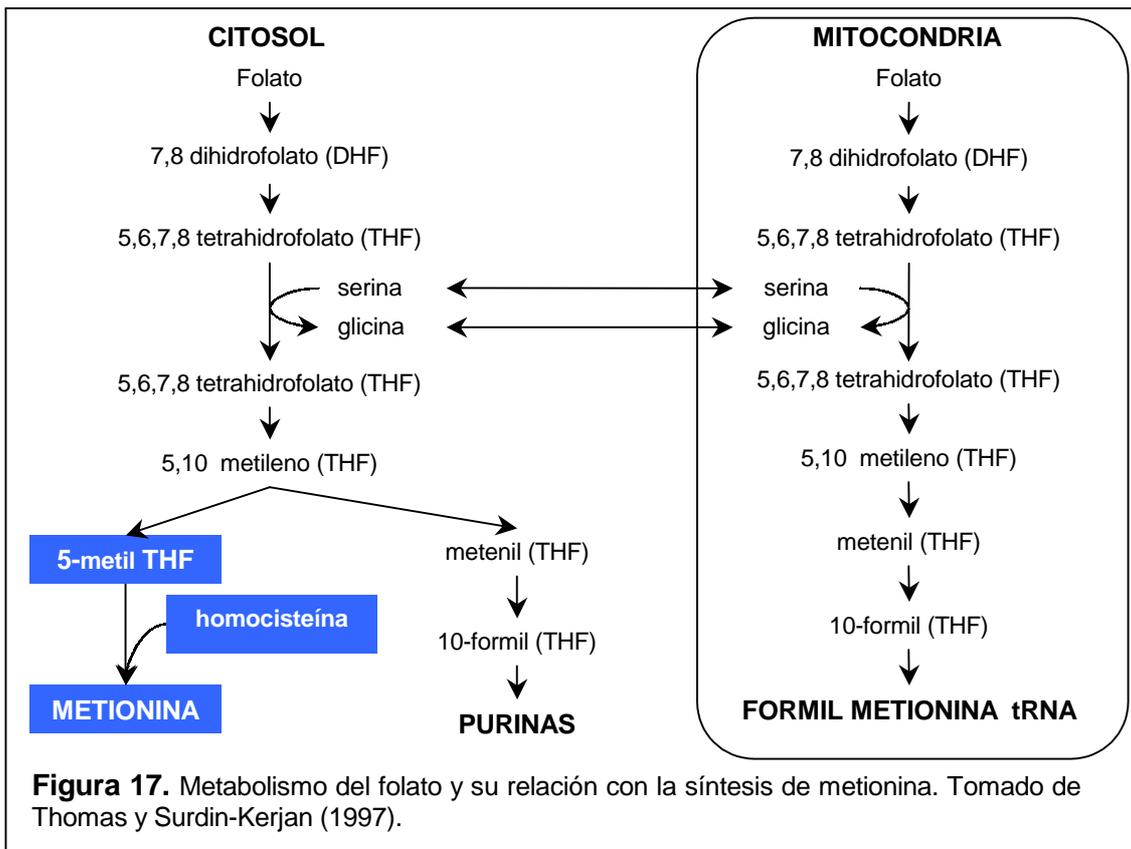
Una vez se ha obtenido el sulfito, este se reduce a costa de la oxidación de tres moléculas de NADPH. La enzima sulfito reductasa, que cataliza esta reacción, contiene diferentes grupos prostéticos: flavin adenin dinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN), un centro hierro/azufre, y el sirohemo, el cual es sintetizado a partir de uroporfirinógeno III. La sulfito reductasa de *S. cerevisiae* tiene una estructura oligomérica $\alpha_2\beta_2$ y contiene dos FAD, dos FMN y dos sirohemo por molécula. Las unidades α y β en *S. cerevisiae* son codificadas por *MET10* y *MET5* respectivamente, por lo que los mutantes simples respectivos tienen el mismo fenotipo (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997).

El paso final de la asimilación del azufre es su incorporación en una molécula orgánica. *Met17*, una homocisteína sintasa, es la enzima encargada de incorporar el sulfuro en una cadena carbonada, la O-acetil-L-homoserina (Figura 14). Para la síntesis de este compuesto es necesaria la proteína *Met2*, una homoserina transacetilasa que utiliza como sustrato la homoserina, un metabolito intermedio de la síntesis de treonina a partir de aspartato. La incorporación del sulfuro en la O-acetil-L-homoserina produce la homocisteína, precursor de la cisteína y la metionina. El mutante que carece de *MET2* puede crecer con O-acetil-L-homoserina, homocisteína, metionina y S-adenosil-L-metionina (AdoMet) como únicas fuentes de azufre, pero no lo hace con cisteína.

En levaduras el aspartato y los demás aminoácidos son transportados al interior de la célula a través de permeasas específicas y no específicas. La permeasa general de aminoácidos o Gap1 transporta todos los L-aminoácidos así como compuestos relacionados como ornitina, citrulina, algunos D-aminoácidos y análogos tóxicos de aminoácidos. Sin embargo, Gap1 no es activa en condiciones específicas; por ejemplo, no se detecta la actividad de Gap1 cuando la levadura crece en medios en los que se puede obtener eficientemente nitrógeno, como los que contienen amonio. Y en estas condiciones los aminoácidos se asimilan por transportadores específicos (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997).

1.9.2. SÍNTESIS DE LA METIONINA

La síntesis *de novo* de la metionina a partir de homocisteína utiliza un grupo metilo, el cual se origina a partir del metabolismo de compuestos monocarbonados. En este metabolismo, durante la oxidación de compuestos como metanol, formaldehído y formato, se transfieren grupos con un único carbono a moléculas receptoras. Uno de los compuestos que se forman durante estos procesos es el tetrahidrofolato. Los derivados monocarbonados del tetrahidrofolato son necesarios para la síntesis no sólo de metionina, sino también de nucleótidos del tipo purinas, timidilato y para la síntesis de *N*-formilmetionina en la mitocondria (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). *S. cerevisiae* tiene un conjunto de enzimas para la conversión del folato localizadas en la mitocondria y en el citosol. Sólo uno de los pasos de esta transformación es necesario para la síntesis de metionina, en concreto la reducción del 5,10-metilen tetrahidropteril tri-L-glutamato (5,10-metilentetrahidrofolato) a 5-metiltetrahidropteril tri-L-glutamato (5-metil tetrahidrofolato), el cual es catalizado por Met13, una metilentetrahidrofolato reductasa. Finalmente, la reacción entre el 5-metil tetrahidrofolato y la homocisteína, catalizada por la homocisteína metil transferasa o Met6, genera L-metionina y tetrahidrofolato (Figura 17).

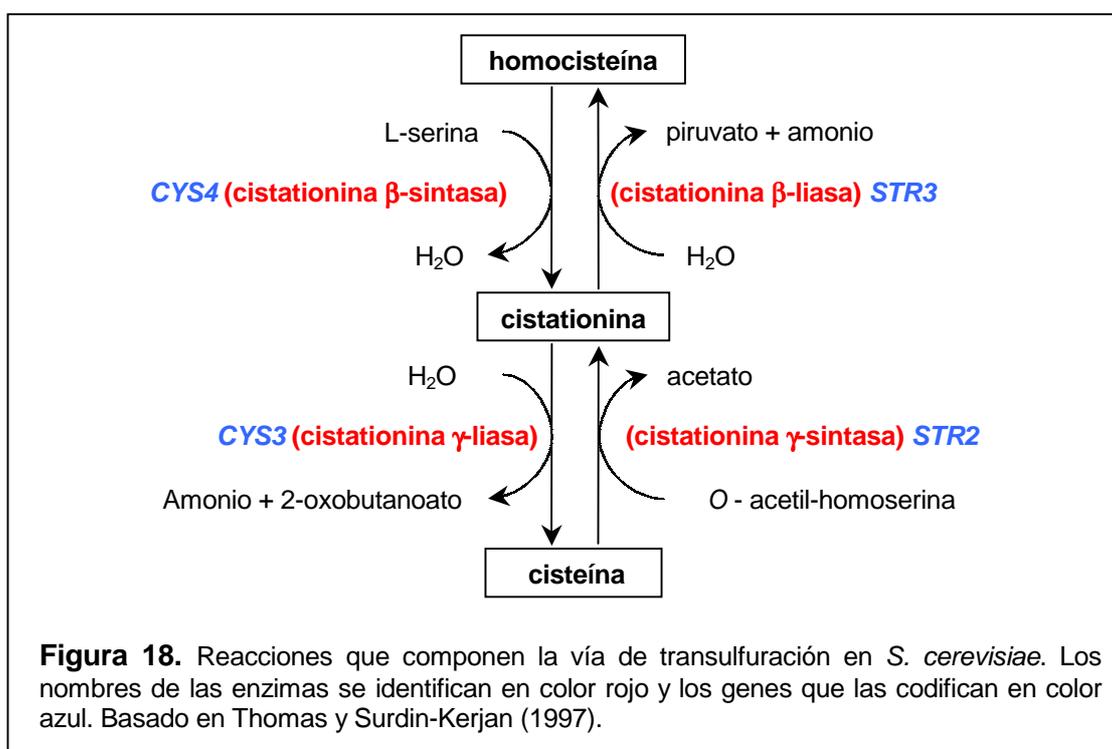


La metionina es metabolizada posteriormente para convertirse en AdoMet, gracias a la reacción con una molécula de ATP que es catalizada por Sam1 y Sam2, dos S-adenosil metiltransferasas que actúan independientemente. AdoMet es el segundo metabolito más importante después del ATP por su participación en diversas reacciones en las que sirve como cofactor. La síntesis de AdoMet es el único ejemplo de la utilización de la energía del enlace fosfato del ATP para generar un compuesto sulfurado altamente energético (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). La reacción consiste en la transferencia nucleofílica del grupo 5'-deoxiadenosil del ATP a uno de los tres pares de electrones del sulfuro tioeter de la L-metionina. Los fosfatos α y β del ATP son los que dan origen al pirofosfato y el fosfato terminal se libera como fosfato inorgánico. La AdoMet se usa en reacciones que involucran diferentes modificaciones químicas debido al sulfuro trivalente deficiente en un electrón que tiene esta molécula. El mayor consumo de AdoMet se produce durante las reacciones de transmetilación en las que AdoMet es el donador del grupo metilo. Este compuesto también puede ser adquirido del medio por transporte activo a través de la proteína de membrana Sam3 (Rouillon *et al.*, 1999). Todas las reacciones de transmetilación producen S-adenosil homocisteína junto con el receptor del grupo metilo. La S-adenosil homocisteína es reciclada por hidrólisis para

producir nuevamente homocisteína y adenosina. Esta reacción de hidrólisis es catalizada por Sha1 (Tehlivets *et al.*, 2004).

1.9.3. LA TRANSULFURACIÓN Y LA SÍNTESIS DE CISTEÍNA

Como se ha mencionado antes, la homocisteína es el precursor de la metionina y la cisteína. En el caso de la síntesis de la cisteína, existen una serie de reacciones que permiten la interconversión de homocisteína y cisteína a través de la formación intermedia de cistationina, lo que se conoce como transulfuración. En el caso de las bacterias entéricas solo se produce la transulfuración en el sentido de la formación de homocisteína a partir de cisteína, mientras que los mamíferos solo realizan el paso de homocisteína a cisteína. En el caso de *S. cerevisiae* la transulfuración puede darse en ambos sentidos, es decir, la formación de cisteína a partir de homocisteína y viceversa. La presencia de dos vías de transulfuración en el mismo organismo no es exclusiva de esta especie ya que también lo pueden llevar a cabo otros hongos así como algunas arqueas, bacterias y las plantas (Zhou y White, 1991; Ravel *et al.*, 1998; Breitinger *et al.*, 2001) (Figura 18).



La síntesis de la cisteína a partir de homocisteína se realiza a través de dos pasos. El primer paso es llevado a cabo por la enzima cistationina β-sintasa (Figura 18). Esta enzima utiliza la homocisteína y la serina para sintetizar cistationina y agua. En *S.*

cerevisiae la cistationina β -sintasa es codificada por *CYS4* (*STR4*). Los mutantes para este gen son auxótrofos para cisteína pero son capaces de crecer con GSH como única fuente de azufre, ya que este tripéptido es fácilmente hidrolizable *in vivo* para obtener cisteína. Una vez se ha sintetizado la cistationina, ésta es usada por la enzima cistationina γ -liasa para formar finalmente cisteína, ácido α -quetobutírico y amonio. El proceso inverso, es decir, la síntesis de homocisteína a partir de cisteína, es llevado a cabo por dos enzimas, la cistationina γ -sintasa y la cistationina β -liasa, codificadas por los genes *STR2* y *STR3* respectivamente (Figura 18) (Hansen y Johannesen, 2000).

La estructura tridimensional de la cistationina β -liasa de *A. thaliana* es muy similar a la de *E. coli* (Breitinger *et al.*, 2001). Aunque hay similitudes en la secuencia, algunos aminoácidos del sitio de unión del sustrato son diferentes, haciendo que este dominio en *A. thaliana* sea más grande que en *E. coli*, lo que se traduce en diferencias en la afinidad por el sustrato. La cistationina β -liasa está compuesta por cuatro subunidades y cada una de ellas está asociada a una molécula de piridoxal 5'-fosfato, el cofactor necesario para la actividad enzimática. Una característica de la proteína de *A. thaliana* es su sensibilidad a inhibidores del bloqueo de tioles como iodoacetamida y *N*-etilmaleimida. Esto indica que al menos una de las cisteínas de esta proteína que está dentro o cerca del centro activo es importante para la actividad enzimática (Ravanel *et al.*, 1996).

1.9.4. REGULACIÓN DE LA RUTA

La vía de síntesis de los aminoácidos sulfurados en *S. cerevisiae* está regulada negativamente. En una cepa silvestre la síntesis de las enzimas necesarias para la asimilación de sulfato, así como para la síntesis de cisteína o metionina, es reprimida cuando se agrega metionina, AdoMet o cisteína al medio de cultivo (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). Inicialmente se propuso que el efecto de represión era llevado a cabo por AdoMet; la hipótesis se basaba en que la adición de metionina al medio de cultivo del doble mutante *sam1 sam2* (cepa que carece totalmente de actividad AdoMet sintasa) no reprime la expresión de los genes de la vía. Esto indicaba que en una cepa silvestre la metionina extra del medio se transforma rápidamente en AdoMet favoreciendo así la represión de los genes de la vía (Thomas *et al.*, 1988). Pero la presencia de AdoMet no es suficiente para esta represión, ya que es necesario un aumento de la concentración intracelular de cisteína proveniente de la transformación de la AdoMet en cisteína por la transulfuración. El aumento de la concentración de

cisteína induce la degradación en el núcleo de Met4, un factor importante en la regulación de los genes de la vía del azufre (Menant *et al.*, 2006).

En el promotor de *MET25* se identificaron dos secuencias reguladoras comunes para varios de los genes *MET*. Una de ellas se centra alrededor de la secuencia TCACGTG, la cual es necesaria para inducir la expresión de los genes *MET* cuando la concentración de AdoMet es baja y para la segregación de los cromosomas durante la división celular (Kuras *et al.*, 1996). Esta secuencia es el sitio de unión para el complejo heterodimérico y activador transcripcional Cbf1-Met4-Met28. La segunda secuencia funcional consenso es AAANTGTG, que es el sitio de unión de dos factores, Met31 y Met32 (Blaiseau *et al.*, 1997).

1.9.4.1. EL COMPLEJO Cbf1-Met4-Met28

La proteína Cbf1 tiene un dominio básico hélice-asa-hélice (bHLH) común en las enzimas de unión al DNA, el cual es necesario para la unión de esta proteína a la secuencia TCACGTG y para su dimerización (Mellor *et al.*, 1991; Masison *et al.*, 1993). Los mutantes para *CBF1* requieren sulfuro inorgánico para crecer, tienen la expresión de *MET16* disminuida respecto de una cepa silvestre y no se detecta en ellos actividad sulfato permeasa (Thomas *et al.*, 1992). Estas evidencias apuntan a que la activación de los genes *MET* requiere la unión de Cbf1 a las regiones promotoras, aunque la expresión no depende estrictamente de la actividad de Cbf1 (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). Por ejemplo, la expresión de los genes *MET3* y *MET17* en un mutante para *CBF1* es aproximadamente la mitad comparada con la expresión en una cepa silvestre, mientras que la expresión de *MET10*, *MET14* y *MET16* depende estrictamente de la presencia de Cbf1, lo cual indica que existen otros mecanismos de regulación adicionales a Cbf1 (Kuras *et al.*, 1996).

Otra de las proteínas necesarias para una inducción completa de los genes *MET* es Met4. Análisis fisiológicos de los auxótrofos para metionina permitieron identificar mutaciones en el locus *MET4*, las cuales confieren resistencia al selenato e imposibilidad de crecer en fuentes inorgánicas de azufre y en cisteína. En los mutantes para *MET4* no se detecta la actividad de las enzimas implicadas en el transporte y la asimilación del azufre, al mismo tiempo que no se manifiesta transcripción de los genes *MET2*, *MET3*, *MET5*, *MET14*, *MET16*, *MET10* y *MET17* (Mountain *et al.*, 1993). *MET4* codifica para una proteína de 666 aminoácidos que en

su extremo C-terminal contiene una región rica en aminoácidos básicos y cinco grupos de siete leucinas. Este extremo es similar a los dominios bZIP que se encuentran en muchas de las proteínas reguladoras de los eucariotas superiores y de hongos. Estas proteínas se caracterizan por dimerizar a través de las repeticiones de leucina y por unirse al DNA a través de la región de aminoácidos básicos. Se ha demostrado que Met4 es un activador de la transcripción fuerte y que su actividad disminuye cuando aumentan la concentración intracelular de AdoMet y cisteína (Menant *et al.*, 2006)

Otra proteína que es necesaria para la inducción de los genes *MET* es Met28. Esta proteína es un efector positivo de la transcripción de varios genes *MET* en condiciones no represivas. La mutación del gen correspondiente también confiere auxotrofía a metionina, resistencia a selenato y pérdida de la actividad de las enzimas necesarias para la asimilación del sulfato (Cherest *et al.*, 1997). Respecto de la expresión de los genes *MET*, se ha determinado que los niveles máximos de *MET3*, *MET10*, *MET14* y *MET16* son menores en este mutante comparados con los de la cepa silvestre (Kuras *et al.*, 1996). La proteína Met28 tiene también un dominio del tipo bZIP pero difiere de Met4 en que hay un segmento de 7 aminoácidos entre la cremallera de leucinas y la región de aminoácidos básicos. Estudios de doble híbrido determinaron que Met4 interacciona con Met28 a través del dominio bZIP, mientras que la interacción entre Met4 y Cbf1 es a través del dominio bZIP de Met4 y el dominio bHLH de Cbf1 (Figura 19). Por el contrario, estos estudios no detectaron interacción entre Cbf1 y Met28, aunque se determinó que Met28 favorece la unión de Cbf1 a la secuencia consenso del DNA (Kuras *et al.*, 1996; Kuras *et al.*, 1997). Estos estudios indican que Met28 tiene dos funciones dentro de la formación del complejo: la primera es aportar estabilidad a la arquitectura del grupo proteico, ya que su interacción con Met4 es indispensable para mantener el complejo estable, y la segunda es estimular la

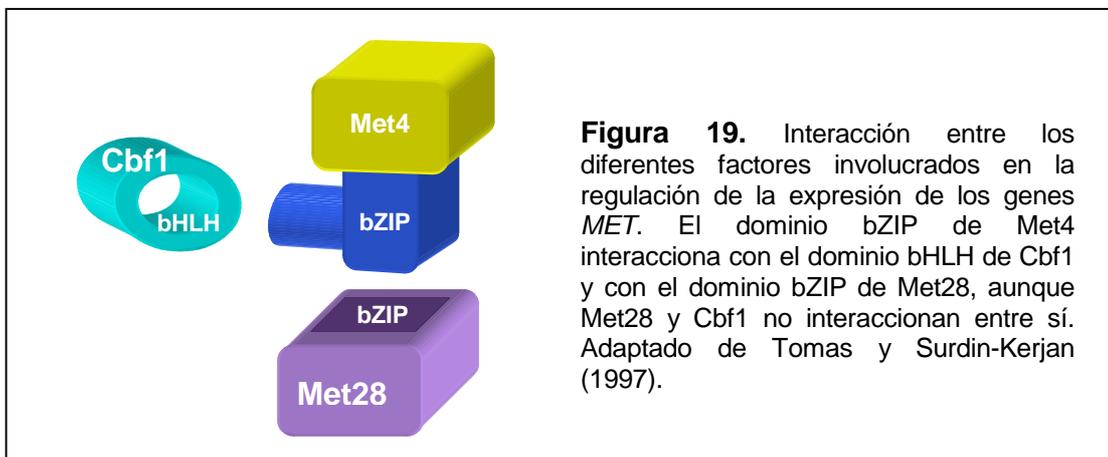
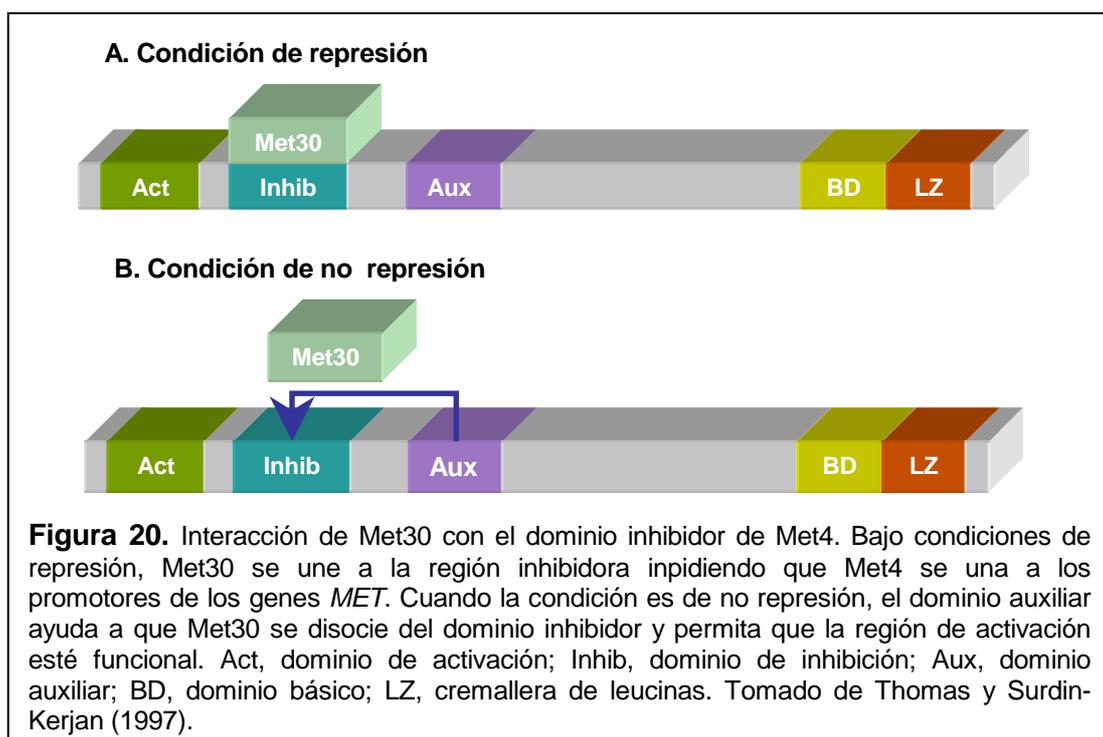


Figura 19. Interacción entre los diferentes factores involucrados en la regulación de la expresión de los genes *MET*. El dominio bZIP de Met4 interacciona con el dominio bHLH de Cbf1 y con el dominio bZIP de Met28, aunque Met28 y Cbf1 no interaccionan entre sí. Adaptado de Tomas y Surdin-Kerjan (1997).

unión de Cbf1 al DNA y por ende la de todo el complejo (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997).

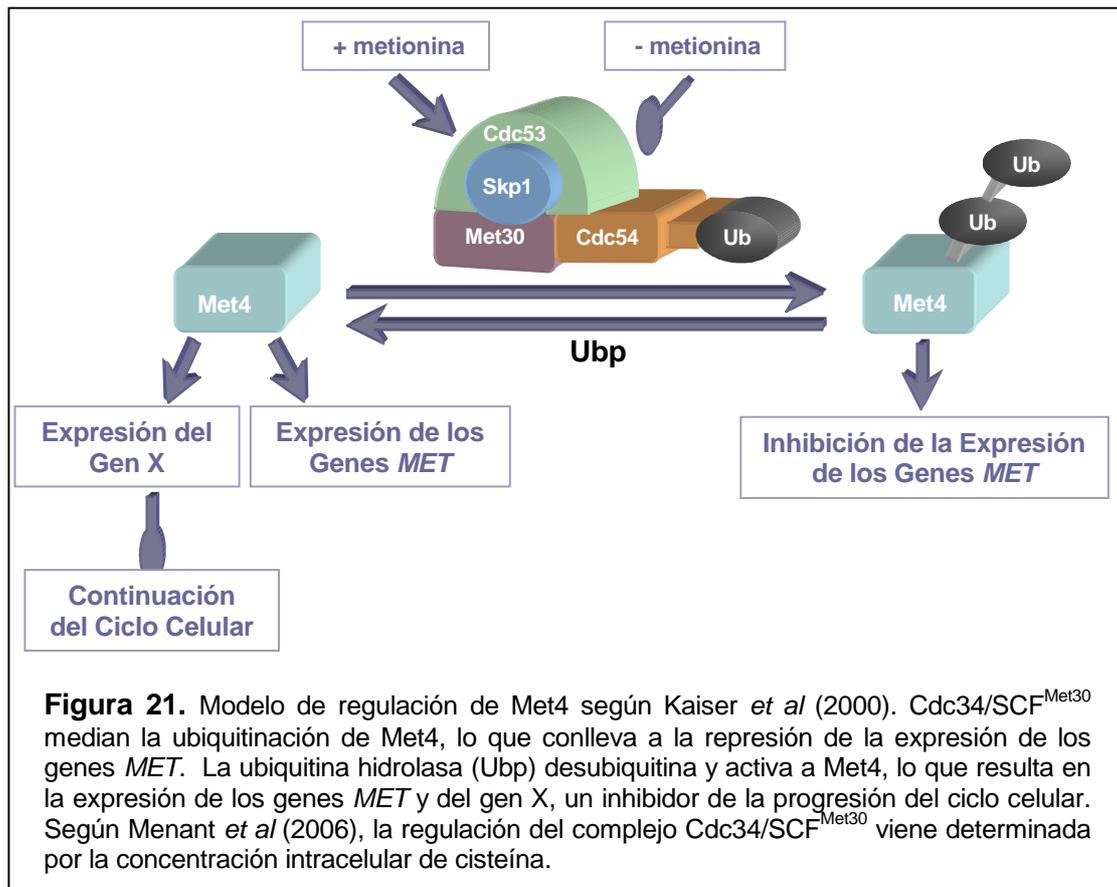
La regulación de la actividad de Met4 está dada por la estructura de la región N-terminal en la que se encuentran tres dominios: activador, inhibidor y auxiliar. El dominio activador está comprendido entre los aminoácidos 92 y 144, hallándose enriquecido en asparragina y en aminoácidos ácidos. Posteriormente se encuentra otro dominio comprendido entre los aminoácidos 189 y 235 necesario para inhibir la actividad de Met4 en condiciones de represión; esta inactivación se lleva a cabo por la unión de la proteína Met30 con este dominio. Existe un último dominio entre los aminoácidos 312 y 375 llamado dominio auxiliar que es necesario para la actividad máxima de Met4 en condiciones de no represión. Este dominio no es un activador de la transcripción pero es necesario para atenuar la función del dominio inhibidor en condiciones de no represión y es aquí donde ayuda al dominio inhibidor a disociarse de Met30, promoviendo así el funcionamiento de la región activadora (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997) (Figura 20).



Una característica importante de Met30 es su relación con el sistema de degradación por ubiquitinación, el cual juega un papel importante en la regulación de los procesos celulares. La función más estudiada de la ubiquitinación es su participación en la degradación de proteínas, en donde las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas por el proteasoma 26S y son rápidamente degradadas. Este proceso

de ubiquitinación es catalizado por una cascada de reacciones enzimáticas que empiezan con la activación de la ubiquitina por parte de las enzimas E1, reacción que depende de ATP. La ubiquitina activada es transferida al residuo cisteína específico de las enzimas tipo E2. Estas enzimas conjugan directamente las proteínas diana con ubiquitina pero para ello necesitan factores que confieren especificidad de sustrato. La especificidad está dada por los complejos ubiquitina-proteína ligasas o E3, siendo los más estudiados los complejos SCF compuestos por tres unidades: Skp1, Cdc53 y una proteína de la familia F-box. Esta última es la responsable de la unión con la proteína diana proporcionando especificidad a todo el complejo de degradación, de modo que por cada proteína F-box existen diferentes complejos SCF. En *S. cerevisiae* se han estudiado tres complejos de este tipo que corresponden a SCF^{Cdc34}, SCF^{Grr1} y SCF^{Met30} (Deshaies, 1999; Kaiser *et al.*, 2000).

Met30 interacciona con la proteína Cdc53, un componente de la ubiquitina-proteína ligasa (Deshaies, 1999), lo cual relaciona la regulación de la actividad de Met4 con el sistema de ubiquitinación. En medio mínimo Met4 es ubiquitinada y degradada en respuesta a un exceso de metionina, mientras que en medio rico Met4 es ubiquitinada pero permanece estable (Kaiser *et al.*, 2000). Al permanecer estable en esta última condición, Met4 no se dirige a los promotores de los genes *MET* pero sí puede activar los genes *SAM1* y *SAM2*, los cuales son necesarios para la síntesis de AdoMet. Esto indica que la ubiquitinación es un mecanismo que regula la unión de Met4 a diferentes promotores (Menant *et al.*, 2006). La hipótesis consiste en que Met4 estaría inactiva durante el crecimiento normal de las células de levadura, pero cuando se agrega metionina al medio de cultivo Met4 se activaría transitoriamente para expresar los genes *MET* y para restaurar las concentraciones adecuadas de los metabolitos importantes de la biosíntesis de la metionina, sobre todo de AdoMet. Por esto se ha propuesto que en condiciones donde las concentraciones de estos metabolitos no son lo suficientemente altas como para mantener la progresión del ciclo, se induce una parada para conservar la integridad celular. Esta parada estaría ligada a la concentración de metionina, junto con la expresión de un gen desconocido que dependería de la actividad de Met4. Este gen tendría una expresión constitutiva en un mutante para *MET30*, lo que conduciría a la parada permanente del ciclo celular (Kaiser *et al.*, 2000).



Recientemente se ha demostrado que la degradación de Met4 en medio mínimo está determinada por la concentración intracelular de cisteína (Menant *et al.*, 2006). Analizando la degradación de las proteínas GFP-Met4 y Met4-HA expresadas bajo el promotor de *MET4* en un mutante $\Delta cys4$ (ausencia de la cistationina β -sintasa), se observa que ambas proteínas son degradadas cuando se agrega al medio cisteína, mientras que el exceso de metionina o AdoMet no inducen esta degradación. Esto indica que una cepa silvestre que crece en medio mínimo transforma el exceso de metionina en cisteína por transulfuración, aumentando su concentración intracelular e induciendo la degradación de Met4 (Menant *et al.*, 2006). Se ha propuesto que el papel de la cisteína en la degradación de Met4 podría consistir en el control directo de la actividad del complejo SCF^{Met30} sobre Met4 a través de un mecanismo tiólico que actuaría sobre Met4 y/o SCF^{Met30}. Una de las hipótesis es que la unión de la cisteína con una subunidad de Met30 estabilizaría la interacción entre Met4 y SCF^{Met30} (Menant *et al.*, 2006) (Figura 21)

1.9.4.2. LOS REGULADORES *Met31* y *Met32*

Como se ha mencionado antes, en el promotor de *MET25* se identificó otra secuencia reguladora que también está presente en otros genes *MET*. Esta secuencia se encuentra alrededor de la posición -200, correspondiendo a la secuencia consenso AAANTGTG que es reconocida por Met4. La unión de este activador con la citada secuencia está mediada por Met31 o Met32 y el complejo es estabilizado por Met28 (Blaiseau y Thomas, 1998). Ambas proteínas se caracterizan por tener dos dominios dedo de zinc: CC/HH en C-terminal y CC/HC en N-terminal. El análisis por Northern de las células que no expresan Met31 y/o Met32 demostró que la función de las dos proteínas durante la transcripción de los genes de la vía del azufre varía de un gen a otro. Por ejemplo, la expresión de los genes *MET3* y *MET14* requiere de la presencia de Met31 y Met32 simultáneamente, mientras que la expresión de *MET28* requiere al menos una de las dos proteínas y la expresión de *MET25* es constitutiva en el doble mutante *met31 met32* (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997; Blaiseau y Thomas, 1998). Por otra parte, en los promotores de *MET28* y *MET3* no se forma el complejo Cbf1-Met28-Met4, lo que indica que existe un sistema activador de la transcripción diferente al formado por este complejo. Todas estas evidencias indican que existen diferentes combinaciones de los activadores de la transcripción para la expresión de los genes *MET* y que en todos es necesario el factor Met4.

Análisis de doble híbrido indican que Met4 interacciona con Met31 y Met32 independientemente, pero estas dos proteínas no interaccionan con Met28. El papel de Met28 es mantener estable los complejos Met4-Met28-Met31 o Met32, siendo indispensable el dominio bZip de Met4 para la formación de ambos complejos. Además se ha demostrado que la unión de Cbf1 a la secuencia TCACGTG aumenta la afinidad del complejo Met4-Met28-Met31(Met32) por la secuencia AAANTGT vecina (Blaiseau y Thomas, 1998).

Todos estos hallazgos señalan que Met4 y Met28 son reclutados dentro de uno u otro complejo dependiendo del tipo de secuencia presente en el promotor, aunque estos complejos pueden actuar de manera sinérgica en la expresión de dichos genes, ya que pueden tener elementos comunes haciendo parte de los sistemas activadores (Blaiseau y Thomas, 1998). A partir de esta idea se han desarrollado dos hipótesis sobre la relación entre los dos sistemas de activación de la transcripción que se ilustran en la figura 22.

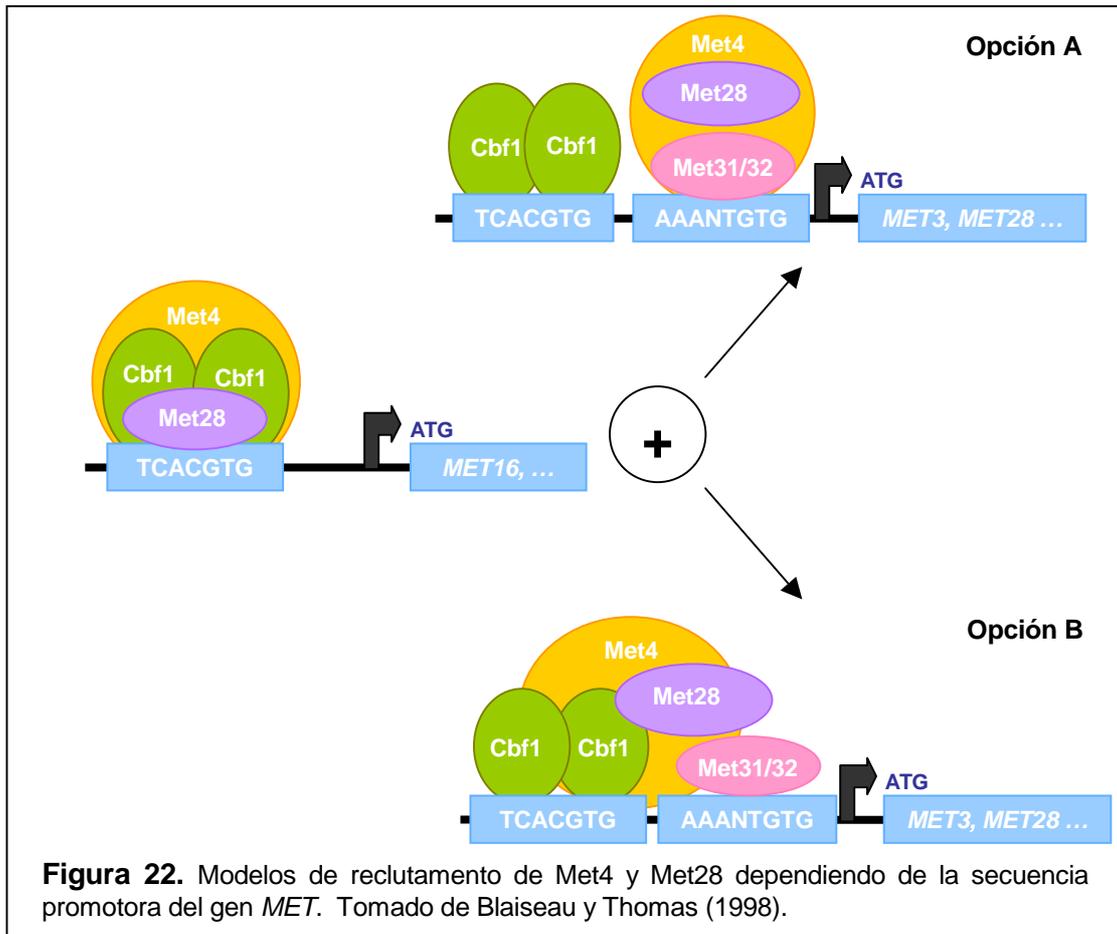


Figura 22. Modelos de reclutamiento de Met4 y Met28 dependiendo de la secuencia promotora del gen *MET*. Tomado de Blaiseau y Thomas (1998).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido caracterizar los genes de *S. cerevisiae* cuyos productos son homólogos a las GST de clase Omega caracterizadas previamente en humanos y otros eucariotas superiores y determinar su relación con estrés oxidativo y con la regulación del estado redox de proteínas. Este objetivo se ha desarrollado a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener los mutantes nulos simples y múltiples para los genes *YGR154c* (*GTO1*), *YKR076w* (*GTO2*) e *YMR251w* (*GTO3*) y analizar su fenotipo.
2. Determinar la localización subcelular de las tres proteínas Gto utilizando la proteína GFP fusionada a cada una de ellas.
3. Analizar la expresión de cada uno de los genes en diferentes condiciones ambientales tales como el tratamiento con diversos agentes oxidantes y otros agentes tóxicos. Además, verificar si esta expresión depende de los factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo Yap1 y Msn2/Msn4.
4. Expresar y purificar las tres proteínas Gto a partir de cultivos de *E. coli* para posteriormente determinar su actividad enzimática frente a diferentes sustratos clásicos de las GST, así como las actividades específicas de las GST de clase Omega (actividad glutaredoxina, DHAR y DMAR^V).
5. Realizar una aproximación genómica para el análisis funcional de las proteínas Gto, y en especial de Gto1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

3.1.1. Cepas de *S. cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio se enumeran en la Tabla 1, en la cual se incluyen su genotipo y los comentarios correspondientes.

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	COMENTARIOS
W303-1A	<i>MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3-112 trp1-1 his3-11,15</i>	Cepa silvestre
W303-1B	<i>MATα ura3-1 ade2-1 leu2-3-112 trp1-1 his3-11,15</i>	Cepa silvestre
MML535	<i>MATa gto1::natMx4</i>	Delección de <i>GTO1</i> en W303 -1A
MML536	<i>MATα gto1::natMx4</i>	Delección de <i>GTO1</i> en W303 -1B
MML538	<i>MATa gto2::kanMX4</i>	Delección de <i>GTO2</i> en W303-1A
MML540	<i>MATα gto2::kanMX4</i>	Delección de <i>GTO2</i> en W303-1B
MML542	<i>MATa gto3::natMx4</i>	Delección de <i>GTO3</i> en W303 -1A
MML546	<i>MATα gto1::kanMx4</i>	Delección de <i>GTO1</i> en W303 -1B
MML572	<i>MATa [pMM401(GTO2-3HA)]:URA3</i>	Integración del plásmido pMM401 en W303-1A
MML587	<i>MATa gto1::kan MX4 gto3::natMX4</i>	Producto del cruce entre MML542 x MML546
MML590	<i>MATα gto1::kanMX4 gto2::kanMX4 gto3::natMX4</i>	Producto del cruce entre MML540 x MML587
MML628	<i>MATa gtt1::CaURA3</i>	Delección de <i>GTT1</i> en W303-1A
MML629	<i>MATa gtt2::kanMX4</i>	Delección de <i>GTT2</i> en W303-1A
MML630	<i>MATα gtt2::natMX4</i>	Delección de <i>GTT2</i> en W303-1A
MML634	<i>MATα gto1::natMX4 gtt1::CaURA3</i>	Producto del cruce entre MML536 x MML628
MML636	<i>MATα gto2::kanMX4 gtt1::CaURA3</i>	Producto del cruce entre MML540 x MML628
MML661	<i>MATa gtt1::CaURA3 gtt2::kanMX4</i>	Producto del cruce entre MML629 x MML634
MML666	<i>MATa gtt1::CaURA3 gtt2::natMX4</i>	Producto del cruce entre MML630 x MML636
MML686	<i>MATa gto1::kanMX4 gto2::kanMX4 gto3::natMX4</i>	Producto del cruce entre MML540 x MML587
MML687	<i>MATa gto1::kanMX4 gto2::kanMX4 gtt1::CaURA3 gtt2::natMX4</i>	Producto del cruce entre MML590 x MML666
MML716	<i>MATa gto1::kanMX4 gto2::kanMX4 gto3::LEU2 gtt1::CaURA3 gtt2::natMX4</i>	Disrupción de <i>GTO3</i> en MML687, usando el plásmido pMM550
MML736	<i>MATa grx2::LEU2</i>	Disrupción de <i>GRX2</i> en W303-1A

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	COMENTARIOS
MML752	<i>MATa grx1::kanMX4 grx2::LEU2</i>	Disrupción de <i>GRX1</i> en MML736
MML826	<i>MATa str3::kanMX4</i>	Delección de <i>STR3</i> en W303-1A
Wmsn2msn4	<i>MATa msn2::HIS3 msn4::TRP1</i>	Proveniente de F. Estruch; delección de <i>MSN2</i> y <i>MSN4</i> en W303-1A
Wyap1	<i>MATa yap1::kanMX4</i>	Proveniente de F. Estruch; delección de <i>YAP1</i> en W303-1A
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Cepa silvestre
Y03603	<i>MATa pex5::kanMX4</i>	De EUROSCARF*; delección de <i>PEX5</i> en BY4741
Y04076	<i>MATa pex7::kanMX4</i>	De EUROSCARF; delección de <i>PEX7</i> en BY4741

Tabla 1. Lista de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. *European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis (Universidad de Frankfurt), <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf>.

3.1.2. CEPAS DE *E. coli*

Para replicar y conservar los plásmidos construidos durante este trabajo se utilizó la cepa de *E. coli* DH5α [*F⁻ SupE44 DlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1*] (Hanahan, 1983). Para los procesos de expresión y purificación de proteínas de *S. cerevisiae* en *E. coli* se utilizaron células de la cepa BL21 [*F ompT hsdS_r (r_B⁻ m_B) gal dcm*, Novagen] de esta última especie.

3.2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo y los comentarios respectivos se detallan en la Tabla 2.

PLÁSMIDO DERIVADO	VECTOR ORIGINAL	COMENTARIOS
pET-21a	Novagen	
pMAL-c2X	New England Biolabs	
YEplac211	Gietz y Sugino, 1988	
pUG35	Proporcionado por W. H. Hegemann, Institute of Microbiology, Duesseldorf, Alemania	

PLÁSMIDO DERIVADO	VECTOR ORIGINAL	COMENTARIOS
pMM399	pUG35	<i>GTO2</i> clonado entre los sitios XbaI-EcoRI del vector y marcado con la secuencia de la proteína GFP en posición C-terminal. La expresión depende del promotor de <i>MET25</i>
pMM400		Plásmido integrativo que contiene <i>GTO1</i> (con su propio promotor) marcado en posición C-terminal con la secuencia de 6 Histidinas y el epítipo HA
pMM401		Plásmido integrativo que contiene <i>GTO2</i> (con su propio promotor) entre los sitios PstI-EcoRI del vector, marcado en posición C-terminal con la secuencia de 6 Histidinas y el epítipo HA
pMM402		Plásmido integrativo que contiene <i>GTO3</i> (con su propio promotor) entre los sitios PstI-BamHI del vector, marcado en posición C-terminal con la secuencia de 6 Histidinas y el epítipo HA
pMM440		Plásmido centromérico que contiene <i>GTO1</i> entre los sitios BSIWI-PstI del vector, en fase con la secuencia de la proteína GFP en posición N-terminal. La expresión depende del promotor <i>tetO₇</i> (Gari <i>et al.</i> , 1997)
pMM446	pUG35	<i>GTO3</i> clonado entre los sitios PstI-EcoRI del vector en fase con la secuencia de la proteína GFP en posición C-terminal. La expresión depende del promotor de <i>MET25</i>
pMM494	pET-21a	<i>GTO2</i> clonado entre los sitios NdeI-XhoI del vector
pMM496	pET-21a	<i>GTO3</i> clonado entre los sitios NdeI-XhoI del vector
pMM498	pET-21a	<i>GTT1</i> clonado entre los sitios NdeI- XhoI del vector
pMM543	pET-21a	Derivado de pMM494 con una sustitución C46G
pMM545	pET-21a	Derivado de pMM494 con una sustitución C67S
pMM563	pET-21a	Derivado de pMM494 con una sustitución C307G
pMM566	pMAL-c2X	<i>GTO1</i> clonado entre los sitios EcoRI- HindIII del vector
pMM578	YEplac211	<i>GTO1</i> con su propio promotor clonado entre los sitios EcoRI-BamHI del vector
pMM584	YEplac211	<i>GTO2</i> con su propio promotor clonado entre los sitios EcoRI-HindIII del vector
pMM611	YEplac211	<i>GTO3</i> con su propio promotor clonado entre los sitios BamHI-PstI del vector
pMM640	pET-21a	Derivado de pMM563 con las sustituciones C67S y C307G
pMM644	pET-21a	Derivado de pMM640 con las sustituciones C46G, C67S y C307G
pMM736		Plásmido centromérico que contiene <i>GTO1</i> (con su propio promotor) marcado con la secuencia TAP en posición N-terminal
pMM756	pCM188	Plásmido centromérico que contiene <i>STR3</i> entre los sitios BamHI-NotI del vector. La expresión depende del promotor <i>tetO₂</i> (Gari <i>et al.</i> , 1997)
pMM758		Derivado de pMM756 con una sustitución C353S
pMM760		Derivado de pMM756 con una sustitución C362S
pMM762		Derivado de pMM756 con una sustitución C387S

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio y una descripción breve de sus características más relevantes.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *S. cerevisiae* se detallan a continuación. Cuando fue necesario se agregó agar al 2% para obtener medios de cultivo sólidos.

- **YPD:** glucosa 2%, peptona 2%, extracto de levadura 1%.
- **YPGly:** glicerol 3% (p/v), peptona 2%, extracto de levadura 1%.
- **YPOle:** extracto de levadura 1%, peptona 2%, Tween 40 (Sigma) 0,02% (p/v), ácido oleico (Sigma) 0,2% (p/v). El extracto de levadura y la peptona se disolvían en agua, se ajustaba el pH a 6,8 y se autoclavaba (121°C y 1 atm de presión durante 15 min). Aparte se mezclaban el ácido oleico y el Tween40, se esterilizaba la mezcla por filtración y se agregaba al medio de cultivo.
- **SC (Sherman, 2002):** Base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos (Difco) 0,67%, glucosa 2%, Drop out 0,2%. El Drop out es la combinación en seco de bases nitrogenadas, aminoácidos y vitaminas, excepto el suplemento adecuado en el caso de selección de plásmidos; se agregaba al medio antes de esterilizarlo por autoclave. Su composición se muestra en la Tabla 3.

AMINOÁCIDO	gramos	AMINOÁCIDO	gramos	AMINOÁCIDO	gramos
Adenina	0,5	Glicina	2,0	Fenilalanina	2,0
Alanina	2,0	Histidina	2,0	Prolina	2,0
Arginina	2,0	Inositol	2,0	Serina	2,0
Asparragina	2,0	Isoleucina	2,0	Treonina	2,0
Ácido aspártico	2,0	Leucina	4,0	Triptófano	2,0
Cisteína	2,0	Lisina	4,0	Tirosina	2,0
Glutamina	2,0	Metionina	4,0	Uracilo	2,0
Ácido glutámico	2,0	Ácido <i>para</i> -aminobenzóico	0,2	Valina	2,0

Tabla 3. Compuestos que hacen parte del Drop out y la cantidad correspondiente dentro de la mezcla (Sherman, 2002).

- **SC OLÉICO:** Base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos 0,67%, Drop out 0,67%, Tween 40 (Sigma) 0,02% (p/v), ácido oléico (Sigma) 0,2% (p/v).
- **MEDIO DE ESPORULACIÓN:** Acetato de potasio 1%, extracto de levadura 0,1%, glucosa 0,05%.

- **MEDIO B (Cherest y Surdin-Kerjan, 1992):** Medio de cultivo utilizado para analizar la capacidad de crecimiento en diferentes fuentes de azufre. Todos los componentes azufrados de este medio son de Sigma. Para obtener el medio sólido se suplementó con 1% de agarosa. Los componentes de este medio y su concentración final son los siguientes:
 - **Sales minerales:** NH₄Cl 15 mM, K₂HPO₄ 6,6 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, NaCl 1,7 mM, CaCl₂ 0,7 mM, MgCl₂ 2 mM.
 - **Oligoelementos:** Ácido bórico 0,5 µg/ml, CuCl₂ 0,04 µg/ml, KCl 0,1 µg/ml, ZnCl₂ 0,19 µg/ml, FeCl₃ 0,05 µg/ml.
 - **Vitaminas y factores de crecimiento:** Pantotenato de calcio 2 µg/ml, tiamina 2 µg/ml, piridoxina 2 µg/ml, biotina 0,02 µg/ml, inositol 20 µg/ml.
 - **Fuentes de carbono:** glucosa 2%.
 - **Fuentes de azufre:** 0,2mM de NH₄SO₄, cisteína, metionina, glutatión o cistationina.

Para el cultivo de *E.coli* se utilizó el siguiente medio:

- **LB:** Triptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0,5%. pH ajustado a 7,5 con NaOH 1N. En determinadas circunstancias el medio fue suplementado con los siguientes componentes:
 - Ampicilina a una concentración final de 50 mg/l.
 - IPTG (isopropil-β-D-galactopiranosido), inductor no metabolizable de la síntesis de la enzima β-galactosidasa. Se agregaba al medio a una concentración final de 1 mM.
 - Sorbitol 1 M y glicil betaína 2,5 mM. La adición de estos compuestos al medio LB favorece la solubilidad de proteínas recombinantes dentro de las células de *E. coli* (Blackwell y Horgan, 1991).
 - Glucosa 0,2% para los cultivos de células transformantes que portan derivados del plásmido pMAL-c2X.

3.4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

Para el cultivo de *S. cerevisiae* las células se incubaron a 30°C y en el caso de *E. coli* las células se incubaron en un rango entre 25 y 37°C, agitando los cultivos líquidos a 180 r.p.m. La medida del crecimiento de los cultivos se realizó mediante la lectura de la densidad óptica a 600 nm.

3.5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.5.1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE *S. cerevisiae*

Soluciones necesarias para la extracción:

- **TNST:** Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM pH 8
- **FC:** fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 con 0,1% 8-hidroxiquinolina y saturado con TE
- **TE:** 0,5 ml de una solución Tris-HCl 2 M pH 8; 0,2 ml de una solución de EDTA 0,5 mM pH 8; agua hasta un volumen de 1 litro.
- **NaOAc:** Acetato de sodio 0,3 M pH 8.

Procedimiento:

1. Se inocularon 10 ml de medio YPD con una colonia fresca y se dejó crecer durante 16 horas.
2. El cultivo se centrifugó a 3.000 g durante 2 min y se pasaron las células a un tubo eppendorf para lavarlas con 1 ml de agua estéril.
3. Las células se resuspendieron con 200 µl de TNST y luego se les agregaron 200 µl de FC y 200 µl de perlas de vidrio (450-600 µm, Sigma).
4. La mezcla se agitó en vortex a máxima velocidad durante 4 min.
5. Posteriormente se agregaron 200 µl de TE mezclando por inversión. La mezcla se centrifugó a 13.200 g durante 5 min.
6. Se tomó el sobrenadante, para colocarlo en un tubo nuevo y se añadió 1 ml de etanol 100%. Después de mezclar por inversión, la mezcla se centrifugó a 13.200 g durante 5 min.

7. Al precipitado se le agregaron 400 µl de TE junto con 3 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 5 min.
8. Después se agregaron 50 µl de NaOAC y 500 µl de FC. Esta mezcla se agitó con vortex a máxima velocidad durante 1 min.
9. Luego se centrifugó a 13.200 g durante 5 min y se desechó el sobrenadante.
10. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 13.200 g durante 1 min.
11. Se retiró completamente el sobrenadante y se centrifugó otra vez a la misma velocidad. El sobrenadante restante se retiró completamente y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min.
12. Se resuspendió el precipitado en 50 µl de agua MilliQ y se valoró de manera aproximada la calidad del DNA por electroforesis en gel de agarosa (Serva) al 0,8%, comparando la intensidad de las correspondientes bandas con la intensidad de las bandas patrón de cantidad conocida.

3.5.2. TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE

Amplificación y clonación de los genes estudiados:

Para la clonación de genes de *S. cerevisiae*, se amplificaron los genes mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa silvestre W303-1A de *S. cerevisiae* y se llevaron a cabo las digestiones, tanto del inserto como del vector, con las enzimas respectivas de acuerdo con los sitios de restricción seleccionados para tal fin. Las enzimas de restricción utilizadas eran de Roche o Takara y se utilizaron siguiendo las indicaciones del fabricante para cada una de las digestiones.

Los fragmentos de DNA obtenidos después de las digestiones se purificaron utilizando el sistema “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche) y fueron valorados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Para determinar el tamaño aproximado de los fragmentos de DNA se utilizó como estándar “1Kb DNA Ladder” (Invitrogen™).

En las ligaciones inserto-vector se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Takara), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Métodos de transformación para *E. coli* y *S. cerevisiae*:

La obtención de células competentes y el protocolo de transformación de cultivos de *E. coli* mediante el método de cloruro de calcio se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos estándar de laboratorio (Ausubel, 1994-1998). En la transformación de *S. cerevisiae* con plásmidos de expresión o fragmentos lineales de DNA se siguió el método rápido con acetato de litio (Gietz *et al.*, 1992), plaqueando las células en medio selectivo (según la auxotrofia o el marcador de selección correspondiente) e incubando las placas a 30°C durante 48 horas.

Purificación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli*

Para la purificación de plásmidos replicados en *E. coli* se cultivaron las células en medio LB con ampicilina a 37°C durante 16 horas, utilizándose el sistema “NucleoSpin® Plasmid QuickPure” (Macherey-Nagel) según las indicaciones del fabricante.

Construcción de proteínas con cambios en aminoácidos específicos

A partir de genes silvestres clonados en plásmidos de expresión en *E. coli* se construyeron plásmidos derivados de éstos con mutaciones introducidas en dichos genes (Tabla 2) mediante el método de ExSite (Weiner y Costa, 1995).

Los oligonucleótidos para la amplificación por PCR e introducción de la mutación se diseñaron cerca del punto donde se deseaba hacer el cambio, el cual no debía alterar el marco de lectura para la correcta transcripción del gen. La mutación era detectada por la creación de un sitio de restricción y confirmada por secuenciación (3100 Avant Genetic Analyser, Applied Biosystems).

3.5.3. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES NULOS SIMPLES Y MÚLTIPLES DE *S. cerevisiae*

Los mutantes nulos para un único gen se obtuvieron siguiendo el método de sustitución por homología de secuencias flanqueantes cortas (*short-flanking homology approach*) con el módulo *kanMX4* (resistencia a geneticina) (Wach *et al.*, 1994), *natMX4* (resistencia a nourseotricina) (Goldstein y McCusker, 1999), o *CaURA3MX* (restauración

de la prototrofia para uracilo) (Goldstein *et al.*, 1999), los cuales eran amplificados previamente por PCR con oligonucleótidos específicos para cada gen. Las mutaciones se confirmaron a continuación mediante PCR, según la estrategia descrita en Wach *et al.* (1994).

Los mutantes múltiples se obtuvieron cruzando las cepas parentales, induciendo la esporulación de la cepa diploide y analizando las tétradas obtenidas para seleccionar la combinación de mutaciones de interés (Sherman, 2002).

3.5.4. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Gto RECOMBINANTES

Para la purificación de las proteínas Gto1 y Gto3 se partió de 500 ml de cultivo mientras que para la purificación de Gto2 se partió de 50 ml de cultivo. Para facilitar la solubilización de Gto3 fue necesario suplementar el medio de cultivo LB con sorbitol 1 M y glicil betaína 2,5 mM e incubar el cultivo a 25°C. En el caso de la expresión de Gto1 el medio de cultivo fue suplementado con glucosa al 0,2% con el fin de reprimir la expresión del gen que codifica para la amilasa, la cual puede degradar la amilosa contenida en la columna de afinidad.

Inducción de las proteínas recombinantes:

1. Se inoculó una colonia del correspondiente transformante de *E. coli* BL21 en la cantidad correspondiente de medio LB con ampicilina (suplementado con los componentes necesarios de acuerdo con el sistema de expresión utilizado).
2. Se incubó el cultivo con agitación a 25 o 37°C según fuese el caso hasta alcanzar una concentración de 2×10^7 células/ml. Se tomó una muestra de 1 ml que se etiquetó como “control no inducido”.
3. Para inducir la expresión de la proteína se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó la incubación con agitación. La inducción de Gto1 y Gto2 se llevó a cabo durante 4 horas mientras que la inducción de Gto3 se llevó a cabo durante toda la noche (16 horas aproximadamente). Se tomó una segunda muestra de 1 ml que se etiquetó como “control inducido”.
4. Una vez terminado el tiempo de inducción, el cultivo se colocó en hielo durante 5 min y luego se centrifugó a 4.000 g durante 20 min a 4°C.

5. Después de retirar el sobrenadante, las células se congelaron a -20°C durante 16 horas o se continuó con la purificación.

La inducción de la proteína se evaluó con las muestras control por electroforesis en gel de SDS-acrilamida al 10% y tinción del gel en solución de azul de Comassie.

Purificación de las proteínas expresadas con el sistema pET-21a:

En este procedimiento se siguieron específicamente las indicaciones del sistema QUIAexpressionist™ (Quiagen) para la purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas Gto2 y Gto3 utilizando columnas de Ni-NTA. Para la elución de la proteína Gto2 se utilizó una solución de imidazol 10 mM, mientras que para la elución de la proteína Gto3 se utilizó una concentración de imidazol 20 mM. Los eluidos correspondientes se analizaron por electroforesis en gel de SDS-acrilamida al 10% y tinción del gel con solución de azul de Comassie.

Purificación de la proteína Gto1 expresada en el sistema pMAL-c2X:

Esta purificación se llevó a cabo siguiendo específicamente las instrucciones del manual del sistema pMAL™ (New England, Biolabs® INC). La digestión de la proteína eluida de la columna con el factor Xa (para separar la proteína Gto1 de la región MBP) se incubó a 20°C durante 16 horas. La comprobación de la digestión se hizo por electroforesis en gel de SDS-acrilamida al 10% y tinción del gen con solución de azul de Comassie.

La concentración final de las proteínas obtenidas mediante ambos sistemas de purificación se determinó utilizando el método de Bradford (reactivos de BioRad).

3.5.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN *S. cerevisiae* POR DIG NORTHERN

Obtención de muestras

Inicialmente se precultivó la cepa de interés en 20 ml de medio de cultivo líquido (según se indicará en cada caso) y se incubó con agitación a 30°C durante 16

horas. Posteriormente se diluyó el cultivo hasta una concentración de 5×10^5 células/ml y se dejó crecer hasta una concentración de 2×10^7 células/ml. En este momento se agregó el compuesto a ensayar y se tomó una muestra correspondiente al tiempo inicial de tratamiento. Los cultivos se incubaron durante 90 min tomando muestras en intervalos de 30 min. El volumen de cada una de las muestras fue de 100 ml de cultivo.

Las células se centrifugaron a 3.000 g durante 5 min y se lavaron con agua estéril a 4°C. A continuación se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C o se continuó con la extracción del RNA inmediatamente.

Para preparar los medios de cultivo y la transferencia del RNA a la membrana de Nylon se utilizó agua MilliQ libre de RNAsas. Todo el material de electroforesis y de transferencia se lavó con agua y abundante jabón; los materiales y las muestras se manipularon con guantes.

Soluciones y materiales:

- **Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, conjugados con fosfatasa alcalina (Roche)**
- **B1:** 25 ml de una solución Tris-HCl 2 M pH 8, agua hasta 500 ml. Esterilizado en autoclave.
- **B2:** 0,5 g de Blocking Reagent (Roche), 100 ml de B1, agua hasta 100 ml. Esterilizado en autoclave.
- **B3:** 0,5 ml de dietanolamina, 40 μ l de HCl 37%, agua hasta 50 ml.
- **CDP-Star™ (Roche):** Sustrato de la fosfatasa alcalina cuya defosforilación da lugar a la formación de un compuesto quimioluminiscente.
- **FC:** Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 con 0,1% 8-hidroxiquinolina y saturado con TE
- **Fenol Ácido:** Fenol:agua 3,75:1 (Invitrogen).
- **MagicHyb:** 25 ml de una solución de Na_2HPO_4 1 M pH 7,2, 1 ml de una solución EDTA 0,5 M pH 8, 20 g SDS, 0,5 g de Blocking Reagent (Roche), agua hasta 100 ml. Conservada a 4°C.
- **Membrana de Nylon (Roche)**
- **NaOAc:** Acetato de sodio 3 M pH 5,2. Esterilizado en autoclave.
- **NaOH 0,1 M y Tris HCl 0,1 M:** para transferir el RNA a la membrana de Nylon.

- **10x NBC:** Ácido bórico 0.5 M, citrato de sodio 10 mM, NaOH 50 mM, agua hasta 1 litro, pH 7,5. Después de preparar esta solución se agregó dietil pirocarbonato 1%, se mezcló por inversión y se autoclavó.
- **Tampón de carga 10x:** Ficoll 15%, EDTA disódico 0.1 M pH 8 y azul de bromofenol 0.25%.
- **TE:** 0,5 ml de una solución de Tris-HCl 2 M pH 8, 0,2 ml de una solución de EDTA 0,5 mM pH 8, agua hasta 1 litro. Esterilizada en autoclave.
- **TES:** 0,5 ml de una solución de Tris-HCl 2 M pH 8,0, 2 ml de una solución de EDTA 0,5 mM pH 8,0, 5 ml de una solución de SDS 10%, agua hasta 100 ml. Esterilizada en autoclave.
- **WB:** 10 ml de una solución de Na₂HPO₄ 1 M pH 7,2, 1 ml de una solución de EDTA 0,5 M pH 8, 5 g de SDS, agua hasta 500ml.

Extracción de RNA total:

1. Las células se resuspendieron en 25 µl de TE y luego se les agregaron 25 µl de fenol ácido
2. La mezcla se incubó a 65°C durante 2 min y posteriormente se agregó un volumen igual de perlas de vidrio (450-600 µm, Sigma)
3. Las células se rompieron agitando la mezcla en vortex a máxima velocidad durante 4 min.
4. Se agregaron 600 µl de TES y 600 µl de fenol ácido, luego se agitó en vortex a máxima velocidad durante 30 seg.
5. Nuevamente se incubó la mezcla a 65°C durante 15 min y se hizo una última agitación en vortex a máxima velocidad durante 30 seg. Luego la mezcla se incubó en hielo durante 5 min.
6. Se centrifugó la mezcla a 13.200 g durante 5 min a 4°C, después se tomó todo el sobrenadante, se colocó en un tubo nuevo y se agregaron 500 µl de FC.
7. Se agitó en vortex a máxima velocidad durante 30 seg y luego se centrifugó a 13.200 g a 4°C durante 5 min.
8. Tomando todo el sobrenadante, se colocó en un tubo nuevo y se agregaron 40 µl de NaOAc y 1 ml de etanol 100%.
9. Para la precipitación del RNA, se incubó a -20°C durante 1 a 2 horas. Luego se centrifugó a 13.200 g durante 5 min a 4°C.

10. El precipitado se lavó con etanol 70% (sin resuspender). Se retiró todo el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min.
11. La resuspensión del RNA se hizo con 50 μ l de agua MilliQ libre de RNAsas.
12. Para la valoración del RNA total extraído se hizo una dilución 1:100 en agua MilliQ libre de RNAsas y se midió la densidad óptica de dicha dilución a 260 nm. La concentración se calculó teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica (260 nm) corresponde aproximadamente a 40 μ g/ μ l de RNA. La razón [densidad óptica (260 nm)/ densidad óptica (280nm)] no era mayor de 2 y la concentración final se ajustó aproximadamente a 5 μ g/ μ l.
13. El RNA total extraído se conservó a -20°C o se procesó directamente para la electroforesis en gel de agarosa.

Síntesis de sondas de DNA marcadas con Dioxigenin-dUDP (DIG-dUDP):

La síntesis de sondas para la detección de mRNA se llevó a cabo utilizando el producto "DIG DNA Labeling Mix, 10x concentration" (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante. Como molde para la síntesis de la sonda se utilizó un fragmento del gen de interés, amplificado por PCR a partir de DNA genómico, con un tamaño no superior a 500 pares de bases. La calidad de la sonda se verificó por electroforesis en agarosa al 0,8%.

Electroforesis en gel de formaldehído-agarosa:

1. Se mezclaron 0,8 g de agarosa (Serva) en 80 ml de 1xNBC. La mezcla se calentó hasta que la agarosa se disolvió completamente.
2. La agarosa se dejó enfriar hasta 65°C y se añadieron 2 ml de formaldehído al 37% mezclando bien.
3. La solución de agarosa se colocó en la cubeta de electroforesis con los peines y se dejó solidificar durante 45 min aproximadamente. Como tampón de electroforesis se utilizó 1xNBC.
4. Se tomaron de 5 a 10 μ g de RNA total (5 μ l aproximadamente) y se colocaron en un tubo nuevo.
5. Luego se agregaron 2 μ l de 10xNBC, 3 μ l de formaldehído al 37% y 10 μ l de formamida.

6. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 15 min y luego se agregaron 2 µl de tampón de carga 10x junto con 0,5 µl de solución de bromuro de etidio (2 mg/ml).
7. Las muestras se cargaron en el gel y se corrió la electroforesis a 100 V durante 90 min.

Transferencia a la membrana de Nylon y fijación con rayos UV:

1. La membrana de Nylon (dimensiones 5 x 15 cm) se sumergió en agua durante 5 min.
2. Se colocó la membrana y luego el gel sobre el equipo de vacío VacuBlot de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Equipo para transferencia de RNA acoplado a bomba de vacío, LKB VacuGen X de Pharmacia).
3. Se acopló a la bomba de vacío y se colocó a una presión de 50 mBar.
4. El gel se cubrió con agua durante 15 min.
5. Se retiró el agua y se cubrió el gel con NaOH 0,1 M durante 15 min. Este paso se repitió una vez más.
6. Se retiró la solución anterior y se cubrió el gel con Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 durante 15 min.
7. Esta última solución se retiró y luego se cubrió la cámara del VacuBlot con agua hasta cubrir completamente los geles para transferir el RNA durante 90 min.
8. Transcurrido este tiempo, la membrana se retiró del VacuBlot y se colocó sobre una bandeja con papel de filtro húmedo.
9. La membrana se colocó en el equipo Stratalinker 1.800 (Stratagen) y se aplicó luz ultravioleta (12.000 µJ/cm²) para fijar en ella el RNA.
10. Usando un transiluminador UV convencional se verificó la transferencia y la posición de los rRNA.
11. Para retirar el formaldehído y el tampón de carga, se lavó la membrana dos veces con 100 ml de WB a 65°C durante 15 min.

Hibridación y lavados:

1. La solución MagicHyb se precalentó en un baño a 65°C hasta que estuvo completamente líquida.

2. Después de los lavados, la membrana se colocó en un tubo de hibridación junto con 5 ml de MagicHyb y se incubó durante 1 hora a 65°C en rotación.
3. Para desnaturalizar la sonda (2,5 ng/ml) se disolvió en 200 µl de TE y se calentó a 90°C durante 2 min; a continuación se colocó en hielo durante 5 min.
4. La sonda desnaturalizada se agregó al tubo de hibridación con la membrana y se incubó a 65°C en rotación durante 16 horas.
5. Para retirar el exceso de sonda se lavó la membrana a 65°C con 100 ml de WB, precalentado a la misma temperatura, durante 20 min. Este paso se repitió dos veces más para un total de tres lavados.

Detección por quimioluminiscencia:

Los pasos siguientes se llevaron a cabo a temperatura ambiente:

1. La membrana se lavó en 50 ml de B1 durante 5 min para un total de dos lavados.
2. Para bloquear la membrana se utilizaron 50 ml de B2 y se incubó con agitación suave durante 60 min.
3. El anticuerpo Anti-DIG se diluyó en proporción 1:15.000 en B2 y se incubó con agitación suave durante 30 min.
4. Para retirar el exceso de anticuerpo, la membrana se lavó con 50 ml de B1 durante 20 min, para un total de 4 lavados.
5. Posteriormente se incubó la membrana con 50 ml de B3 durante 5 min y luego con 1 ml de B3 con CDP-Star diluido 1:100 durante 5 min.
6. Para captar la quimioluminiscencia se utilizó el equipo "Lumi-Imager™" (Roche).

3.5.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA UTILIZANDO MICROORDENAMIENTOS DE DNA

Obtención de las muestras

Inicialmente se precultivaron la cepa silvestre de *S. cerevisiae* y la cepa de interés cada una en 20 ml de medio de cultivo líquido incubando con agitación a 30°C durante 16 horas. Posteriormente los cultivos se diluyeron hasta una concentración de

5×10^5 células/ml para un volumen final de 30 ml de cultivo y se dejaron crecer hasta una concentración de 3×10^7 células/ml. Las células se centrifugaron a 13.200 g durante 2 min, se retiró el sobrenadante y finalmente se lavaron con agua estéril a 4°C. A partir de este momento se inició la extracción del RNA.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA marcado con fluorocromos

Para la extracción del RNA a partir de las células de cada cepa se utilizó el sistema “RiboPure™-Yeast” (Ambion®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la concentración del RNA se utilizó el equipo “NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer”.

Para la síntesis y marcaje de cDNA a partir del RNA total se utilizó el sistema “CyScribe Post-Labeling Kit” (Amersham Biosciences) y para la purificación del cDNA marcado se utilizó el sistema “CyScribe GFX Purification Kit” (Amersham Biosciences), siguiendo específicamente las instrucciones del fabricante.

La cantidad de RNA total utilizada para las síntesis de cDNA fue de 30 µg y la síntesis se llevó a cabo en presencia de Cy3-dUTP o Cy5dUTP. Una vez marcado el cDNA de cada una de las cepas se combinó para hibridar el microordenamiento genómico de levadura. La concentración del cDNA marcado y la cantidad de fluorocromo incorporado (expresado en pmol) se determinaron utilizando el equipo “NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer”.

Hibridación y análisis del microordenamiento

Las características del microordenamiento y las condiciones de prehibridación, hibridación y lavados se han descrito previamente (Viladevall *et al.*, 2004). Para la prehibridación y la hibridación se utilizó el equipo Array Booster™ (Advalytix) de acuerdo con las especificaciones de uso del equipo. Las soluciones para esta parte del procedimiento son las siguientes:

SSC 20x: NaCl 3 M, Citrato de sodio dihidratado 0,3 M.

Solución de prehibridación: 5x SSC, SDS 0,1%, BSA 1%.

Solución de hibridación: Formamida 50%, 5x SSC, SDS 0,1%.

Solución de lavado A: 1x SSC, SDS 0,2%.

Solución de lavado B: 0,1x SSC, 0,2% SDS.

Solución de lavado C: 0,1x SSC.

Estas soluciones eran filtradas para evitar que el soporte que contiene el microordenamiento se contaminase con artefactos que interfiriesen con la lectura en el escáner de fluorescencia.

Se tomó el soporte que contiene el microordenamiento y se aplicó luz UV en el equipo Stratalinker (12.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$). Para prehibridar, se precalentó la solución de prehibridación a una temperatura de 42°C y se colocó el soporte junto con la solución de prehibridación en el Array Booster™ incubando a 42°C de 45 a 60 min. Luego se colocó el soporte en una cesta portaobjetos para lavarlo sumergiéndolo 5 veces en agua MilliQ.

Para la hibridación se suspendieron los cDNA marcados de cada cepa en tampón de hibridación, colocando como mínimo entre 20 y 30 pmoles de cada una de las muestras, para un volumen total de 97 μl . El soporte se colocó en el Array Booster™ y luego se agregó sobre él la mezcla de cDNA para hibridar durante 16 horas a 42°C.

Una vez transcurrido este tiempo, el soporte se colocó en una cesta portaobjetos y se sumergió en solución de lavado A precalentada a 42°C con agitación durante 8 min, luego en solución de lavado B a temperatura ambiente con agitación durante 8 min y en solución de lavado C con agitación durante otros 8 min. Finalmente el soporte se sumergió 5 veces en agua MilliQ y se secó por centrifugación a 100 g durante 20 min.

Para medir la fluorescencia del microordenamiento hibridado se utilizó el escáner Axon 4100A (Axon Instruments, Inc.) y para el análisis de los datos se utilizó el programa GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments, Inc.). En este programa se calculó para cada gen la razón entre la intensidad de la señal del cDNA de la cepa silvestre y la señal del cDNA del mutante. Se analizaron los datos de tres experimentos independientes y se obtuvo la media de esta razón para cada gen.

Se consideró que un gen dado estaba expresado diferencialmente entre las dos cepas cuando el resultado del cálculo de la razón era mayor que 2 o menor que 0,5. Para cada experimento, el cDNA obtenido a partir de las cepas silvestre y mutante se

marcó en paralelo y se intercambiaron los fluorocromos de las muestras entre experimentos independientes compensar así diferencias debidas al fluorocromo.

3.5.7 AISLAMIENTO Y SUBFRACCIONAMIENTO DE MITOCONDRIAS A PARTIR DE CÉLULAS DE *S. cerevisiae*

Las mitocondrias se purificaron a partir de células creciendo exponencialmente en medio YPGly a una concentración de 2×10^7 células/ml para un volumen total de 1 litro y se fraccionaron posteriormente de acuerdo con el método descrito por Diekert *et al.* (2001). El análisis por Western de cada una de las fracciones se llevó a cabo según se describe por Rodríguez-Manzaneque *et al.* (1999), utilizando el anticuerpo mAB anti-HA (Roche) a una dilución 1: 5.000 y anticuerpo policlonal de conejo anti-lipóico a una dilución 1: 50.000 (Cabisco *et al.*, 2000).

3.6. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

3.6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE GLUTATIÓN OXIDADO Y REDUCIDO

La medición de la concentración de glutatión oxidado y reducido por espectrofotometría se ha descrito previamente (Jakubowski *et al.*, 2000). El número de células y su volumen se determinó utilizando el analizador de partículas Coulter Z2. La obtención de los extractos celulares se describe brevemente a continuación.

Obtención de los extractos celulares

La cepas silvestre y mutante se cultivaron exponencialmente cada una en 50 ml de YPD hasta una concentración de 2×10^7 células/ml. Posteriormente se centrifugaron a 3.000 g durante 5 min y se retiró el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril a 4°C y se resuspendieron en una solución de ácido sulfosalicílico 1% (Sigma) a 4°C. Se agregó luego un volumen igual de perlas de vidrio (450-600 μm , Sigma) y se agitó durante 2 minutos dejando en hielo otros dos minutos más. Esta agitación e incubación en hielo se repitió 4 veces más para un total de 5 repeticiones. Posteriormente la mezcla se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó a 13.200 g a 4°C durante 5 min. Se tomó el sobrenadante (200 μl aproximadamente) y se dividió en dos partes iguales. Una de las partes se dejó intacta para medir la concentración de

glutación total (GSH + GSSG) y la segunda fue tratada para medir únicamente glutatión oxidado (GSSG). El tratamiento consistió en bloquear las moléculas de GSH agregando 2,6 μ l de vinilpiridina y luego rápidamente 8 μ l de trietanolamina 1,5 M. Se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 hora. Finalmente se determinó la concentración de GSH por espectrofotometría utilizando el reactivo de Ellman (Jakubowski *et al.*, 2000).

3.6.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Obtención de los extractos celulares

Para determinar las actividades *in vivo* fueron necesarios 200 ml de cultivos de las correspondientes cepas de *S. cerevisiae* en fase exponencial a una concentración de 2×10^7 células/ml. Luego los cultivos se centrifugaron a 5.400 g durante 6 min y las células se lavaron con tampón de lisis (fosfato de sodio 0,11 M pH 6,5) a 4°C. Las células se resuspendieron en 200 μ l de tampón de lisis a 4°C y se agregaron 7 μ l de inhibidor de proteasas 200x PIB (fenilmetasulfonil fluoruro 200 mM, N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona 20 mM, pepstatina A 200 μ M, preparado en etanol 100%). Después de mezclar bien se agregó un volumen igual de perlas de vidrio (450-600 μ m, Sigma) y se agitó dos veces en el equipo "FastPrep FP120" (Thermo Savant) a máxima velocidad durante 45 seg con una incubación intermedia en hielo de 5 min. Toda la fase líquida se recuperó y se centrifugó a 4°C y a 13.200 g durante 30 min. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo para posteriormente valorar la concentración de proteína según el método de Bradford (reactivos de BioRad) y utilizarlo para determinar las actividades enzimáticas específicas.

Determinación de las actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas de las GST se determinaron espectrofotométricamente sobre diferentes sustratos (Habig *et al.*, 1974). Para la actividad glutaredoxina o tiol transferasa se utilizó como sustrato el HED, el cual forma un puente disulfuro mixto con el GSH que es resuelto por la enzima generando así GSSG. Esta reacción se acopla a la actividad de la glutatión reductasa y a la oxidación del NADPH, cuya concentración se mide espectrofotométricamente (Holmgren y Aslund, 1995). La actividad DHAR y DMAR se midieron también espectrofotométricamente según se describe en la literatura (Whitbread *et al.*, 2005).

3.7. LOCALIZACIÓN MICROSCÓPICA DE PROTEÍNAS MARCADAS CON GFP

Las proteínas marcadas con GFP se expresaron en células de *S. cerevisiae* y se observaron al microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) según las técnicas estándar (Tatchell y Robinson, 2002). Para la localización de la proteína de fusión GFP-Gto1, el transformante respectivo se cultivó en medio SC Oleico durante 16 horas para inducir la formación de peroxisomas y verificar su localización en este organelo. Para la inducción de Gto2 y Gto3 se utilizó el medio SC con una concentración de metionina de 300 μ M haciendo las observaciones en cultivos exponenciales.

3.8. ANÁLISIS *IN SILICO*

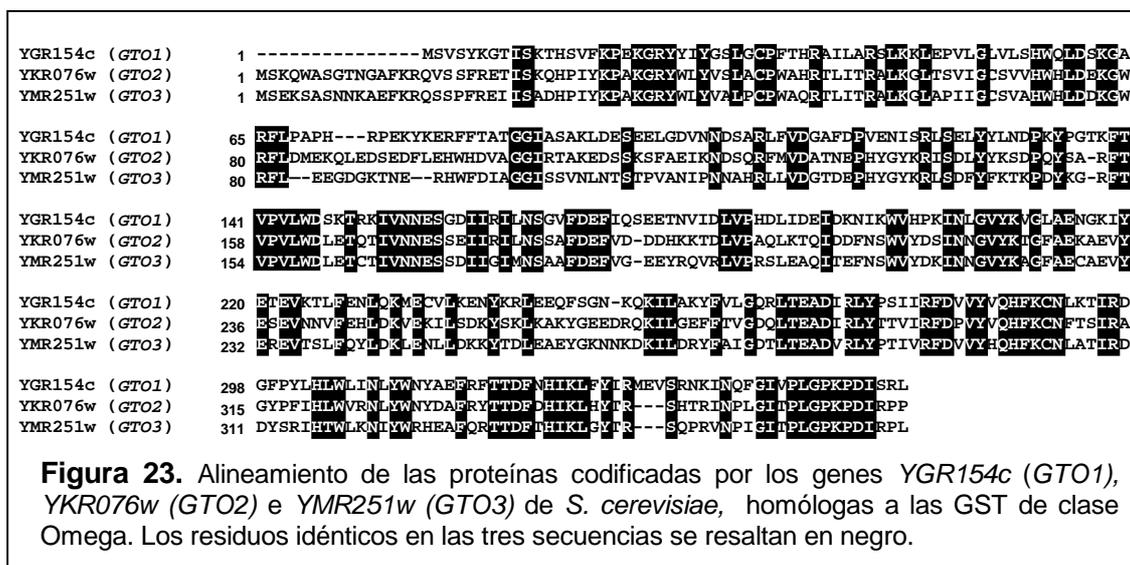
La búsqueda de secuencias homólogas se llevó a cabo utilizando el programa BLAST con los parámetros propuestos por el sistema (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Los alineamientos múltiples se realizaron aplicando el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), disponible desde el servidor del Instituto Europeo de Bioinformática (www.ebi.ac.uk). Para la búsqueda de secuencias reguladoras en regiones promotoras se utilizaron las herramientas informáticas disponibles en <http://rsat.scmbb.ulb.ac.be/rsat> (van Helden, 2003). Para la predicción de la estructura secundaria se utilizó el análisis de combinación de regresión lineal multivariada aplicando los programas SOPMA, GOR4 y SIMPA (Combet *et al.*, 2000) (Network Protein Sequence Analysis, PBIL, <http://npsa-pbil.ibcp.fr>). El programa MITOPROT permitió predecir posibles secuencias mitocondriales y sitios de corte en proteínas (Claros y Vincens, 1996). La búsqueda de las denominaciones de diferentes genes bacterianos se realizó en la base de datos del TIGR (The Institute for Genomic Research, www.tigr.org).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EL GENOMA DE *S. cerevisiae* CONTIENE TRES ORF QUE CODIFICAN PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A LAS GST DE CLASE OMEGA

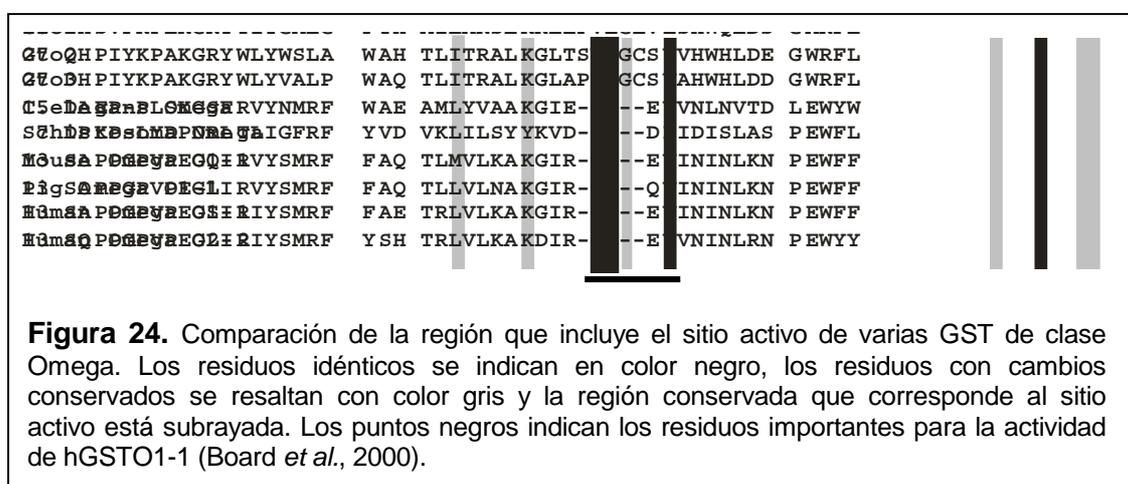
El análisis del genoma de *S. cerevisiae* indica que este hongo tiene tres secuencias cuyos productos son homólogos a proteínas GST de clase Omega, entre ellas a hGSTO1-1. Las tres secuencias identificadas corresponden a las ORF *YGR154c*, *YKR076w* y *YMR251w*, y los tres genes fueron respectivamente denominados *GTO1*, *GTO2* y *GTO3* (por Glutathione Transferase Omega-like). Al gen *GTO2* se le ha asignado previamente el nombre *ECM4* (de Extra Celular Mutants) por su posible relación con la biogénesis de la pared celular, ya que el mutante correspondiente fue descrito como sensible a varios agentes químicos que evidencian defectos en esta estructura celular (Lussier *et al.*, 1997). Sin embargo, en el fondo genético utilizado por nosotros no hemos sido capaces de reproducir tal sensibilidad (resultados no publicados).



La homología entre las tres proteínas Gto se extiende a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos. Gto1 tiene una homología del 50% con Gto2 y del 62% con Gto3. La homología entre Gto2 y Gto3 también es del 50% (Figura 23). Comparando el tamaño de las Gto de *S. cerevisiae* con hGSTO1-1, aquellas son más largas que ésta, debido a una serie de aminoácidos adicionales presentes en las Gto de levadura que no tienen homólogos en la secuencia de la proteína humana. Un ejemplo de ello es la

región comprendida entre los aminoácidos 179 y 227 de las tres proteínas, la cual no se encuentra en la secuencia de hGSTO1-1.

Como se mencionó en el apartado 1.2.2.2., las GST de clase Omega tienen una cisteína conservada en el sitio activo, la cual es importante para las actividades enzimáticas dependientes de glutatión. Esta cisteína está presente en las tres Gto, localizada en la posición 31 de Gto1 y en la posición 46 de Gto2 y Gto3 (Figura 24). Otros aminoácidos importantes para la actividad de hGSTO1-1 como Pro33, Leu56 y Lys59 también están conservados en las tres Gto, aunque el residuo Phe34 se ha sustituido por triptófano en Gto2 y Gto3 (Figura 24).

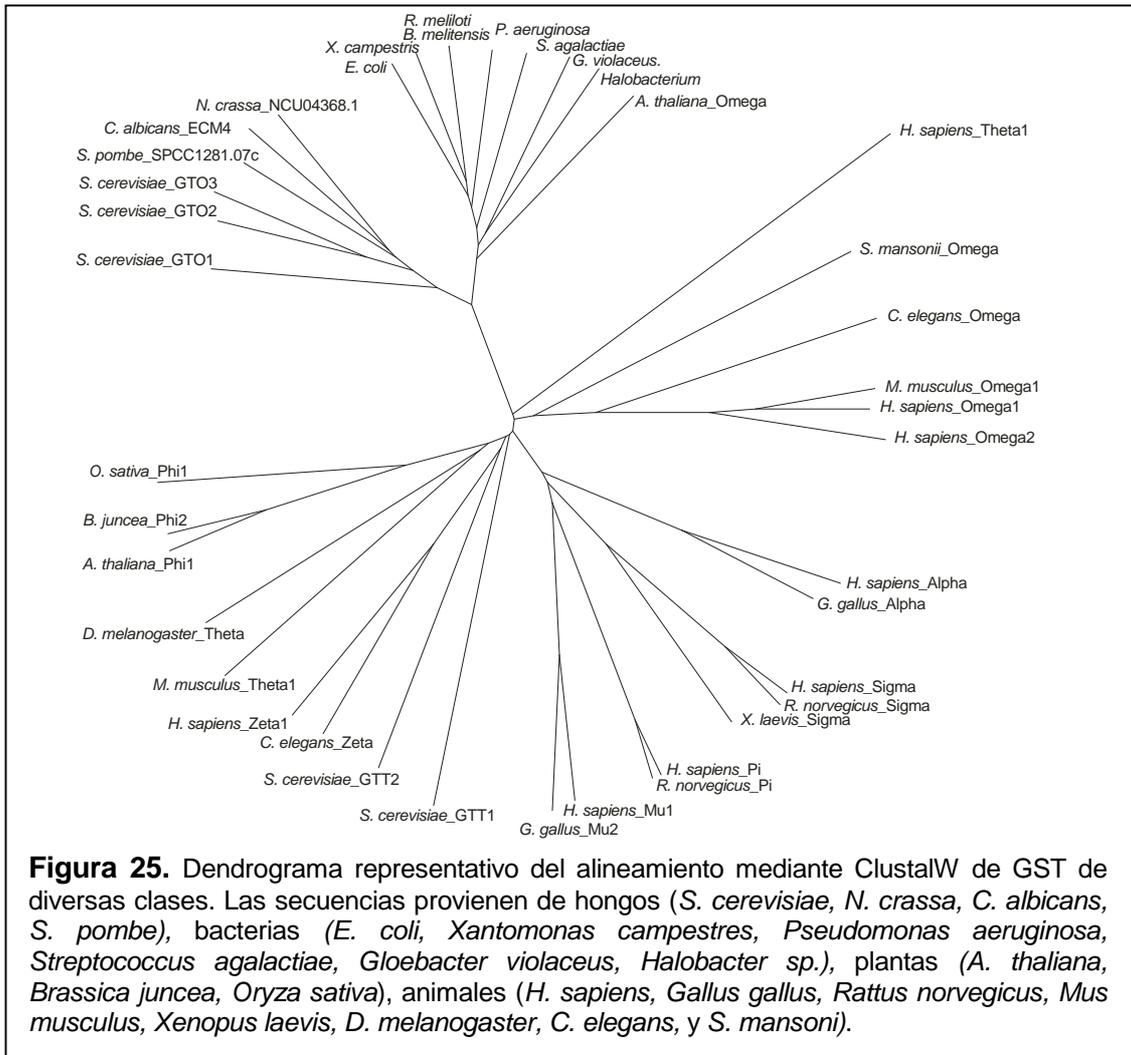


4.2. HOMÓLOGOS DE LOS GENES GTO EN OTROS MICROORGANISMOS

La búsqueda de secuencias homólogas a las Gto en otros organismos muestra que éstas existen en otros hongos, por ejemplo, en *C. albicans*, *S. pombe* y *N. crassa*, así como en bacterias, particularmente en cianobacterias y proteobacterias (Figura 25). En el alineamiento de estas proteínas hipotéticas se observa que las secuencias homólogas halladas en hongos, así como las bacterianas, forman un grupo claramente separado de las GST de otras clases. Gtt1 no se encuentra dentro de un grupo en particular aunque Gtt2 se acerca a las GST de clase Zeta (Figura 25). Este hecho confirma la divergencia ya descrita entre las proteínas Gtt de *S. cerevisiae* y las demás GST fúngicas o de mamíferos (McGoldrick *et al.*, 2005b).

La secuencia proteica de *E. coli* homóloga a las GST de clase Omega es codificada por el gen *yqjG*, siendo aquella altamente similar a secuencias presentes en otras enterobacterias como *Salmonella enterica* (serovar Typhi CT18), *Shigella flexneri*

(cepa 2a 2457T), *Yersinia pestis* (cepa KIM) y *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PAO1) (Figura 25). De acuerdo con diversas bases de datos, se predice que estas proteínas son hipotéticas GST (Salgado *et al.*, 2006).



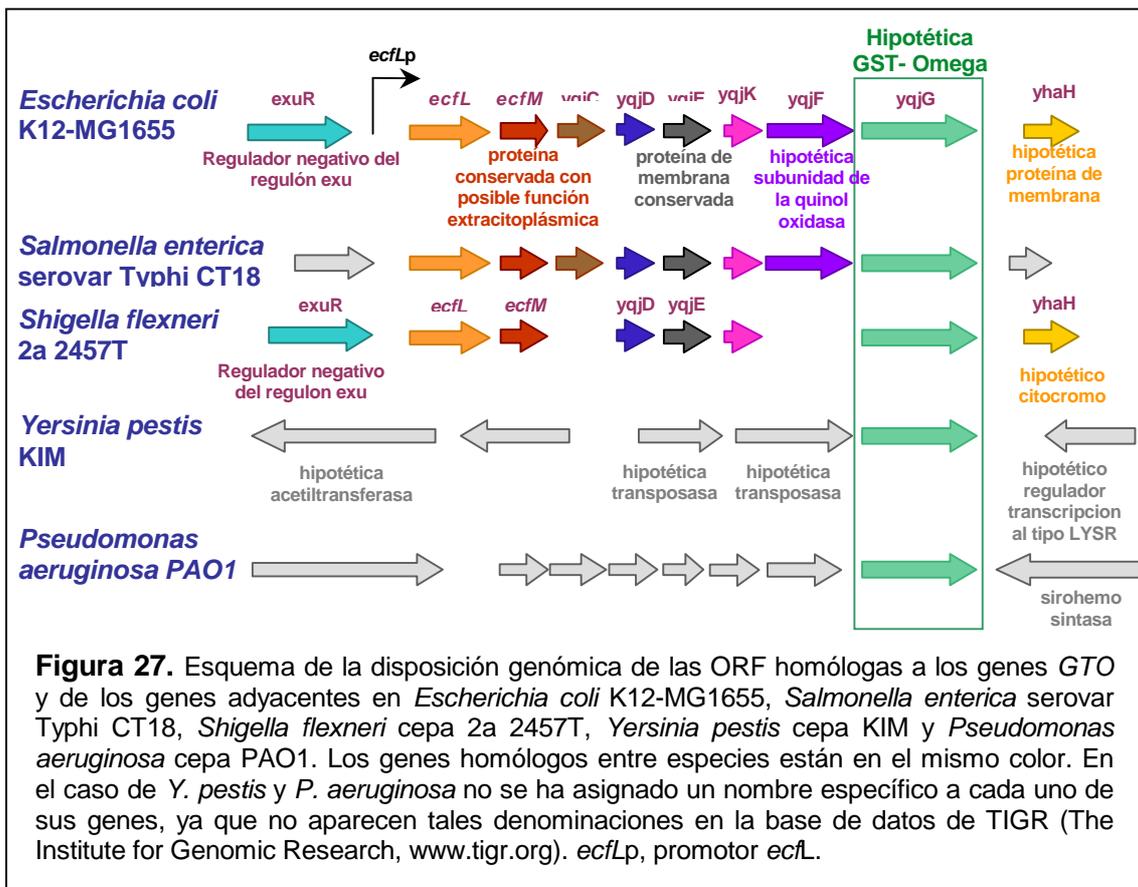
Analizando la posición de los genes adyacentes a esta GST hipotética de *E. coli*, se observa que algunos de ellos tienen el mismo sentido de transcripción. Esta misma disposición se observa en los genomas de otras enterobacterias como *Salmonella enterica* y *Shigella flexneri*, aunque no se conserva en especies evolutivamente más alejadas como son *Yersinia pestis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 26). Esto indica que posiblemente dichos genes se transcriben sobre una sola molécula de mRNA haciendo parte de un operón. Los genes que se co-transcriben de este modo frecuentemente tienen funciones relacionadas, por ejemplo haciendo parte de una misma ruta metabólica, y son co-regulados a nivel transcripcional (Ermolaeva *et al.*, 2001). Como se ilustra en la figura 26, siete genes antes de *yqjG* se encuentra el

promotor *ecfLp*. Este promotor es reconocido por la enzima $E\sigma^E$ RNA polimerasa, la cual controla uno de los dos regulones que responden al choque térmico en *E. coli* (Dartigalongue *et al.*, 2001).

<i>E. coli</i>	MGQLIDGVVHDTWYDTKSTGGKFQRSASAFRNWLTADGAPGPTGKGG	AAFKIRYHNVS	60
<i>S. flexneri</i>	MGQLIDGVVHDTWYDTKSTGGKFQRSASAFRNWLTADGAPGPTGTGG	IAFKIRYHNVS	60
<i>S. enterica</i>	MGQLIDGVVHDTWYDTKSSGGKFQRSASAFRNWLTADGAPGPSGEGG	AAFKIRYHNVS	60
<i>Y. pestis</i>	MGR---WWRWKWTFHPS-----LTTTDGQAGPQGGKGFNAFAIRYHNVS	43	
<i>P. aeruginosa</i>	MGQLIDGRWHDQWYDTQKDG-----RFQRENAQRHHLGEPAEPAEGGRYHNVS	50	
Gtol <i>S.c.</i>	-----MSVSYKGTISKTHSVKPKKRYHNVS	28	
<i>E. coli</i>	LACPWAHRTLIMRKLKGLPEFISVSVVNPLMLENGWTFD-----DSFPGA	TC--- 107	
<i>S. flexneri</i>	LACPWAHRTLIMRKLKGLPEFISVSVVNPLMLENGWTFD-----DSFPGA	TC--- 107	
<i>S. enterica</i>	LACPWAHRTLIFRKLKGLPEFIPVSVVNPLMLENGWTFD-----DTFPA	TC--- 107	
<i>Y. pestis</i>	LACPWAHRRALLMRTLKGLLESLSVSVVHPLMQENGWTFD-----SDFPA	TC--- 90	
<i>P. aeruginosa</i>	LACPWAHRTLIVRKLKGLLESIVDVSVSWLMRENWTFD-----PAH-G	TC--- 96	
Gtol <i>S.c.</i>	LCPPFTHRAILARSILKLEPVLGLVLSHWQLDSKCAEFLPAPHRPEKYKERFFTA	TCGIA 88	
<i>E. coli</i>	-----DTLYQHEHLYQIYMLHAEHHSYG-RVTVFVLWIKK	140	
<i>S. flexneri</i>	-----DTLYQHEHLYQIYMLHAEHHSYG-RVTVFVLWIKK	140	
<i>S. enterica</i>	-----DTLYQHEHLYQIYMLHAEHHSYG-RVTVFVLWIKK	140	
<i>Y. pestis</i>	-----DALYHLDLYQIYMLRAAEHHSYG-RVTVFVLWIKK	123	
<i>P. aeruginosa</i>	-----DRLDGLAFLHORYTRDDEHHSYG-RVTVFVLWIKK	129	
Gtol <i>S.c.</i>	SAKLDESEELGDVNNDSARLFVDGAFDPVENISFLISELYYLNLEKFLGTKFVTVFVLWIKK	148	
<i>E. coli</i>	NHTIVSNESAETIRRMNT-AFDALG---AKAGDYYPATIQPKIDELNGWIYDYNNGV	195	
<i>S. flexneri</i>	NHTIVSNESAETIRRMNT-AFDALG---AKAGDYYPATIQPKIDELNGWIYDYNNGV	195	
<i>S. enterica</i>	NHTIVSNESAETIRRMNT-AFDALG---AKAGDYYPATIQPKIDELNGWIYDYNNGV	195	
<i>Y. pestis</i>	QQTIVSNESAETIRRMNT-AFDVVG---AKAGDYYPATIRNLI DDINGWVYDYNNGV	178	
<i>P. aeruginosa</i>	AQKIVSNESAETIRRMNT-AFDALG---ANALDFYEPATIRERLRLNGRIYPAVYNGV	184	
Gtol <i>S.c.</i>	TRKIVSNESGDIIRLINSVGFDEFIQSEETNVIDLVEHLLIDELDKNIKWVHPKINNGV	208	
<i>E. coli</i>	KACFATSQQAYDEAVAKVFESTARLEQIIIGQ-----HRYLTCNGLTE	237	
<i>S. flexneri</i>	KACFATSQQAYDEAVAKVFESTARLEQIIIGQ-----HRYLTCNGLTE	237	
<i>S. enterica</i>	KACFATSQQAYDEAVEKVFESTARLEQIIIGQ-----HRYLTCNGLTE	237	
<i>Y. pestis</i>	KACFATTQAYDEAVGTFESALDRLEQIIIGQ-----HRYLTCNGLTE	220	
<i>P. aeruginosa</i>	KACFATRQDAYEEAFVQLFEEDYIEGLIIGE-----RRYLTCNGLTE	226	
Gtol <i>S.c.</i>	KVCLAENGLIYETEVTLEFENLQKMECVIKENYKRLEEQFSGNKQKILAKYFVLCNGLTE	268	
<i>E. coli</i>	ADIRLWITLVRFDVYVTHFKCDKRRISD-YLNIYGFIRDYIQ-MPGIARTVNFHIRNH	295	
<i>S. flexneri</i>	ADIRLWITLVRFDVYVTHFKCDKRRISD-YLNIYGFIRDYIQ-MPGIARTVNFHIRNH	295	
<i>S. enterica</i>	ADIRLWITLVRFDVYVTHFKCDKRRISD-YLNIYGFIRDYIQ-IPGIARTVNFHIRNH	295	
<i>Y. pestis</i>	ADIRLWITLVRFDVYVTHFKCDKRRISD-YPNLYGFIRDYIQ-MPGIARTVDFHIRNH	278	
<i>P. aeruginosa</i>	ADIRLWITLVRFDVYVTHFKCDKRRISD-YPNISGWIRELYIQ-RPGIGETVDFHIRNH	284	
Gtol <i>S.c.</i>	ADIRLYPSIIRFDVYVQHFKNLKTIRDFGFPYIHLWILNIYWNIAEFRETDFHIRNH	328	
<i>E. coli</i>	YFRSHKT---INPTGIIISIGFWQDLDEPHGRDVRFG----- 328		
<i>S. flexneri</i>	YFRSHKT---INPTGIIISIGFWQDLDEPHGRDVRFG----- 328		
<i>S. enterica</i>	YFRSHKT---INPTGIIISVGFQDLLEPHGRDVRFG----- 328		
<i>Y. pestis</i>	YFRSHGT---INPYGIIISIGFQQNLLEPHDRANRFV----- 311		
<i>P. aeruginosa</i>	YFASHRT---INPTGIVPLGFRDLARAPGRERLPGKGIWGE 324		
Gtol <i>S.c.</i>	YIRMEVSRNKINQFGLVPLGFKPDISRL----- 356		

Figura 26. Alineamiento por ClustalW de las secuencias proteicas homólogas a Gto1 de *S. cerevisiae* presentes en las especies *E. coli* cepa K12-MG1655, *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18, *Shigella flexneri* cepa 2a 2457T, *Yersinia pestis* cepa KIM y *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1. En barras negras se resaltan los residuos idénticos y en barras grises se resaltan los cambios conservados entre proteínas.

Como no se conoce la función de ninguno de los genes que pueden pertenecer a este operón, no se les puede relacionar con alguna actividad biológica específica, aunque a algunos se les ha asignado una actividad enzimática hipotética por su homología con otras enzimas (Figura 27). En resumen, del análisis de la posición en el genoma de *E. coli* u otras bacterias del gen que codifica la hipotética GST de clase Omega no se puede extraer ninguna conclusión sobre su función más allá de su posible localización en un operón.



4.3. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS IN VITRO E IN VIVO DE LAS PROTEÍNAS *Gto*

4.3.1. PURIFICACIÓN Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS IN VITRO DE LAS PROTEÍNAS *Gto1*, *Gto2*, *Gto3* Y *Gtt1*

Para determinar la actividad enzimática de las tres proteínas *Gto*, cada una de ellas fue clonada en el vector de expresión pET-21 y expresada en *E. coli*. *Gto2* se obtuvo en una forma soluble a partir de cultivos incubados a 37°C en medio LB sin mayores modificaciones en las condiciones de cultivo de la cepa, mientras que *Gto1* y *Gto3* no eran solubles en estas mismas condiciones de cultivo. Se ha reportado que la

adición de sorbitol y glicil betaína al medio de cultivo LB permite la solubilización de proteínas recombinantes que son insolubles en el citoplasma de *E. coli* (Blackwell y Horgan, 1991). Para probar la expresión de Gto1 y Gto3 bajo estas condiciones, se ensayó la adición de estos compuestos al medio de cultivo incubando las bacterias entre 25 y 37°C. Gto3 se solubilizó cuando el cultivo se incubó a 25°C pero Gto1 continuó siendo insoluble bajo todas las condiciones probadas. En vista de ello, se determinó cambiar el vector de expresión y se clonó el gen *GTO1* en el plásmido pMAL-c2X. Este vector permite fusionar la secuencia de la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MBP) con la proteína de interés en el extremo N-terminal. La expresión de Gto1-MBP se llevó a cabo en medio LB, a 37°C y sin ninguna otra modificación, lo que permitió obtener esta proteína de fusión en la fracción soluble. Todas las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando columnas específicas para cada caso. Las construcciones basadas en los plásmidos pET-21 se purificaron utilizando columnas de níquel y la construcción basada en pMAL-c2X se purificó mediante columnas de resina-amilasa. En este último caso, la proteína Gto1 se separó del

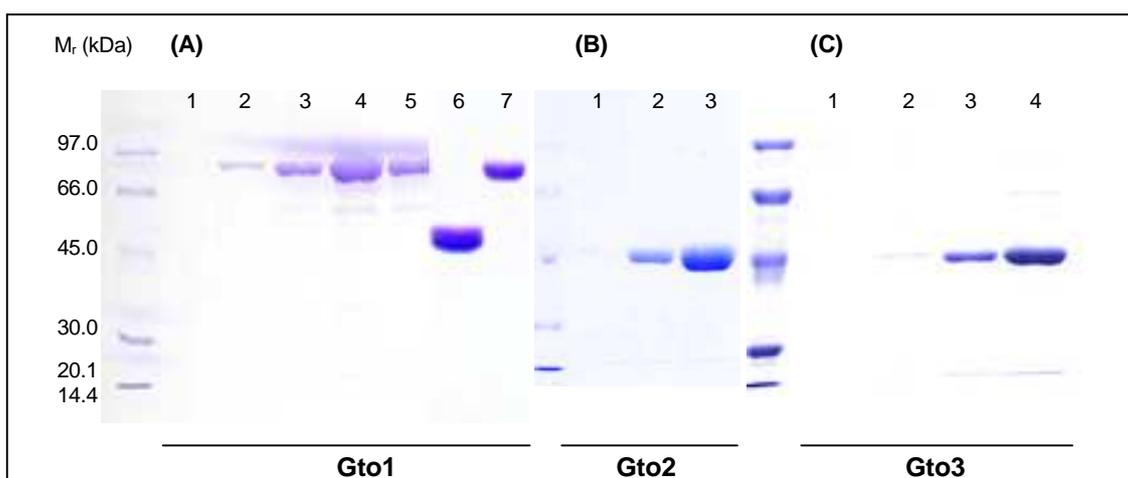


Figura 28. Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida de las proteínas Gto1, Gto2 y Gto3 purificadas a partir de cultivos de *E. coli*. *GTO1* fue clonada en el plásmido pMAL-c2X y expresada en *E. coli* a 37°C en medio LB. El extracto celular pasó a través de columnas de resina-amilasa para retener la proteína Gto1-MBP. La proteína retenida fue separada de la resina utilizando tampón de elución y la proteína obtenida fue digerida con el Factor X para separar a Gto1 de la MBP (ver Materiales y Métodos). En (A) los carriles 1 al 5 corresponden a las eluciones de la columna resina-amilasa y los carriles 6 y 7 corresponden a la digestión de los eluidos con el Factor X (carril 6 Gto1 y carril 7 Gto1-MBP). Los genes *GTO2* y *GTO3* fueron clonados en el plásmido pET-21 y expresados también en *E. coli*. La proteína Gto2 se obtuvo en la fracción soluble del extracto celular de la cepa correspondiente cultivada en LB a 37°C, mientras que para solubilizar a Gto3 fue necesario cultivar la cepa de *E. coli* correspondiente a 37°C en medio LB con glicil betaína y sorbitol. Los extractos celulares de ambas cepas pasaron a través de columnas de níquel y se eluyeron con tampón de elución (ver Materiales y Métodos). Los carriles 1 al 3 en (B) y los carriles 1 al 4 en (C) muestran los eluidos que contienen a Gto2 y Gto3 respectivamente obtenidos a partir de la purificación con columnas de afinidad de níquel.

fragmento MBP mediante la digestión del producto de la purificación con el Factor X. Los productos de la purificación y de la digestión se valoraron por electroforesis en geles de SDS-acrilamida, tinción con azul de Coomassie y obtención de una imagen digital de los geles teñidos (Figura 28). Al final del proceso, la pureza de cada uno de los productos fue, como mínimo, del 95%. También se expresó Gtt1 a partir de la correspondiente construcción en el plásmido pET-21 para utilizarse como control positivo de la actividad enzimática GST sobre CDNB.

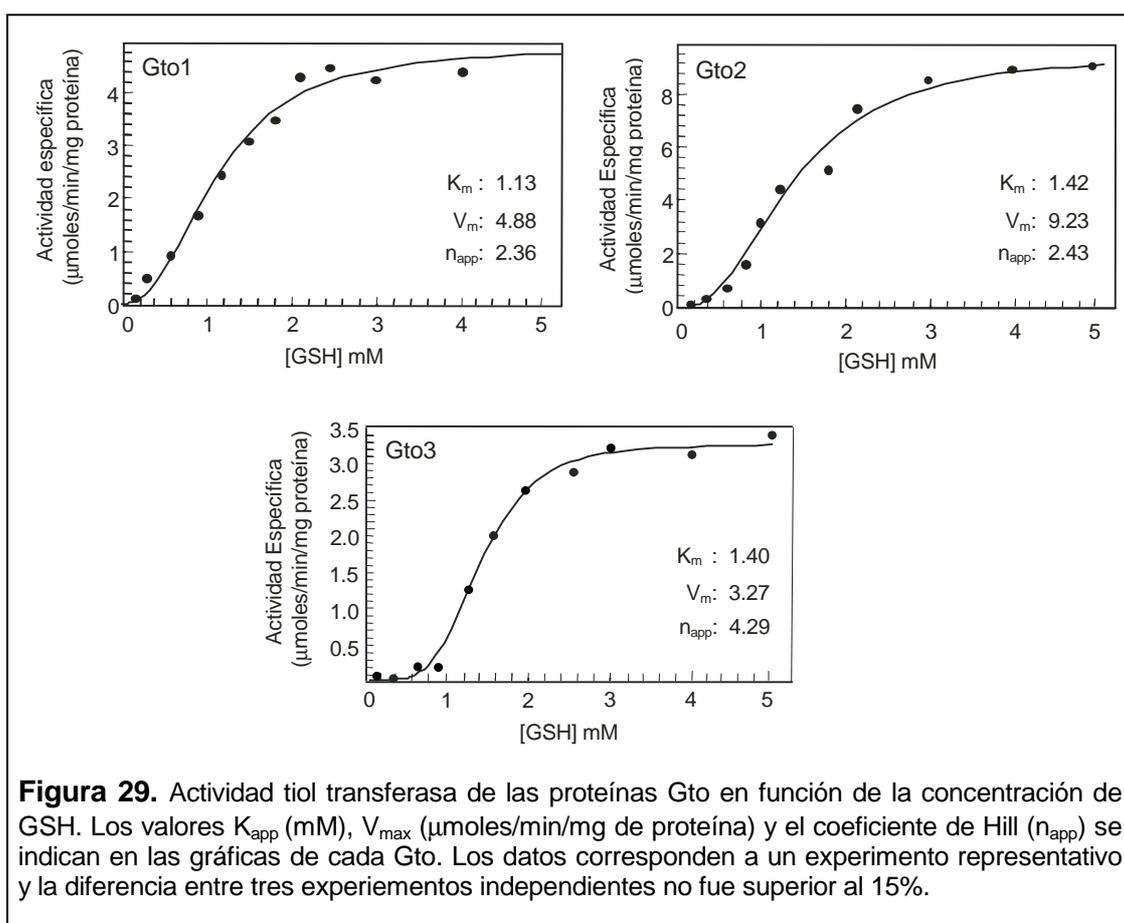
No se detectó actividad en ninguna de las proteínas Gto sobre los sustratos CDNB, 1,2-dicloronitrobenzeno o 4-hidroxinonenal, aunque sí se detectó actividad sobre el ácido etacrínico (Tabla 4). Por otro lado, las tres Gto tienen actividad tiol transferasa sobre HED, sustrato común de las glutaredoxinas ditiólicas (Holmgren y Aslund, 1995). De manera opuesta, Gtt1 presenta actividad considerable sobre CDNB, como se había descrito anteriormente (Choi *et al.*, 1998), pero no tiene actividad tiol transferasa. Además, las Gto tienen una actividad DHA reductasa y DMA^v reductasa moderada (Tabla 4). Comparando la actividad de las Gto con las GSTO humanas, se observa que la actividad específica de las proteínas Gto sobre los diferentes sustratos ensayados es

ACTIVIDAD	Gto1	Gto2	Gto3	Gtt1
Glutación Transferasa^a				
1-Cloro, 2-4,dinitrobenzeno	ND	ND	ND	70±8
1,2-Dicloronitrobenzeno	ND	ND	ND	ND
Ácido etacrínico	252 ± 31	94 ± 6	104 ± 19	1045 ± 11
4-hidroxinonenal	ND	ND	ND	ND
Tiol transferasa^b	1.93 ± 0.118	3,27 ± 1.286	1.18 ± 0.240	ND
Dehidroascorbato reductasa^c	0.23 ± 0.031	0.11 ± 0.009	0.16 ± 0.004	ND
Dimetilarsenato (V) reductasa^d	0.17 ± 0.031	0.14 ± 0.009	0.15 ± 0.026	ND

Tabla 4. Actividad de las GST recombinantes de *S. cerevisiae* sobre varios sustratos. Los resultados son la media ± desviación estandar de tres determinaciones, obtenidas a partir de purificaciones proteicas independientes. (a) Actividad específica expresada como nmoles de conjugado de glutación formado por minuto por mg de proteína; (b) Actividad específica expresada como μmoles de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína utilizando como sustrato el HED; (c) Actividad específica como μmoles de DHA reducido por minuto por mg de proteína; (d) Actividad específica expresada como μmoles de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína. ND, No detectada.

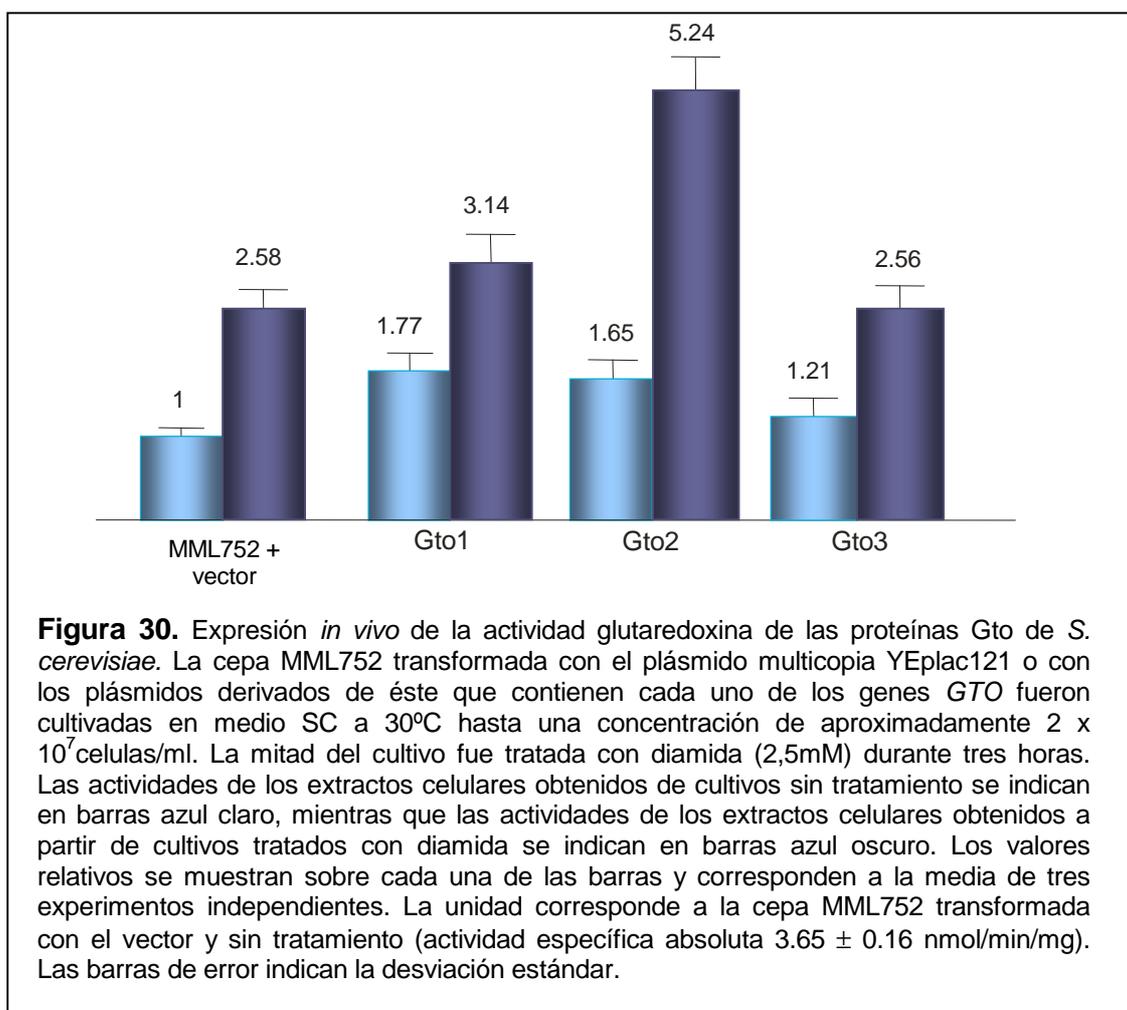
similar a la descrita para hGSTO1-1, aunque la actividad DHA reductasa de hGST2-2 es considerablemente mayor (Board *et al.*, 2000; Schmuck *et al.*, 2005).

También se determinó la actividad específica de las proteínas Gto en función de la concentración de GSH. La representación gráfica de los datos y los análisis de éstos con funciones de regresión no lineal mediante el programa Matemática 5.1 indican que las gráficas se ajustan a una curva sigmoideal (Figura 29). Se calcularon los coeficientes aparentes de Hill (n_{app}) para cada una de las proteínas, que corresponden a 2,36 para Gto1, 2,43 para Gto2 y 4,29 para Gto3. Estos datos muestran que existe una cooperatividad positiva considerable, lo cual se asocia con proteínas multiméricas. La K_{app} para GSH de las tres proteínas es similar (entre 1,13 y 1,42 mM), mientras que las V_{max} son bastante diferentes (entre 3,27 y 9,23 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína).



4.3.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS *IN VIVO* DE Gto1, Gto2, Gto3

Para determinar si la actividad tior transferasa de las Gto se manifiesta también *in vivo*, una cepa que carece de las dos glutaredoxinas Grx1 y Grx2 fue transformada con los plásmidos multicopia conteniendo los genes *GTO1*, *GTO2* o *GTO3*, expresados bajo sus respectivos promotores propios (pMM578, pMM584 y pMM611 respectivamente). Se utilizó la cepa MML752 ($\Delta grx1 \Delta grx2$) con el fin de reducir la actividad tior transferasa mediada por Grx1 y Grx2 sobre el sustrato HED en los extractos celulares. Esta cepa tiene reducida su actividad tior transferasa aproximadamente en un 70% comparada con la cepa silvestre, lo cual concuerda con observaciones previas hechas en fondos genéticos diferentes (Rodríguez-Manzanque *et al.*, 1999).



La sobreexpresión de *GTO1* y *GTO2* en la cepa MML752 causa un aumento de la actividad tior transferasa celular, incremento que está entre el 60 y 70% respecto de la

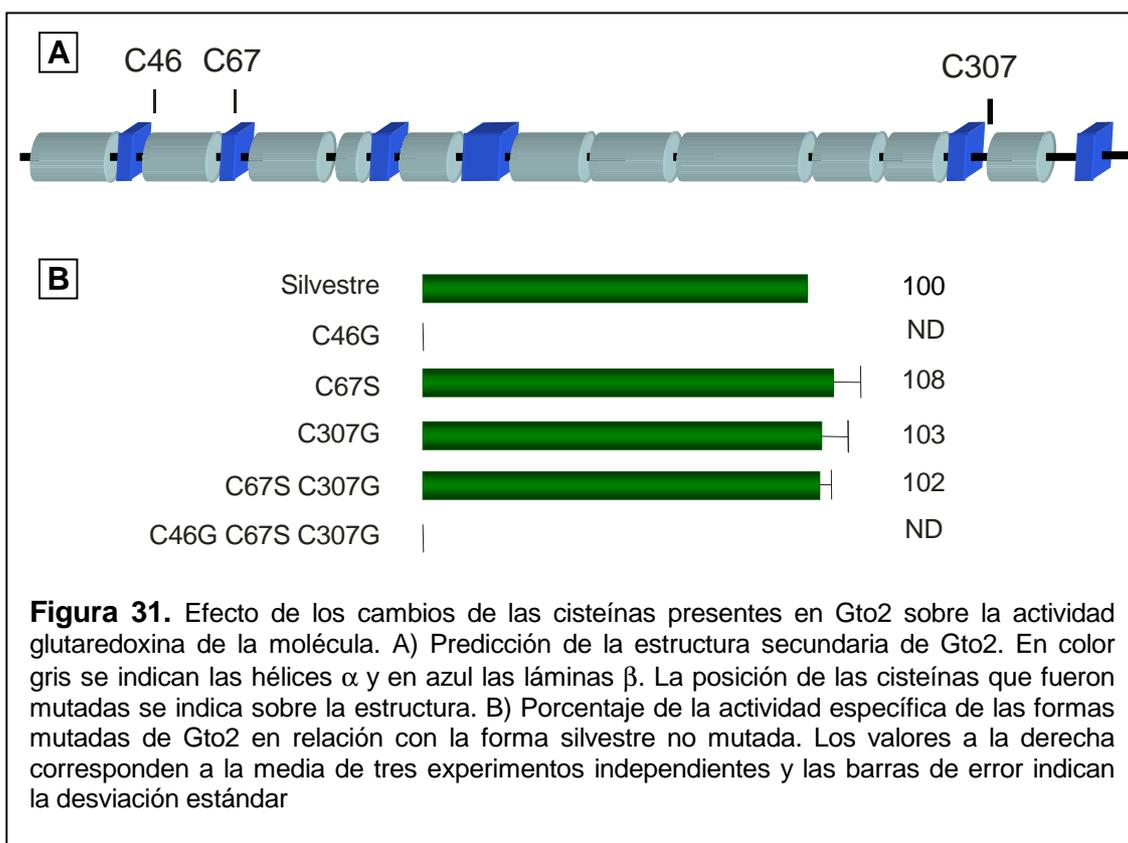
actividad de la misma cepa transformada con el plásmido vacío (Figura 30). Por otro lado, la sobreexpresión de *GTO3* en la misma cepa genera un aumento de la actividad tiol-transferasa menor (cerca del 20%).

Como una de las funciones de las GST es proteger las células de la acción de agentes oxidantes (Hayes *et al.*, 2005; Oakley, 2005), se quiso comprobar si el tratamiento de estas células sobreexpresoras con un agente oxidante podría incrementar la actividad tiol transferasa medida en los extractos celulares. Para ello, los cultivos celulares de cada uno de los sobreexpresores se trataron con diamida, un agente oxidante de grupos sulfidriilo, durante tres horas. Como consecuencia de dicho tratamiento sólo se incrementó la actividad glutaredoxina mediada por Gto2 (Figura 30). En resumen, la actividad tiol transferasa (glutaredoxina) de las tres proteínas Gto, además de ser detectable *in vitro* en las proteínas purificadas, también se manifiesta *in vivo*, aunque en grado diferente para cada una de las proteínas.

4.3.3. LA ACTIVIDAD GLUTAREDOXINA DE Gto2 REQUIERE DEL RESÍDUO CISTEÍNA EN POSICIÓN 46

El siguiente paso consistió en determinar si alguna de las cisteínas presentes en la proteína Gto2 podría ser importante para la actividad glutaredoxina de esta molécula. Inicialmente se determinó el modelo teórico de la estructura secundaria de la proteína Gto2; la predicción indica que el dominio N-terminal posee hélices α que alternan con láminas β , mientras que el dominio C-terminal es una región rica en hélices α , lo cual concuerda con la estructura de otras GST de clase Omega (Armstrong, 1997; Oakley, 2005). La secuencia de Gto2 tiene tres residuos cisteína en las posiciones 46, 67 y 307 (Figura 31A). Cys46 está entre una lámina β y una hélice α en el modelo de la figura 29A y la prolina adyacente puede ser importante para cambiar la orientación de la siguiente hélice α . Dichos residuos Cys46 y Pro47 están conservados en hGSTO1-1, siendo Cys32 el residuo equivalente en hGSTO1-1, el cual está expuesto hacia la superficie de la molécula (Board *et al.*, 2000). Las otras dos cisteínas de Gto2 no tienen equivalentes en hGSTO1-1 ni en las otras dos Gto de *S. cerevisiae*. A partir de esta observación, se construyeron las proteínas Gto2 mutantes que contenían una de las siguientes sustituciones: C46G, C67S o C307G, además de la proteína en la que se sustituyeron las tres cisteínas simultáneamente y otra que solo conservaba la Cys46. Con todas estas variantes de Gto2 se ensayó la actividad glutaredoxina. Las actividades de las proteínas con las sustituciones C67G y/o C307G son similares a la actividad de la

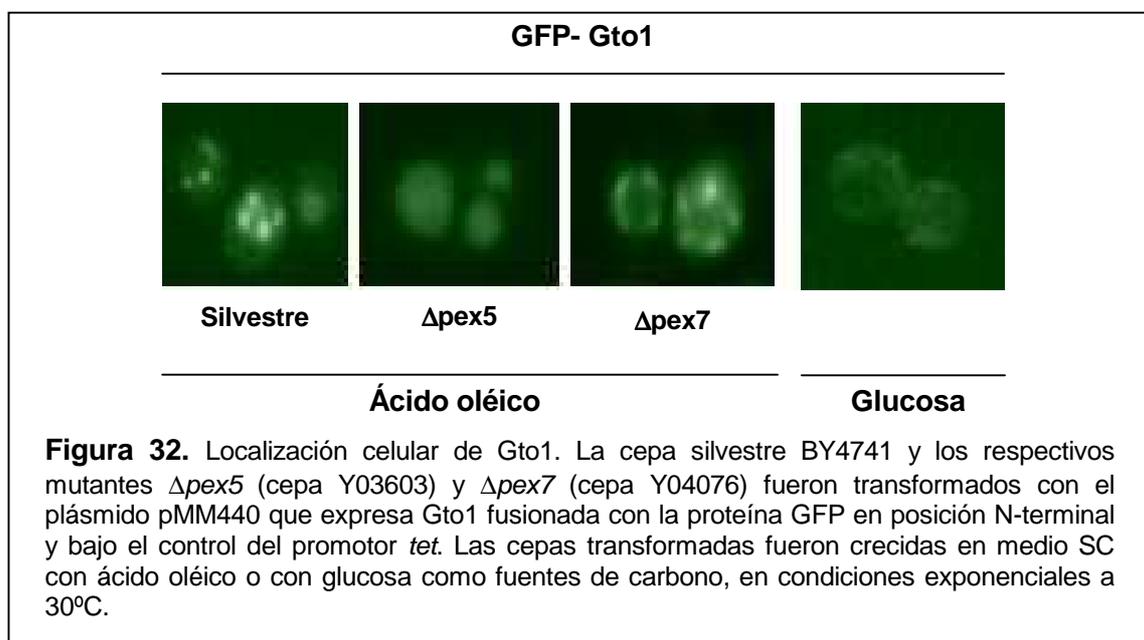
proteína silvestre, mientras que la mutación C46G reduce la actividad a valores indetectables, resultado que también se obtiene con la proteína que carece de las tres cisteínas (Figura 31B). Por otro lado, la molécula que sólo conserva la Cys46 posee una actividad equivalente a la forma intacta de Gto2. Estos resultados demuestran que de las tres cisteínas de Gto2, Cys46 es necesaria y suficiente para la actividad glutaredoxina de la molécula.



4.4. Gto1 SE LOCALIZA EN EL PEROXISOMA, MIENTRAS QUE Gto2 Y Gto3 ESTÁN EN EL CITOPLASMA

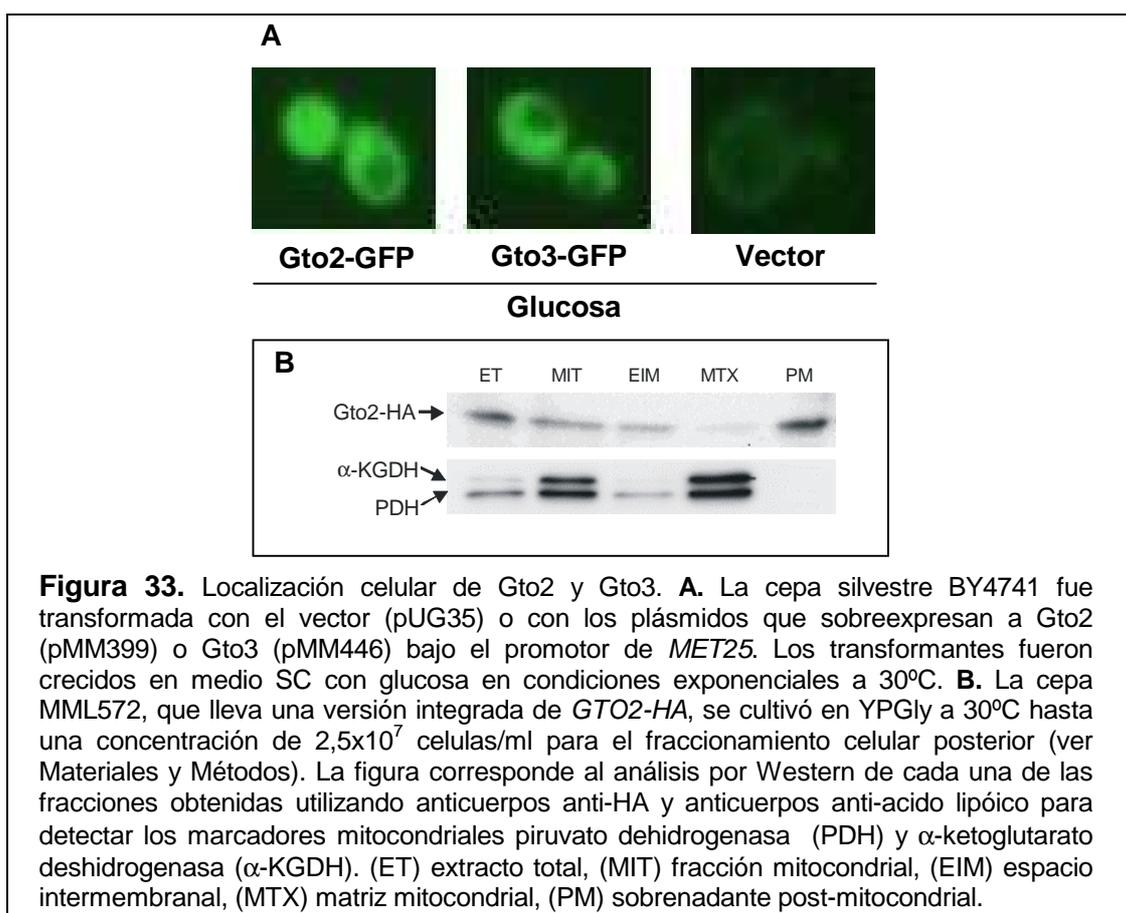
Gto1 tiene en su extremo C-terminal una secuencia compatible con una señal de localización peroxisomal de tipo PTS1 (Subramani, 1996; Purdue y Lazarow, 2001; Heiland y Erdmann, 2005), que está presente en otras proteínas peroxisomales de *S. cerevisiae* (Veenhuis *et al.*, 2000). Para confirmar la localización peroxisomal de Gto1 por microscopía de fluorescencia, se construyó la proteína de fusión GFP-Gto1, añadiendo la proteína GFP al extremo N-terminal de Gto1 para evitar enmascarar la posible señal de localización peroxisomal. Esta proteína de fusión se expresó bajo el control del promotor *tet* regulado por doxiciclina y se transformó la cepa silvestre con esta construcción. La cepa transformada se cultivó en medio con ácido oleico como

única fuente de carbono para inducir la formación de peroxisomas. Se observó que Gto1 tiene una distribución punteada en medio con ácido oleico, la cual es propia de las proteínas peroxisomales (Erdmann y Gould, 2002). Esta distribución no se observa en la misma cepa cultivada en medio con glucosa como única fuente de carbono. Para confirmar que la señal de localización sigue la ruta de internalización a través de Pex5, se estudió microscópicamente la ubicación de GFP-Gto1 en un mutante $\Delta pex5$ (incapaz de internalizar en el peroxisoma proteínas con señales tipo PTS1) y $\Delta pex7$ (incapaz de internalizar proteínas con señales de localización peroxisomal tipo PTS2). Los mutantes se crecían en medio con ácido oleico. En el mutante $\Delta pex5$ la localización de Gto1 es citoplásmica mientras que la localización punteada que se observa en la cepa silvestre se conserva en el mutante $\Delta pex7$ (Figura 32). Esta observación demuestra que la localización de Gto1 es peroxisomal y que la proteína es internalizada a través de la vía mediada por Pex5-PTS1. Los resultados aquí descritos confirman estudios previos sobre la identificación *in silico* de proteínas peroxisomales en el genoma de *S. cerevisiae* (Geraghty *et al.*, 1999) y la detección experimental de proteínas peroxisomales, los cuales ya sugerían la localización peroxisomal de la proteína que hemos denominado Gto1 (Yi *et al.*, 2002).



También se analizó si los homólogos de las proteínas Gto en otros hongos podrían tener secuencias tipo PTS1 en su extremo C-terminal. De los homólogos en las especies *Kluyveromyces lactis* (número de acceso SwissProt Q6CKB2), *Torulopsis glabrata* (Q6FTJ1), *Candida albicans* (Q5A953), *Yarrowia lipolytica* (Q6CDX7),

Debaryomyces hansenii (Q6BTR1 y Q6BTR2), *Cryptococcus neoformans* (Q55K61 y Q55K65), *Schizosaccharomyces pombe* (O94524), *Neurospora crassa* (Q7RWR2) y *Asperillus nidulans* (Q5BBA6 y Q5B0U9), ninguna de las secuencias tiene una señal tipo PTS1. Solamente se encontró este tipo de señal en la ORF c287-8925 del hongo *Saccharomyces paradoxus*. El producto hipotético de esta ORF tiene una homología alta con Gto1 y posee una secuencia PKL en posición C-terminal que es compatible con una señal tipo PTS1 (Lametschwandtner *et al.*, 1998). Las proteínas homólogas halladas en las demás especies tampoco tienen una señal igual o similar a las de tipo PTS2 en la región N-terminal. Aunque no se descarta totalmente que alguna de estas proteínas pudiese localizarse en el peroxisoma mediante señales distintas a las de tipo PTS1 y PTS2, los resultados de este análisis en diversas especies de hongos indican que la localización peroxisomal de Gto1 es probablemente exclusiva de *S. cerevisiae* y de especies estrechamente relacionadas.



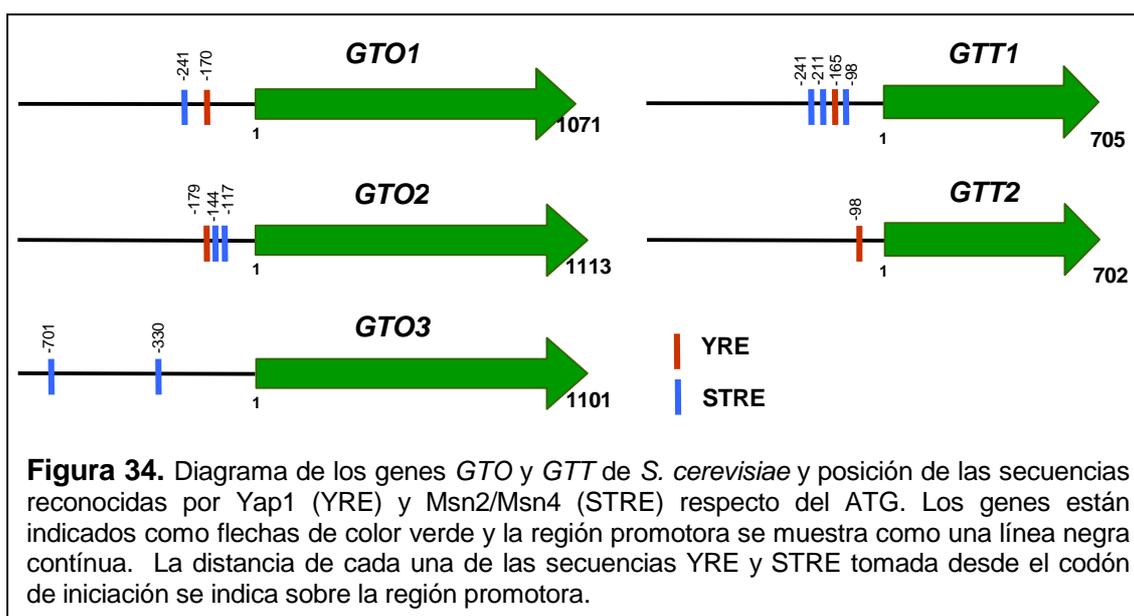
En el caso de las proteínas Gto2 y Gto3, la secuencia GFP se añadió en el extremo C-terminal y la construcción se expresó bajo el promotor de *MET25* (ver Tabla 1). La observación microscópica determinó que ambas proteínas tienen localización

citoplásmica independientemente de la fuente de carbono presente en el medio (Figura 33A).

El análisis *in silico* de la proteína Gto2 predijo una señal de localización mitocondrial en su secuencia proteica, lo cual entraba en contradicción con la localización celular determinada microscópicamente. Para aclarar esto, se expresó bajo su propio promotor la proteína Gto2 marcada con el epítipo HA en posición C-terminal, en una cepa silvestre de *S. cerevisiae* que posteriormente se utilizó para hacer estudios de subfraccionamiento celular. La cepa fue cultivada en medio rico con glicerol (YPGly) como única fuente de carbono para inducir la formación de mitocondrias. Los análisis de Western indican que gran parte de la proteína de Gto2 se encuentra en la fracción post-mitocondrial (Figura 33B), lo cual confirma las observaciones al microscopio sobre la localización citosólica de esta misma proteína (Figura 33A). Sin embargo, hay una proporción aproximadamente del 3% de la proteína total que se encuentra asociada al espacio intermembranal de la mitocondria (Figura 33B).

4.5. EXPRESIÓN DE LOS GENES GTO EN CONDICIONES OXIDANTES

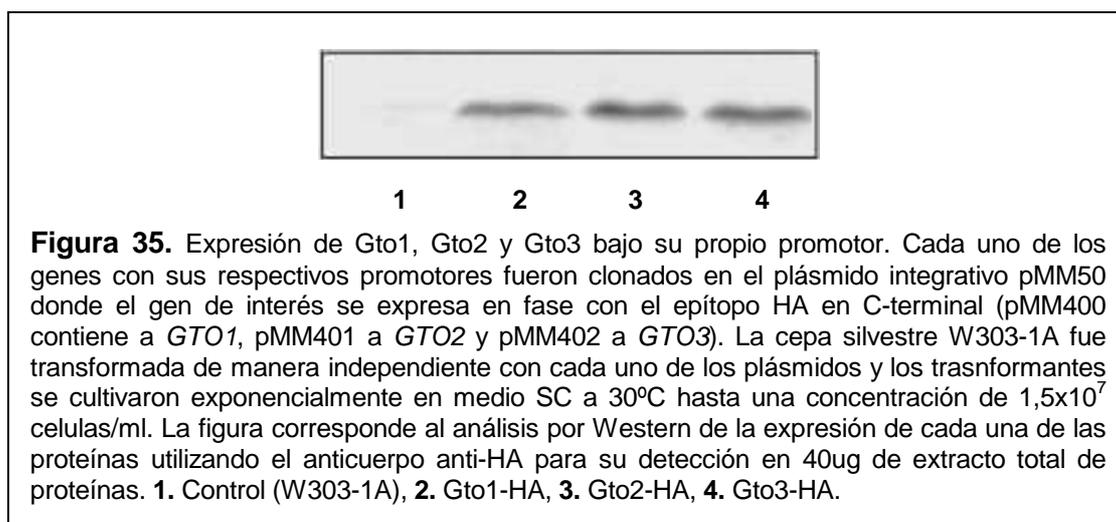
S. cerevisiae responde al estrés oxidativo causado por agentes externos, manifestándose esta respuesta mediante la alteración de la expresión de un gran número de genes, dentro de los que se incluyen los que participan en la detoxificación de las ROS (Gasch, 2003). La inducción de los genes que responden al estrés puede tener un componente específico o general. Una respuesta específica que se activa frente al estrés oxidativo está mediada por el factor de transcripción Yap1, una proteína del tipo b-ZIP que reconoce y activa los promotores que contienen la secuencia consenso YRE (TT/GACTAA) (He y Fassler, 2005). Por otra parte, la respuesta general a diferentes estreses también incluye la inducción de genes por agentes oxidantes externos. Esta respuesta está mediada en parte por los factores de transcripción Msn2 y Msn4. Estas dos proteínas reconocen las secuencias conocidas como STRE (CCCCT) presentes en los promotores de los genes que regulan (Estruch, 2000). Para determinar si la expresión de los genes *GTO* aumenta por estrés oxidativo, se analizó inicialmente la secuencia de cada uno de los promotores en busca de sitios de reconocimiento para Yap1 o Msn2/Msn4. Adicionalmente se realizó el mismo análisis para los promotores de los genes *GTT1* y *GTT2*. La localización de estas secuencias se ilustra en la Figura 34.



El promotor de *GTO1* tiene una secuencia YRE en la posición -170 mientras que en el promotor de *GTO2* está en la posición -179. Por el contrario, el promotor de *GTO3* no tiene esta secuencia canónica. En el caso de los genes *GTT*, la secuencia canónica está en la posición -165 del promotor de *GTT1* y en -98 en el caso de *GTT2*. En el caso de la secuencia reconocida por los factores de transcripción Msn2/Msn4, el promotor de *GTO1* tiene una en la posición -241, mientras que en el caso de *GTO2* existen dos secuencias STRE en las posiciones -117 y -144. El promotor de *GTO3* también tiene dos secuencias STRE en las posiciones -330 y -701. Por otro lado, en el promotor de *GTT1* se localizaron tres secuencias STRE en -241, -211 y -98. En el promotor de *GTT2* no se encontró ninguna secuencia STRE. Todo ello indicaría que la expresión de los genes *GTO* podría inducirse por estrés oxidativo, dado que estudios anteriores sobre la expresión del genoma de esta levadura también lo indican (Gasch, 2003). Teniendo en cuenta esta información, se estudió la expresión de los genes *GTO* y de su posible dependencia de los factores de transcripción Yap1 y Msn2/Msn4, bajo estrés oxidativo. Como oxidantes se utilizaron *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH) y diamida. Este último causa específicamente la oxidación de los grupos sulfidrilos. El estudio también incluyó la exposición al sustrato CDNB y al cloruro de cadmio. Se ha propuesto que el CDNB causa indirectamente un estrés oxidativo en las células de levadura, como consecuencia de la formación del complejo GSH-CDNB y la consiguiente disminución de la concentración de GSH intracelular (Collinson y Grant, 2003). El cadmio, por otra parte, causa un efecto citotóxico, que deriva en parte en estrés oxidativo y peroxidación lipídica (Avery, 2001). El cadmio forma un complejo con

el GSH, el cual es retirado del citosol a través de bombas del tipo ABC, específicamente el transportador Ycf1. Este se ubica en la membrana vacuolar y se encarga de llevar el complejo hacia el interior de este organelo (Li *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2002).

La expresión basal de todos los genes *GTO* y *GTT* en células crecidas en medio con glucosa no es detectable en el análisis por Northern, aunque las proteínas correspondientes marcadas con el epítipo HA y expresadas bajo su propio promotor generan una señal considerable en el análisis por Western (Figura 35).



La expresión de *GTO1* solamente supera el nivel basal cuando las células son tratadas con CDNB o diamida (Figura 36). La expresión de *GTO1* no se detecta en los mutantes $\Delta yap1$ y $\Delta msn2 \Delta msn4$ después de 60 minutos de tratamiento con diamida, lo que indica que el aumento de la expresión de *GTO1* inducida por diamida depende de ambos factores de transcripción. Además, el aumento de la expresión de *GTO1* inducida por CDNB depende parcialmente de los factores Msn2 y Msn4 y completamente de Yap1, ya que en el doble mutante $\Delta msn2 \Delta msn4$ tratado con este xenobiótico la expresión de *GTO1* se evidencia después de los 60 minutos de exposición, mientras que en el mutante $\Delta yap1$ no se observa inducción de *GTO1* bajo las mismas condiciones de tratamiento (Figura 36).

La expresión de *GTO2* aumenta en la cepa silvestre después de tratar las células con cualquiera de los cuatro agentes usados en este estudio. La inducción de este gen no se produce en el mutante $\Delta yap1$ cuando es tratado con diamida o CDNB, mientras que la inducción es menor cuando se trata el mismo mutante con cloruro de cadmio o *t*-BOOH. El papel de los factores Msn2 y Msn4 parece ser menos relevante en

la inducción de *GTO2*, ya que el tratamiento del doble mutante $\Delta msn2 \Delta msn4$ con los agentes oxidantes seleccionados únicamente causa una disminución de la inducción de *GTO2*. La inducción de la expresión de *GTO2* no es eliminada por completo en los mutantes $\Delta yap1$ y $\Delta msn2 \Delta msn4$ tratados con cloruro de cadmio y *t*-BOOH, lo que apunta a que otros factores de transcripción estén participando en la inducción de *GTO2* durante el tratamiento con estos dos compuestos. Uno de ellos puede ser Skn7, otro factor involucrado en la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo y del que no se conoce detalladamente su mecanismo de acción (Toledano, 2003).

En la cepa silvestre la expresión de *GTO3* aumenta cuando las células son tratadas con *t*-BOOH y esta inducción disminuye considerablemente cuando no están presentes los factores Msn2 y Msn4. La falta del factor Yap1 no ejerce ningún cambio en la expresión del *GTO3* durante el tratamiento con este agente oxidante. Estos resultados se relacionan con la presencia de dos secuencias STRE y la ausencia de secuencias YRE en el promotor de *GTO3*.

La inducción de *GTT1* es moderada después del tratamiento con cada uno de los agentes, observándose que este gen no se expresa en el mutante $\Delta yap1$ después del tratamiento con diamida. La expresión de *GTT1* no varía en el mutante $\Delta msn2 \Delta msn4$ después de los tratamientos realizados, indicando que Msn2 y Msn4 no influyen en la expresión de esta GST y que otros factores de transcripción probablemente estén involucrados en la inducción de su expresión después del tratamiento con los agentes escogidos en este estudio.

GTT2 también se induce después del tratamiento de la cepa silvestre con los cuatro agentes ensayados. Esta inducción no se produce en el mutante $\Delta yap1$ después de ninguno de los tratamientos, lo que indica que para los cuatro casos es necesaria la presencia de Yap1 para la inducción de *GTT2*. Por el contrario, dicha expresión no depende de Msn2 ni de Msn4, ya que la expresión de *GTT2* no cambia en la cepa que carece de estas dos proteínas. Los resultados concuerdan con la presencia de una secuencia YRE y la ausencia de secuencias STRE en el promotor de *GTT2*.

En resumen, la inducción de los genes *GTO* y *GTT* y la dependencia de esta inducción de los factores de transcripción Yap1 y Msn2/Msn4 se correlaciona con la presencia de secuencias YRE y STRE en los promotores de dichos genes.

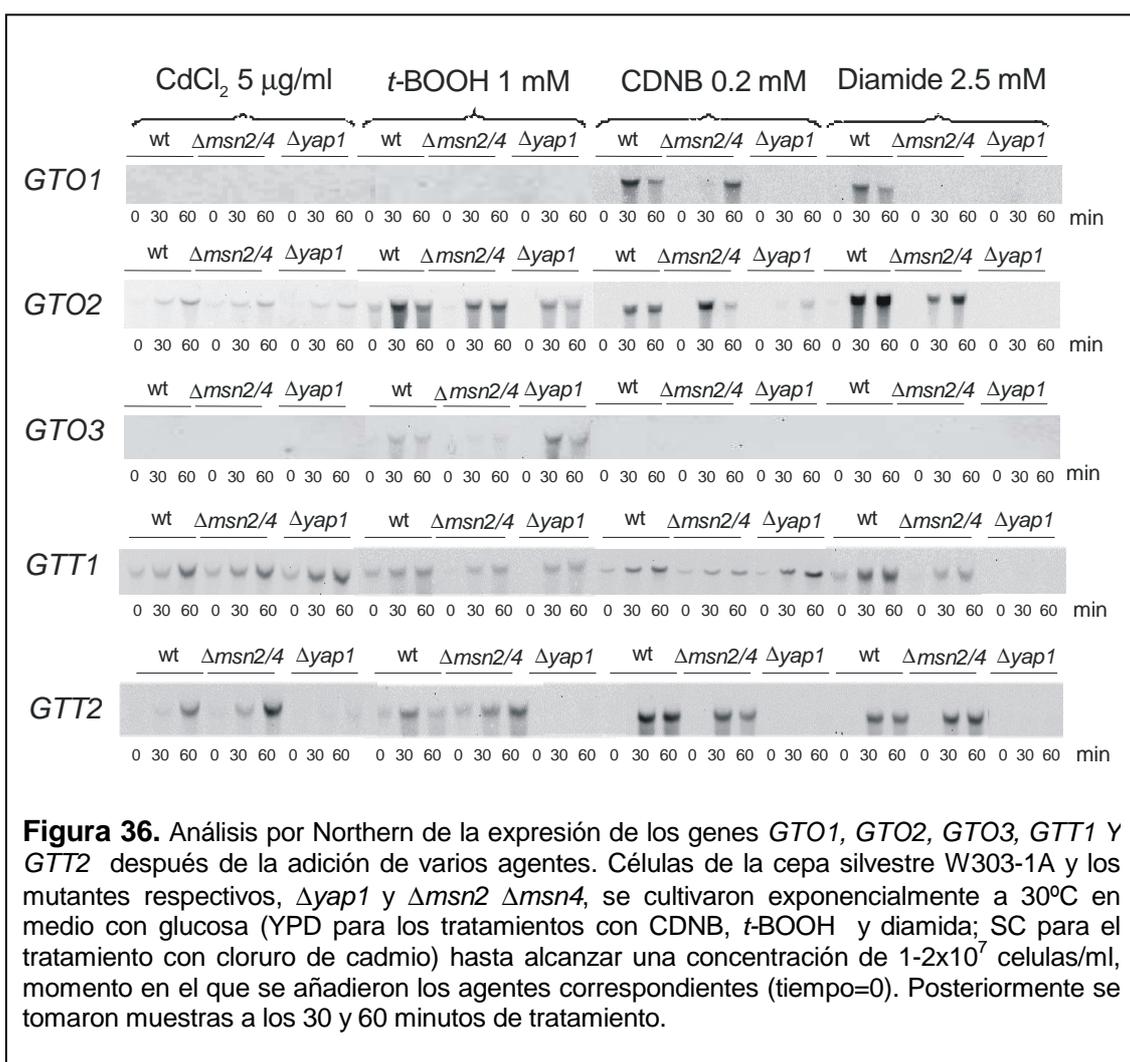
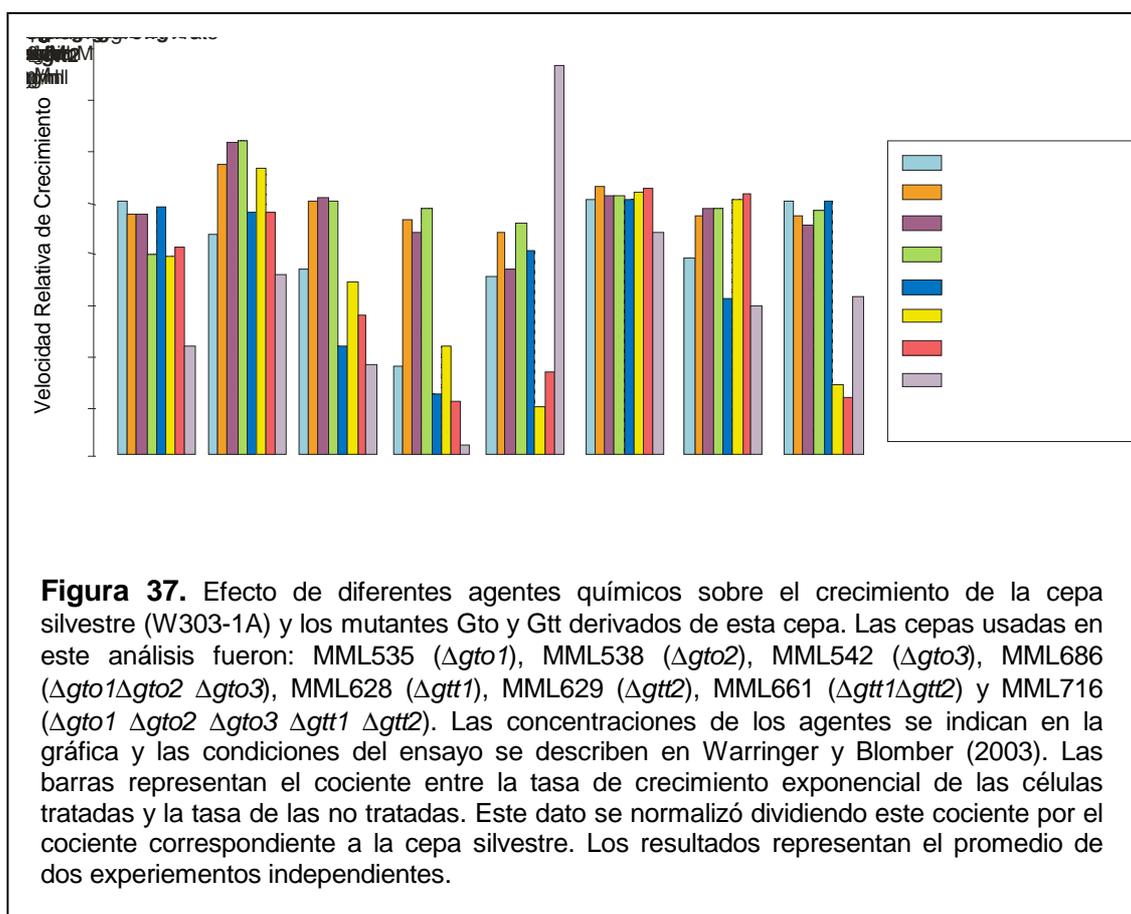


Figura 36. Análisis por Northern de la expresión de los genes *GTO1*, *GTO2*, *GTO3*, *GTT1* Y *GTT2* después de la adición de varios agentes. Células de la cepa silvestre W303-1A y los mutantes respectivos, $\Delta yap1$ y $\Delta msn2 \Delta msn4$, se cultivaron exponencialmente a 30°C en medio con glucosa (YPD para los tratamientos con CDNB, t-BOOH y diamida; SC para el tratamiento con cloruro de cadmio) hasta alcanzar una concentración de $1-2 \times 10^7$ células/ml, momento en el que se añadieron los agentes correspondientes (tiempo=0). Posteriormente se tomaron muestras a los 30 y 60 minutos de tratamiento.

4.6. DEFECTOS FENOTÍPICOS DE LOS MUTANTES QUE CARECEN DE LOS GENES *GTO* Y *GTT* EN *S. cerevisiae*

El hecho que los genes *GTO* y *GTT* aumenten su expresión durante la exposición a agentes oxidantes indicaría que asumen un papel importante en la respuesta al estrés oxidativo. Para determinar si los mutantes simples o múltiples de los genes *GTO* y *GTT* en *S. cerevisiae* tienen defectos de crecimiento durante la exposición a determinados agentes tóxicos, se llevó a cabo un análisis fenotípico cuantitativo de alta resolución en colaboración con el grupo del Dr. Per Sunnerhagen del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Göteborg, Suecia. Este estudio se basa en el microcultivo de las cepas en 350 μl de medio líquido, donde el crecimiento es medido de manera automática por densidad óptica (600 nm), en intervalos de veinte minutos, durante un total de 2.500 minutos, lo cual permite obtener curvas de crecimiento detalladas de las cepas mutantes y la cepa de referencia. A partir de estos

datos se determina el índice fenotípico, el cual relaciona los cambios en la tasa de crecimiento de la cepa mutante respecto de la cepa de referencia bajo unas condiciones de crecimiento específicas (Warringer y Blomberg, 2003). En este caso, la condición de crecimiento se refiere al tratamiento de la cepa silvestre y las cepas mutantes con varios compuestos: cloruro de cadmio (5ug/ml), CDNB (0,05mM), dietilmaleato (2mM), diamida (0,75mM), *t*-BOOH (0,5mM), paraquato (2,5mg/ml), bromuro de etidio (55µg/ml) y 4-nitroquinolona (NQO) (0,3 µg/ml). Las tasas de crecimiento relativas se resumen en la figura 37.

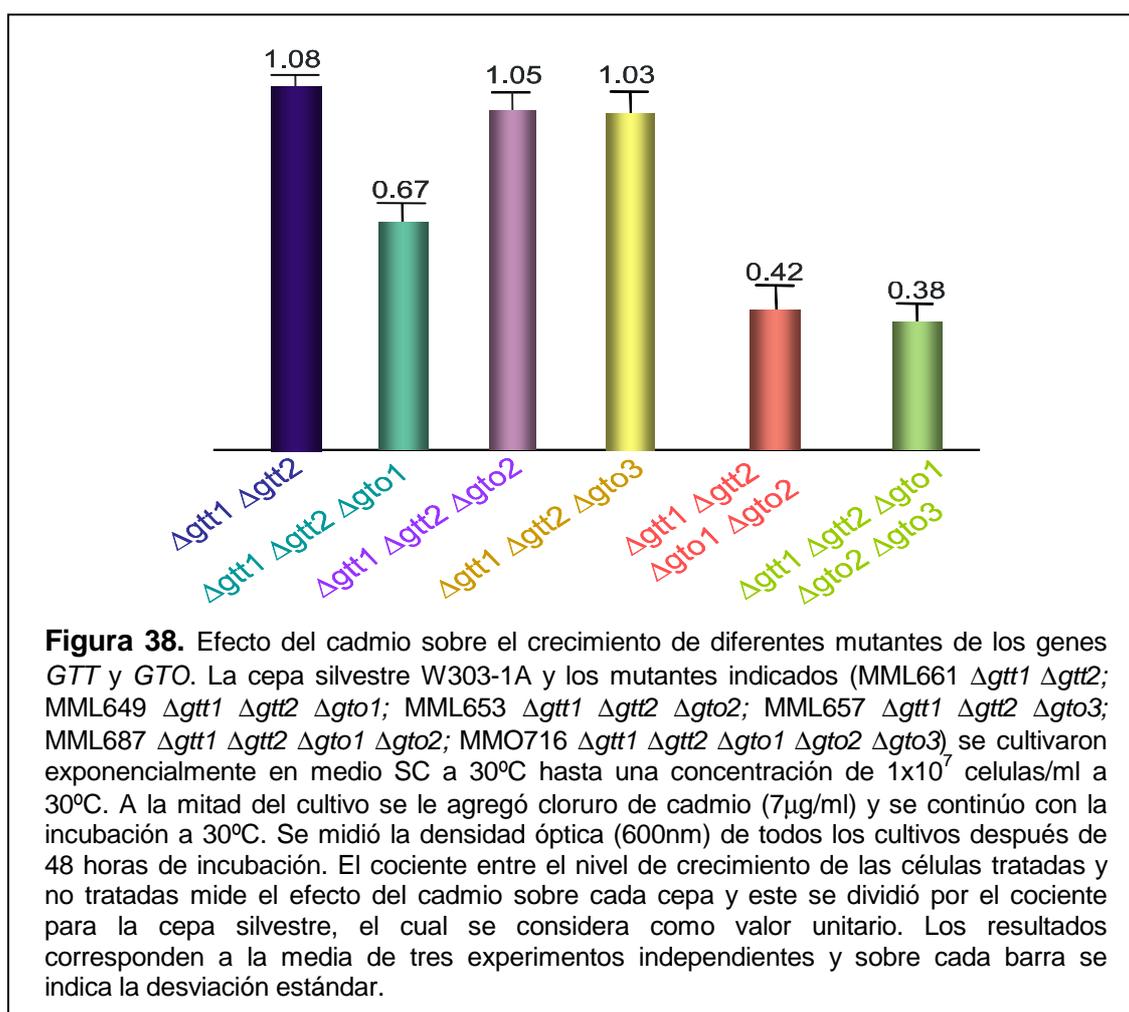


La falta de *GTO1* causa una sensibilidad importante a la diamida y una sensibilidad todavía significativa pero menos considerable al dietilmaleato y al *t*-BOOH, comparado con la cepa silvestre. Por otra parte, la ausencia de uno de los genes *GTT* o de ambos simultáneamente causa hipersensibilidad a los oxidantes dietilmaleato, diamida y *t*-BOOH, mientras que la ausencia de *GTT2* (pero no de *GTT1*) causa hipersensibilidad frente a la NQO, aunque esta hipersensibilidad es menos grave en el mutante que carece de todos los genes *GTO* y *GTT*. Estos resultados concuerdan con el papel antioxidante propuesto anteriormente para los genes *GTT1* y *GTT2* (Collinson y

Grant, 2003), y los datos permiten ampliar esta capacidad detoxificadora de *GTT2* también sobre NQO. Otro fenotipo significativo es la hipersensibilidad del quintuple mutante $\Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3 \Delta gtt1 \Delta gtt2$ al cloruro de cadmio, lo que pondría en evidencia el efecto aditivo de las *Gto* y las *Gtt* en la detoxificación del cadmio. Es sorprendente ver que este mismo mutante es hiperresistente al *t*-BOOH comparado con la cepa silvestre y con los demás mutantes. Aunque no se tiene una explicación para este hecho, no es la primera vez que se observa un efecto similar. En *S. pombe* los mutantes simples o múltiples para las GST son hiperresistentes a la diamida comparados con la cepa silvestre (Veal *et al.*, 2002).

4.7. LA FUNCIÓN DE *Gto1* Y LAS *Gtt* TIENEN UN EFECTO ADITIVO EN LA PROTECCIÓN FRENTE A LA TOXICIDAD DEL CADMIO

Con el fin de ampliar la información acerca de la importancia que pueda tener cada uno de los genes *GTT* y *GTO* en la protección frente a la toxicidad del cadmio, se



llevaron a cabo estudios de crecimiento, en medio SC con cloruro de cadmio (7 μ g/ml) de los mutantes Gtt que adicionalmente llevan una mutación simple en cada uno de los genes *GTO*, del cuádruple mutante $\Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gtt1 \Delta gtt2$ y del quíntuple mutante $\Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3 \Delta gtt1 \Delta gtt2$. Los resultados se muestran en la figura 38. Se observó que el quíntuple mutante no tiene una sensibilidad mayor que el cuádruple mutante $\Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gtt1 \Delta gtt2$, lo cual indica que el gen *GTO3* no es importante en la protección frente al efecto tóxico del cadmio. Por otra parte, el triple mutante $\Delta gtt1 \Delta gtt2 \Delta gto1$ tiene una sensibilidad similar a la del quíntuple mutante (Figura 38), lo que indica que solamente Gto1 junto con Gtt1 y Gtt2 protegen de manera cooperativa contra la toxicidad del cadmio en *S. cerevisiae*.

4.8. EL MUTANTE $\Delta gto1$ NO CRECE NORMALMENTE EN MEDIO CON ÁCIDO OLEICO

En bastantes pero no en todos los casos, los promotores de los genes que codifican proteínas peroxisomales y factores de biogénesis de este organelo contienen el elemento de respuesta al oleato (ORE, de “Oleate Response Element”), el cual es reconocido por los factores de transcripción Pip2 y Oaf1 (Einerhand *et al.*, 1993).

Se ha propuesto la secuencia CGG(N3)TNA(N7–13)(GyC)CG como consenso para el elemento ORE, utilizada además para la identificación de genes inducibles por oleato o asociados con el peroxisoma (Geraghty *et al.*, 1999). Analizando la secuencia del promotor de *GTO1* se observó que no existe en ella el elemento ORE, lo que se relaciona con que la expresión de este gen no se induzca en la cepa silvestre cuando se cambia de medio con glucosa a ácido oleico (Figura 39A).

También se analizó el nivel relativo de la proteína Gto1 en los medios de cultivo con glucosa y con ácido oleico, observando que este nivel es incluso menor cuando se cultivan las células con esta última fuente de carbono (Figura 39A). Adicionalmente se determinó que el crecimiento de la cepa $\Delta gto1$ es deficiente en medio de cultivo con ácido oleico comparada con la cepa silvestre (Figura 39B), aunque el crecimiento de estas dos cepas en medio con glucosa (YPD) no muestra diferencias importantes (ver recuadro en la Figura 39B).

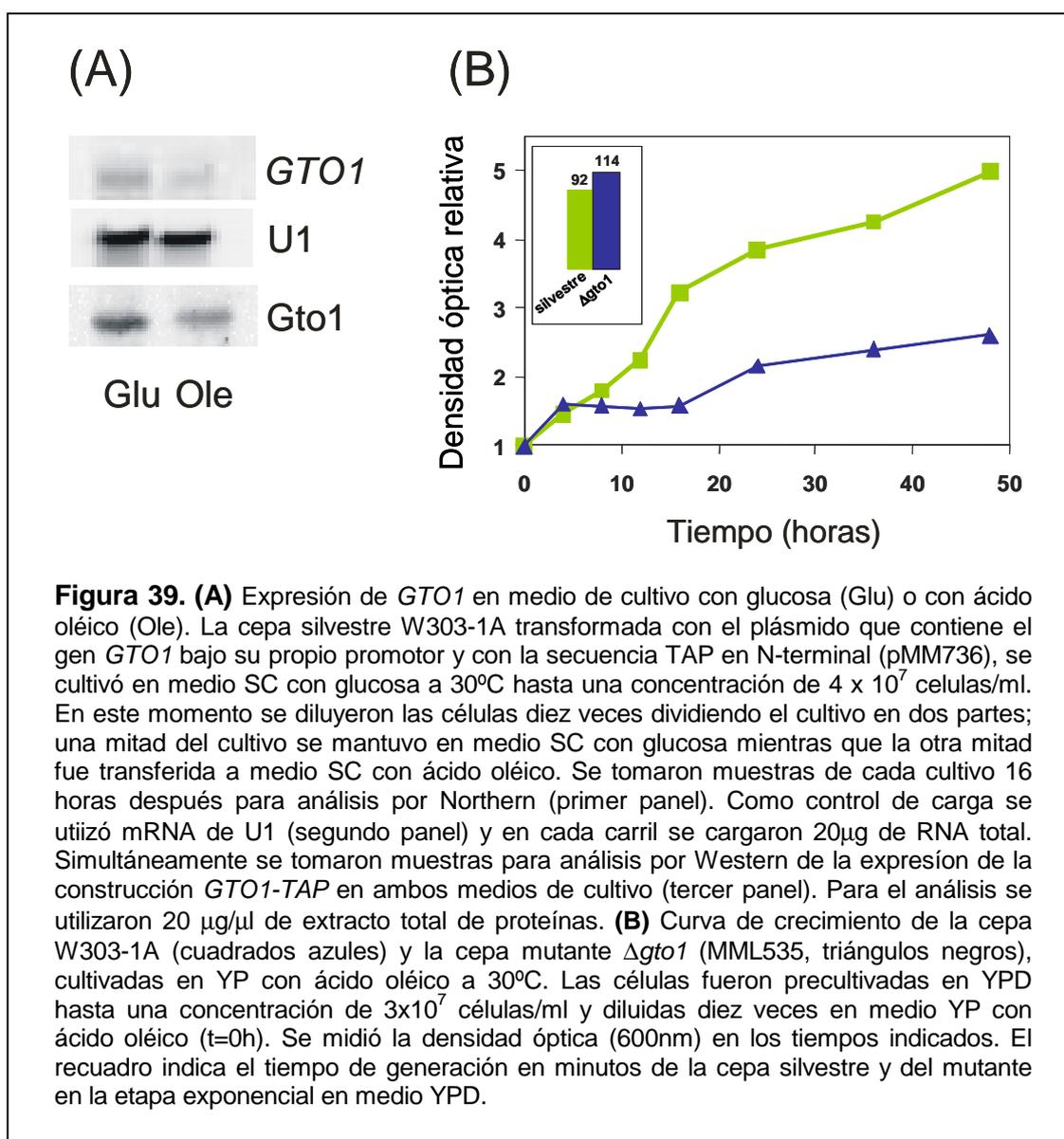


Figura 39. (A) Expresión de *GTO1* en medio de cultivo con glucosa (Glu) o con ácido oléico (Ole). La cepa silvestre W303-1A transformada con el plásmido que contiene el gen *GTO1* bajo su propio promotor y con la secuencia TAP en N-terminal (pMM736), se cultivó en medio SC con glucosa a 30°C hasta una concentración de 4×10^7 células/ml. En este momento se diluyeron las células diez veces dividiendo el cultivo en dos partes; una mitad del cultivo se mantuvo en medio SC con glucosa mientras que la otra mitad fue transferida a medio SC con ácido oléico. Se tomaron muestras de cada cultivo 16 horas después para análisis por Northern (primer panel). Como control de carga se utilizó mRNA de U1 (segundo panel) y en cada carril se cargaron 20 μ g de RNA total. Simultáneamente se tomaron muestras para análisis por Western de la expresión de la construcción *GTO1-TAP* en ambos medios de cultivo (tercer panel). Para el análisis se utilizaron 20 μ g/ μ l de extracto total de proteínas. **(B)** Curva de crecimiento de la cepa W303-1A (cuadrados azules) y la cepa mutante $\Delta gto1$ (MML535, triángulos negros), cultivadas en YP con ácido oléico a 30°C. Las células fueron precultivadas en YPD hasta una concentración de 3×10^7 células/ml y diluidas diez veces en medio YP con ácido oléico ($t=0$ h). Se midió la densidad óptica (600nm) en los tiempos indicados. El recuadro indica el tiempo de generación en minutos de la cepa silvestre y del mutante en la etapa exponencial en medio YPD.

Estos datos indican que alguna función de Gto1 es importante para el crecimiento de *S. cerevisiae* en medio con ácido oleico como única fuente de carbono.

4.9. LA MUTACIÓN DE *GTO1* EN *S. cerevisiae* AFECTA EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS QUE CONTIENEN AZUFRE

Los resultados respecto de la sensibilidad al cadmio indican que la función de Gto1, además de estar relacionada con los defectos en el crecimiento en medio de cultivo con ácido oleico, también puede ser importante durante el crecimiento en glucosa, es decir, durante condiciones fermentativas. Para determinar la posible función

de *Gto1* en estas condiciones, se llevó a cabo un análisis del transcriptoma del mutante $\Delta gto1$ en etapa exponencial de crecimiento en medio YPD a 30°C, utilizando micrordenamientos de DNA con el conjunto de genes de *S. cerevisiae* (véase Materiales y Métodos). En la tabla 4 se indican los genes en los que se observaron diferencias significativas de expresión entre la cepa mutante $\Delta gto1$ y la cepa silvestre W303-1A.

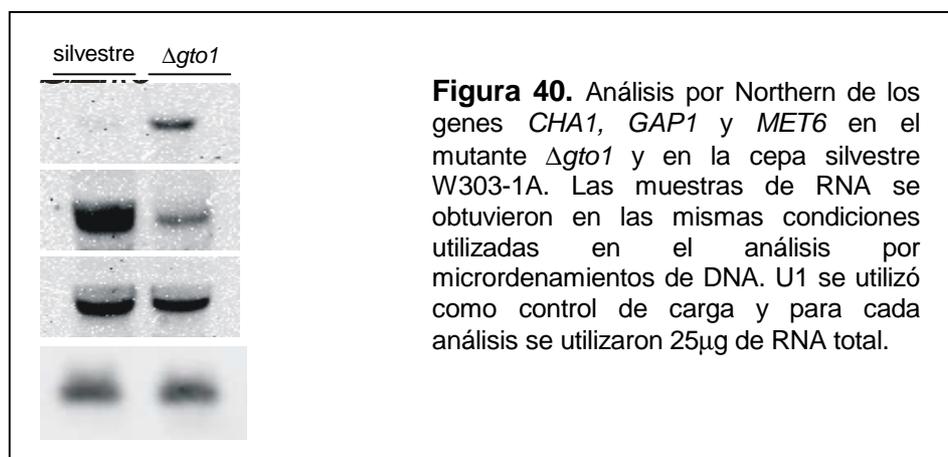
GEN	FUNCIÓN	COCIENTE $\Delta gto1$ / silvestre	Secuencia reconocida por el complejo Met4/Met28/Cfb1	Secuencia reconocida por el complejo Met4/Met31/Met32
<i>CHA1</i>	Serina/treonina deshidratasa	3.74	-	-
<i>CIT2</i>	Citrato sintasa peroxisomal	2.21	-	+
<i>AVO2</i>	Desconocida	2.15	-	-
<i>MET16</i>	3'-fosfo-5'-adenilsulfatoquinasa	0.499	+	-
<i>SAM3</i>	S-adenosil-L-metionina permeasa	0.493	-	+
<i>MUP1</i>	Metionina permeasa de alta afinidad	0.472	-	+
<i>MET5</i>	Sulfitoreductasa	0.471	+	-
<i>MET17</i>	Homocisteína sintasa	0.450	+	+
<i>SER3</i>	3-fosfoglicerato deshidrogenasa	0.372	-	+
<i>MET14</i>	5'-adenilsulfato quinasa	0.320	+	-
<i>GAP1</i>	Permeasa general de aminoácidos	0.186	-	+

Tabla 4. Genes sobreexpresados y reprimidos en el mutante $\Delta gto1$ respecto de la cepa silvestre W303-1A (con una diferencia de al menos el doble o la mitad de la expresión). El análisis con microordenamientos de DNA se llevó a cabo a partir de RNA extraído de células de cada cepa, cultivadas exponencialmente a 30°C en medio YPD. La presencia (+) o ausencia (-) en el promotor de secuencias reconocidas por el complejo Met4/Met28/Cfb1 (TCACGTG) y por el complejo Met4/Met30/Met31 (CTGTGG) se indica para cada uno de los genes.

Es remarcable que el número de genes cuya expresión está alterada significativamente en el mutante es bastante limitado, en comparación con otros muchos estudios de otros mutantes de *S. cerevisiae*, y que la mayoría de estos genes están relacionados con la asimilación del azufre y biosíntesis de la metionina y la cisteína.

Para confirmar los resultados anteriores se llevaron a cabo análisis por Northern de los genes *CHA1* y *GAP1*, y de *MET6* como control. Los resultados del Northern y de los micrordenamientos de DNA coinciden, confirmando que en el mutante $\Delta gto1$ *CHA1* se encuentra sobre expresado y *GAP1* reprimido (Figura 40). El gen *MET6*

no muestra ningún cambio significativo en el análisis por micrordenamientos, lo cual también se comprobó por Northern (Figura 40).



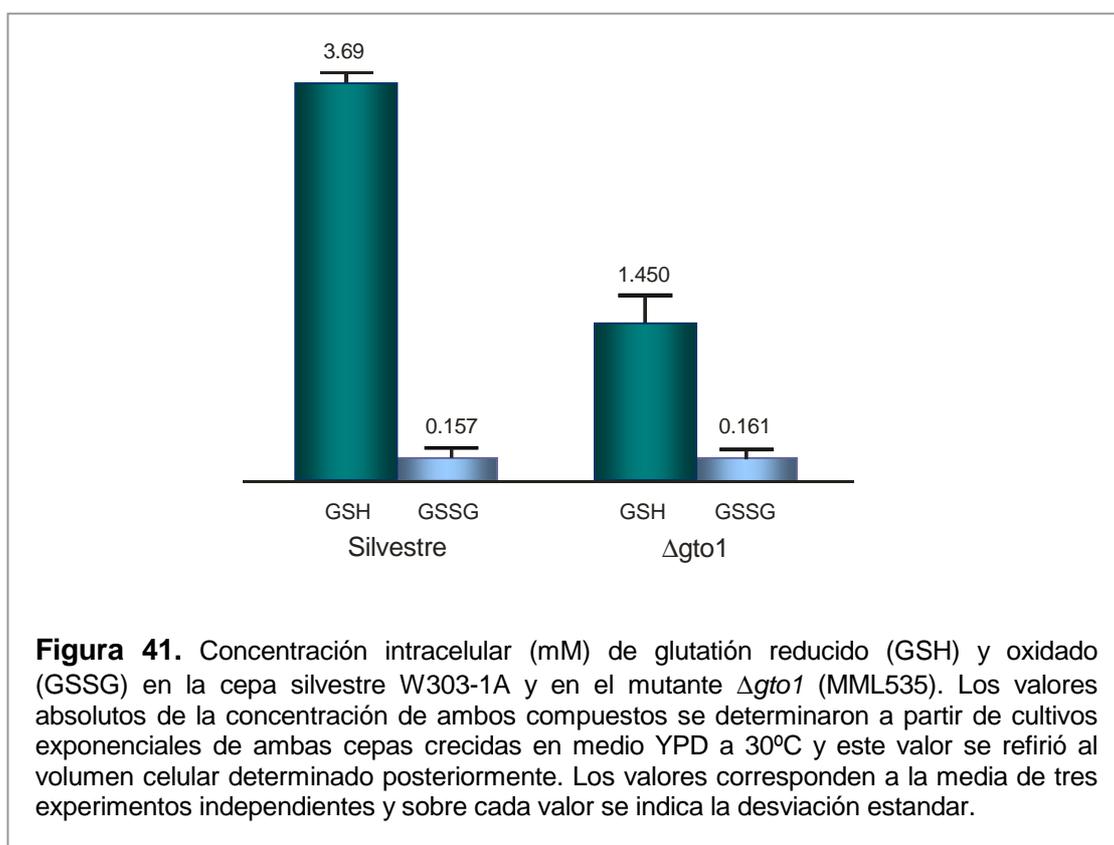
Como ya se ha apuntado, la mayoría de los genes que tienen alterada su expresión en el mutante $\Delta gto1$ están involucrados en la vía de asimilación del azufre y biosíntesis de la metionina y la cisteína (Tabla 4 y Figura 14). Algunos genes implicados en las reacciones de la vía previas a la síntesis de homocisteína (precursor de la metionina y la cisteína) están reprimidos en el mutante $\Delta gto1$ como son *MET14*, *MET16*, *MET5* Y *MET17* (Tabla 4 y Figura 14).

Por otra parte, en el mutante $\Delta gto1$ también está alterada la expresión de los genes *SER3* y *CHA1*, los cuales están involucrados respectivamente en la síntesis y metabolismo de la serina. Esta última, junto con la homocisteína, son precursores de la cistationina. *SER3* codifica para una 3-fosfogliceratodeshidrogenasa que cataliza la conversión de 3-fosfoglicerato en 3-fosfohidroxipiruvato (uno de los precursores de la serina) (Albers *et al.*, 2003) y *CHA1* codifica para una Serina/treonina deshidratasa que cataliza la conversión de la serina en piruvato (Petersen *et al.*, 1988; Albers *et al.*, 2003). Comparado con la cepa silvestre, en el mutante $\Delta gto1$ la expresión de *SER3* es menor mientras que *CHA1* está sobrepresada (Tabla 4 y Figura 38).

Otro conjunto de genes que tienen una expresión menor en el mutante $\Delta gto1$ comparado con la cepa silvestre son los que codifican para algunos transportadores de aminoácidos: *GAP1*, *MUP1* y *SAM3* (Tabla 4). *GAP1* es una permeasa general de aminoácidos que permite tomar directamente del medio los L-aminoácidos y otros compuestos similares (Jauniaux y Grenson, 1990), mientras que *SAM3* y *MUP1* son específicos para la captación de aminoácidos que contienen azufre. La primera es una permeasa que permite tomar del medio la S-adenosil-L-metionina, la cual puede ser

utilizada como fuente de azufre para la síntesis de homocisteína. *MUP1* es una permeasa de alta afinidad para la captación de metionina del medio que también está relacionada en la captación de cisteína (Isnard *et al.*, 1996; Kosugi *et al.*, 2001) (Figura 14).

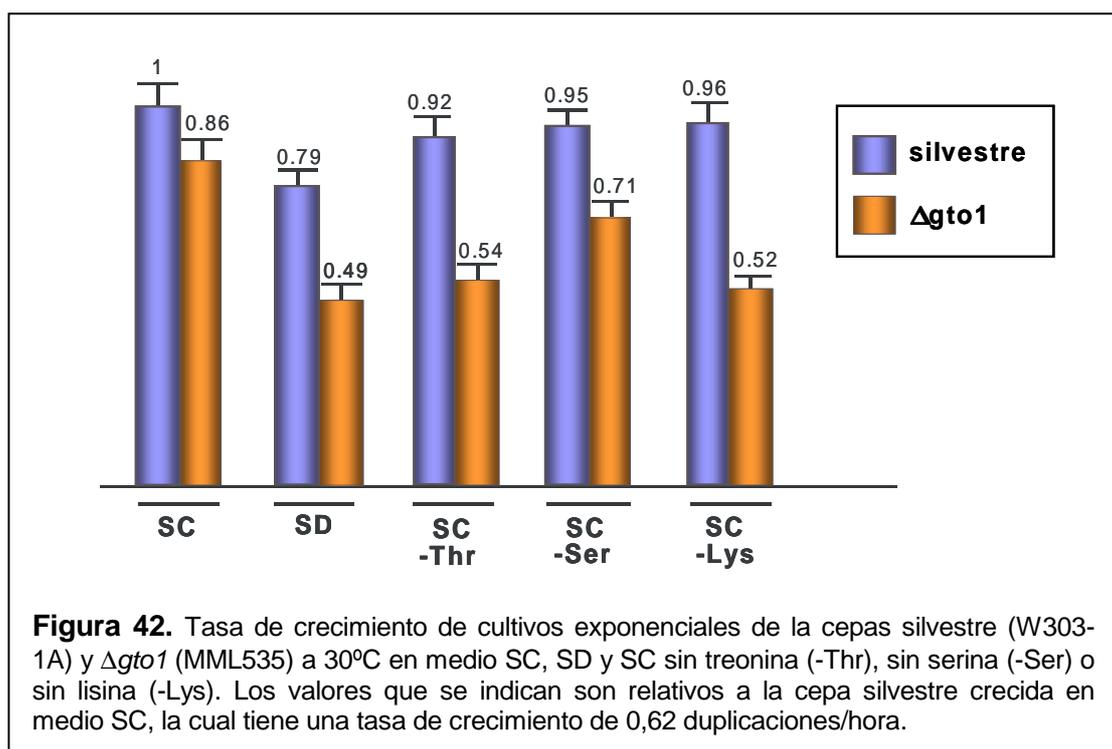
Todos estos datos apuntan a que existe una relación entre *GTO1* y la vía de captación del azufre, de modo que en el mutante $\Delta gto1$ podrían estar alterados los niveles intracelulares de los aminoácidos que contienen azufre. Uno de estos aminoácidos es la cisteína y se ha visto que los cambios en la concentración de cisteína intracelular también alteran los niveles de GSH en *S. cerevisiae* (Jauniaux y Grenson, 1990; Dormer *et al.*, 2000). Para comprobar si existía una relación entre la alteración de la captación de azufre y la formación de GSH en el mutante $\Delta gto1$, se llevó a cabo la determinación de la concentración de GSH y GSSG intracelulares en este mutante y en la cepa silvestre. Los resultados de este análisis se ilustran en la figura 41.



Comparado con la cepa silvestre, el mutante $\Delta gto1$ tiene un nivel de GSH menor mientras que los valores de GSSG no son diferentes entre ambas cepas, lo cual concuerda con los resultados del análisis por microrordenamiento de DNA. Este nivel bajo

de GSH explicaría la sensibilidad al cadmio que presentan los mutantes que carecen de los genes *GTT1*, *GTT2* y *GTO1* simultáneamente.

Además, respecto de la cepa silvestre, el mutante $\Delta gto1$ tiene una tasa de crecimiento menor en medio SD suplementado exclusivamente con los aminoácidos correspondientes a las auxotrofías de la cepa, defecto que no se observa en medio SC suplementado con los 20 aminoácidos, indicando que en el mutante habría deficiencias en la síntesis de uno o más aminoácidos. Para determinar qué aminoácidos no se sintetizaban correctamente en este mutante, se realizaron cultivos en distintos medios SC en los que faltaba uno de los 20 aminoácidos necesarios, con el fin de determinar la tasa de crecimiento del mutante en estas condiciones respecto de la cepa silvestre. Así se determinó que sólo la ausencia de treonina, serina o lisina causaba un crecimiento defectuoso del mutante $\Delta gto1$. Los resultados se muestran en la figura 42, solo para aquellos aminoácidos que dieron diferencias significativas.



El ensayo indicó que la ausencia de serina genera un defecto moderado en el crecimiento del mutante mientras que la ausencia de serina o lisina causa un defecto en el crecimiento similar al que se observa en el medio SD. Podemos concluir que, aunque en diferente grado, el mutante tiene defectos en la síntesis de estos tres aminoácidos o

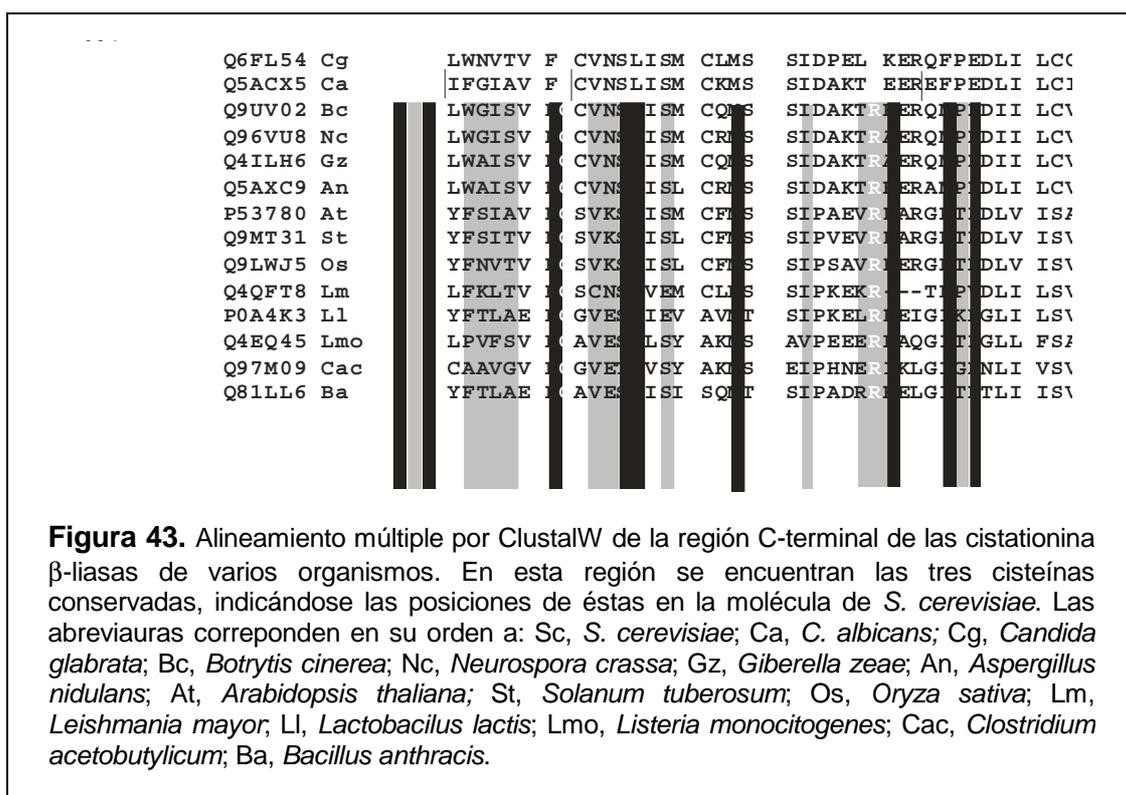
en sus niveles intracelulares. Sin embargo la ausencia de cisteína o metionina en el medio no tiene ningún efecto en el crecimiento del mutante $\Delta gto1$.

4.10. RELACIÓN ENTRE EL FUNCIONAMIENTO DE LOS PEROXISOMAS Y LA VÍA DE ASIMILACIÓN DEL AZUFRE EN *S. cerevisiae*

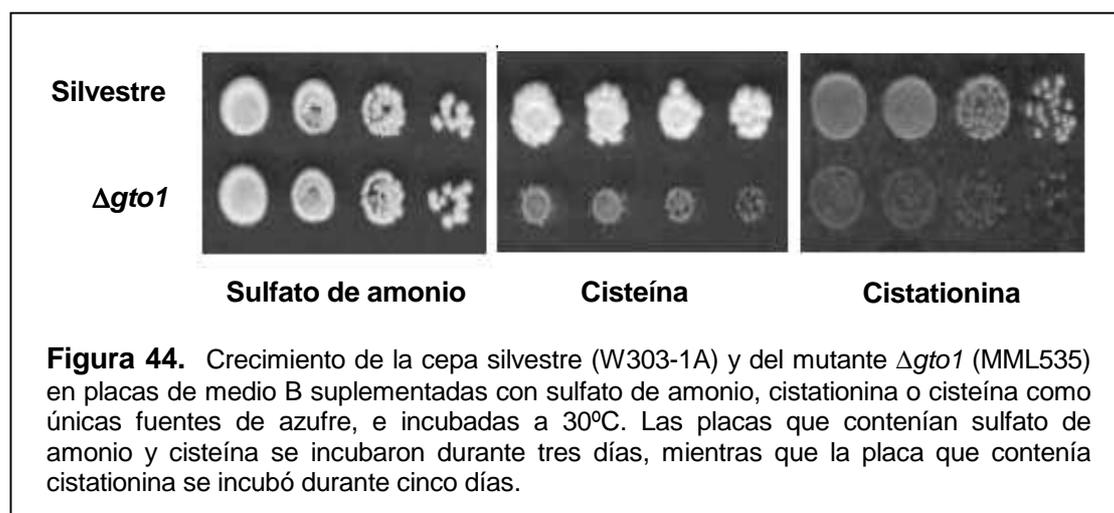
La relación de la proteína Gto1 con la vía de la asimilación del azufre y su localización peroxisomal sugieren que este organelo participa de alguna manera en esta ruta metabólica. Es importante anotar que el producto del gen *STR3* de *S. cerevisiae*, la enzima cistationina β -liasa, tiene una señal de localización del tipo PTS1 en posición C-terminal y que, además, se ha demostrado experimentalmente que Str3 se localiza en el peroxisoma (Schafer *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2002). Por otra parte, las demás proteínas de la vía de asimilación del azufre no tienen señales tipo PTS y ninguna de ellas ha sido detectada en este organelo.

La proteína Str3 participa en la vía de la asimilación del azufre, concretamente en el proceso de la transulfuración, interviniendo en la conversión de cisteína en homocisteína (Figuras 14 y 18). Como se ha mencionado en el apartado 1.9.6., en las bacterias entéricas, las plantas y *S. cerevisiae* se produce la transulfuración en el sentido de la formación de homocisteína a partir de cisteína, mientras que los mamíferos solo realizan el paso de homocisteína a cisteína. La proteína Str3 de *S. cerevisiae* cataliza la conversión de cistationina en homocisteína y el mutante correspondiente es incapaz de crecer en medios donde la cisteína o la cistationina son las únicas fuentes de azufre (Hansen y Johannesen, 2000).

Dado que Gto1 es una tiol transferasa, posiblemente el papel de Gto1 sea regular la actividad enzimática de Str3 a través de la regulación de su estado de oxidación. Str3 tiene diez cisteínas de las cuales tres están situadas en la región C-terminal de la molécula, específicamente en las posiciones 353, 362 y 387. Estas tres cisteínas están conservadas en las moléculas de cistationina β -liasas de otras especies de hongos indicando que pueden ser importantes para la función de estas proteínas (Figura 43).

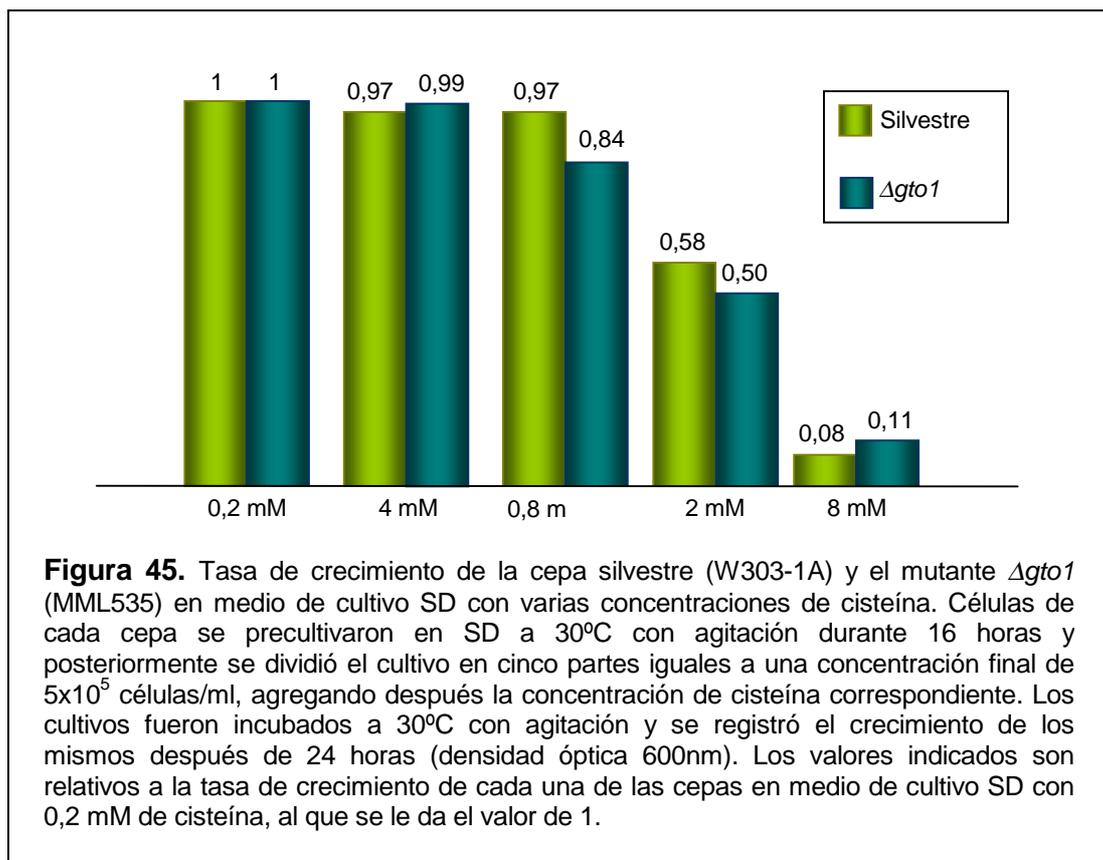


Para comprobar que la actividad de la proteína Str3 es defectuosa en ausencia de Gto1, se estudió la capacidad del mutante $\Delta gto1$ para crecer en medios de cultivo que tienen como única fuente de azufre la cistationina o la cisteína. Al comparar este crecimiento con la cepa silvestre, se observa que el mutante tiene defectos en su crecimiento en estos medios de cultivo, en mayor grado cuando la única fuente de azufre es la cistationina (Figura 44).



Los resultados indicarían que el mutante $\Delta gto1$ no puede convertir eficientemente la cistationina en homocisteína, lo que genera un aumento de la concentración intracelular de cistationina y, que además, el mutante no pueda utilizar eficientemente la cisteína como única fuente de azufre.

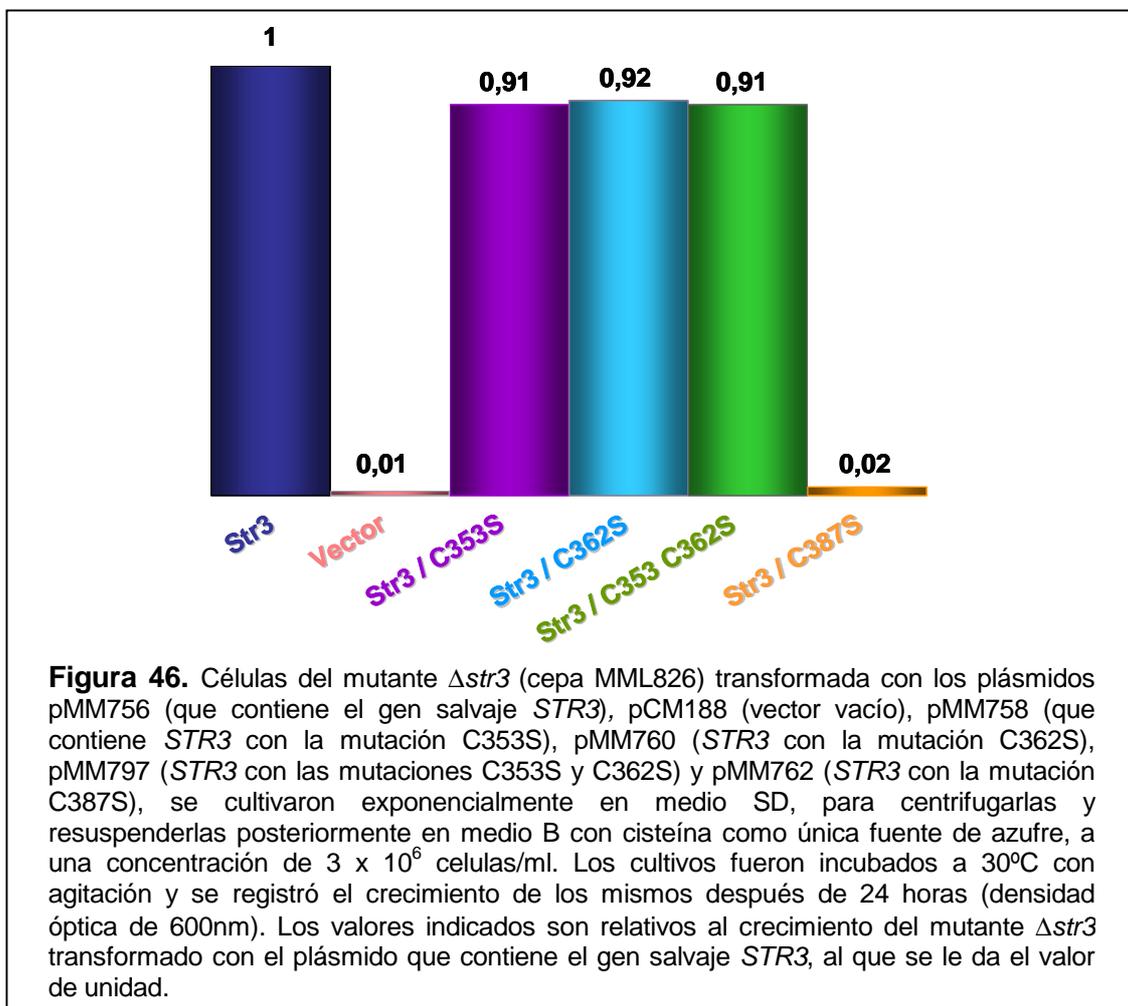
Se ha descrito que concentraciones altas de cisteína o cistationina en el medio de cultivo son tóxicas para *S. cerevisiae* (Kumar *et al.*, 2006). La posible hiperacumulación de cisteína y/o cistationina en el mutante $\Delta gto1$ podría explicar el crecimiento defectuoso del mismo en medio B, dada la toxicidad de ambos compuestos. Para determinar si el mutante $\Delta gto1$ es más sensible a altas concentraciones de cisteína que la cepa silvestre, se comparó el crecimiento de ambas cepas en medio SD con varias concentraciones de cisteína. El ensayo demostró que el mutante $\Delta gto1$ no tiene una sensibilidad mayor que la cepa silvestre a altas concentraciones de cisteína (Figura 45), lo cual estaría indicando que el defecto en el crecimiento del mutante $\Delta gto1$ en un medio donde la única fuente de azufre es la cisteína, no se debe a un efecto de toxicidad por cisteína sino a un defecto en la conversión de cistationina en homocisteína.



En la estructura terciaria de la cistationina β -liasa de *Arabidopsis thaliana* no se indica la presencia de cisteínas en el centro activo, aunque la actividad de esta enzima se inhibe con el compuesto N-etilmaleimida (Breitinger *et al.*, 2001), lo cual indica que algunas de las cisteínas presentes en la molécula podrían ser importantes para mantener la estructura terciaria funcional de la molécula (Ravanel *et al.*, 1996; Breitinger *et al.*, 2001).

Para determinar si las tres cisteínas conservadas tienen alguna relación con la actividad de la proteína Str3 en *S. cerevisiae*, se llevaron a cabo mutaciones independientes de cada una de las cisteínas y se expresaron estas proteínas mutantes en la cepa $\Delta str3$. Los transformantes obtenidos se cultivaron posteriormente en un medio de cultivo que tiene cisteína como única fuente de azufre. Los resultados indican que la proteína silvestre y las proteínas que llevan las mutaciones C353S y/o C362S restauran el defecto de crecimiento del mutante $\Delta str3$ en este medio (Figura 46). Por otro lado, la proteína que contiene la mutación C387S no permite el crecimiento del mutante en dicho medio, lo que indica que este residuo, pero no los otros dos, es esencial para la actividad de la enzima (Figura 46). Estos resultados reafirman la

importancia del estado redox de la proteína en el control de la actividad de la cistationina β -liasa de *S. cerevisiae*.



6. *DISCUSIÓN*

5. DISCUSIÓN

La secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* evidenció que en algún momento de la evolución un ancestro de esta especie duplicó su genoma completo y sufrió seguidamente una serie de rearrreglos y pérdidas de regiones enteras (Wong *et al.*, 2002). Por esta razón no es sorprendente encontrar en el genoma de *S. cerevisiae* dos o más copias de bastantes genes (parálogos), evento que se refleja en las GST de clase Omega descritas en este trabajo y en otros grupos de proteínas. Sin embargo, la similitud estructural de las proteínas codificadas por estos genes parálogos no implica una relación entre su función biológica y tampoco implica que coexistan en el mismo espacio intracelular.

Se ha propuesto que las GST se originaron a partir de un progenitor tioredoxina/glutaredoxina (Hayes *et al.*, 2005), relacionando estructural y funcionalmente a las GST con las glutaredoxinas. Este hecho se observa en el plegamiento tipo tioredoxina, compartido por el dominio N-terminal de las GST y por la estructura completa de las glutaredoxinas ditiólicas. La actividad de ambos tipos de enzimas también guarda una relación. Las glutaredoxinas tienen actividad tior oxidoreductasa sobre el sustrato HED y el mecanismo puede ser monotiólico o ditiólico dependiendo del número de cisteínas del centro activo empleadas en la reacción. Las glutaredoxinas utilizan el GSH como donador de electrones en la reducción de los puentes disulfuro, mientras que las GST clásicas utilizan el GSH para conjugar compuestos electrofílicos (Holmgren y Aslund, 1995; Hayes *et al.*, 2005).

Las GST de hongos tienen estructuras primarias variadas y son diferentes a las estructuras presentes en las GST de mamíferos o de otros organismos (McGoldrick *et al.*, 2005b). Las GST descritas previamente en *S. cerevisiae*, Gtt1 y Gtt2, tienen una similitud cercana al 50% con GST de insectos como *Manduca sexta*, *Bombix mori*, *Musca domestica* y de plantas como *Zea mays*, *Silene vulgaris* y *Arabidopsis thaliana* (Choi *et al.*, 1998). La comparación de las secuencias de estas GST indicó que los aminoácidos conservados se encuentran mayoritariamente en la región N-terminal correspondiente al sitio de unión con el GSH; además, Gtt1 y Gtt2 son activas sobre CDNB, sustrato estándar de las GST (Choi *et al.*, 1998). En este estudio se ha comparado la secuencia de Gtt1 y Gtt2 con las GST de otras clases, mostrándose una cierta similitud con las enzimas de la clase Zeta. Sin embargo, se ha descrito que las enzimas de esta clase carecen de actividad sobre el sustrato CDNB aunque pueden

tener actividad sobre algunos hidroperóxidos orgánicos como es el caso de otras GST citosólicas (Board y Anders, 2005). El nivel de homología en cualquier caso no permite adscribir Gtt1 y Gtt2 a la clase Zeta ni a ninguna otra clase establecida para las GST.

En el caso de las GST de clase Omega, solo comparten un 20% de identidad con los miembros de otras clases aunque estudios estructurales confirman que son miembros de la gran superfamilia de las GST (Board *et al.*, 2000). Tomando como referencia la secuencia de la proteína humana hGSTO1-1, se determinó que no solo hay GST de clase Omega en eucariotes superiores, sino que también están presentes en bacterias y en eucariotas inferiores tales como parásitos y hongos (Whitbread *et al.*, 2005). La estructura básica de las GST de clase Omega está presente a lo largo de la escala evolutiva, lo cual junto con su actividad tiol transferasa sugiere que las GST con capacidad de conjugar GSH han evolucionado a partir de las glutaredoxinas; la presencia de una cisteína en su centro activo sería también evidencia de este hecho (Caccuri *et al.*, 2002). En la presente memoria se describen tres proteínas de *S. cerevisiae* homólogas a las GST de clase Omega previamente conocidas, las cuales están codificadas por las ORF *YGR154c*, *YKR076w* y *YMR251w*. A los respectivos genes los denominamos *GTO1*, *GTO2* y *GTO3* (por Glutathione Transferase Omega-like). Además de compartir similitud estructural con las enzimas de la clase Omega, estas proteínas también presentan las mismas actividades enzimáticas que se han descrito previamente para esta clase de GST. Si se compara la estructura primaria de las Gto con otras GST de clase Omega se puede ver que tienen más similitud con las enzimas bacterianas, aunque los residuos importantes para la estructura terciaria así como para la unión con el GSH en la hGSTO1-1 humana también están presentes en las tres proteínas Gto, incluyendo la cisteína del centro activo, que es esencial para la actividad tiol transferasa.

A nivel de distribución celular es posible encontrar proteínas con estructura y actividad enzimática similares pero con localización celular diferente. Un ejemplo son las glutaredoxinas monotiólicas de *S. cerevisiae*, Grx3, Grx4 y Grx5. Estas tres proteínas son estructuralmente similares pero las dos primeras tienen localización nuclear mientras que la última es mitocondrial (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999; Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Las tres GST de clase Omega de *S. cerevisiae* que se describen aquí también tienen una compartimentalización diferencial. Mientras que Gto1 es peroxisomal, Gto2 y Gto3 son citosólicas. Esta diferencia en la localización celular

podría estar relacionada con funciones biológicas diferentes. En el presente estudio se hace énfasis en la función biológica de la proteína Gto1.

En el caso de las actividades enzimáticas de las GST Omega de *S. cerevisiae*, las tres proteínas son activas como tiol oxidoreductasas sobre el sustrato HED, empleando un mecanismo monotiólico. Así, en Gto2 la cisteína Cys46, presente en la región homóloga con el sitio activo de hGSTO1-1, es necesaria y suficiente para la actividad tiol oxidoreductasa de la molécula. La medida de la actividad de las Gto *in vitro* se correlaciona con las actividades detectadas *In vivo*. En el fondo genético utilizado en este estudio la actividad glutaredoxina endógena se debe en gran parte a la actividad de las enzimas ditiólicas Grx1 y Grx2 simultáneamente (70% aproximadamente), mientras que el aporte de las Gto a la actividad glutaredoxina total de la célula es menor en condiciones normales de crecimiento. Posiblemente la actividad de las proteínas Gto sólo se requiera para funciones celulares específicas que no necesiten niveles cuantitativamente elevados, o bien dicha actividad se induzca en situaciones ambientales especiales. Al igual que las enzimas de la familia tioredoxina, se ha descrito que las GST también responden frente al tratamiento con pro-oxidantes (Veal *et al.*, 2002; Allocati *et al.*, 2003; Leiers *et al.*, 2003), de modo que la inducción de las GST bajo estas condiciones es una respuesta evolutivamente conservada de las células al estrés oxidativo. Esta respuesta frente a agentes oxidantes también se observa en las GST descritas en este trabajo, indicando que probablemente intervengan en menor o mayor medida en la defensa frente al estrés oxidativo. Así, la actividad de Gto2 se incrementa considerablemente después de un tratamiento con diamida. La actividad glutaredoxina intracelular basal baja detectada *in vivo* estaría relacionada con la participación en funciones que requerirían la regulación del estado redox de proteínas específicas. Esta función reguladora redox sobre algunas proteínas es también característica de las glutaredoxinas monotiólicas de *S. cerevisiae* (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002; Fernandes y Holmgren, 2004).

La localización peroxisomal de Gto1 en *S. cerevisiae* es importante dado que solo se han reportado dos GST de mamíferos localizadas en este organelo. Una ellas es humana y pertenece a la clase Kappa (Morel *et al.*, 2004), mientras que la otra es microsomal y se ha detectado en los peroxisomas hepáticos de rata (Islinger *et al.*, 2006). Analizando las secuencias homólogas de Gto1 presentes en otros hongos se observa que sólo las proteínas de especies muy cercanas a *S. cerevisiae* podrían tener localización peroxisomal. Esta sería, pues, una adquisición evolutiva muy reciente.

Otras proteínas que se localizan en los peroxisomas de *S. cerevisiae* son Lys 1 y Lys4, las cuales hacen parte de la vía de síntesis de la lisina; probablemente Lys12 también es peroxisomal ya que ha detectado en su secuencia una señal de localización tipo PTS2 (Breitling *et al.*, 2002). En el caso del mutante $\Delta pex12$, en el que existen deficiencias en la biogénesis de los peroxisomas, se sobrepresan genes relacionados con la síntesis de la lisina, probablemente como parte de un mecanismo compensatorio. Además, los mutantes $\Delta pex5$, $\Delta pex7$ y $\Delta pex12$ crecen normalmente en un medio sin este aminoácido, indicando que a pesar del defecto en la biogénesis de los peroxisomas se sigue sintetizando lisina posiblemente mediante una vía alternativa en el citosol (Breitling *et al.*, 2002). En el caso del mutante $\Delta gto1$, su crecimiento se ve afectado en parte cuando el medio de cultivo carece de lisina, además de tener una deficiencia general en el funcionamiento de los peroxisomas dado que no crece normalmente en un medio de cultivo con ácido oleico como única fuente de carbono. Sin embargo, los genes de la vía de síntesis de la lisina no están sobrepresados en este mutante. Esto indicaría que la ausencia de Gto1 podría estar afectando la síntesis o la regulación de la concentración intracelular de este aminoácido debido a un defecto en la actividad de algunas proteínas peroxisomales. No se descarta, sin embargo, que el efecto de la ausencia de Gto1 sobre la síntesis de lisina sea indirecto.

Además de la β -oxidación de ácidos grasos y la síntesis de lisina, los peroxisomas también participan en vías metabólicas como la síntesis de eterfosfolípidos, α -oxidación o el metabolismo del glioxilato, entre otras. Otra proteína que tiene una localización peroxisomal es la cistationina β -liasa en *S. cerevisiae*. La cistationina β -liasa, codificada por *STR3* en esta levadura, es la única enzima de la vía de síntesis de aminoácidos sulfurados que se localiza en el peroxisoma (Gabaldón *et al.*, 2006). Específicamente cataliza la conversión de la cistationina en homocisteína, paso intermedio de la transulfuración o síntesis de metionina a partir de cisteína (Figura 18). La relación entre la cistationina β -liasa y Gto1 posiblemente consistiría en la regulación del estado redox de una o varias cisteínas de Str3 mediante la actividad glutaredoxina de Gto1. La matriz del peroxisoma es un ambiente oxidante debido a la producción de H_2O_2 , aniones superóxido y epóxidos resultantes de algunos procesos metabólicos que allí ocurren. Estos oxidantes podrían estar modificando el estado de oxidación de las cisteínas de las proteínas peroxisomales y por consiguiente su actividad biológica. Para contrarrestar este efecto podría existir un sistema que regulase el estado redox de estas proteínas en el peroxisoma, de modo que la oxidación de las cisteínas fuese un evento

reversible mediante procesos de glutationilación. La actividad de Str3 estaría regulada por su estado redox, el cual sería modificado por Gto1 mediante la actividad glutaredoxina de ésta. El análisis realizado en este trabajo indica que la Cys387 de Str3 está conservada en las cistationina β -liasas de otros hongos, que es importante para su actividad y que este residuo podría ser una diana para la regulación de Str3 mediante la actividad glutaredoxina de Gto1. La localización de Gto1 y Str3 en el peroxisoma posiblemente fue un evento paralelo que ocurrió después de la duplicación del genoma en el ancestro de los saccharomicetes, lo que permitió en la especialización funcional y la compartimentalización diferencial de las proteínas homólogas resultantes. Teniendo en cuenta esta idea, la actividad de Str3 se ve afectada en ausencia de Gto1, ya que el mutante $\Delta gto1$ no crece normalmente cuando la cisteína o la cistationina son las únicas fuentes de azufre disponibles en el medio, además de resultar dicha mutación en la disminución de la concentración intracelular de GSH. Todos estos datos indican que los peroxisomas de *S. cerevisiae* están relacionados con la síntesis de aminoácidos que contienen azufre.

El desbalance que existe en la vía de asimilación y fijación del azufre en el mutante $\Delta gto1$ causa indirectamente alteraciones en el metabolismo de la serina y la treonina. Los resultados de este estudio muestran que en el mutante $\Delta gto1$ la expresión de *CHA1* (gen que codifica para una serina/treonina hidratasa que cataliza la conversión de la serina en piruvato y la treonina en 2-oxobutanoato) es superior comparada con la cepa silvestre. Esto causa que dicho mutante tenga concentraciones intracelulares bajas de ambos aminoácidos y que dependa del suministro externo presente en el medio de cultivo. Es importante recordar que la serina es importante para la síntesis de cisteína a partir de homocisteína y su déficit también afecta la concentración intracelular de GSH (Figura 35). Quizás la sobreexpresión de *CHA1* tenga por finalidad evitar la acumulación excesiva de la cistationina, que puede resultar tóxica en *S. cerevisiae* (Figura 44). Dicha acumulación se produciría debido a una proteína Str3 defectuosa.

La cistationina β -liasa de otras especies de levaduras evolutivamente relacionadas con *S. cerevisiae* como *Candida glabrata*, *Kuyveromyces lactis* y *Ashbya gossypii* también tienen una señal tipo PTS1, indicando que la participación de los peroxisomas en la transulfuración, al igual que en la síntesis de lisina, es también una especialización reciente de algunos hemiascomicetos. La razón por la que se localizan ciertos pasos de una vía metabólica en un organelo específico no se ha aclarado pero podría deberse a la toxicidad que tienen algunos metabolitos intermedios. Una evidencia

de ello puede ser que altas concentraciones de homocisteína y cisteína son tóxicas para *S. cerevisiae* (Kumar *et al.*, 2006), lo cual no descarta que la cistationina también sea tóxica cuando se supera la concentración habitual de este compuesto en condiciones normales de crecimiento. Otro aspecto importante que se ha observado previamente es la diferencia en el pH del lumen peroxisomal entre levaduras y mamíferos. El pH es una condición importante para la actividad enzimática y se ha reportado que en los peroxisomas de mamíferos el pH está dentro del rango 6,9-7,1 el cual es similar al del citosol (Jankowski *et al.*, 2001), mientras que en *S. cerevisiae* el interior peroxisomal es alcalino (pH 8,2) aunque en el citosol este valor es neutral (van Roermund *et al.*, 2004). Esto indica que las células de levadura han desarrollado un sistema de gradiente de H⁺ para el correcto funcionamiento de los procesos metabólicos que allí se llevan a cabo, lo que también puede estar relacionado con la compartimentalización de un solo paso de ciertas rutas metabólicas como es el caso de la síntesis de lisina o la transulfuración.

La presencia de una GST con actividad glutaredoxina en el peroxisoma lleva a la pregunta sobre la necesidad de internalizar GSH en este organelo. Se sabe poco acerca de la concentración de GSH que pueda haber dentro del peroxisoma y cómo se regula dicha concentración. Sin embargo, se ha reportado la presencia de GSH en los peroxisomas de la levadura *Candida boidinii* (Horiguchi *et al.*, 2001) y en los peroxisomas de plantas (Churin *et al.*, 1999). Además, se ha detectado la presencia de glutatión peroxidasas en peroxisomas de mamíferos (Schrader y Fahimi, 2004) y de plantas (del Rio *et al.*, 2003), indicando que debe haber una cantidad mínima de GSH para el funcionamiento de estas enzimas y que debe existir un sistema de transporte y regulación del GSH peroxisomal. Recientemente se ha demostrado *in vitro* que la membrana de los peroxisomas de mamíferos permite el paso libre de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño como el glicolato y el ureato, pero es impermeable a cofactores de tamaño mayor como NAD/H, NADP/H o CoA (Antonenkov *et al.*, 2004), lo cual implica la existencia de transportadores de metabolitos que faciliten la entrada de estos compuestos y de otros sustratos de enzimas peroxisomales.

Mantener la concentración intracelular de GSH también es importante para *S. cerevisiae*, entre otras razones porque esta molécula interviene en la detoxificación del cadmio, el cual forma un conjugado con el GSH que es expulsado del citosol hacia la vacuola (Li *et al.*, 1997). La hipersensibilidad que presenta el mutante triple *gtt1 gtt2 gto1* al cadmio resultaría de la suma de dos factores: la concentración baja de GSH generada por la falta de Gto1 y la ausencia de enzimas que favorezcan la formación del conjugado

Cd-GSH. Se ha observado en *S. cerevisiae* varios efectos relacionados con este hecho. Por un lado, el mutante $\Delta gsh1$ (incapaz de sintetizar GSH) es hipersensible al cadmio y por otro la expresión de *GTT2* en esta especie se induce hasta 25 veces después de tratar la cepa silvestre con Cd^{+2} (Fauchon *et al.*, 2002). Además, en los mutantes $\Delta gtt1$ y $\Delta gtt2$ no se forma eficientemente el conjugado después de exponer las células a este metal, causando una hiperacumulación en el citosol que no compromete la supervivencia de los mutantes (Adamis *et al.*, 2004). En el presente estudio hemos observado que el doble mutante $\Delta gtt1 \Delta gtt2$ no presenta una hipersensibilidad al Cd^{+2} , aunque sí existe un efecto aditivo cuando en ausencia de Gtt1 y Gtt2 hay una concentración baja de GSH causada por la falta de Gto1.

Otro aspecto importante respecto de la detoxificación mediada por GST es que la ausencia de Gtt2 afecta la detoxificación del NQO (4-nitroquinolona), ya que el mutante correspondiente $\Delta gtt2$ es hipersensible a este compuesto. Sorprendentemente, el quintuple mutante que carece tanto de las Gto como de las Gtt resulta ser menos sensible al NQO que el mutante $\Delta gtt2$ aunque más sensible que la cepa silvestre y que los demás mutante evaluados en este estudio (Figura 37). El NQO y sus metabolitos forman aductos en los ácidos nucleicos, lo que conlleva una actividad carcinogénica que se ha observado previamente en modelos animales, además de sus efectos citotóxicos (Bailleul *et al.*, 1989). Se ha visto en mamíferos que la coexpresión de los genes *MRP1* o *MRP2*, que codifican para transportadores de membrana, junto con *GSTP1-1* tiene un efecto sinérgico en la protección frente a los efectos citotóxicos y genotóxicos de la NQO, indicando que la formación y el transporte del conjugado con GSH (QO-SG) deben ocurrir simultáneamente para la correcta detoxificación de la NQO (Morrow *et al.*, 1998). Además, se ha visto que Mrp1 no transporta NQO en ausencia de GSH y que el conjugado NQO-SG es transportado por Mrp1 con una eficiencia similar a la de otros sustratos (Peklak-Scott *et al.*, 2005). A pesar de esta relación entre las GST y la detoxificación de la NQO, no queda claro el papel de las proteínas Gto en este proceso en *S. cerevisiae*, ya que la ausencia simultánea de los genes *GTO* y *GTT* reduce la sensibilidad a este compuesto; sin embargo, sí se puede deducir la importancia que tiene Gtt2 en la detoxificación de NQO en *S. cerevisiae* mediante su actividad GST.

En resumen, este estudio muestra cómo el defecto en la función de una GST con actividad glutaredoxina (Gto1) causa una serie de fenotipos que probablemente son consecuencia de alteraciones en la vía de síntesis de aminoácidos que contienen azufre. Los genes que intervienen en esta vía están regulados por la concentración

intracelular de AdoMet y de cisteína mediante el factor de transcripción Met4 (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). Como se ha mencionado en el apartado 1.9.4., la actividad de Met4 es regulada por ubiquitinación y la proteína hace parte de dos complejos, Met4/Met28/Cbf1 y Met4/Met31/Met32, que reconocen secuencias o elementos específicos presentes en los promotores de los genes *MET* así como en los de algunos genes que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos. Dichos genes se sobrepresan en *S. cerevisiae* cuando existe un exceso de homocisteína o cisteína en el medio de cultivo (Kumar *et al.*, 2006). Los genes que tienen un nivel de expresión menor en el mutante $\Delta gto1$ contienen uno o los dos elementos reconocidos por los complejos inductores de la transcripción (Tabla 4). Es interesante observar en estos resultados que genes como *MUP1*, *GAP1*, *SAM3* y *SER3*, los cuales no intervienen directamente en la síntesis de metionina y cisteína, también tienen las secuencias que pueden ser reconocidas por dichos complejos. La expresión baja de estos genes no concuerda con la baja concentración de cisteína, que a su vez resulta en una concentración intracelular baja de GSH en el mutante $\Delta gto1$. Esto señalaría que este mutante estaría acumulando otro metabolito intermedio y que dicha acumulación afectaría la transcripción de los genes necesarios para la síntesis de cisteína y metionina así como la captación de estos aminoácidos del medio. Como se ha mencionado anteriormente, la falta de Gto1 puede estar afectando la actividad de la cistationina β -liasa generando una acumulación de cistationina intracelular. Ello nos lleva a sugerir que la cistationina podría ser también un regulador de la transcripción de estos genes, aunque sea necesario hacer estudios más profundos sobre esta posible regulación.

Aunque en este trabajo se ha llevado a cabo una aproximación sobre la posible función biológica de Gto1, es importante abarcar otros aspectos para determinar la relación entre las funciones que regulan el estado redox de las proteínas peroxisomales mediadas por Gto1 y la vía del metabolismo de la cisteína y la metionina. Determinar el estado redox de las cisteínas de algunas de las proteínas peroxisomales que posiblemente están alteradas por la ausencia de Gto1 es una de las tareas pendientes que pueden proporcionar información interesante sobre los interrogantes que este trabajo ha abierto. La determinación de los blancos de acción de las otras dos proteínas Gto, en este caso de localización citosólica, son otra línea de estudio abierta.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De los estudios realizados durante este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. *S. cerevisiae* tiene tres GST de clase Omega denominadas Gto1, Gto2 y Gto3, las cuales presentan las actividades enzimáticas típicas de esta clase de enzimas, esto es poseer una actividad tiol transferasa elevada, una actividad conjugante de glutatión muy baja o nula, actividad dehidroascorbato reductasa y dimetilarsinato reductasa.
2. La actividad tiol oxidoreductasa de las tres Gto de *S. cerevisiae* detectada *in vitro* se manifiesta también *in vivo*, aunque el grado de esta actividad es diferente para cada una de ellas.
3. La cisteína localizada en la posición 46 de la proteína Gto2 es necesaria y suficiente para la actividad tiol oxidoreductasa de esta enzima.
4. La expresión de los genes *GTO* de *S. cerevisiae* se induce por estrés oxidativo, aunque con patrones diferentes para los tres genes, y la dependencia de esta expresión de los factores de transcripción Yap1, Msn2 y Msn4 está relacionada con la presencia de secuencias YRE y STRE en los promotores de dichos genes.
5. Gto1 junto con Gtt1 y Gtt2 protegen de manera cooperativa contra la toxicidad del cadmio en *S. cerevisiae*. Además, Gtt2 es importante para la detoxificación del compuesto genotóxico 4-nitroquinolona (NQO) en esta especie.
6. La proteína Gto1 tiene localización peroxisomal mientras que las proteínas Gto2 y Gto3 son citosólicas. Además, solamente los homólogos para Gto1 en especies cercanas a *S. cerevisiae* tienen una señal de localización peroxisomal de tipo PTS1 en la región C-terminal.
7. En *S. cerevisiae* la concentración intracelular de glutatión reducido en el mutante $\Delta gto1$ es menor que en la cepa silvestre. Esta deficiencia explica la sensibilidad del triple mutante $\Delta gtt1 \Delta gtt2 \Delta gto1$ al cadmio.

8. El mutante $\Delta gto1$ de *S. cerevisiae* muestra crecimiento defectuoso cuando utiliza ácido oleico como única fuente de carbono, lo que se relaciona con deficiencias en el funcionamiento de los peroxisomas en este mutante.
9. La falta de la proteína Gto1 en *S. cerevisiae* causa una reducción de la expresión de diversos genes implicados en la vía de síntesis de aminoácidos que contienen azufre, así como de genes involucrados en el transporte de metionina y S-adenosil metionina a la célula.
10. En el mutante que carece de Gto1 se sobreexpresa el gen *CHA1* causando la reducción de serina y treonina intracelulares.
11. El mutante $\Delta gto1$ de *S. cerevisiae* utiliza deficientemente la cistationina o la cisteína como únicas fuentes de azufre debido a que en este mutante la actividad cistationina β -liasa de la proteína Str3 está afectada.
12. La cisteína localizada en la posición 387 de la proteína Str3 de *S. cerevisiae* es importante para su actividad cistationina β -liasa y podría ser blanco de regulación redox por Gto1 mediante su actividad tiol oxidoreductasa.

7. ABREVIATURAS

7. ABREVIATURAS

AD	Enfermedad de Alzheimer
APS	Adenil-sulfato
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CRIDS	Fármacos inhibidores de la liberación de citoquinas
DCNB	Dicloronitrobenceno
DMAR	dimetilarsenato reductasa
DHAR	dehidroascorbato reductasa
GFP	Proteína verde fluorescente
GPx	peroxidasa dependiente de glutatión
Glr	glutatión reductasa
GSH	L- γ -glutamil L-cisteinil-glicina o glutatión
GSSG	glutatión oxidado
GST	Glutatión transferasa(s)
HCCI	ácido 2-hidroxicromeno-2-carboxílico isomerasas
HED	2-hidroxietildisulfuro
4-HNE	4-hidroxinonenal
IL-1	Interleucina-1
MBP	Proteína de unión a maltosa (Maltosa Binding Protein)
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato
NQO	4-nitroquinolona-1-óxido
PBDs	Desórdenes en la Biogénesis de los Peroxisomas
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto
TCHQD	tertaclorohidroquinona deshalogenasa

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Adamis, P. D., Gomes, D. S., Pinto, M. L., Panek, A. D. y Eleutherio, E. C. 2004. The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol Lett* 154: 81-88

Agne, B., Meindl, N. M., Niederhoff, K., Einwachter, H., Rehling, P. *et al.*, 2003. Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell* 11: 635-646

Albers, E., Laize, V., Blomberg, A., Hohmann, S. y Gustafsson, L. 2003. Ser3p (Yer081wp) and Ser33p (Yil074cp) are phosphoglycerate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 10264-10272

Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J. A. *et al.*, 1997. Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell* 89: 83-92

Alin, P., Danielson, U. H. y Mannervik, B. 1985. 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Lett* 179: 267-270

Al-Kassab, S., Boyland, E. y Williams, K. 1963. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. 2. Replacement of nitro groups. *Biochem J* 87: 4-9

Allocati, N., Favaloro, B., Masulli, M., Alexeyev, M. F. y Di Ilio, C. 2003. *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochem J* 373: 305-311

Antononkov, V. D., Sormunen, R. T. y Hiltunen, J. K. 2004. The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites in vitro. *J Cell Sci* 117: 5633-5642

Arca, P., Garcia, P., Hardisson, C. y Suarez, J. E. 1990a. Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. *FEBS Lett* 263: 77-79

Arca, P., Hardisson, C. y Suarez, J. E. 1990b. Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomicin resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 844-848

Arca, P., Rico, M., Brana, A. F., Villar, C. J., Hardisson, C. y Suarez, J. E. 1988. Formation of an adduct between fosfomicin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1552-1556

Armstrong, R. N. 1991. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chem Res Toxicol* 4: 131-140

Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10: 2-18

Ausubel, F. M., Kingston, Re., Brent, R., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, S. A. And Struhl, K. 1994-1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, cop

Avery, S. V. 2001. Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol* 49: 111-142

Awasthi, S., Srivatava, S. K., Piper, J. T., Singhal, S. S., Chaubey, M. y Awasthi, Y. C. 1996. Curcumin protects against 4-hydroxy-2-trans-nonenal-induced cataract formation in rat lenses. *Am J Clin Nutr* 64: 761-766

Awasthi, Y. C., Ansari, G. A. y Awasthi, S. 2005. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 401: 379-407

Awasthi, Y. C., Sharma, R., Cheng, J. Z., Yang, Y., Sharma, A. *et al.*, 2003. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med* 24: 219-230

Awasthi, Y. C., Yang, Y., Tiwari, N. K., Patrick, B., Sharma, A. *et al.*, 2004. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free Radic Biol Med* 37: 607-619

Bai, M., Zhou, J. M. y Perrett, S. 2004. The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms. *J Biol Chem* 279: 50025-50030

Bailleul, B., Daubersies, P., Galiegue-Zouitina, S. y Loucheux-Lefebvre, M. H. 1989. Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 80: 691-697

Bandyopadhyay, S., Starke, D. W., Mieval, J. J. y Gronostajski, R. M. 1998. Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J Biol Chem* 273: 392-397

Barrera, G., Di Mauro, C., Muraca, R., Ferrero, D., Cavalli, G. *et al.*, 1991. Induction of differentiation in human HL-60 cells by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Exp Cell Res* 197: 148-152

Barycki, J. J. y Colman, R. F. 1997. Identification of the nonsubstrate steroid binding site of rat liver glutathione S-transferase, isozyme 1-1, by the steroid affinity label, 3beta-(iodoacetoxy)dehydroisoandrosterone. *Arch Biochem Biophys* 345: 16-31

Batist, G., Tulpule, A., Sinha, B. K., Katki, A. G., Myers, C. E. y Cowan, K. H. 1986. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 261: 15544-15549

Beall, C., Fyrberg, C., Song, S. y Fyrberg, E. 1992. Isolation of a Drosophila gene encoding glutathione S-transferase. *Biochem Genet* 30: 515-527

Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., Rogerson, S. y Ginsburg, H. 2004. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 34: 163-189

Beharry, Z. y Palzkill, T. 2005. Functional analysis of active site residues of the fosfomicin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 280: 17786-17791

Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J. W. y Mannervik, B. 1994. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1480-1484

Beuckmann, C. T., Fujimori, K., Urade, Y. y Hayaishi, O. 2000. Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem Res* 25: 733-738

Blackwell, J. R. y Horgan, R. 1991. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* 295: 10-12

Blaiseau, P. L., Isnard, A. D., Surdin-Kerjan, Y. y Thomas, D. 1997. Met31p and Met32p, two related zinc finger proteins, are involved in transcriptional regulation of yeast sulfur amino acid metabolism. *Mol Cell Biol* 17: 3640-3648

Blaiseau, P. L. y Thomas, D. 1998. Multiple transcriptional activation complexes tether the yeast activator Met4 to DNA. *Embo J* 17: 6327-6336

Board, P. G. y Anders, M. W. 2005. Human glutathione transferase zeta. *Methods Enzymol* 401: 61-77

Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S. *et al.*, 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* 275: 24798-24806

Boorstein, W. R. y Craig, E. A. 1990. Regulation of a yeast HSP70 gene by a cAMP responsive transcriptional control element. *Embo J* 9: 2543-2553

Booth, J., Boyland, E., Sims, P. 1961. An Enzyme from Rat Liver Catalysing Conjugations with Glutathione. *Biochem Journal* 79: 516-524

Bousset, L., Belrhali, H., Janin, J., Melki, R. y Morera, S. 2001. Structure of the globular region of the prion protein Ure2 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Structure* 9: 39-46

Bray, H. G., Franklin, T. J. y James, S. P. 1959a. The formation of mercapturic acids. 2. The possible role of glutathionase. *Biochem J* 71: 690-696

Bray, H. G., Franklin, T. J. y James, S. P. 1959b. The formation of mercapturic acids. 3. N-Acetylation of S-substituted cysteines in the rabbit, rat and guinea pig. *Biochem J* 73: 465-473

Breitinger, U., Clausen, T., Ehlert, S., Huber, R., Laber, B. *et al.*, 2001. The three-dimensional structure of cystathionine beta-lyase from *Arabidopsis* and its substrate specificity. *Plant Physiol* 126: 631-642

Breitling, R., Sharif, O., Hartman, M. L. y Krisans, S. K. 2002. Loss of compartmentalization causes misregulation of lysine biosynthesis in peroxisome-deficient yeast cells. *Eukaryot Cell* 1: 978-986

Bresell, A., Weinander, R., Lundqvist, G., Raza, H., Shimoji, M. *et al.*, 2005. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *Febs J* 272: 1688-1703

Brogdon, W. G. y Mcallister, J. C. 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 4: 605-613

- Brophy, P. M. y Barrett, J. 1990. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology* 100 Pt 2: 345-349
- Brophy, P. M. y Pritchard, D. I. 1994. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp Parasitol* 79: 89-96
- Burmeister, C., Perbandt, M., Betzel, C., Walter, R. D. y Liebau, E. 2003. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59: 1469-1471
- Burns, C., Geraghty, R., Neville, C., Murphy, A., Kavanagh, K. y Doyle, S. 2005. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 42: 319-327
- Bushweller, J. H., Aslund, F., Wuthrich, K. y Holmgren, A. 1992. Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* 31: 9288-9293
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. y Ros, J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 27393-27398
- Caccuri, A. M., Antonini, G., Allocati, N., Di Ilio, C., De Maria, F. *et al.*, 2002. GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. *J Biol Chem* 277: 18777-18784
- Callahan, H. L., Crouch, R. K. y James, E. R. 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today* 4: 218-225
- Cao, M., Bernat, B. A., Wang, Z., Armstrong, R. N. y Helmann, J. D. 2001. FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183: 2380-2383
- Cha, C. J., Coles, B. F. y Cerniglia, C. E. 2001. Purification and characterization of a glutathione S-transferase from the fungus *Cunninghamella elegans*. *FEMS Microbiol Lett* 203: 257-261
- Cherest, H., Davidian, J. C., Thomas, D., Benes, V., Ansorge, W. y Surdin-Kerjan, Y. 1997. Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145: 627-635
- Cherest, H., Kerjan, P. y Surdin-Kerjan, Y. 1987. The *Saccharomyces cerevisiae* MET3 gene: nucleotide sequence and relationship of the 5' non-coding region to that of MET25. *Mol Genet* 210: 307-313
- Cherest, H. y Surdin-Kerjan, Y. 1992. Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* 130: 51-58
- Choi, J. H., Lou, W. y Vancura, A. 1998. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 29915-29922

- Churin, Y., Schilling, S. y Borner, T. 1999. A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Lett* 459: 33-38
- Claros, M. G. y Vincens, P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241: 779-786
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E. *et al.*, 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654
- Collinson, E. J. y Grant, C. M. 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 278: 22492-22497
- Collinson, E. J., Wheeler, G. L., Garrido, E. O., Avery, A. M., Avery, S. V. y Grant, C. M. 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 277: 16712-16717
- Combes, B. y Stakelum, G. S. 1961. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J Clin Invest* 40: 981-988
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. y Deleage, G. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25: 147-150
- Cornett, R., James, M. O., Henderson, G. N., Cheung, J., Shroads, A. L. y Stacpoole, P. W. 1999. Inhibition of glutathione S-transferase zeta and tyrosine metabolism by dichloroacetate: a potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 752-756
- Cotgreave, I. A. y Gerdes, R. G. 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
- Dartigalongue, C., Missiakas, D. y Raina, S. 2001. Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* 276: 20866-20875
- Daubaras, D. L., Hershberger, C. D., Kitano, K. y Chakrabarty, A. M. 1995. Sequence analysis of a gene cluster involved in metabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* AC1100. *Appl Environ Microbiol* 61: 1279-1289
- Del Rio, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M. y Barroso, J. B. 2003. Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life* 55: 71-81
- Denton, H., Mcgregor, J. C. y Coombs, G. H. 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* 381: 405-412
- Deponte, M. y Becker, K. 2005. Glutathione S-transferase from malarial parasites: structural and functional aspects. *Methods Enzymol* 401: 241-253
- Deshaies, R. J. 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 435-467

- Di Gregorio, S., Zocca, C., Sidler, S., Toffanin, A., Lizzari, D. y Vallini, G. 2004. Identification of two new sets of genes for dibenzothiophene transformation in Burkholderia sp. DBT1. *Biodegradation* 15: 111-123
- Di Ilio, C., Aceto, A., Piccolomini, R., Allocati, N., Faraone, A. *et al.*, 1988. Purification and characterization of three forms of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*. *Biochem J* 255: 971-975
- Dinareello, C. A. 1998. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 16: 457-499
- Dirr, H. W. y Reinemer, P. 1991. Equilibrium unfolding of class pi glutathione S-transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 294-300
- Dixon, D. P., Davis, B. G. y Edwards, R. 2002. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277: 30859-30869
- Dormer, U. H., Westwater, J., McLaren, N. F., Kent, N. A., Mellor, J. y Jamieson, D. J. 2000. Cadmium-inducible expression of the yeast GSH1 gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *J Biol Chem* 275: 32611-32616
- Dowd, C. A., Buckley, C. M. y Sheehan, D. 1997. Glutathione S-transferases from the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem J* 324 (Pt 1): 243-248
- Dowd, C. A. y Sheehan, D. 1999. Variable expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the fungus, *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiol Lett* 170: 13-17
- Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G. y Board, P. 2001. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem* 276: 3319-3323
- Eaton, R. W. 1994. Organization and evolution of naphthalene catabolic pathways: sequence of the DNA encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase and trans-o-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase from the NAH7 plasmid. *J Bacteriol* 176: 7757-7762
- Echtay, K. S., Esteves, T. C., Pakay, J. L., Jekabsons, M. B., Lambert, A. J. *et al.*, 2003. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* 22: 4103-4110
- Edwards, R. y Dixon, D. P. 2005. Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 169-186
- Einerhand, A. W., Kos, W. T., Distel, B. y Tabak, H. F. 1993. Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *Eur J Biochem* 214: 323-331
- Erdmann, R. y Gould, S. J. 2002. Visualization and purification of yeast peroxisomes. *Methods Enzymol* 351: 365-381

- Erhardt, J. y Dirr, H. 1995. Native dimer stabilizes the subunit tertiary structure of porcine class pi glutathione S-transferase. *Eur J Biochem* 230: 614-620
- Ermolaeva, M. D., White, O. y Salzberg, S. L. 2001. Prediction of operons in microbial genomes. *Nucleic Acids Res* 29: 1216-1221
- Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24: 469-486
- Fahey, R. C. y Sundquist, A. R. 1991. Evolution of glutathione metabolism. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 64: 1-53
- Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J. C., Lombardia, L., Soularue, P. *et al.*, 2002. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell* 9: 713-723
- Fernandes, A. P. y Holmgren, A. 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* 6: 63-74
- Fernandez-Canon, J. M. y Penalva, M. A. 1998. Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J Biol Chem* 273: 329-337
- Fillgrove, K. L., Pakhomova, S., Newcomer, M. E. y Armstrong, R. N. 2003. Mechanistic diversity of fosfomicin resistance in pathogenic microorganisms. *J Am Chem Soc* 125: 15730-15731
- Foley, V. y Sheehan, D. 1998. Glutathione S-transferases of the yeast *Yarrowia lipolytica* have unusually large molecular mass. *Biochem J* 333 (Pt 3): 839-845
- Ford-Hutchinson, A. W. 1990. Leukotriene B4 in inflammation. *Crit Rev Immunol* 10: 1-12
- Fornai, F., Piaggi, S., Gesi, M., Saviozzi, M., Lenzi, P. *et al.*, 2001. Subcellular localization of a glutathione-dependent dehydroascorbate reductase within specific rat brain regions. *Neuroscience* 104: 15-31
- Fornai, F., Saviozzi, M., Piaggi, S., Gesi, M., Corsini, G. U. *et al.*, 1999. Localization of a glutathione-dependent dehydroascorbate reductase within the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 94: 937-948
- Fournier, D., Bride, J. M., Poirie, M., Berge, J. B. y Plapp, F. W., Jr. 1992. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J Biol Chem* 267: 1840-1845
- Fraser, J. A., Davis, M. A. y Hynes, M. J. 2002. A gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 68: 2802-2808
- Gabaldón, T., Snel, B., Zimmeren, F., Hemrika, W., Tabak, H. y Huynen, M. A. 2006. Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biol Direct* 1: 8
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. y Herrero, E. 1997. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 837-848

- Gasch, A. P. 2003. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In *Topics in current genetics: yeast stress responses* (P. W. H. Mager S. Hohmann, eds eds), pp. 11-70, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Geraghty, M. T., Bassett, D., Morrell, J. C., Gatto, G. J., Jr., Bai, J. *et al.*, 1999. Detecting patterns of protein distribution and gene expression in silico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2937-2942
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. y Schiestl, R. H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425
- Girardini, J., Amirante, A., Zemzoumi, K. y Serra, E. 2002. Characterization of an omega-class glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities. *Eur J Biochem* 269: 5512-5521
- Goldstein, A. L. y Mccusker, J. H. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 1541-1553
- Goldstein, A. L., Pan, X. y Mccusker, J. H. 1999. Heterologous URA3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 507-511
- Goto, S., Ihara, Y., Urata, Y., Izumi, S., Abe, K. *et al.*, 2001. Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi. *Faseb J* 15: 2702-2714
- Gottesman, M. M. y Pastan, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62: 385-427
- Gould, S. J. y Collins, C. S. 2002. Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 382-389
- Gupta, S. y Srivastava, A. K. 2006. Glutathione metabolism of filarial worms: A vulnerable target for the design and synthesis of new antifilarial agents. *Med Sci Monit* 12: HY1-9
- Habig, W. H., Pabst, M. J. y Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139
- Hamed, R. R., Abu-Shady, M. R., El-Beih, F. M., Abdalla, A. M. y Afifi, O. M. 2005. Purification and characterization of a glutathione S-transferase from *Mucor mucedo*. *Pol J Microbiol* 54: 153-160
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hanbauer, I., Boja, E. S. y Moskovitz, J. 2003. A homologue of elongation factor 1 gamma regulates methionine sulfoxide reductase A gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8199-8204
- Hansen, J. y Johannesen, P. F. 2000. Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 263: 535-542

- Harris, J., Coles, B., Meyer, D. J. y Ketterer, B. 1991. The isolation and characterization of the major glutathione S-transferase from the squid *Loligo vulgaris*. *Comp Biochem Physiol B* 98: 511-515
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A. D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E. y Toledano, M. B. 2002. The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol* 45: 233-241
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. y Jowsey, I. R. 2005. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 51-88
- Hayes, J. D. y Mantle, T. J. 1986. Use of immuno-blot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Yc subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues. Evidence for three immunochemically distinct groups of transferase in the rat. *Biochem J* 233: 779-788
- Hayes, J. D. y Mclellan, L. I. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31: 273-300
- He, X. J. y Fassler, J. S. 2005. Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 58: 1454-1467
- Heijn, M., Oude Elferink, R. P. y Jansen, P. L. 1992. ATP-dependent multispecific organic anion transport system in rat erythrocyte membrane vesicles. *Am J Physiol* 262: C104-110
- Heiland, I. y Erdmann, R. 2005. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *Febs J* 272: 2362-2372
- Hemingway, J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 1009-1015
- Hemingway, J. y Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45: 371-391
- Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M. *et al.*, 1995. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 65: 2146-2156
- Hiller, N., Fritz-Wolf, K., Deponte, M., Wende, W., Zimmermann, H. y Becker, K. 2006. *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase--structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition. *Protein Sci* 15: 281-289
- Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P. y Tabak, H. F. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122: 85-95
- Hofer, B., Backhaus, S. y Timmis, K. N. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* 144: 9-16
- Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264: 13963-13966
- Holmgren, A. y Aslund, F. 1995. Glutaredoxin. *Methods Enzymol* 252: 283-292

- Horiguchi, H., Yurimoto, H., Kato, N. y Sakai, Y. 2001. Antioxidant system within yeast peroxisome. Biochemical and physiological characterization of CbPmp20 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J Biol Chem* 276: 14279-14288
- Huang, H. S., Hu, N. T., Yao, Y. E., Wu, C. Y., Chiang, S. W. y Sun, C. N. 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem Mol Biol* 28: 651-658
- Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B. y Williamson, G. 1998. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem J* 332 (Pt 1): 97-100
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. y Kimura, A. 1989. Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli* B. *J Bacteriol* 171: 6039-6042
- Ishikawa, T. 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 17: 463-468
- Ishikawa, T., Casini, A. F. y Nishikimi, M. 1998. Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase. *J Biol Chem* 273: 28708-28712
- Islinger, M., Luers, G. H., Zischka, H., Ueffing, M. y Volkl, A. 2006. Insights into the membrane proteome of rat liver peroxisomes: microsomal glutathione-S-transferase is shared by both subcellular compartments. *Proteomics* 6: 804-816
- Isnard, A. D., Thomas, D. y Surdin-Kerjan, Y. 1996. The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. *J Mol Biol* 262: 473-484
- Jakubowski, H. y Goldman, E. 1993. Methionine-mediated lethality in yeast cells at elevated temperature. *J Bacteriol* 175: 5469-5476
- Jakubowski, W., Bilinski, T. y Bartosz, G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 28: 659-664
- Jankowski, A., Kim, J. H., Collins, R. F., Daneman, R., Walton, P. y Grinstein, S. 2001. In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the fluorescent protein pHluorin. *J Biol Chem* 276: 48748-48753
- Jauniaux, J. C. y Grenson, M. 1990. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur J Biochem* 190: 39-44
- Jeppesen, M. G., Ortiz, P., Shepard, W., Kinzy, T. G., Nyborg, J. y Andersen, G. R. 2003. The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1B γ from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 47190-47198
- Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J. y Kropp, H. 1974. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* 235: 364-386

- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C. y Reed, S. I. 2000. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* 102: 303-314
- Kampkotter, A., Volkmann, T. E., De Castro, S. H., Leiers, B., Klotz, L. O. *et al.*, 2003. Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST-3): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 325: 25-37
- Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M. *et al.*, 1997. Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 90: 1085-1095
- Kelley, R. F. y Richards, F. M. 1987. Replacement of proline-76 with alanine eliminates the slowest kinetic phase in thioredoxin folding. *Biochemistry* 26: 6765-6774
- Ketterman, A. J., Jayawardena, K. G. y Hemingway, J. 1991. Purification and characterisation of a mosquito carboxylesterase involved in insecticide resistance. *Biochem Soc Trans* 19: 305S
- Kim, H. G., Park, K. N., Cho, Y. W., Park, E. H., Fuchs, J. A. y Lim, C. J. 2001. Characterization and regulation of glutathione S-transferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* 1520: 179-185
- Klein, A. T., Barnett, P., Bottger, G., Konings, D., Tabak, H. F. y Distel, B. 2001. Recognition of peroxisomal targeting signal type 1 by the import receptor Pex5p. *J Biol Chem* 276: 15034-15041
- Kobayashi, S., Kidou, S. y Ejiri, S. 2001. Detection and characterization of glutathione S-transferase activity in rice EF-1betabeta'gamma and EF-1gamma expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 509-514
- Koonin, E. V., Mushegian, A. R., Tatusov, R. L., Altschul, S. F., Bryant, S. H. *et al.*, 1994. Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain--study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein Sci* 3: 2045-2054
- Kosugi, A., Koizumi, Y., Yanagida, F. y Udaka, S. 2001. MUP1, high affinity methionine permease, is involved in cysteine uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 728-731
- Kragler, F., Langeder, A., Raupachova, J., Binder, M. y Hartig, A. 1993. Two independent peroxisomal targeting signals in catalase A of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 120: 665-673
- Kumar, A., John, L., Alam, M. M., Gupta, A., Sharma, G. *et al.*, 2006. Homocysteine- and cysteine-mediated growth defect is not associated with induction of oxidative stress response genes in yeast. *Biochem J* 396: 61-69
- Kumar, S., Christophides, G. K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y. S. *et al.*, 2003. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14139-14144
- Kuras, L., Barbey, R. y Thomas, D. 1997. Assembly of a bZIP-bHLH transcription activation complex: formation of the yeast Cbf1-Met4-Met28 complex is regulated through Met28 stimulation of Cbf1 DNA binding. *Embo J* 16: 2441-2451

- Kuras, L., Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y. y Thomas, D. 1996. A heteromeric complex containing the centromere binding factor 1 and two basic leucine zipper factors, Met4 and Met28, mediates the transcription activation of yeast sulfur metabolism. *Embo J* 15: 2519-2529
- Laliberte, R. E., Perregaux, D. G., Hoth, L. R., Rosner, P. J., Jordan, C. K. *et al.*, 2003. Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1beta posttranslational processing. *J Biol Chem* 278: 16567-16578
- Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J. y Hartig, A. 1998. The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem* 273: 33635-33643
- Lazarow, P. B. y Fujiki, Y. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1: 489-530
- Leiers, B., Kampkotter, A., Grevelding, C. G., Link, C. D., Johnson, T. E. y Henkle-Duhrsen, K. 2003. A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 34: 1405-1415
- Lewis, A. D., Hayes, J. D. y Wolf, C. R. 1988. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 9: 1283-1287
- Li, Y. J., Oliveira, S. A., Xu, P., Martin, E. R., Stenger, J. E. *et al.*, 2003. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Hum Mol Genet* 12: 3259-3267
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D. J. y Rea, P. A. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 42-47
- Liebau, E., Eckelt, V. H., Wildenburg, G., Teesdale-Spittle, P., Brophy, P. M. *et al.*, 1997. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochem J* 324 (Pt 2): 659-666
- Liebau, E., Walter, R. D. y Henkle-Duhrsen, K. 1994a. Isolation, sequence and expression of an *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase cDNA. *Mol Biochem Parasitol* 63: 305-309
- Liebau, E., Walter, R. D. y Henkle-Duhrsen, K. 1994b. *Onchocerca volvulus*: isolation and sequence of a second glutathione S-transferase cDNA. *Exp Parasitol* 79: 68-71
- Listowsky, I. 2005. Proposed intracellular regulatory functions of glutathione transferases by recognition and binding to S-glutathiolated proteins. *J Pept Res* 65: 42-46
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M. y Markesbery, W. R. 1995. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 1594-1601
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W. y Grant, C. M. 1998. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* 9: 1081-1091

- Lumjuan, N., Mccarroll, L., Prapanthadara, L. A., Hemingway, J. y Ranson, H. 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 861-871
- Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., Di Paolo, T., Treadwell, J. *et al.*, 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147: 435-450
- Mannervik, B., Awasthi, Y. C., Board, P. G., Hayes, J. D., Di Ilio, C. *et al.*, 1992. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J* 282 (Pt 1): 305-306
- Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I. y Pearson, W. R. 2005. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 1-8
- Markesbery, W. R. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23: 134-147
- Markesbery, W. R. y Lovell, M. A. 1998. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19: 33-36
- Marnell, L. L., Garcia-Vargas, G. G., Chowdhury, U. K., Zakharyan, R. A., Walsh, B. *et al.*, 2003. Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. *Chem Res Toxicol* 16: 1507-1513
- Marnett, L. J., Riggins, J. N. y West, J. D. 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111: 583-593
- Martin, J. L. 1995. Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure* 3: 245-250
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. y Estruch, F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J* 15: 2227-2235
- Masison, D. C., O'connell, K. F. y Baker, R. E. 1993. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* general regulatory factor CP1. *Nucleic Acids Res* 21: 4133-4141
- Mattson, M. P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639
- Mcgoldrick, S., Mccarthy, T. V. y Sheehan, D. 2005a. The 110kDa glutathione transferase of *Yarrowia lipolytica* is encoded by a homologue of the TEF3 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, expression, and homology modeling of the recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 1125-1132
- Mcgoldrick, S., O'sullivan, S. M. y Sheehan, D. 2005b. Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol Lett* 242: 1-12
- Mecocci, P., Macgarvey, U. y Beal, M. F. 1994. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36: 747-751

- Mellor, J., Rathjen, J., Jiang, W., Barnes, C. A. y Dowell, S. J. 1991. DNA binding of CPF1 is required for optimal centromere function but not for maintaining methionine prototrophy in yeast. *Nucleic Acids Res* 19: 2961-2969
- Menant, A., Baudouin-Cornu, P., Peyraud, C., Tyers, M. y Thomas, D. 2006. Determinants of the ubiquitin-mediated degradation of the Met4 transcription factor. *J Biol Chem* 281: 11744-11754
- Milhon, J. L., Albert, T. J., Vande Waa, E. A., O'leary, K. A., Jackson, R. N. *et al.*, 2000. SmMAK16, the *Schistosoma mansoni* homologue of MAK16 from yeast, targets protein transport to the nucleolus. *Mol Biochem Parasitol* 108: 225-236
- Moldovan, L. y Moldovan, N. I. 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol* 122: 395-412
- Montine, K. S., Kim, P. J., Olson, S. J., Markesbery, W. R. y Montine, T. J. 1997. 4-hydroxy-2-nonenal pyrrole adducts in human neurodegenerative disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 866-871
- Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N. *et al.*, 2004. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J Biol Chem* 279: 16246-16253
- Morrow, C. S., Diah, S., Smitherman, P. K., Schneider, E. y Townsend, A. J. 1998. Multidrug resistance protein and glutathione S-transferase P1-1 act in synergy to confer protection from 4-nitroquinoline 1-oxide toxicity. *Carcinogenesis* 19: 109-115
- Mountain, H. A., Bystrom, A. S. y Korch, C. 1993. The general amino acid control regulates MET4, which encodes a methionine-pathway-specific transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 7: 215-228
- Nakamura, T., Ohno, T., Hirota, K., Nishiyama, A., Nakamura, H. *et al.*, 1999. Mouse glutaredoxin - cDNA cloning, high level expression in *E. coli* and its possible implication in redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. *Free Radic Res* 31: 357-365
- Nakashima, K., Ueno, N., Kamei, D., Tanioka, T., Nakatani, Y. *et al.*, 2003. Coupling between cyclooxygenases and prostaglandin F(2alpha) synthase. Detection of an inducible, glutathione-activated, membrane-bound prostaglandin F(2alpha)-synthetic activity. *Biochim Biophys Acta* 1633: 96-105
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A. y Eisenhaber, F. 2003. Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol* 328: 581-592
- Newton, G. L., Arnold, K., Price, M. S., Sherrill, C., Delcardayre, S. B. *et al.*, 1996. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J Bacteriol* 178: 1990-1995
- Nishimura, M., Sakamoto, T., Kaji, R. y Kawakami, H. 2004. Influence of polymorphisms in the genes for cytokines and glutathione S-transferase omega on sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 368: 140-143
- Oakley, A. J. 2005. Glutathione transferases: new functions. *Curr Opin Struct Biol* 15: 716-723

- O'leary, K. A. y Tracy, J. W. 1991. Schistosoma mansoni: glutathione S-transferase-catalyzed detoxication of dichlorvos. *Exp Parasitol* 72: 355-361
- Ortelli, F., Rossiter, L. C., Vontas, J., Ranson, H. y Hemingway, J. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J* 373: 957-963
- Ozturk, A., Desai, P. P., Minster, R. L., Dekosky, S. T. y Kamboh, M. I. 2005. Three SNPs in the GSTO1, GSTO2 and PRSS11 genes on chromosome 10 are not associated with age-at-onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26: 1161-1165
- Paulson, K. E., Darnell, J. E., Jr., Rushmore, T. y Pickett, C. B. 1990. Analysis of the upstream elements of the xenobiotic compound-inducible and positionally regulated glutathione S-transferase Ya gene. *Mol Cell Biol* 10: 1841-1852
- Paumi, C. M., Smitherman, P. K., Townsend, A. J. y Morrow, C. S. 2004. Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-delta 12,14prostaglandin J2 (15-d-PGJ2). *Biochemistry* 43: 2345-2352
- Pearson, W. R. 2005. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol* 401: 186-204
- Peklak-Scott, C., Townsend, A. J. y Morrow, C. S. 2005. Dynamics of glutathione conjugation and conjugate efflux in detoxification of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide: contributions of glutathione, glutathione S-transferase, and MRP1. *Biochemistry* 44: 4426-4433
- Pemble, S., Schroeder, K. R., Spencer, S. R., Meyer, D. J., Hallier, E. *et al.*, 1994. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 (Pt 1): 271-276
- Penninckx, M. J. y Elskens, M. T. 1993. Metabolism and functions of glutathione in microorganisms. *Adv Microb Physiol* 34: 239-301
- Perito, B., Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Dragani, B. *et al.*, 1996. Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase gene from *Proteus mirabilis*. *Biochem J* 318 (Pt 1): 157-162
- Perregaux, D., Barberia, J., Lanzetti, A. J., Geoghegan, K. F., Carty, T. J. y Gabel, C. A. 1992. IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin. *J Immunol* 149: 1294-1303
- Petersen, J. G., Kielland-Brandt, M. C., Nilsson-Tillgren, T., Bornaes, C. y Holmberg, S. 1988. Molecular genetics of serine and threonine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 119: 527-534
- Pettersson, P. L. y Mannervik, B. 2001. The role of glutathione in the isomerization of delta 5-androstene-3,17-dione catalyzed by human glutathione transferase A1-1. *J Biol Chem* 276: 11698-11704
- Piccolomini, R., Di Ilio, C., Aceto, A., Allocati, N., Faraone, A. *et al.*, 1989. Glutathione transferase in bacteria: subunit composition and antigenic characterization. *J Gen Microbiol* 135: 3119-3125

Pickett, C. B. y Lu, A. Y. 1989. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem* 58: 743-764

Pickett, J. A., Chamberlain, K., Poppy, G. M. y Woodcock, C. M. 1999. Exploiting insect responses in identifying plant signals. *Novartis Found Symp* 223: 253-262; discussion 262-255, 266-259

Piper, P. J. 1984. Formation and actions of leukotrienes. *Physiol Rev* 64: 744-761

Prabhu, K. S., Reddy, P. V., Gumprich, E., Hildenbrandt, G. R., Scholz, R. W. *et al.*, 2001. Microsomal glutathione S-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochem J* 360: 345-354

Prabhu, K. S., Reddy, P. V., Jones, E. C., Liken, A. D. y Reddy, C. C. 2004. Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 424: 72-80

Precious, W. Y. y Barrett, J. 1989. Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitol Today* 5: 156-160

Procopio, A., Alcaro, S., Cundari, S., De Nino, A., Ortuso, F. *et al.*, 2005. Molecular modeling, synthesis, and preliminary biological evaluation of glutathione-S-transferase inhibitors as potential therapeutic agents. *J Med Chem* 48: 6084-6089

Purdue, P. E. y Lazarow, P. B. 2001. Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 701-752

Purdue, P. E., Yang, X. y Lazarow, P. B. 1998. Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J Cell Biol* 143: 1859-1869

Ranson, H., Cornel, A. J., Fournier, D., Vaughan, A., Collins, F. H. y Hemingway, J. 1997a. Cloning and localization of a glutathione S-transferase class I gene from *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem* 272: 5464-5468

Ranson, H. y Hemingway, J. 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 226-241

Ranson, H., Prapanthadara, L. y Hemingway, J. 1997b. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem J* 324 (Pt 1): 97-102

Ravanel, S., Gakiere, B., Job, D. y Douce, R. 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7805-7812

Ravanel, S., Job, D. y Douce, R. 1996. Purification and properties of cystathionine beta-lyase from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem J* 320 (Pt 2): 383-392

Raza, H., Robin, M. A., Fang, J. K. y Avadhani, N. G. 2002. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 366: 45-55

- Reddy, J. K. y Mannaerts, G. P. 1994. Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 14: 343-370
- Rice, M. E. 2000. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 23: 209-216
- Rife, C. L., Pharris, R. E., Newcomer, M. E. y Armstrong, R. N. 2002. Crystal structure of a genomically encoded fosfomicin resistance protein (FosA) at 1.19 Å resolution by MAD phasing off the L-III edge of TI(+). *J Am Chem Soc* 124: 11001-11003
- Rigsby, R. E., Fillgrove, K. L., Beihoffer, L. A. y Armstrong, R. N. 2005. Fosfomicin resistance proteins: a nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily. *Methods Enzymol* 401: 367-379
- Rigsby, R. E., Rife, C. L., Fillgrove, K. L., Newcomer, M. E. y Armstrong, R. N. 2004. Phosphonoformate: a minimal transition state analogue inhibitor of the fosfomicin resistance protein, FosA. *Biochemistry* 43: 13666-13673
- Rodriguez-Manzaneque, M. T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A. y Herrero, E. 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 8180-8190
- Rodriguez-Manzaneque, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J. y Herrero, E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* 13: 1109-1121
- Rogers, M. E., Jani, M. K. y Vogt, R. G. 1999. An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *J Exp Biol* 202: 1625-1637
- Rossjohn, J., Feil, S. C., Wilce, M. C., Sexton, J. L., Spithill, T. W. y Parker, M. W. 1997. Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine candidate: *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase. *J Mol Biol* 273: 857-872
- Rouillon, A., Surdin-Kerjan, Y. y Thomas, D. 1999. Transport of sulfonium compounds. Characterization of the s-adenosylmethionine and s-methylmethionine permeases from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 28096-28105
- Rouimi, P., Anglade, P., Benzekri, A., Costet, P., Debrauwer, L. *et al.*, 2001. Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem J* 358: 257-262
- Rushmore, T. H., Morton, M. R. y Pickett, C. B. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266: 11632-11639
- Rushmore, T. H. y Pickett, C. B. 1993. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem* 268: 11475-11478
- Sacksteder, K. A. y Gould, S. J. 2000. The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu Rev Genet* 34: 623-652

- Salgado, H., Gama-Castro, S., Peralta-Gil, M., Diaz-Peredo, E., Sanchez-Solano, F. *et al.*, 2006. RegulonDB (version 5.0): Escherichia coli K-12 transcriptional regulatory network, operon organization, and growth conditions. *Nucleic Acids Res* 34: D394-397
- Salvatore, L., Wijffels, G., Sexton, J. L., Panaccio, M., Mailer, S. *et al.*, 1995. Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of Fasciola hepatica. *Mol Biochem Parasitol* 69: 281-288
- Saxena, M., Singhal, S. S., Awasthi, S., Singh, S. V., Labelle, E. F. *et al.*, 1992. Dinitrophenyl S-glutathione ATPase purified from human muscle catalyzes ATP hydrolysis in the presence of leukotrienes. *Arch Biochem Biophys* 298: 231-237
- Sayre, L. M., Zelasko, D. A., Harris, P. L., Perry, G., Salomon, R. G. y Smith, M. A. 1997. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68: 2092-2097
- Schafer, H., Nau, K., Sickmann, A., Erdmann, R. y Meyer, H. E. 2001. Identification of peroxisomal membrane proteins of Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry. *Electrophoresis* 22: 2955-2968
- Schmuck, E. M., Board, P. G., Whitbread, A. K., Tetlow, N., Cavanaugh, J. A. *et al.*, 2005. Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenet Genomics* 15: 493-501
- Schoneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Billaut-Mulot, O., Loyens, M. *et al.*, 1994. Trypanosoma cruzi cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. *Biol Cell* 80: 1-10
- Schrader, M. y Fahimi, H. D. 2004. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122: 383-393
- Schriek, U. y Schwenn, J. D. 1986. Properties of the purified APS-kinase from Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. *Arch Microbiol* 145: 32-38
- Schroder, K. R., Hallier, E., Meyer, D. J., Wiebel, F. A., Muller, A. M. y Bolt, H. M. 1996. Purification and characterization of a new glutathione S-transferase, class theta, from human erythrocytes. *Arch Toxicol* 70: 559-566
- Schuller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C. y Ruis, H. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the Saccharomyces cerevisiae CTT1 gene. *Embo J* 13: 4382-4389
- Schwenn, J. D., Krone, F. A. y Husmann, K. 1988. Yeast PAPS reductase: properties and requirements of the purified enzyme. *Arch Microbiol* 150: 313-319
- Sharma, K. G., Mason, D. L., Liu, G., Rea, P. A., Bachhawat, A. K. y Michaelis, S. 2002. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a Saccharomyces cerevisiae MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell* 1: 391-400
- Sharp, P. J., Smith, D. R., Bach, W., Wagland, B. M. y Cobon, G. S. 1991. Purified glutathione S-transferases from parasites as candidate protective antigens. *Int J Parasitol* 21: 839-846

- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. y Dowd, C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360: 1-16
- Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350: 3-41
- Shi, J., Vlamis-Gardikas, A., Aslund, F., Holmgren, A. y Rosen, B. P. 1999. Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *J Biol Chem* 274: 36039-36042
- Shin, Y. H., Park, E. H., Fuchs, J. A. y Lim, C. J. 2002. Characterization, expression and regulation of a third gene encoding glutathione S-transferase from the fission yeast. *Biochim Biophys Acta* 1577: 164-170
- Silva, C., Loyola, G., Valenzuela, R., Garcia-Huidobro, T., Monasterio, O. y Bronfman, M. 1999. High-affinity binding of fatty acyl-CoAs and peroxisome proliferator-CoA esters to glutathione S-transferases effect on enzymatic activity. *Eur J Biochem* 266: 143-150
- Singh, S. P., Coronella, J. A., Benes, H., Cochrane, B. J. y Zimniak, P. 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *Eur J Biochem* 268: 2912-2923
- Sinning, I., Kleywegt, G. J., Cowan, S. W., Reinemer, P., Dirr, H. W. *et al.*, 1993. Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *J Mol Biol* 232: 192-212
- Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R. *et al.*, 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10540-10543
- Snyder, M. J. y Maddison, D. R. 1997. Molecular phylogeny of glutathione-S-transferases. *DNA Cell Biol* 16: 1373-1384
- Soboll, S., Grundel, S., Harris, J., Kolb-Bachofen, V., Ketterer, B. y Sies, H. 1995. The content of glutathione and glutathione S-transferases and the glutathione peroxidase activity in rat liver nuclei determined by a non-aqueous technique of cell fractionation. *Biochem J* 311 (Pt 3): 889-894
- Srivastava, P., Puri, S. K., Kamboj, K. K. y Pandey, V. C. 1999. Glutathione-S-transferase activity in malarial parasites. *Trop Med Int Health* 4: 251-254
- Subramani, S. 1996. Protein translocation into peroxisomes. *J Biol Chem* 271: 32483-32486
- Szczyepka, M. S., Wemmie, J. A., Moye-Rowley, W. S. y Thiele, D. J. 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* 269: 22853-22857
- Tamaki, H., Yamamoto, K. y Kumagai, H. 1999. Expression of two glutathione S-transferase genes in the yeast *Issatchenkia orientalis* is induced by o-dinitrobenzene during cell growth arrest. *J Bacteriol* 181: 2958-2962

- Tamarit, J., Belli, G., Cabisco, E., Herrero, E. y Ros, J. 2003. Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J Biol Chem* 278: 25745-25751
- Tang, A. H. y Tu, C. P. 1994. Biochemical characterization of Drosophila glutathione S-transferases D1 and D21. *J Biol Chem* 269: 27876-27884
- Tatchell, K. y Robinson, L. C. 2002. Use of green fluorescent protein in living yeast cells. *Methods Enzymol* 351: 661-683
- Tehlivets, O., Hasslacher, M. y Kohlwein, S. D. 2004. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in yeast: key enzyme of methylation metabolism and coordinated regulation with phospholipid synthesis. *FEBS Lett* 577: 501-506
- Thomas, D., Jacquemin, I. y Surdin-Kerjan, Y. 1992. MET4, a leucine zipper protein, and centromere-binding factor 1 are both required for transcriptional activation of sulfur metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12: 1719-1727
- Thomas, D., Rothstein, R., Rosenberg, N. y Surdin-Kerjan, Y. 1988. SAM2 encodes the second methionine S-adenosyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*: physiology and regulation of both enzymes. *Mol Cell Biol* 8: 5132-5139
- Thomas, D. y Surdin-Kerjan, Y. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 503-532
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector D., Azevedo, D. 2003. Oxidative stress response in yeast. In *Topics in Current Genetics*, pp. 241-330. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg: S. Hohmann, P. W. H. Mager, eds
- Tomarev, S. I., Zinovieva, R. D., Guo, K. y Piatigorsky, J. 1993. Squid glutathione S-transferase. Relationships with other glutathione S-transferases and S-crystallins of cephalopods. *J Biol Chem* 268: 4534-4542
- Tu, C. P. y Akgul, B. 2005. Drosophila glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 401: 204-226
- Tzeng, H. F., Blackburn, A. C., Board, P. G. y Anders, M. W. 2000. Polymorphism- and species-dependent inactivation of glutathione transferase zeta by dichloroacetate. *Chem Res Toxicol* 13: 231-236
- Uchida, K. 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 42: 318-343
- Van Bladeren, P. J. y Van Ommen, B. 1991. The inhibition of glutathione S-transferases: mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits. *Pharmacol Ther* 51: 35-46
- Van Helden, J. 2003. Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 31: 3593-3596

- Van Roermund, C. W., De Jong, M., L, I. J., Van Marle, J., Dansen, T. B. *et al.*, 2004. The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline. *J Cell Sci* 117: 4231-4237
- Veal, E. A., Toone, W. M., Jones, N. y Morgan, B. A. 2002. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277: 35523-35531
- Veenhuis, M., Salomons, F. A. y Van Der Klei, I. J. 2000. Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: a structure/function analysis. *Microsc Res Tech* 51: 584-600
- Vibanco-Perez, N., Jimenez, L., Merchant, M. T. y Landa, A. 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol* 85: 448-453
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J. *et al.*, 2004. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 43614-43624
- Vuilleumier, S. 1997. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J Bacteriol* 179: 1431-1441
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. y Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-1808
- Wanders, R. J., Van Grunsven, E. G. y Jansen, G. A. 2000. Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in humans. *Biochem Soc Trans* 28: 141-149
- Wanders, R. J. y Waterham, H. R. 2006. Biochemistry of Mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75: 295-332
- Wanders, R. J. A. W., H.R. 2006. Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. *Annu Rev Biochem* 75: 295-332
- Wang, L., Xu, J., Ji, C., Gu, S., Lv, Y. *et al.*, 2005. Cloning, expression and characterization of human glutathione S-transferase Omega 2. *Int J Mol Med* 16: 19-27
- Wang, Y., Lau, P. C. y Button, D. K. 1996. A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 62: 2169-2173
- Warringer, J. y Blomberg, A. 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20: 53-67
- Washburn, M. P. y Wells, W. W. 1999. The catalytic mechanism of the glutathione-dependent dehydroascorbate reductase activity of thioltransferase (glutaredoxin). *Biochemistry* 38: 268-274
- Wei, S. H., Clark, A. G. y Syvanen, M. 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 1145-1153

Weiner, M. P. y Costa, L. 1995. Rapid PCR site-directed mutagenesis. In PCR Primer, a Laboratory Manual (Dieffenbach C. W., Dveksler, G.S. eds), pp. 613-621, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Welsh, M. J., Anderson, M. P., Rich, D. P., Berger, H. A., Denning, G. M. *et al.*, 1992. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: a chloride channel with novel regulation. *Neuron* 8: 821-829

Wheeler, G. L. y Grant, C. M. 2004. Regulation of redox homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol Plant* 120: 12-20

Whitbread, A. K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M. y Board, P. G. 2005. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 78-99

Whitbread, A. K., Tetlow, N., Eyre, H. J., Sutherland, G. R. y Board, P. G. 2003. Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* 13: 131-144

Wickner, R. B., Koh, T. J., Crowley, J. C., O'neil, J. y Kaback, D. B. 1987. Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of the MAK16 gene and analysis of an adjacent gene essential for growth at low temperatures. *Yeast* 3: 51-57

Wilce, M. C., Board, P. G., Feil, S. C. y Parker, M. W. 1995. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *Embo J* 14: 2133-2143

Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M. *et al.*, 1994. 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368: 32-38

Wong, S., Butler, G. y Wolfe, K. H. 2002. Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9272-9277

Xia, B., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., Wright, P. E. y Dyson, H. J. 2001. Solution structure of *Escherichia coli* glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases. *J Mol Biol* 310: 907-918

Xie, C., Lovell, M. A. y Markesbery, W. R. 1998. Glutathione transferase protects neuronal cultures against four hydroxynonenal toxicity. *Free Radic Biol Med* 25: 979-988

Xu, D. P., Washburn, M. P., Sun, G. P. y Wells, W. W. 1996. Purification and characterization of a glutathione dependent dehydroascorbate reductase from human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 117-121

Yang, Y., Cheng, J. Z., Singhal, S. S., Saini, M., Pandya, U. *et al.*, 2001. Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J Biol Chem* 276: 19220-19230

Yang, Y., Sharma, R., Cheng, J. Z., Saini, M. K., Ansari, N. H. *et al.*, 2002. Protection of HLE B-3 cells against hydrogen peroxide- and naphthalene-induced lipid peroxidation and apoptosis by transfection with hGSTA1 and hGSTA2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 434-445

- Yang, Y., Trent, M. B., He, N., Lick, S. D., Zimniak, P. *et al.*, 2004. Glutathione-S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 173: 211-221
- Yang, Y. F. y Wells, W. W. 1991. Identification and characterization of the functional amino acids at the active center of pig liver thioltransferase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 266: 12759-12765
- Yi, E. C., Marelli, M., Lee, H., Purvine, S. O., Aebersold, R. *et al.*, 2002. Approaching complete peroxisome characterization by gas-phase fractionation. *Electrophoresis* 23: 3205-3216
- Yu, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162
- Zakharyan, R. A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S. M., Tsapralis, G., Board, P. G. *et al.*, 2001. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol* 14: 1051-1057
- Zarkovic, N., Tillian, M. H., Schaur, J., Waeg, G., Jurin, M. y Esterbauer, H. 1995. Inhibition of melanoma B16-F10 growth by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Cancer Biother* 10: 153-156
- Zhao, T., Singhal, S. S., Piper, J. T., Cheng, J., Pandya, U. *et al.*, 1999. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 367: 216-224
- Zhou, D. y White, R. H. 1991. Transsulfuration in archaeobacteria. *J Bacteriol* 173: 3250-3251
- Zhou, Z. H. y Syvanen, M. 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol Gen Genet* 256: 187-194

9. APÉNDICE

ARTÍCULO 1

Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases

Ana GARCERÁ, Lina BARRETO, Lidia PIEDRAFITA, Jordi TAMARIT and Enrique HERRERO¹

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, 25008-Lleida, Spain

The *Saccharomyces cerevisiae* genome encodes three proteins that display similarities with human GSTOs (Omega class glutathione S-transferases) hGSTO1-1 and hGSTO2-2. The three yeast proteins have been named Gto1, Gto2 and Gto3, and their purified recombinant forms are active as thiol transferases (glutaredoxins) against HED (β -hydroxyethyl disulphide), as dehydroascorbate reductases and as dimethylarsinic acid reductases, while they are not active against the standard GST substrate CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene). Their glutaredoxin activity is also detectable in yeast cell extracts. The enzyme activity characteristics of the Gto proteins contrast with those of another yeast GST, Gtt1. The latter is active against CDNB and also displays glutathione peroxidase activity against organic hydroperoxides such as cumene hydroperoxide, but is not active as a thiol transferase.

Analysis of point mutants derived from wild-type Gto2 indicates that, among the three cysteine residues of the molecule, only the residue at position 46 is required for the glutaredoxin activity. This indicates that the thiol transferase acts through a mono-thiol mechanism. Replacing the active site of the yeast monothiol glutaredoxin Grx5 with the proposed Gto2 active site containing Cys⁴⁶ allows Grx5 to retain some activity against HED. Therefore the residues adjacent to the respective active cysteine residues in Gto2 and Grx5 are important determinants for the thiol transferase activity against small disulphide-containing molecules.

Key words: deglutathionylation, glutaredoxin (Grx), glutathione peroxidase, glutathione S-transferase (GST), redox regulation, thiol oxidoreductase.

INTRODUCTION

GSTs (glutathione S-transferases) are enzymes that conjugate GSH to a variety of exogenous and endogenous electrophilic compounds, including environmental xenobiotics, anticancer drugs and products of oxidative stress [1–4]. GSH conjugates are usually more soluble than the original compounds, and are removed from the cell by membrane-associated ATP-binding-cassette transporter. Initially, most studies into GST function were carried out using mammalian GSTs, which have been classified into cytosolic, mitochondrial and membrane-associated forms [3]. On the basis of primary sequence and substrate specificity, cytosolic GSTs (of both mammalian and non-mammalian origins) have been divided into a number of classes: Alpha, Beta, Delta, Epsilon, Kappa, Lambda, Mu, Phi, Pi, Sigma, Tau, Theta, Omega and Zeta. The human Kappa class GST protein is located both in the peroxisomes and mitochondria [5], widening the range of organelle locations for mammalian GSTs. Most GST classes share a number of substrates, among which CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) is commonly used in standard GST activity determinations. However, GSTOs (Omega class GSTs) display low or null activity with standard GST substrates, while they have significant thiol transferase (glutaredoxin) activity [6–9]. In most GST classes, an N-terminal tyrosine or serine residue is essential for the nucleophilic attack on substrates. In contrast, Omega and also Beta class GSTs form a mixed disulphide involving GSH and an N-terminal domain cysteine residue from the GST molecule [2,6–9]. These GSTs lack the active site tyrosine/serine residue characteristic of the other classes. GSTOs therefore have different characteristics from those of most other GSTs, and functionally they resemble Grx (glutaredoxin) proteins. Some GSTs,

such as the Alpha class, also display glutathione peroxidase activity against organic hydroperoxides, including phospholipid hydroperoxides [10–12].

GSTOs are widely distributed among living organisms, although only the human (hGSTO1-1 and hGSTO2-2), pig and *Schistosoma mansoni* species have been studied extensively with regard to their enzymatic functions [6–9,13]. The three-dimensional structure of hGSTO1-1 has been determined [6], which revealed that it has the basic characteristics of a GST molecule, having an N-terminal domain with a thioredoxin-fold structure that includes the reactive cysteine and a carboxy domain with several α -helix regions, which are important for substrate specificity. GSTOs could potentially act as redox modulators of the activity of various proteins. It has been observed that hGSTO1-1 modulates the activity of calcium channels in different cell types [14], and also plays a role in the post-translational processing of interleukin-1 β [15]. A genetic study associates the hGSTOs with the age of onset of Alzheimer's disease [16], which may point to the relationship between these GSTs and oxidative stress protection.

Compared with GSTs from other organisms, those from fungal species are both more functionally and structurally diverse [17]. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two GSTs (Gtt1 and Gtt2) that act on standard GST substrates [18]. Analysis of their sequences shows that they cannot be assigned to any of the above-mentioned GST classes. Gtt1 is associated with the endoplasmic reticulum and is involved in thermotolerance [18]. More recently, it has been shown that Gtt1 and Gtt2 are functionally related to Grx1 and Grx2, and provide defence against oxidants and other stresses [19]. Grx1 and Grx2 are classical dithiol glutaredoxins required to protect yeast cells against external oxidants [20]. Purified Grx1 and Grx2 are active as GSTs, and the absence of the Gtt

Abbreviations used: CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; DHA, dehydroascorbate; DMA^V, dimethylarsinic acid; Grx, glutaredoxin; GST, glutathione transferase; GSTO, Omega class GST; Gtt1, *Saccharomyces cerevisiae* GST1; HED, β -hydroxyethyl disulphide; hGSTO, human GSTO; Gto, glutathione transferase Omega-like; Ni-NTA, Ni²⁺-nitrilotriacetate; IPTG, isopropyl β -D-thiogalactoside; SC, synthetic complete; t-BOOH, t-butyl hydroperoxide; ORF, open reading frame; TPCK, N-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone.

¹ To whom correspondence should be addressed (email enric.herrero@cmb.udl.es).

proteins in a *GRX1 GRX2* deletion mutant exacerbates the sensitivity of the yeast to oxidants [19]. These data therefore support that in *S. cerevisiae* Gtt1 and Gtt2 could participate in the defence against several stress conditions, including oxidant action, in close relationship with dithiol glutaredoxins. A role in defence against hydroperoxides has also been described for the *Schizosaccharomyces pombe* homologues of Gtt1 and Gtt2 [21].

In addition to the two dithiol glutaredoxins, *S. cerevisiae* cells contain three monothiol glutaredoxins (Grx3, Grx4 and Grx5) that have homologues in organisms from bacteria to humans and are characterized by the presence of a CGFS motif at the active site [22,23]. The cysteine residue is required for the biological activity of yeast Grx5 in the synthesis of Fe-S clusters in mitochondria [23]. In contrast with dithiol glutaredoxins, monothiol glutaredoxins are not active in the standard thiol transferase assay when the low-molecular mass disulphide molecule HED (β -hydroxyethyl disulphide) was used as the substrate [24–26].

The observations relating to: (i) the glutaredoxin activity of GSTOs; (ii) the activity of Alpha class and other GSTs as glutathione peroxidases; and (iii) the fact that Grx1 and Grx2 are active as glutathione peroxidases [27] help to depict the complex interplay between GSTs, glutaredoxins and glutathione peroxidases in oxidative stress responses. Analysis of the *S. cerevisiae* genome shows that it contains three ORFs (open reading frames) that could code for proteins similar to known GSTOs. In the present study, we demonstrate that purified recombinant products of the three ORFs are indeed Gto (glutathione transferase Omega-like) proteins, which confirms the presence of this class of GST protein in lower eukaryotes. We show that a single cysteine residue is essential for the thiol transferase activity and that it cannot be replaced by residues that are required for thiol transferase activity in other GST classes. This therefore defines a monothiol mechanism of action for the Gto proteins as thiol transferases. The role of other residues conserved in the yeast GSTO proteins are also described. Finally, we also demonstrate that yeast Grx5 can retain activity against HED when the Gto2 active site motif replaces the CGFS motif, therefore pointing to the importance of the residues surrounding the active site cysteine for the thiol transferase specificity of monothiol glutaredoxins and GSTOs.

EXPERIMENTAL

Materials

GSH, NADPH, H₂O₂, t-BOOH (t-butyl hydroperoxide), ethacrynic acid, DHA (dehydroascorbate), sodium cacodylate, IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside), glycyl betaine, PMSF, TPCK (N-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone) and pepstatin A were purchased from Sigma. HED, CDNB and cumene hydroperoxide were from Aldrich. Amylose resin was from New England Biolabs and Ni-NTA (Ni²⁺-nitrilotriacetate)-agarose was from Qiagen. Factor X was purchased from Amersham Biosciences.

Strains and plasmids

The plasmids employed for expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* BL21 cells (Novagen) are described in Table 1. Two expression vectors were used: pET-21a (Novagen) and pMAL-c2X (New England Biolabs). Derivatives of the wild-type genes mutated in the *GTO2* or *GRX5* sequences (Table 1) were constructed using the ExSite method [28]. Oligonucleotides for PCR amplification and introduction of the mutations were designed to insert a restriction enzyme site (that did not alter the translation product) near to or at the desired point mutation and therefore could be used as a marker for it. Mutations were con-

Table 1 Plasmids employed in this work

Plasmid	Original vector	Comments
pMM494	pET-21a	<i>GTO2</i> cloned between <i>Nde</i> I and <i>Xho</i> I sites of vector
pMM496	pET-21a	<i>GTO3</i> cloned between <i>Nde</i> I and <i>Xho</i> I sites of vector
pMM498	pET-21a	<i>GTT1</i> cloned between <i>Nde</i> I and <i>Xho</i> I sites of vector
pMM543	pET-21a	pMM494 derivative, with C46G substitution
pMM545	pET-21a	pMM494 derivative, with C67S substitution
pMM547	pET-21a	pMM494 derivative, with C46Y substitution
pMM563	pET-21a	pMM494 derivative, with C307G substitution
pMM566	pMAL-c2X	<i>GTO1</i> cloned between <i>Eco</i> RI and <i>Hind</i> III sites of vector
pMM640	pET-21a	pMM563 derivative, with C67S and C307G substitutions
pMM644	pET-21a	pMM640 derivative, with C46G, C67S and C307G substitutions
pMM646	pMAL-c2X	<i>GTO2</i> cloned between <i>Eco</i> RI and <i>Pst</i> I sites of vector
pMM647	pMAL-c2X	pMM646 derivative, the CPWA sequence beginning at position 46 of Gto2 protein replaced by CGFS
pMM652	pMAL-c2X	<i>GTO2</i> sequence coding for amino acids 1 to 200 cloned between <i>Eco</i> RI and <i>Pst</i> I sites of vector
pMM677	pMAL-c2X	pMM646 derivative, with L246A substitution
pMM679	pMAL-c2X	pMM646 derivative, with G280L substitution
pMM681	pMAL-c2X	pMM646 derivative, with D287G substitution
pMM684	pMAL-c2X	pMM646 derivative, with E173A substitution
pMM686	pMAL-c2X	pMM646 derivative, with S174A substitution
pMM688	pMAL-c2X	pMM646 derivative, with R51A substitution
pMM690	pMAL-c2X	pMM646 derivative, with E173D substitution
pMM694	pMAL-c2X	<i>GRX5</i> with the coding sequence for CPWA instead of the wild sequence for C60FPS, cloned between <i>Bam</i> HI and <i>Pst</i> I sites of vector
pMM696	pMAL-c2X	pMM690 derivative, with R51A and E173D substitutions
pMM731	pET-21a	pMM494 derivative, with C46A substitution
pMM742	pET-21a	pMM494 derivative, with C46S substitution

firmed by DNA sequencing. The *S. cerevisiae* *GTO* genes plus approx. 600 bp upstream and 200 bp downstream of the coding sequence were cloned in the multicopy plasmid YEplac195 [29]. The resulting plasmids were pMM579 (*GTO1*, cloned between *Eco*RI and *Bam*HI sites of the vector polylinker), pMM584 (*GTO2*, cloned between *Eco*RI and *Hind*III sites) and pMM611 (*GTO3*, cloned between *Bam*HI and *Pst*I sites).

S. cerevisiae W303-1A (*MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15*) was used as standard wild-type yeast strain [22]. MML752 is an isogenic derivative with the *GRX1::kanMX4* and *GRX2::LEU2* gene disruptions. These were successively introduced in the wild-type strain by standard genetic methods.

Growth conditions

E. coli BL21 cells carrying the recombinant plasmids were grown at temperatures ranging from 25 to 37 °C in LB (Luria-Bertani) medium plus 100 μ g/ml ampicillin. For transformants carrying pMAL-c2X derivatives, 0.2% glucose was added to the culture medium. For plasmid selection, yeast cells were grown at 30 °C in synthetic complete medium [30] without uracil.

Purification of recombinant proteins

Bacterial cultures transformed with the desired plasmid (derived from pET-21a or pMAL-c2X) were grown exponentially until they reached a *D*₆₀₀ of 0.5. IPTG was then added to a final concentration of 1 mM and the cells were grown for a further 4 h. The cells were recovered by centrifugation at 8000 g for 20 min, and the pellets were processed according to the manufacturer's instructions for pET-21a- and pMAL-c2X-based recombinant proteins. In some cases, 1 M sorbitol plus 2.5 mM glycyl betaine was added to the LB/ampicillin medium to favour the recovery of soluble recombinant proteins. Proteins were purified by affinity chromatography following the manufacturer's instructions. Ni-NTA-agarose

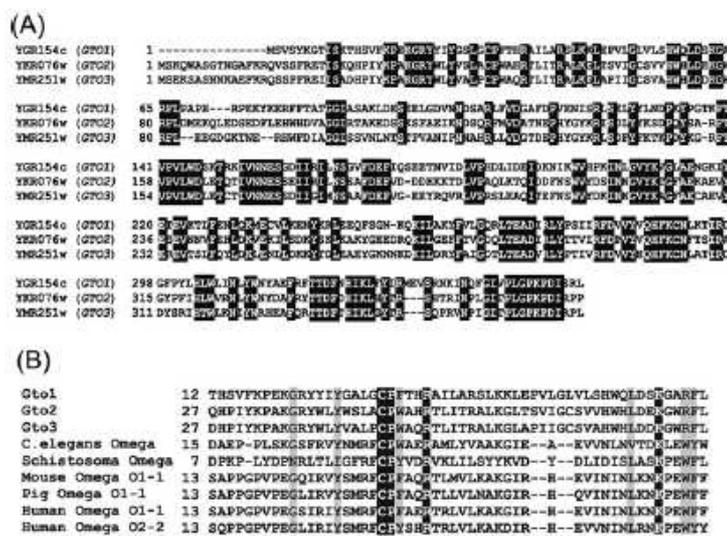


Figure 1 Comparison of GSTO protein sequences

(A) ClustalW multiple sequence alignment of the protein products of *S. cerevisiae* ORFs *GTO1* (YGR154c), *GTO2* (YKR076w) and *GTO3* (YMR251w). Residues identical in the three sequences are shown in black boxes. (B) Sequence comparison of the region around the putative active site of several GSTOs, after ClustalW alignment. SwissProt accession numbers of the respective proteins are: Gto1, P46233; Gto2, P36156; Gto3, Q04806; *Caenorhabditis elegans* Omega, P34345; *Schistosoma mansoni* Omega, Q88LC0; mouse Omega O1-1, Q09131; pig Omega O1-1, Q2N1F5; human Omega O1-1, P78417; human Omega O2-2, Q9H4Y5. Residues identical in the compared sequences are in black boxes and residues with conserved changes are in grey boxes. The conserved region corresponding to the putative active site is underlined. Dots mark residues described as important for the activity of the hGSTO1-1 enzyme [6,9].

columns were used for proteins expressed from plasmids based on pET-21a, and amylose resin columns were used for proteins expressed from plasmids based on pMAL-c2X.

Lysis of yeast cultures

Yeast cells were grown exponentially to a concentration of approx. 2×10^7 cells/ml. They were recovered by centrifugation at 6000 g for 10 min, washed with lysis buffer (150 mM phosphate buffer, pH 6.5) and resuspended in lysis buffer containing a mixture of protease inhibitors (PMSF, TPCK and pepstatin A, each at a final concentration of 1 mM). An equal volume of glass beads was added and the cells were broken by shaking using a FastPrep FP120 (Thermo Savant), for two periods of 45 s each separated by 1 min on ice. The liquid extract was recovered and centrifuged at 12000 g for 30 min. The resultant supernatant was kept for further analyses.

Enzyme activity analysis

GST activities were spectrophotometrically determined for different substrates [31]. Thiol transferase (glutaredoxin) activity with HED as substrate was determined through the reduction of the mixed disulphide formed between HED and GSH, as described previously [32]. DHA and DMA⁺ (dimethylarsinic acid) reductase activities were measured as described previously [9]. Peroxidase activity with different peroxides as substrates was assayed as described previously [27]. Protein concentration was determined using the Bradford method.

Intrinsic fluorescence measurements

Intrinsic fluorescence measurements of wild-type and mutant Gto2 proteins were performed at 25 °C using a spectrofluorimeter

system RF-5000 (Shimadzu) equipped with a temperature-controlled cell holder. Measurements were carried out using 2.5 μM protein in Tris/HCl, pH 8.0. The excitation wavelength was set at 280 nm, and the range of emission wavelength was set to between 270 and 400 nm.

In silico analysis

Homology searches were performed using the BLASTP program with default parameters (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Multiple sequence alignments were performed with ClustalW [33], using the European Bioinformatics Institute tools (<http://www.ebi.ac.uk>). Protein secondary structure was predicted using a Multivariate Linear Regression Combination analysis that combined the SOPMA, GOR4 and SIMPA programs [34] (Network Protein Sequence Analysis, PBIL, <http://npsa-pbil.ibcp.fr>).

RESULTS

Three ORFs of the *S. cerevisiae* genome code for GSTO proteins

Analysis of the *S. cerevisiae* genome indicated that it contains three ORFs whose putative products display similarity with hGSTO1-1 and other GSTO proteins. We therefore named the three ORFs *GTO1* (YGR154c), *GTO2* (YKR076w) and *GTO3* (YMR251w). *GTO2* has also been named *ECM4* by other authors, where it was proposed to be involved in cell wall biogenesis, on the basis of the hypersensitivity of the corresponding null mutant to chemical agents that sense cell wall defects [35]. Similarity between the three Gto proteins extends throughout their entire amino acid sequence (Figure 1A). Gto1 is 50% identical with



Figure 2 Dendrogram after ClustalW multiple alignment of the indicated GST proteins

SwissProt accession numbers of the compared proteins are (see also legend of Figure 1): *Brucella melitensis*, Q8Y1I9; *Rhizobium melioli*, Q62N64; *Xanthomonas campestris*, Q8P4Y7; *E. coli*, P42520; *Pseudomonas aeruginosa*, Q910M8; *Streptococcus agalactiae*, Q8E608; *Gloeobacter violaceus*, Q7NG00; *Halobacterium* sp., Q9HN26; *Arabidopsis thaliana* Omega Q8H121; *A. thaliana* Phi1, P42790; *Brassica juncea* Phi2, Q7X737; *Oryza sativa* Phi1, Q65857; *C. elegans* Zeta, Q18038; *Homo sapiens* Zeta1, Q43708; *Gallus gallus* Alpha, Q08392; *H. sapiens* Alpha, P09210; *Xenopus laevis* Sigma, Q8HA47; *Rattus norvegicus* Sigma, Q35543; *H. sapiens* Sigma, Q6PHT9; *R. norvegicus* Pi, P04906; *H. sapiens* Pi, Q5TZY3; *G. gallus* Mu2, P20136; *H. sapiens* Mu1, Q5TZY5; *Drosophila melanogaster* Theta, P20432; *Mus musculus* Theta1, Q64471; *H. sapiens* Theta1, P30711; *S. cerevisiae* Gtt1, P40682; *S. cerevisiae* Gtt2, Q12390; *Schizosaccharomyces pombe* SPCC1281.07c, Q94524; *Candida albicans* ECM4, Q5A953; *Neurospora crassa* NCU04368.1, Q7RWF2.

Gto2 and 62% with Gto3, while Gto2 and Gto3 are 50% identical. Similarity with the metazoan homologues is less marked, although it also extends throughout the sequence. The cysteine residue essential for GSH-dependent activity in hGSTO1-1 [6] is conserved in the three Gto proteins and in eukaryotic homologues (Cys³¹ in Gto1 and Cys⁴⁶ in Gto2 and Gto3; Figure 1B). Other important residues for the activity of the hGSTO1-1 species such as Pro³³, Leu³⁶ and Lys³⁹ [6] are conserved in the three yeast Gto proteins. hGSTO1-1 Phe³⁴ also has its corresponding residue in Gto1, while it is replaced by a tryptophan residue in Gto2 and Gto3. Compared with hGSTO1-1, *S. cerevisiae* Gto proteins are larger as they contain additional amino acid stretches that do not correspond to any part of the hGSTO1-1 sequence. As an example, the Gto1 region spanning amino acids 179–227 (and its equivalent regions in Gto2 and Gto3; Figure 1A) has no counterpart in hGSTO1-1. BLAST searches reveal the presence of proteins similar to the three *S. cerevisiae* products in other fungal species and in many bacteria, especially proteobacteria and cyanobacteria. Multiple alignment analysis indicated that fungal (including the *S. cerevisiae* Gto proteins) and bacterial sequences are grouped close to the metazoan GSTO proteins and are significantly separated from other classes of GSTs (Figure 2). In this tree, the *S. cerevisiae* Gto proteins and their fungal relatives group together as a subcluster with their bacterial homologues. Remarkably, yeast Gtt1 does not become grouped with other known GST classes, while Gtt2 forms a cluster with sequences of the GST Zeta class (Figure 2). This confirms the previously observed divergence between the Gtt proteins (and in general most fungal GSTs) and mammalian GST classes [17].

Purified Gto proteins have enzyme activities characteristic of GSTOs

We attempted to purify the Gto1, Gto2 and Gto3 proteins from *E. coli* cells when they were overexpressed using the pET-21a expression vector. It was possible to obtain Gto2 in a soluble form from bacterial cultures at 37°C without further additions. However, neither recombinant Gto1 nor Gto3 became soluble under these conditions. It has been reported that addition of 1 M sorbitol plus glycerol betaine to the growth medium may result in the solubilization of some recombinant proteins that under other conditions are insoluble in *E. coli* cells [36]. We therefore tested the expression of Gto1 and Gto3 under these growth conditions at a temperature range from 25 to 37°C. Gto3 was obtained in a soluble form with the above additions even at 37°C, while Gto1 remained insoluble under all conditions. We therefore used a different expression vector, pMAL-c2X, to overexpress Gto1. This allowed us to obtain a soluble protein in which the maltose-binding protein was N-terminally fused to Gto1. This was achieved in LB medium without additions at 37°C. Soluble recombinant Gto proteins obtained under the different conditions reported above were further purified by affinity chromatography using Ni-NTA resin columns (for pET-21a-based constructs) or amylose resin columns (for pMAL-c2X-based constructs). In the latter case, the Gto1 moiety was cleaved from the maltose-binding protein by digestion with Factor X. Purity of the final Gto preparations were checked by SDS/PAGE (10% gels), followed by Coomassie Blue staining and scanning of the stained gels (using a GS-800 Bio-Rad densitometer). In the above cases and also in those described in later

Table 2 Activity of recombinant GSTs of *S. cerevisiae* with various substratesResults are means \pm S.D. of three determinations with separate protein preparations. ND, not detectable.

Substrate	Enzyme			
	Gto1	Gto2	Gto3	Gtt1
Glutathione transferase activity ^a				
CDNB	ND	ND	ND	70 \pm 8
1,2-Dichloronitrobenzene	ND	ND	ND	ND
Ethacrynic acid	252 \pm 31	94 \pm 6	104 \pm 19	105 \pm 11
4-Hydroxynonenal	ND	ND	ND	ND
Thiol transferase ^b	1.93 \pm 0.118	3.27 \pm 1.286	1.18 \pm 0.240	ND
DHA reductase ^c	0.23 \pm 0.031	0.11 \pm 0.009	0.16 \pm 0.004	ND
DMA ^v reductase ^d	0.17 \pm 0.031	0.14 \pm 0.009	0.15 \pm 0.025	ND

^a Specific activity as nmol of glutathione conjugate formed per min per mg of protein.^b Specific activity as μ mol of NADPH oxidized per min per mg of protein, with β -hydroxyethyl disulphide as a substrate.^c Specific activity as μ mol of DHA reduced per min per mg of protein.^d Specific activity as μ mol of NADPH oxidized per min per mg of protein.

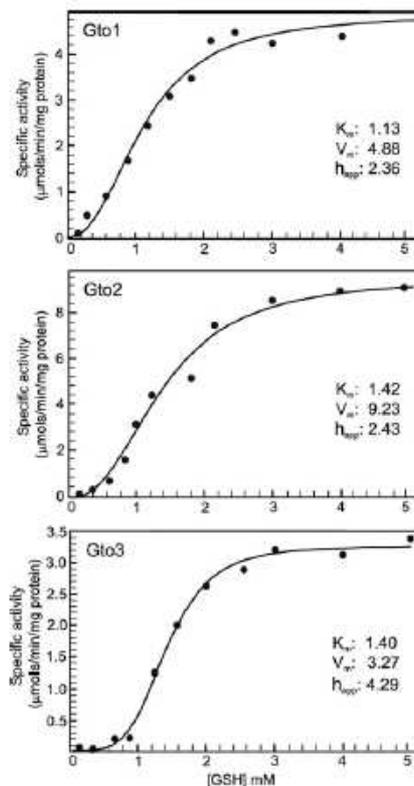
sections, the purity of the recombinant Gto protein in the final preparation was at least 95%.

Recombinant Gto proteins did not display activity against the GST substrates CDNB, 1,2-dichloronitrobenzene or 4-hydroxynonenal, while they were active on ethacrynic acid (Table 2). In contrast, they demonstrated thiol transferase activity against HED, which is a substrate of dithiol glutaredoxins [32]. Using recombinant Gtt1 (purified from a construction based on pET-21a, Table 1) as a control for standard GSTs, this protein showed measurable activity against CDNB, as previously reported [18]. However, it did not demonstrate any glutaredoxin activity (Table 2). The Gto proteins also displayed moderate activity as DHA and DMA^v reductases (Table 2). The specific activity of the recombinant Gto proteins against the different substrates tested was at approximately the same level as that reported for hGSTO1-1 [6,13]. In contrast, hGSTO2-2 displayed considerably higher activity as a DHA reductase [13].

Specific activity of the recombinant Gto proteins as a function of GSH concentration was determined (Figure 3). The data were best-fitted with a sigmoidal curve. The apparent Hill coefficients (h_{app}) were calculated to be 2.36, 2.43 and 4.29 for Gto1, Gto2 and Gto3 respectively, indicating strong positive co-operativity. These co-operative interactions are most frequently associated with multimeric proteins. The K_m (app) for GSH was similar for the three proteins (1.13–1.42 mM), while the V_{max} values exhibited larger differences (Figure 3).

Thiol transferase activity of the Gto proteins is expressed *in vivo*

To determine whether the thiol transferase activity observed with recombinant Gto proteins was also manifested *in vivo*, a strain (MML752) was used that lacked the two dithiol glutaredoxins Grx1 and Grx2, to lower the thiol transferase activity against the substrate HED in cell extracts. This strain exhibited approx. one-third of the thiol transferase activity present in extracts from wild-type cells. This was in accordance with previous observations for a different genetic background [22]. The origin of the residual thiol transferase activity in the absence of GRX1 and GRX2 was not determined. MML752 cells were transformed with multicopy plasmids carrying *GTO1*, *GTO2* or *GTO3*, in which these genes were expressed under their own promoters. Overexpression of

**Figure 3** Thiol transferase activity of Gto proteins as a function of GSH concentration

Thiol transferase activity of recombinant proteins was assayed according to the method described previously [32], with GSH concentration varying in the range 0–5 mM. Best-fit plots were determined with non-linear regression functions included in the Mathematica 5.1 program. K_m (app) (labelled K_m ; mM), V_{max} (labelled V_{max} ; μ g/min per mg of protein) and Hill coefficient (labelled h_{app}) values are shown for each curve. Results correspond to a single representative experiment; differences between three experiments were less than 15%.

Gto1 or Gto2 proteins *in vivo* caused a significant increase (60–70%) in cellular thiol transferase activity above the level observed in cellular extracts from the void vector-transformed $\Delta grx1 \Delta grx2$ mutant (Figure 4). The increase in enzyme activity in the cell extracts from Gto3-overexpressing cells was more modest (approx. 20%) but was still reproducible. One of the functions of GSTs is defence against oxidants [3,4]. We therefore hypothesized that treatment of the above *GTO* transformants with diamide (an oxidant of thiol groups) could promote a further increase in thiol transferase activity measured in cell extracts. This was, in fact, the case for Gto2-overexpressing cells, but not for those overexpressing Gto1 or Gto3 (Figure 4). It was concluded that thiol transferase activity of Gto proteins is present in yeast cells under normal growth conditions and that, in the case of Gto2, this activity is induced under oxidative stress conditions. This latter observation is in accordance with the reported activation of expression of the *GTO2* gene under oxidative stress conditions [37].

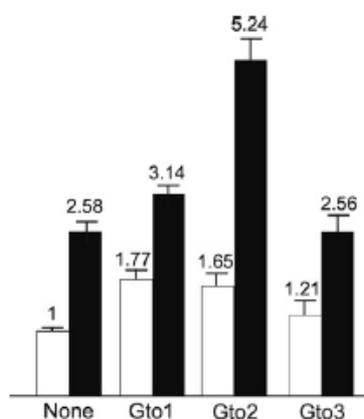


Figure 4 *In vivo* expression of glutaredoxin activity from *S. cerevisiae* Gto proteins

Cultures of *S. cerevisiae* cells transformed with the multicopy vector YEplac121 or the derived plasmids pMM529 (Gto1), pMM584 (Gto2) or pMM511 (Gto3) were grown exponentially in SC medium at 30°C to a cell concentration of about 2×10^7 cells/ml. In each case, half of the culture had been treated with 2.5 mM diamide for the previous 3 h (black bars), while the other half remained untreated (white bars). Total cell extracts were obtained and the glutaredoxin activity determined. Relative values of specific activity are shown over the bars. The unit value corresponds to untreated wild-type cells transformed with the vector (absolute specific activity: 3.65 ± 0.16 nmol/min per mg of protein). Results are means \pm S.D. for three experiments.

Gtt1 has significant activity as glutathione peroxidase, in contrast with Gto proteins

Many Alpha class GSTs and also some members of other classes display glutathione peroxidase activity against organic hydroperoxides [10–12]. We analysed whether Gto proteins were also active as glutathione peroxidases. Purified recombinant Gtt1 was analysed in parallel. H_2O_2 and two organic hydroperoxides, t-BOOH and cumene hydroperoxide, were tested as substrates. Recombinant Gto1 showed no activity against these three substrates, while Gto2 and Gto3 exhibited only very modest activity against t-BOOH (Figure 5). Gto3 also showed low but reproducible activity against cumene hydroperoxide. In contrast, we detected significant peroxidase activity for purified Gtt1 against cumene hydroperoxide (Figure 5). Elimination of any single component in the *in vitro* reaction with Gtt1 decreased the measurements to almost undetectable levels (Figure 5, inset). This confirmed that the detected glutathione peroxidase activity could indeed be attributed to purified Gtt1. Specific peroxidase activity as a function of GSH concentration displayed a sigmoidal curve, with a K_m (app) value of 0.45 mM (results not shown).

The glutaredoxin activity of Gto2 operates through a single cysteine residue

Our attention was focused on Gto2 to analyse the residues and protein regions necessary for the glutaredoxin activity of the molecule. The three-dimensional structure of hGSTO1-1 has been determined experimentally [6]. However, this structure could not be used for obtaining a reliable spatial model of Gto2, since the similarity between the two proteins throughout the amino acid sequence is below 20%. A secondary structure model was determined for Gto2 (see the Experimental section). In accordance with the known structure of GSTOs and other GST classes

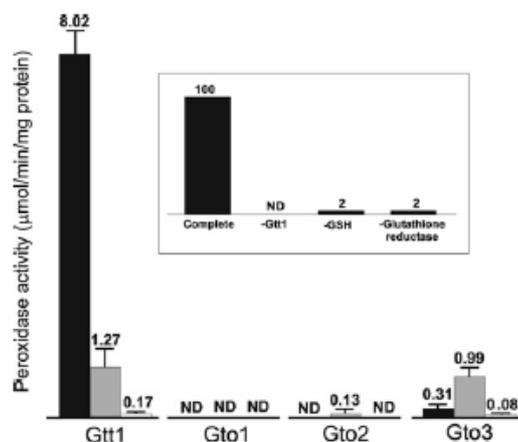


Figure 5 Glutathione peroxidase activity of *S. cerevisiae* GSTs

Recombinant Gtt1 (expressed from plasmid pMM498), Gto1 (pMM566), Gto2 (pMM494) and Gto3 (pMM496) proteins were assayed for glutathione peroxidase activity against cumene hydroperoxide (black bars), t-BOOH (grey bars) and H_2O_2 (white bars). Specific activity values are given as μ mol/min per mg of protein. The requirements for Gtt1 glutathione peroxidase activity against cumene hydroperoxide are shown in the inset, where the percentage of specific activity (relative to the complete assay mixture) is indicated when the mixture lacked the Gtt1 enzyme, GSH or glutathione reductase. Results are means \pm S.D. for three independent experiments.

[1–4,6], the predicted secondary structure of Gto2 depicts an N-terminal domain in which β -strands alternate with α -helices and a C-terminal domain rich in α -helices (Figure 6A). The sequence has three cysteine residues (at positions 46, 67 and 307, as shown in Figure 1A) that could be required for the activity of Gto2 as a glutaredoxin. Cys⁴⁶ is located between a β -strand and an α -helix region in the model of Figure 6(A), and the adjacent proline residue could be important in causing a change in orientation of the following α -helix domain. Both residues are conserved in hGSTO1-1 (Figure 1B). The equivalent Cys³² in hGSTO1-1 is exposed at the surface of the molecule [6]. The other two cysteine residues of Gto2 do not have an equivalent in hGSTO1-1 or in Gto1 or Gto3. Point mutations were inserted into the sequence of Gto2 that altered the three cysteine residues. Only the absence of Cys⁴⁶ decreased the thiol transferase activity of Gto2 to the same undetectable levels as a molecule lacking all three cysteines (Figure 6B). A mutant form of Gto2 was made in which Cys⁴⁶ was the only one of the three cysteine residues left unchanged, and this protein had enzyme activity levels comparable with that of the wild-type protein, which indicated that the thiol transferase activity of Gto2 operates through a single cysteine residue at position 46, that is, using a monothiol mechanism.

In many GST classes, a serine or tyrosine residue at the active site is responsible for the nucleophilic attack on substrates such as CDNB [1–3]. We then tested the effect of replacing Cys⁴⁶ with a serine or tyrosine residue on the *in vitro* GST activity of Gto2. Besides being completely inactive as thiol transferases (Figure 6B), the mutated Gto2 versions (C46S and C46Y) did not recover the activity against CDNB, which remained at basal levels. Recently, it has been shown that replacing the active site cysteine with an alanine residue in hGSTO1-1 is able to restore activity with CDNB [9]. However, this was not the case for the Gto2 mutant C46A, which displayed no activity against CDNB (results not shown).

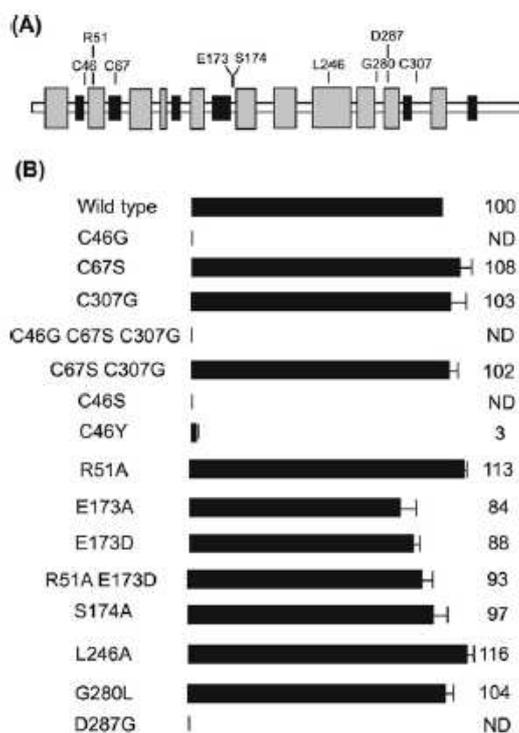


Figure 6 Effect of amino acid changes on the glutaredoxin activity of Gto2

(A) Secondary-structure prediction for Gto2 protein. Grey boxes correspond to proposed α -helices and black boxes to β -strands. The positions of the amino acid residues which were mutated in the present study are shown. (B) Percentage of specific enzyme activity (in the HED assay for glutaredoxin) of the recombinant Gto2 versions with the indicated amino acid changes, relative to the wild-type protein. Values are given on the right and are the means for three independent experiments. Proteins were expressed in *E. coli* cultures transformed with the respective plasmids indicated in Table 1. Results are means \pm S.D. for three independent experiments.

An analysis of fluorescence emission spectra was made to determine whether replacement of the active site Cys⁴⁶ residue had an effect on the global structure of Gto2 (Figure 7). The intrinsic fluorescence emission of a protein is affected by changes in the environment of aromatic residues and provides information on changes in its tertiary structure. No detectable changes were seen for the C46G and C46A substitutions, indicating that the lack of enzyme activity of the respective derivatives was strictly due to the absence of Cys⁴⁶. For the C46S and C46Y substitutions, a moderate decrease of emission intensity was detected, which may indicate some alteration of the tertiary structure of the protein or quenching of tryptophan fluorescence by the more polar environment caused by the hydroxylated amino acid.

We tested whether replacing Cys⁴⁶ plus the adjacent residues Pro⁴⁷, Trp⁴⁸ and Ala⁴⁹ in Gto2 (Figure 1A) with the CGFS sequence of the Grx5 active site had some effect on the thiol transferase activity of the protein. It must be stressed that, besides Cys⁴⁶, only Gto2 Pro⁴⁷ (but not Trp⁴⁸ and Ala⁴⁹) is conserved in other GSTOs (Figure 1B). The hybrid Gto2 molecule with the CGFS motif of Grx5 showed no detectable activity as a thiol transferase with HED (Figure 6B). This confirmed that, although

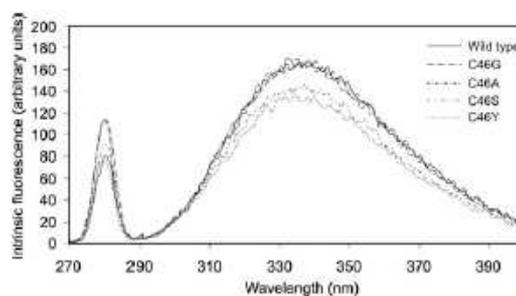


Figure 7 Intrinsic fluorescence emission spectra analysis of Gto2

Emission spectra of wild-type and recombinant Gto2 proteins with the indicated amino acid changes were recorded after excitation at 280 nm.

Cys⁴⁶ was required for Gto2 activity, the adjacent residues were also important.

It has been proposed that an electron-sharing network consisting of alternating ionic bridge interactions between negatively and positively charged amino acids is important for the catalytic activity of many, if not all, GST classes [38]. In hGSTO1-1, Arg³⁷, Glu⁸⁵ and Ser⁸⁶ would be part of in such a network, facilitating the formation of anionic glutathione as an essential step in the GST-mediated catalysis [38]. The equivalent residues in *S. cerevisiae* Gto2 are Arg⁵¹, Glu¹⁷³ and Ser¹⁷⁴. We individually replaced these residues with alanine residues and purified the new protein versions. None of the substitutions, or indeed an E173D change, affected the thiol transferase activity of Gto2 (Figure 6B). The double substitution R51A/E173D also had no effect on Gto2 activity. At least in the case of yeast Gto2, it therefore seems that those three residues are not required for the *in vitro* enzyme activity.

The C-terminal domain of Gto2 is also required for the activity of the protein

GSTs and both dithiol and monothiol glutaredoxins are members of the thioredoxin superfamily together with other proteins that interact with cysteine-containing substrates, such as thioredoxins, protein disulphide-isomerases and glutathione peroxidases [39,40]. A structural motif called the thioredoxin fold is shared by all members of this superfamily. This motif is formed by a four- or five-stranded β -sheet with a number of α -helices distributed on either side. This thioredoxin-fold structure constitutes the N-moiety of all GSTs, including those of the Omega class [1-4,6]. To test whether the first half of the Gto2 molecule, which includes all parts of the thioredoxin-fold structure (Figure 6A), was sufficient to provide the enzyme activity, a version of Gto2 was made that was truncated after amino acid 200. Although this truncated form of Gto2 still contained Cys⁴⁶, it was not active in the HED assay. This indicated that for Gto2 the thioredoxin-fold domain alone was not sufficient for the protein to be active as a thiol transferase. Three residues (Leu²⁴⁶, Gly²⁸⁰ and Asp²⁸⁷) in the C-terminal moiety of Gto2 are conserved at equivalent positions of Gto2 homologues from other species. We mutated these residues separately and studied the effects on activity of the respective recombinant proteins. The change D287G totally abolished enzyme activity, while the other two changes (L246A and G280L) produced no detectable effects (Figure 6B).

A hybrid Grx5 protein with the active site of Gto2 has some thiol transferase activity

As shown above, Gto2 operates through a monothiol mechanism of action for its thiol oxidoreductase activity on HED. However, Grx5 and other monothiol glutaredoxins are unable to reduce this substrate. To test whether the CPWA sequence of the proposed active site of Gto2 was able to provide Grx5 with activity in the HED assay, we made a mutant protein where the Grx5 CGFS active site was replaced with the CPWA sequence (plasmid pMM694; as shown in Table 1). This hybrid Grx5 protein displayed some activity in the complete assay (69 ± 14 nmol/min per mg of protein, mean \pm S.D. for three experiments). The specific activity against HED of the modified Grx5 form was considerably lower than the activity of Gto2 in the same assay (Table 2). However, it was significantly above background levels and it was not detectable in the absence of GSH or the substrate. We conclude that the amino acids adjacent to the respective active site cysteine residues in Gto2 and Grx5 are important determinants to define the action on small disulphide-containing molecules such as HED.

DISCUSSION

Glutaredoxins utilize GSH as an electron donor in the reduction of disulphide bridges, while typical GSTs use GSH to conjugate it to electrophilic compounds [1–4,32]. The two types of enzymes are related both structurally and functionally. Thus the N-terminal moiety of GSTs and the complete structure of dithiol glutaredoxins share the thioredoxin-fold domain [39,40]. Dithiol glutaredoxins, but not monothiol ones, exhibit GSH-disulphide oxidoreductase activity when assayed with substrates such as HED [24–26,32]. This is also the case for eukaryotic GSTOs, including the three yeast Gto proteins. A single cysteine at the active site (Cys⁴⁶) is sufficient for the enzyme activity of Gto2, which therefore operates as thiol oxidoreductase through a monothiol mechanism of action. However, the differential activity on the small disulphide HED molecule indicates that monothiol glutaredoxins and GSTOs employ different mechanisms of enzyme activity. The present study shows that the amino acids adjacent to the active site cysteine residue in Gto2 and Grx5 are important for determining the activity of the two proteins against HED. A hybrid derivative of Grx5 with the CPWA sequence from the Gto2 active site retains some enzyme activity. This suggests that the glycine, phenylalanine and serine residues adjacent to Cys⁶⁰ in Grx5 establish some constraints for the deglutathionylation reaction. This does not discard the existence of additional structural constraints outside the active site of Grx5 [41], which would explain that the activity of the hybrid Grx5 derivative occurs at low levels.

Fungal GSTs display a wide variety of primary structures, which are different from structures of mammalian GST classes [3,17]. However, homologues of hGSTO1-1 and of other higher eukaryote GSTOs are also present in lower eukaryotes such as *S. cerevisiae*, as well as in other fungi and bacteria. The primary structure of the three yeast homologues (Gto1, Gto2 and Gto3) is more similar to bacterial GSTOs than to hGSTO1-1, although a number of residues that are important for the tertiary structure of the latter and for its interaction with GSH [6] are also present in the three yeast Gto proteins. This includes the N-terminal cysteine residue essential for thiol oxidoreductase activity (Cys³² and Cys⁴⁶ in hGSTO1-1 and Gto2 respectively). It is remarkable that, while most bacterial and fungal GSTs are structurally separated from mammalian GSTs [17], those with the basic structure of the Omega class are present along the whole evolutionary scale.

This, together with the fact that they operate as glutaredoxins, suggest their importance in the evolution from GSH-dependent redox enzymes to GST-conjugating enzymes on the basis of a thioredoxin-fold module. It has been suggested that the GST classes with GSH-conjugation ability could have evolved from thiol-disulphide oxidoreductases that use GSH as redox donor, and could be precursors of other GST classes [42]. GSTs with cysteine residues at their active sites could be representatives of these ancient GSTs.

The glutaredoxin activity of Gto1, Gto2 and Gto3 measured *in vitro* correlates with their *in vivo* expression. Of the total thiol transferase activity detected in cell extracts in our hands, approx. 70% was probably due to the two dithiol glutaredoxins Grx1 and Grx2. The remaining activity in the absence of Grx1 and Grx2 can be increased approx. 1.6- to 1.7-fold by separately overexpressing Gto1 or Gto2 (or more modestly in the case of Gto3) in otherwise normal growth conditions. This means that in yeast cells with a single copy of any of the *GTO* genes, the glutaredoxin activity of these GSTs would account for only a small percentage of the total glutaredoxin activity of the cell. The enzyme activity of the Gto proteins is probably required for specialized functions during growth on glucose medium, or they must otherwise be induced in specific situations. For instance, Gto2 activity increases significantly during stress caused by diamide. Whole-proteome analysis in yeast cells [43] and our own studies with green fluorescent protein-tagged forms of the three Gto proteins indicate that Gto1 has a peroxisomal location, while Gto2 and Gto3 are cytosolic. In spite of the peroxisomal location of Gto1, it is clear that its activity can even be expressed under growth conditions (such as on glucose-based medium) in which the number of peroxisomes per yeast cell is low. The low glutaredoxin activity of Gto proteins is compatible with their participation in specific functions inside the cell that require the maintenance of the adequate redox state of specific protein targets, instead of a general role in the defence against oxidative stress. These specific roles in determined cellular functions are also characteristic of monothiol glutaredoxins [44,45].

The C-terminal moiety of Gto2 is required for the activity of the enzyme in addition to the N-terminal region containing Cys⁴⁶. Asp²⁸⁷ is an essential residue in the C-terminal region. Aspartate residues are present at equivalent positions in Gto homologues, including hGSTO1-1. The equivalent in hGSTO1-1 (Asp¹⁷⁴) is located at the same α -helix as Arg¹⁸³. This has been proposed to participate (together with other residues at both the N- and C-terminal moieties) in the formation of the H-site responsible for the interaction with GST substrates [6]. hGSTO1-1 Arg¹⁸³ is also conserved in all the GSTO proteins analysed. However, it must be kept in mind that the *in vitro* assays for thiol transferase activity are not performed with natural GST substrates. This favours the hypothesis that Asp²⁸⁷ in Gto2, and its equivalents in Gto2 homologues, could participate in the maintenance of the general structure of the protein instead of being directly involved in the enzyme reaction. In hGSTO1-1, Asp¹⁷⁴ is part of the α 6-helix, which is located close to the α 1-helix. The α 1-helix is important for the structure of the active site and includes Arg³⁷, a residue that is conserved in the three Gto proteins [6] (Figure 1). This model for hGSTO1-1 suggests an interaction between Asp¹⁷⁴ and Arg³⁷. A similar situation in Gto2 would explain the requirement for Asp²⁸⁷ for the spatial conformation of the molecule.

S. cerevisiae Gtt1 and Gtt2 have structural similarities with Ure2, a regulator of nitrogen catabolic gene expression. Although lacking GST activity [18], the Ure2 protein has glutathione peroxidase activity [46]. Purified Gtt1 is active as a glutathione peroxidase against organic hydroperoxides, although not against H₂O₂. This combined with the peroxidase activity of Grx1 and

Grx2 [23] supports the *in vivo* role of the Gtt GSTs and the two dithiol glutaredoxins in the defence against hydroperoxides. Among the three *Schizosaccharomyces pombe* GSTs (Gst1, Gst2 and Gst3), Gst3 is the most similar to Gtt1 and exhibits *in vivo* activity as a glutathione peroxidase against organic hydroperoxides [18]. Therefore the peroxidase activity of Gtt1 and its possible role in protection against oxidative stress in co-operation with other antioxidant systems may be a conserved property in different fungi. Altogether, these observations support the existence of a complex relationship between GSTs, glutaredoxins and glutathione peroxidases in general protection against oxidative stress and in specific protein redox regulation.

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (BFL2004-03167) and the Generalitat de Catalunya (2001SGR00305). A.G. was recipient of a postdoctoral grant from the Generalitat de Valencia. We thank Albert Sorribas for his help during the preparation of this manuscript.

REFERENCES

- 1 Armstrong, R. N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 2–18
- 2 Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. and Dowd, C. A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **360**, 1–16
- 3 Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51–88
- 4 Oakley, A. J. (2005) Glutathione transferases: new functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 716–723
- 5 Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Fitor, A., Theret, N., Coles, B. and Guillozo, A. (2004) Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* **279**, 16246–16253
- 6 Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastaig, S., Jermini, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffon, M. C., Kamath, A. V. et al. (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **275**, 24798–24806
- 7 Fouimi, P., Anglade, P., Benzekri, A., Costet, P., Debrauer, L., Pineau, T. and Tulliez, J. (2001) Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem. J.* **358**, 257–262
- 8 Girardini, J., Amiante, A., Zermoumi, K. and Serra, E. (2002) Characterization of an omega-class glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5512–5521
- 9 Whitbread, A. K., Masoumi, A., Tellow, N., Schmuck, E., Coggan, M. and Board, P. G. (2005) Characterization of the Omega-class of glutathione transferases. *Methods Enzymol.* **401**, 78–99
- 10 Hurst, R., Bao, Y., Mannervik, B. and Williamson, G. (1998) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem. J.* **332**, 97–100
- 11 Zhao, T., Singhal, S. S., Piper, J. T., Cheng, J., Pandya, U., Clark-Wronski, J., Awasthi, S. and Awasthi, Y. C. (1999) The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 216–224
- 12 Prabhu, K. S., Reddy, P. V., Jones, E. C., Liken, A. D. and Reddy, C. C. (2004) Characterization of a class alpha glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **424**, 72–80
- 13 Schmuck, E. M., Board, P. G., Whitbread, A. K., Tellow, N., Blackburn, A. C. and Masoumi, A. (2005) Characterization of the monomethylarsenate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants. Implications for arsenic metabolism and age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenet. Genomics* **15**, 493–501
- 14 Dulhanty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G. and Board, P. (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J. Biol. Chem.* **276**, 3319–3323
- 15 Laliberla, R. E., Perregaux, D. G., Hoth, L. R., Rosner, P. J., Jordan, C. K., Peese, K. M., Egger, J. F., Dombroski, M. A., Geoghegan, K. F. and Gabel, C. A. (2003) Glutathione S-transferase omega 1-1 is a target of cytoline release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1 β posttranslational processing. *J. Biol. Chem.* **278**, 16567–16578
- 16 Li, Y. J., Oliveira, S. A., Xu, O., Martin, E. R., Stenger, J. E., Scherzer, C. R., Hauser, M. A., Scott, W. K., Small, G. W., Nance, M. A. et al. (2003) Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-of-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Human Mol. Genet.* **12**, 3259–3267
- 17 McGoldrick, S., O'Sullivan, S. M. and Sheehan, D. (2005) Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 1–12
- 18 Choi, J. H., Lou, W. and Vancura, A. (1998) A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 29915–29922
- 19 Collinson, E. J. and Grant, C. M. (2003) Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **278**, 22492–22497
- 20 Luikenhuis, S., Dawes, I. W. and Grant, C. M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1081–1091
- 21 Veal, E. A., Toone, W. M., Jones, N. and Morgan, B. A. (2002) Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 35523–35531
- 22 Rodriguez-Manzanque, M. T., Ros, J., Cabriscol, E., Sorribas, A. and Herrero, E. (1999) Gtx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8180–8190
- 23 Belli, G., Polaina, J., Tamarit, J., de la Torre, M. A., Rodriguez-Manzanque, M. T., Ros, J. and Herrero, E. (2002) Structure-function analysis of yeast Gtx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 37590–37596
- 24 Rahlfs, S., Fischer, M. and Becker, K. (2001) *Plasmodium falciparum* possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a P1COT homology domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 37133–37140
- 25 Tamarit, J., Belli, G., Cabriscol, E., Herrero, E. and Ros, J. (2003) Biochemical characterization of yeast mitochondrial Gtx5 monothiol glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* **278**, 25745–25751
- 26 Fernandes, A. P., Flachvad, M., Berndt, C., Andréson, C., Lillig, C. H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A. and Vlamis-Gardikas, A. (2005) A novel monothiol glutaredoxin (Gtx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **280**, 24544–24552
- 27 Collinson, E. J., Wheeler, G. L., O'Coon-Garrido, E., Avery, A. M., Avery, S. V. and Grant, C. M. (2002) The yeasts glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* **277**, 16712–16717
- 28 Weiner, M. P. and Costa, L. (1995) Rapid PCR site-directed mutagenesis. In *PCR Primer, a Laboratory Manual* (Dieffenbach, C. W. and Dveksler, G. S., eds.), pp. 613–621, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- 29 Gietz, R. D. and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 3065–3073
- 30 Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3–41
- 31 Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139
- 32 Holmgren, A. and Aslund, F. (1995) Glutaredoxin. *Methods Enzymol.* **252**, 283–292
- 33 Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
- 34 Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. and Deléage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 147–150
- 35 Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. L., Chen-Weiner, J., Ram, A. F., Kapteyn, J. C. et al. (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435–450
- 36 Blackwell, J. R. and Horgan, R. (1991) A novel strategy for the production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* **295**, 10–12
- 37 Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257
- 38 Winayanawattikun, P. and Ketterman, A. J. (2005) An electron-sharing network involved in the catalytic mechanism is functionally conserved in different glutathione transferase classes. *J. Biol. Chem.* **280**, 31776–31782
- 39 Martin, J. L. (1995) Thioredoxin – a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245–250
- 40 Ferrari, D. M. and Söling, H. D. (1999) The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* **339**, 1–10
- 41 Flachvad, M., Bellanda, M., Fernandes, A. P., Mammì, S., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A. and Sunnerhagen, M. (2005) Molecular mapping of functionalities in the solution structure of reduced Gtx4, a monothiol glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 24553–24561

- 42 Caccuri, A. M., Antonioni, G., Allocata, N., Di Ilio, C., De Maria, F., Innocenti, F., Parker, M. W., Masulli, M., Lo Bello, M., Turella, P., Federico, G. and Ricci, G. (2002) GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 18777–18784.
- 43 Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weismann, J. S. and O'Shea, E. K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature (London)* **425**, 686–691.
- 44 Fernandes, A. P. and Holmgren, A. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signaling* **6**, 63–74.
- 45 Molina, M. M., Belli, G., de la Torre, M. A., Rodríguez-Manzanogue, M. T. and Herrero, E. (2004) Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* **279**, 51923–51930.
- 46 Bai, M., Zhou, J. M. and Perrett, S. (2004) The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar form. *J. Biol. Chem.* **279**, 50025–50030.

Received 5 January 2006/18 May 2006; accepted 18 May 2006
Published as BJ Immediate Publication 18 May 2006, doi:10.1042/BJ20060034

ARTÍCULO 2

A Peroxisomal Glutathione Transferase of *Saccharomyces cerevisiae* Is Functionally Related to Sulfur Amino Acid Metabolism[∇]

Lina Barreto,¹ Ana Garcerá,¹ Kristina Jansson,² Per Sunnerhagen,² and Enrique Herrero^{1*}

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, 25008 Lleida, Spain,¹ and Department of Cell and Molecular Biology, Lundberg Laboratory, Göteborg University, S-405 30 Göteborg, Sweden²

Received 11 July 2006/Accepted 8 August 2006

Saccharomyces cerevisiae cells contain three omega-class glutathione transferases with glutaredoxin activity (Gto1, Gto2, and Gto3), in addition to two glutathione transferases (Gtt1 and Gtt2) not classifiable into standard classes. Gto1 is located at the peroxisomes, where it is targeted through a PTS1-type sequence, whereas Gto2 and Gto3 are in the cytosol. Among the *GTO* genes, *GTO2* shows the strongest induction of expression by agents such as diamide, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, *tert*-butyl hydroperoxide or cadmium, in a manner that is dependent on transcriptional factors Yap1 and/or Msn2/4. Diamide and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (causing depletion of reduced glutathione) also induce expression of *GTO1* over basal levels. Phenotypic analyses with single and multiple mutants in the *S. cerevisiae* glutathione transferase genes show that, in the absence of Gto1 and the two Gtt proteins, cells display increased sensitivity to cadmium. A *gto1*-null mutant also shows growth defects on oleic acid-based medium, which is indicative of abnormal peroxisomal functions, and altered expression of genes related to sulfur amino acid metabolism. As a consequence, growth of the *gto1* mutant is delayed in growth medium without lysine, serine, or threonine, and the mutant cells have low levels of reduced glutathione. The role of Gto1 at the *S. cerevisiae* peroxisomes could be related to the redox regulation of the Str3 cystathionine β -lyase protein. This protein is also located at the peroxisomes in *S. cerevisiae*, where it is involved in transsulfuration of cysteine into homocysteine, and requires a conserved cysteine residue for its biological activity.

Glutathione transferases (GSTs) conjugate xenobiotics or their metabolites to glutathione (GSH), followed by elimination of the conjugates from the cell through ATPase pumps (2, 34, 64). In addition, GSTs are also important in processes such as protection against oxidative stress, regulation of gene expression, or signal transduction (4, 34, 51, 64, 70). GSTs are divided into classes based on sequence, substrate specificity, or immunological properties. A majority of studies have been done with mammalian cytosolic GSTs, for which the division into classes was initially applied. However, GSTs also exist as membrane-associated (microsomal) forms, as well as in organelles such as mitochondria or peroxisomes (34, 46). Bacteria and eukaryotes such as fungi or parasites also contain GSTs, although these are structurally and immunologically different from mammalian or plant GSTs (17, 47, 64, 75).

Only a few fungal GST and GST-like proteins have been studied to some extent (47). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two proteins with GST activity, the products of the genes *GTT1* and *GTT2* (11). Gtt1 is associated with the endoplasmic reticulum and could be involved in thermotolerance (11). Gtt1 and Gtt2 are functionally related to dithiol glutaredoxins Grx1 and Grx2 in defense against oxidants and other stresses (14). In addition to their thiol transferase activity, Grx1 and Grx2 are active as glutathione peroxidases and have activity against standard GST substrates (14, 15). Purified Gtt1

also displays activity as glutathione peroxidase against organic hydroperoxides (25). Overlapping functions therefore seem to exist between the Gtt1/Gtt2 and the Grx1/Grx2 proteins. *Schizosaccharomyces pombe* has three homologues of Gtt1/Gtt2 (named Gst1, Gst2, and Gst3) also with a function in defense against hydroperoxides (72). A role of *S. cerevisiae* Gtt1 and Gtt2 has been proposed in cadmium stress through the possible formation of Cd-GSH complexes (1). However, a *gtt1 gtt2* mutant is not hypersensitive to Cd (56), raising doubts on the function of the Gtt proteins in Cd detoxification. Intriguingly, the Gtt homologue Ure2, which is devoid of glutathione peroxidase and GST activity, participates in the detoxification of Cd and other heavy metals (56, 57). The relationship between Cd stress and GSH metabolism is nevertheless supported by two facts: (i) expression of the *GSH1* gene (coding for the first enzyme of the GSH biosynthetic route, γ -glutamylcysteine synthetase) is induced by Cd through a mechanism that is dependent on transcriptional regulators that modulate the sulfur amino acid biosynthetic route (19) and (ii) when yeast cells are exposed to Cd most of the assimilated sulfur is redirected to GSH synthesis (23).

Omega class GSTs diverge from other GST classes because they have low or no activity against standard GST substrates, whereas they are active as glutaredoxins/thiol oxidoreductases and dehydroascorbate reductases through a single cysteine residue at the active site (6, 80). Thus, omega GSTs are active as redox regulators of thiol groups, with GSH as a reductant. Omega GSTs or homologues for which enzyme activity has not yet been characterized are widespread in evolutionary divergent organisms from bacteria to mammals (25, 30, 60, 80). *S. cerevisiae* cells contain three omega class GSTs (Gto1, Gto2,

* Corresponding author. Mailing address: Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, 25008 Lleida, Spain. Phone: (34) 973-702409. Fax: (34) 973-702426. E-mail: enric.herrero@cmb.udl.es.

[∇] Published ahead of print on 25 August 2006.

TABLE 1. Strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Comments
W303-1A	<i>MATa ura3-1 ade2-1 leu2,3-112 trp1-1 his3-11,15</i>	Wild type
W303-1B	<i>MATα ura3-1 ade2-1 leu2,3-112 trp1-1 his3-11,15</i>	Wild type
MML535	<i>MATα gto1::natMX4</i>	Deletion of <i>GTO1</i> in W303-1A
MML536	<i>MATα gto1::kanMX4</i>	Deletion of <i>GTO1</i> in W303-1B
MML538	<i>MATα gto2::kanMX4</i>	Deletion of <i>GTO2</i> in W303-1A
MML540	<i>MATα gto2::kanMX4</i>	Deletion of <i>GTO2</i> in W303-1B
MML542	<i>MATα gto3::natMX4</i>	Deletion of <i>GTO3</i> in W303-1A
MML546	<i>MATα gto1::kanMX4</i>	Deletion of <i>GTO1</i> in W303-1B
MML572	<i>MATa [pMM401(<i>GTO2-3HA</i>):<i>URA3</i></i>	Integration of pMM401 in W303-1A
MML587	<i>MATα gto1::kanMX4 gto3::natMX4</i>	From a cross, MML542 × MML546
MML590	<i>MATα gto1::kanMX4 gto2::kanMX4 gto3::natMX4</i>	From a cross, MML540 × MML587
MML628	<i>MATα gtt1::CaURA3</i>	Deletion of <i>GTT1</i> in W303-1A
MML629	<i>MATα gtt2::kanMX4</i>	Deletion of <i>GTT2</i> in W303-1A
MML630	<i>MATα gtt2::natMX4</i>	Deletion of <i>GTT2</i> in W303-1A
MML634	<i>MATα gto1::natMX4 gtt1::CaURA3</i>	From a cross, MML536 × MML628
MML636	<i>MATα gto2::kanMX4 gtt1::CaURA3</i>	From a cross, MML540 × MML628
MML661	<i>MATα gtt1::CaURA3 gtt2::kanMX4</i>	From a cross, MML629 × MML634
MML666	<i>MATα gtt1::CaURA3 gtt2::natMX4</i>	From a cross, MML630 × MML636
MML686	<i>MATα gto1::kanMX4 gto2::kanMX4 gto3::natMX4</i>	From a cross, MML540 × MML587
MML687	<i>MATα gto1::kanMX4 gto2::kanMX4 gtt1::CaURA3 gtt2::natMX4</i>	From a cross, MML590 × MML666
MML716	<i>MATα gto1::kanMX4 gto2::kanMX4 gto3::LEU2 gtt1::CaURA3 gtt2::natMX4</i>	Disruption of <i>GTO3</i> in MML687, using pMM550
MML826	<i>MATa str3::kanMX4</i>	Deletion of <i>STR3</i> in W303-1A
Wmsn2msn4	<i>MATα msn2::HIS3 msn4::TRP1</i>	From F. Estruch; deletion of <i>MSN2</i> and <i>MSN4</i> in W303-1A
Wyap1	<i>MATα yap1::kanMX4</i>	From F. Estruch; deletion of <i>YAP1</i> in W303-1A
BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Wild type
Y03603	<i>MATα pex5::kanMX4</i>	From EUROSCARF ^a ; deletion of <i>PEX5</i> in BY4741
Y04076	<i>MATα pex7::kanMX4</i>	From EUROSCARF ^a ; deletion of <i>PEX7</i> in BY4741

^a EUROSCARF, European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis (University of Frankfurt; <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf>).

and Gto3) with an enzyme activity pattern similar to human omega GSTs hGTO1-1 and hGTO2-2 (25). Studies with purified Gto2 indicate that a single cysteine conserved in other omega GSTs is sufficient for its glutaredoxin activity, therefore indicating that this occurs through a monothiol mechanism of action (25). In the present study we demonstrated that Gto2 and Gto3 are located at the cytosol, whereas Gto1 is peroxisomal. We also analyzed the expression of the three genes in different stress conditions and carried out a phenotypic study of the mutants in relation to mutants lacking the *GTT* genes. These functional analyses point to a role of Gto1 in the metabolism of sulfur amino acids at the peroxisomes and propose a relationship between Gto1 and cystathionine β-lyase activity.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. The *S. cerevisiae* strains used in the present study are described in Table 1. The following rich media were used for cell growth: YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), YPGly (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol), and YPOle (1% yeast extract, 2% peptone, 0.2% oleic acid, 0.02% Tween 40). Defined SC or SD media were also used, with the auxotrophic requirements for each strain (65); glucose at 2% or oleic acid (0.2%) plus Tween 40 (0.02%) was added as a carbon source. Two percent agar was added in solid media. Sulfur-free B medium (in some cases solidified with 1% agarose [10]) was used to analyze growth ability on different sulfur sources. Cultures were incubated at 30°C. Before cells were grown in oleic acid-based medium, they were preincubated in YPD medium (or in SC plus glucose in case of plasmid transformants) to a cell density of 3×10^7 cells/ml and then resuspended at 0.3 to 0.5×10^7 cells/ml in YPOle (or SC plus oleic acid) medium and incubated in these conditions for the indicated times.

Plasmids. Plasmids pMM399 and pMM446 contain C-terminal green fluorescent protein (GFP) fusions to *GTO2* and *GTO3*, respectively, under the control of the *MET25* promoter in the pUG35 vector (from W. H. Hegemann, Institute of Microbiology, Dusseldorf, Germany). The complete *GTO2* and *GTO3* coding

sequences (PCR-amplified) were cloned between the XbaI-EcoRI (for pMM399) or BamHI-ClaI (for pMM446) vector sites. Integrative plasmid pMM401 is a YIplac211 (29) derivative with *GTO2* under its own promoter, tagged at the C end with three hemagglutinin (HA) epitopes in tandem. This plasmid was used to construct strain MML572, after EcoRV-mediated linearization of pMM401, transformation of wild-type cells, and integration at the chromosomal *URA3* site. pMM440 is a centromeric *URA3* plasmid that carries the complete coding sequence of *GTO1* under the control of the *retO₇* promoter from pCM189 (26), with an N-terminal fusion of the coding sequence to the GFP tag. Plasmid pMM736 is based in YCplac211 (29) and contains the *GTO1* gene expressed under its own promoter and TAP tagged at its N terminus; the TAP tag was PCR amplified from plasmid pBS1761 (54). To generate the internal disruption of *GTO3* in strain MML716, plasmid pMM550 was constructed. This plasmid is based on YIplac211 and contains the *GTO3* sequence under its own promoter, C-end tagged with 3-HA and disrupted at the internal XbaI site of *GTO3* with a *LEU2* gene plus promoter cassette amplified from YIplac128 (29). Then, a DNA fragment that contains the *LEU2* marker cassette flanked at both ends by 250 bp of the *GTO3* coding sequence was PCR amplified from pMM550 for disruption of the wild-type *GTO3* gene. Plasmid pMM756 contains the *STR3* open reading frame expressed from the *retO₂* promoter, cloned between the BamHI and NotI sites of pCM188 (26). The following plasmids derive from pMM756 and express point mutant derivatives of *STR3*: pMM758 (Cys353Ser), pMM760 (Cys362Ser), and pMM762 (Cys387Ser).

Genetic methods. Standard protocols were used for DNA manipulations and cell transformations. Point mutants were constructed with the ExSite method (79), using oligonucleotides for PCR amplification that introduced the desired mutation and proximally inserted a restriction enzyme site that did not alter the translation product. Mutations were confirmed by DNA sequencing. Single null mutants were obtained by using the short-flanking homology approach after PCR amplification of the *kanMX4* (76), the *natMX4* (32), or the *CaURA3MX* (31) cassettes. Disruptions were confirmed by PCR analysis. Multiple mutants were obtained by crossing the desired parental mutant strains, followed by diploid sporulation, tetrad analysis, and selection of the desired mutant combinations (65).

Determination of chemical sensitivities. Bioscreen automated analysis of the effect of different inhibitors on yeast cell growth was done with cells cultured in

supplemented SD liquid medium at 30°C, using procedures described previously (78). A range of concentrations were tested beforehand for each chemical to determine the concentration value decreasing the exponential growth rate in wild-type cells by 20%. This value was used in further experiments. The results were scored during 48 h of growth at 30°C at high intensity shaking. The time interval between optical density (600 nm) readings was 20 min.

Microarray analysis. About 3×10^8 wild-type or mutant cells growing exponentially in YPD medium were collected, and total RNA was extracted by using the RiboPure-Yeast RNA purification kit (Ambion). For each array hybridization experiment, labeled cDNA was synthesized from a wild-type or mutant sample (30 μ g of total RNA) by using the CyScribe postlabeling kit in the presence of Cy3-dUTP or Cy5-dUTP (GE Healthcare). Dyes were swapped for wild-type and mutant cells in independent experiments to avoid dye-specific bias. Fluorescence-labeled cDNAs from both strains were combined and hybridized to yeast genomic microarrays. The characteristics of these and the prehybridization, hybridization, and washing conditions have been described elsewhere (74). Hybridized arrays were scanned with an Axon 4100A scanner (Axon Instruments, Inc.), and fluorescence ratio measurements were analyzed by using the GenePix Pro 5.0 software (Axon Instruments, Inc.). The data from three independent experiments in which both strains were labeled in parallel were used to calculate the median of the ratio for each gene. A given gene was considered to be differentially expressed between both strains when the wild-type/mutant ratio was higher than 2.0 or lower than 0.5 in at least two of the three experiments, and the dyes were swapped in the considered experiments.

In silico analysis. A search for promoter regulatory sequences was made at the regulatory sequence analysis tools site (<http://rsat.scmb.uib.ac.be/rsat>) (71). The MITOPROT program (13) was used to predict mitochondrial targeting sequences. Multiple sequence alignments were done with CLUSTAL W (68), using the European Bioinformatics Institute tools (www.ebi.ac.uk).

Miscellaneous methods. Mitochondria were purified and subfractionated (18) from exponential yeast cultures in YPGly medium at a cell concentration of 2×10^7 cells per ml. Western blot analyses were done as described previously (59), with 12CA5 anti-HA MAb antibody (Roche Diagnostics) at a 1:5,000 dilution and anti-lipoic acid antibody at 1:50,000 dilution. In Northern blot studies, electrophoresis of RNA, probe labeling with digoxigenin, hybridization, and signal detection were carried out as previously described (26). Signals were quantified by using the Lumi-Imager equipment (Roche Diagnostics) software. Gene probes were generated from genomic DNA by PCR, using oligonucleotides designed to amplify internal open reading frame regions. Microscopic localization of GFP-labeled proteins in living cells was done by standard techniques (66). Total and reduced glutathione was measured as described previously (41). Cell volumes were determined with a Coulter Z2 particle analyzer.

RESULTS

Gto1 is located at peroxisomes, whereas Gto2 and Gto3 are cytosolic. In order to determine the cellular location of the yeast Gto proteins, we constructed GFP-fused versions of them. Gto1 has a C-terminal sequence compatible with a peroxisomal location. Most peroxisomal proteins are imported into the organelle by one of two alternative pathways, one that recognizes a PTS1 sequence at the protein C terminus and another one that recognizes an internal PTS2 sequence (36, 55). The C-terminal SRL amino acid sequence of Gto1 is one of the possible PTS1 variants in yeast cells (44, 73). To confirm the peroxisomal location of Gto1 microscopically, the GFP tag was added at the N terminus of the protein, and this was expressed under the control of the doxycycline-regulatable *tet* promoter. For Gto2 and Gto3 the tag was added at the C terminus and the construct expressed from the *MET25* promoter. Gto1 showed a punctate distribution in cells grown on oleic acid, which was not observed in glucose-grown cells (Fig. 1A). This pattern is characteristic of peroxisomal proteins (21). To confirm it, we studied the microscopic pattern of Gto1 in a $\Delta pex5$ mutant (deficient in PTS1-mediated import) and a $\Delta pex7$ mutant (deficient in PTS2-mediated import) (21, 73). The punctate location of Gto1 in oleic acid-grown cells was lost

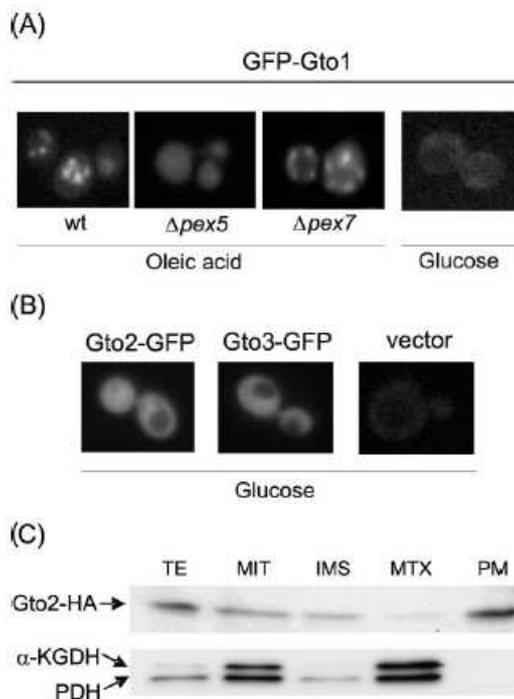


FIG. 1. Cellular localization of the Gto proteins. (A and B) Wild-type BY4741 cells or the respective $\Delta pex5$ (strain Y03603) and $\Delta pex7$ (strain Y04076) mutants transformed with the empty vector pUG35 or with the plasmids carrying the GFP-tagged *GTO* constructions (pMM440, pMM399, and pMM446, respectively, for *GTO1*, *GTO2*, and *GTO3*) were grown in oleic acid (YPOle) medium for 16 h at 30°C or in glucose (YPD) medium in exponential conditions and then observed by fluorescence microscopy. (C) MM572 cells (carrying a chromosomally integrated version of *GTO2-3HA*) were grown in YPD medium until late exponential phase and then diluted 1:100 in YPGly medium and cultured at 30°C until a concentration of 2.5×10^7 cells/ml before cellular fractionation was achieved. The resulting fractions were analyzed by Western blotting, using anti-HA antibodies to detect Gto2 and anti-lipoic acid antibodies to detect the mitochondrial markers pyruvate dehydrogenase (PDH) and α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH). Six micrograms of protein were loaded in each lane for total cell extracts (TE) and postmitochondrial supernatant (PM) fractions, and 3 μ g was loaded for the mitochondrial (MIT), intermembrane space (IMS), and matrix (MTX) fractions.

in the $\Delta pex5$ mutant, but not in $\Delta pex7$ cells (Fig. 1A). This therefore supported a PTS1-mediated import pathway for Gto1. The punctate pattern was still observed when gene expression was reduced by adding intermediate doxycycline concentrations (50 to 100 ng/ml) to the growth medium (not shown). These observations confirm previous studies based on in silico detection of yeast peroxisomal proteins (28) and also the experimental detection in a high-throughput screen of Gto1 in peroxisomes (82).

We analyzed whether Gto homologues in other fungi also carried PTS1 motifs at their C termini. None of the Gto homologues in *Kluyveromyces lactis* (Swiss-Prot accession number

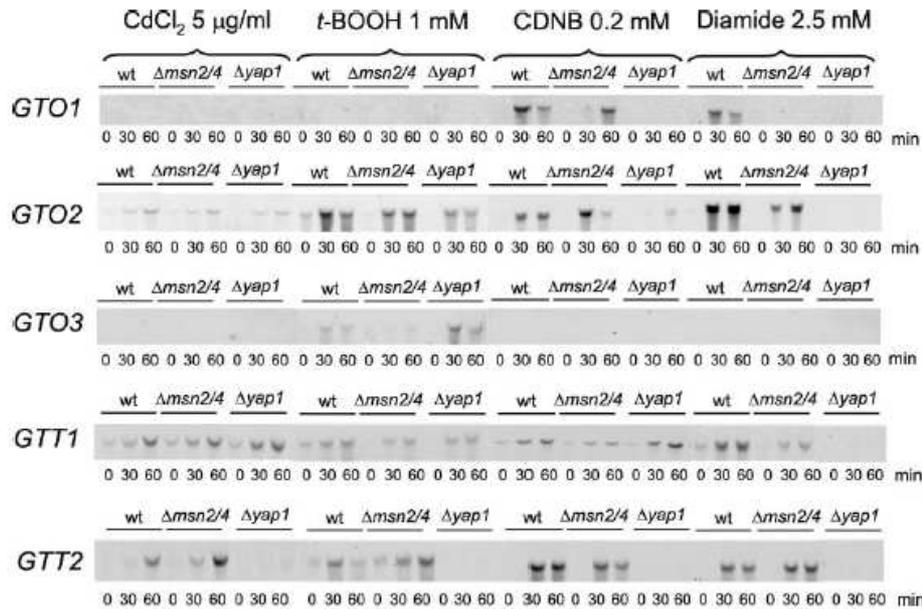


FIG. 2. Northern blot analysis of the expression of the *GTO1*, *GTO2*, *GTO3*, *GTT1*, and *GTT2* genes after addition of different agents. Cells from a wild-type (W303-1A) or the respective isogenic $\Delta yap1$ (W_{yap1}) or $\Delta msn2 msn4$ (W_{msn2msn4}) strains were grown exponentially at 30°C in YPD medium, except in the cadmium experiments, in which cells were grown in SC medium. When cultures reached a concentration of 1.5×10^7 cells per ml, the agent was added at the indicated concentration (time zero), and samples were obtained at the indicated times for expression analysis. A total of 25 µg of total RNA was tested run per lane.

Q6CKB2), *Torulopsis glabrata* (Q6FTJ1), *Candida albicans* (Q5A953), *Yarrowia lipolytica* (Q6CDX7), *Debaryomyces hansenii* (Q6BTR1 and Q6BTR2), *Cryptococcus neoformans* (Q55K61 and Q55K65), *Schizosaccharomyces pombe* (O94524), *Neurospora crassa* (Q7RWR2), and *Aspergillus nidulans* (Q5BBA6 and Q5B0U9) contained PTS1 motifs. Only *Saccharomyces paradoxus* open reading frame c287_8925 (*Saccharomyces* Genome Database, <http://db.yeastgenome.org/fungi>), which displays a very strong homology with Gto1, has a PKL sequence at C terminus that is compatible with a PTS1 motif (44). None of these proteins contained N-terminal putative PTS2 sequences. Although we cannot totally discard the possibility that other motifs different from PTS1 or PTS2 could direct some of the Gto1 homologues to peroxisomes, our analyses strongly suggest that a peroxisomal location is specific for *S. cerevisiae* Gto1 and homologues from closely related yeast species.

Gto2 and Gto3 showed a homogeneous cytosolic distribution with different carbon sources (see Fig. 1B for glucose-grown cells). In silico analysis predicted a mitochondrial location for Gto2. To clarify this apparent contradiction, subfractionation studies were made with glycerol-grown cells carrying a C-terminal HA-tagged version of Gto2 expressed under its own promoter. Most of the Gto2 protein associated with the postmitochondrial supernatant (Fig. 1C), confirming the microscopic studies. A minor fraction appeared associated with the mitochondrial intermembrane space (Fig. 1C). This was ca. 3% of the total cell Gto2 protein, taking into consideration the cell protein equivalents in each of the fractions run in Fig. 1C. We con-

clude that the three Gto proteins constitute a family, one of whose members is peroxisomal, whereas the other two are located mostly if not totally in the cytosol.

GTO gene expression responds to oxidant conditions. *S. cerevisiae* cells respond to oxidative stress caused by external agents by altering the expression of a large number of genes (27). A specific oxidative stress response is mediated by the Yap1 transcription factor, which recognizes and activates the YRE promoter element (TT/GACTAA) (35, 69). Gene induction by oxidants can also be part of the general stress response that is mediated by the Msn2 and Msn4 transcription factors recognizing promoter STRE elements (CCCCCT) (22). Sequence analysis of the *GTO* promoters revealed the presence of an YRE site at position -170 in the *GTO1* promoter and at position -179 in the *GTO2* promoter; no canonical YRE sites exist in the *GTO3* promoter. All three *GTO* genes contain STRE sites in their promoters, at positions -241 in *GTO1*, -144 and -117 in *GTO2*, and at positions -701 and -330 in *GTO3*. This pointed to the possibility that *GTO* gene expression was induced in oxidative conditions. We therefore studied such expression (and its dependence on the Yap1 and Msn2/4 factors) in response to the oxidants *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) and diamide, the latter specifically causing the oxidation of sulfhydryl groups. The study was extended to the standard GST substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and also to cadmium. It has been proposed (14) that CDNB causes oxidative stress in yeast cells by deriving the GSH molecules into GSH-CDNB complexes due to the cellular GST

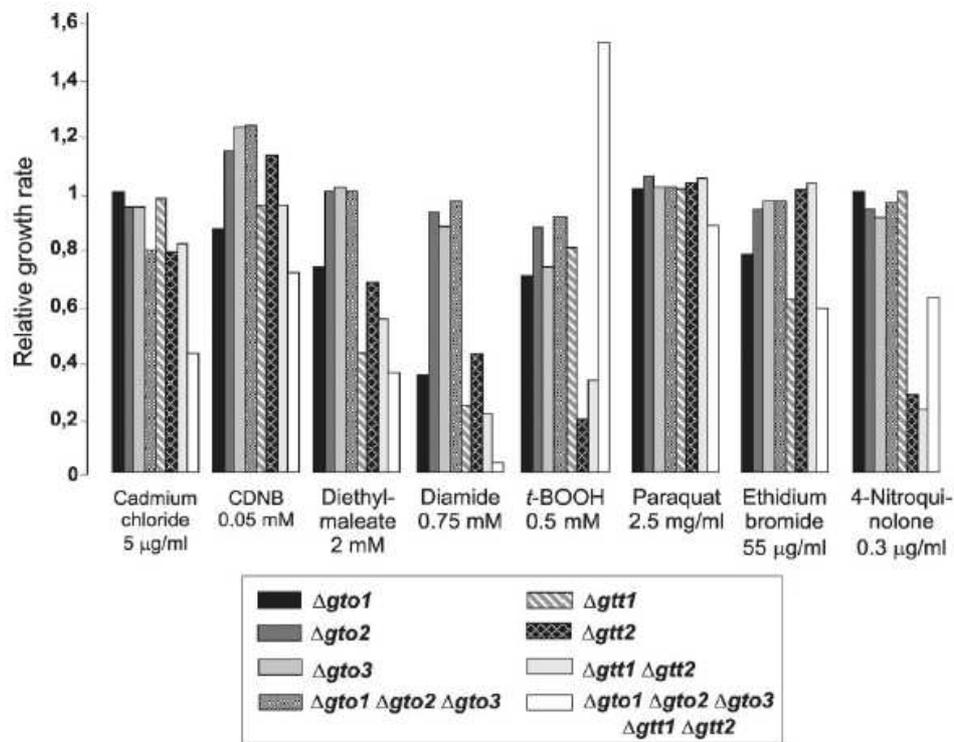


FIG. 3. Effect of different chemical agents on growth rate of *S. cerevisiae* wild-type cells (W303-1A) and *gtt* and *gto* mutant derivatives. The following mutant strains were studied: MML535 ($\Delta gto1$), MML538 ($\Delta gto2$), MML542 ($\Delta gto3$), MML686 ($\Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3$), MML628 ($\Delta gtt1$), MML629 ($\Delta gtt2$), MML661 ($\Delta gtt1 \Delta gtt2$), and MML716 ($\Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3 \Delta gtt1 \Delta gtt2$). Conditions for growth were as described previously (80), and the respective agents were used at the indicated concentrations. Growth was recorded by measuring the optical density (600 nm) at 20-min intervals. Bars represent the ratios between the exponential growth rates of treated and untreated mutant cultures, and the values were normalized by dividing them by the corresponding ratio of the wild-type strain. The values of two independent experiments were averaged.

activity. Cd causes cell toxicity, at least in part, by provoking oxidative stress and lipid peroxidation (3, 9). Expression of the other two GST genes, *GTT1* and *GTT2*, was studied in parallel, since their promoters contain YRE elements (at -165 in *GTT1* and -98 in *GTT2*) and, in addition, the *GTT1* promoter has three STRE sites at positions -241 , -211 , and -114 .

The basal expression of the three *GTO* genes in glucose-grown cells was almost under detection levels by Northern analysis (Fig. 2), although the corresponding HA-tagged *Gto* proteins expressed under their own promoters produced a significant signal in Western analyses (results not shown). Transcriptional response to the tested oxidants showed a complex pattern (Fig. 2). Among the three *GTO* genes, *GTO2* displayed the more intense response, since the four tested agents caused induction of transcript levels. This was abolished in a $\Delta yap1$ mutant in the case of diamide and CDNB and partially diminished in the case of *t*-BOOH and Cd. *Msn2/4* seemed to play a more limited role in *GTO2* induction by the four agents, although transcript levels and/or the duration of the response were lower in the $\Delta msn2 \Delta msn4$ double mutant than in wild-type cells. The fact that the induction of *GTO2*

transcription by Cd or *t*-BOOH was not totally eliminated in $\Delta yap1$ or $\Delta msn2 \Delta msn4$ mutants points to the participation of other factors, such as *Skp1* (69). Only diamide and CDNB increased *GTO1* expression over basal levels, the induction being dependent on *Yap1* and *Msn2/4*. *GTO3* expression was upregulated only by *t*-BOOH in an *Msn2/4*-dependent manner (Fig. 2). In summary, the dependence of *GTO* induction on the transcriptional activators *Yap1* and *Msn2/4* correlated with the presence of the respective binding sites at the promoters.

GTT1 was moderately induced by the four agents. Although its promoter contains putative STRE and YRE sites, only in the case of diamide was a dependence on *Yap1* observed (Fig. 2). This leaves open the possible participation of other transcriptional factors in such activation. *GTT2* expression was also induced by the four tested agents, the induction in all cases being dependent on *Yap1* but not on *Msn2/4* (Fig. 2). This is in accordance with the presence of YRE sites and the absence of STRE elements in the *GTT2* promoter.

Mutants in *S. cerevisiae* genes coding for GSTs display several phenotypic defects. Induction of *GTO* and *GTT* gene expression by agents that cause oxidative stress pointed to the

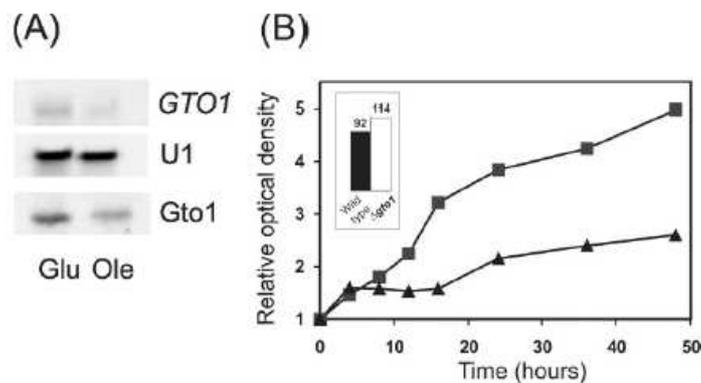


FIG. 4. (A) Expression of *GTO1* in glucose- and oleic acid-grown cells. Wild-type W303-1A cells transformed with pMM736 (expressing *GTO1* under its own promoter with a N-terminal TAP tag-expressing sequence) were pregrown in SC medium plus glucose at 30°C to about 4×10^7 cells/ml and then were diluted 10 times, and half of the culture was maintained in SC plus glucose, whereas the other half was shifted to SC plus oleic acid medium. Samples were obtained after 16 h at 30°C for Northern (upper two panels, U1 mRNA as a loading control) or Western (lower panel, 20 μ g of total cell protein per lane) blot analysis. (B) The growth of wild-type W303-1A cells (■) and Δ *gto1* mutant cells (strain MML535 [▲]) in YPOle medium at 30°C was recorded. Cells were pregrown in YPD medium to about 3×10^7 cells/ml and diluted 10 times in YPOle medium (time zero). The optical density (600 nm) was measured at the indicated times and made relative to the unit value at time zero for the respective strain. The inset box shows the doubling times (in minutes) of the wild-type and mutant strains during exponential growth in YPD medium at 30°C.

importance of yeast GSTs in protection against oxidants. To confirm this, we carried out a high-resolution quantitative phenotypic analysis (78) using single and multiple *gto* and *gtt* mutants exposed to oxidants and other toxic agents (Fig. 3). Absence of one of the *GTT* genes or both together caused hypersensitivity to oxidants (diethylmaleate, diamide, *t*-BOOH) and, in the case of *GTT2*, also to the DNA-damaging agent 4-nitroquinolone. The results are in accordance with the proposed antioxidant role of Gtt1/Gtt2 (14) and suggest that Gtt2 activity is required to detoxify 4-nitroquinolone in yeast cells. Among the three *GTO* genes, the absence of *GTO1* caused significant sensitivity to diamide and more modest sensitivity to diethylmaleate and *t*-BOOH compared to wild-type cells (Fig. 3). In addition, a *gto1 gto2 gto3* mutant that also lacked the two *GTT* genes was hypersensitive to Cd. This pointed to some additive effect between Gto and Gtt functions in Cd detoxifi-

cation. Surprisingly, the quintuple mutant was hyper-resistant to *t*-BOOH compared to any of the other mutant strains tested and also to wild-type cells (Fig. 3). The lack of the three Gto proteins also ameliorated the hypersensitivity of the *gtt2* and *gtt1 gtt2* mutants to 4-nitroquinolone.

Nonautomated measurements over a wider range of Cd concentrations confirmed the previous observations (not shown). Since the quintuple mutant *gtt1 gtt2 gto1 gto2 gto3* mutant did not display increased sensitivity to Cd over the quadruple mutant carrying the wild-type *GTO3* gene, this indicated that the latter was not important in protection against Cd effects. We then determined the sensitivity of double *gtt1 gtt2* mutants that additionally carried a single null mutation in each of the *GTO* genes. Only the absence of *GTO1* in a *gtt1 gtt2* background caused hypersensitivity to levels proximal to the quintuple mutant (not shown). That is, the Gto1 function, but not that of the

TABLE 2. Genes upregulated or downregulated (at least twofold) in the Δ *gto1* mutant relative to the wild-type strain^a

Gene	Function	Δ <i>gto1</i> /wild-type ratio	Presence (+) or absence (-) of:	
			Met4/Met28/Cbf1 element	Met4/Met31/Met32 element
<i>CHAI</i>	Serine/threonine dehydratase	3.74	-	-
<i>CIT2</i>	Citrate synthase (peroxisomal)	2.21	-	+
<i>AVO2</i>	Unknown	2.15	-	-
<i>MET16</i>	3'-Phospho-5'-adenylylsulfate kinase	0.499	+	-
<i>SAM3</i>	S-Adenosyl-l-methionine permease	0.493	-	+
<i>MUP1</i>	High-affinity methionine permease	0.472	-	+
<i>MET5</i>	Sulfite reductase	0.471	+	-
<i>MET17</i>	Homocysteine synthase	0.450	+	+
<i>SER3</i>	3-Phosphoglycerate dehydrogenase	0.372	-	+
<i>MET14</i>	5'-Adenylylsulfate kinase	0.320	+	-
<i>GAP1</i>	General amino acid permease	0.186	-	+

^a DNA microarray analyses were carried out after RNA extraction from exponentially growing cultures in YPD medium at 30°C. The presence or absence of promoter elements recognized by the Met4/Met28/Cbf1 (core sequence TCACGTG) and Met4/Met30/Met31 (core sequence CTGTGG) in the respective gene promoters is indicated. See also Fig. 5.

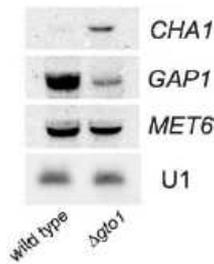


FIG. 5. Northern blot analysis of the expression of the indicated genes in $\Delta gto1$ and wild-type cells. Samples were obtained under the conditions described in Table 2. The small nuclear U1 RNA served as a loading control (25 μ g of total RNA per lane).

other two Gto proteins, protects *S. cerevisiae* cells against Cd toxicity in cooperation with the Gtt1/Gtt2 functions.

S. cerevisiae cells lacking *GTO1* are defective for growth on oleic acid medium. The *GTO1* promoter lacks oleate response elements that are responsible for the induction of expression of many peroxisomal genes in *S. cerevisiae* cells growing on oleic acid (28). In accordance with this, *GTO1* expression was not

induced when cells were shifted from glucose-based medium to oleic acid-based medium (Fig. 4). The relative levels of Gto1 protein were even lower in oleic acid than in glucose medium (Fig. 4A). However, the growth of *gto1* mutant cells was compromised when transferred from glucose medium to oleic acid medium compared to wild-type cells (Fig. 4). This contrasts with the situation when wild-type or mutant cells are exponentially growing in glucose-based rich medium without further additions, where differences in growth rates are minor (Fig. 4B, inset). Therefore, some Gto1 function is required for peroxisome-dependent growth of yeast cells using oleic acid as an energy source.

A *gto1* mutant is affected in the metabolism of sulfur amino acids. The results on Cd sensitivity indicated that the Gto1 protein plays some role not only when cells grow on oleic acid-based medium but also during fermentative growth on glucose. To address the role of Gto1 in these conditions, we used DNA microarrays to analyze the transcriptome of a $\Delta gto1$ mutant growing exponentially in YPD medium. Only a few significant (at least twofold) differences were observed in gene expression relative to wild-type cells (Table 2). Northern analysis of an upregulated (*CHA1*) and a downregulated gene (*GAP1*) confirmed the DNA microarray results for these genes (Fig. 5). A control gene (*MET6*) involved in the same meta-

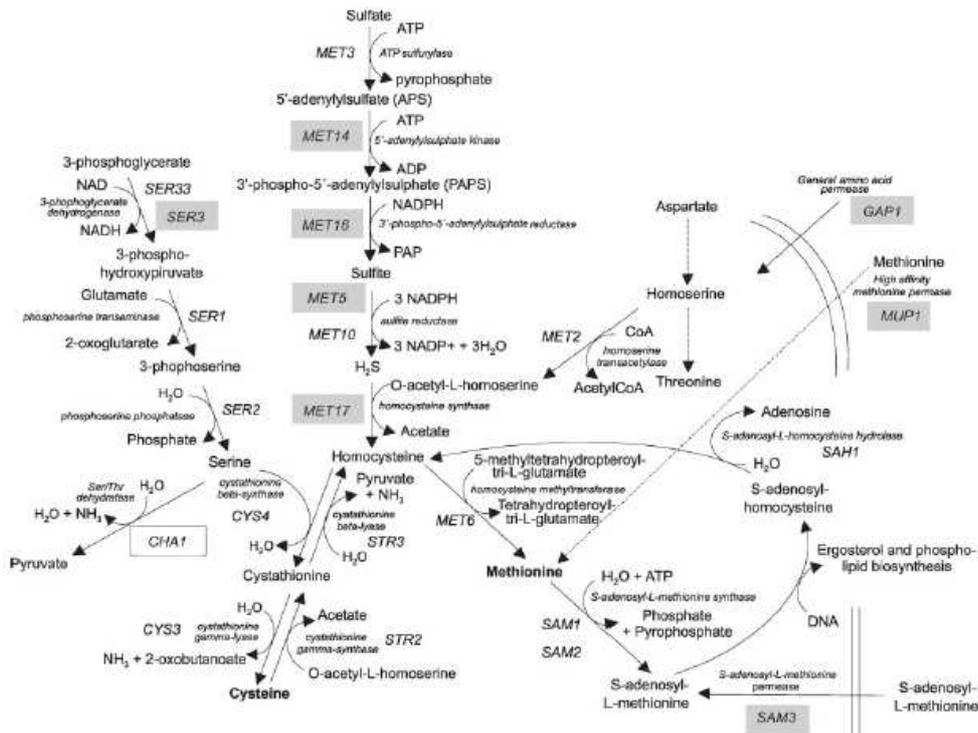


FIG. 6. Biochemical steps involved in the sulfur assimilation and biosynthesis of cysteine and methionine in *S. cerevisiae* and genes coding for the respective proteins. Genes boxed in white and gray correspond to upregulated and downregulated genes, respectively, in the $\Delta gto1$ mutant.

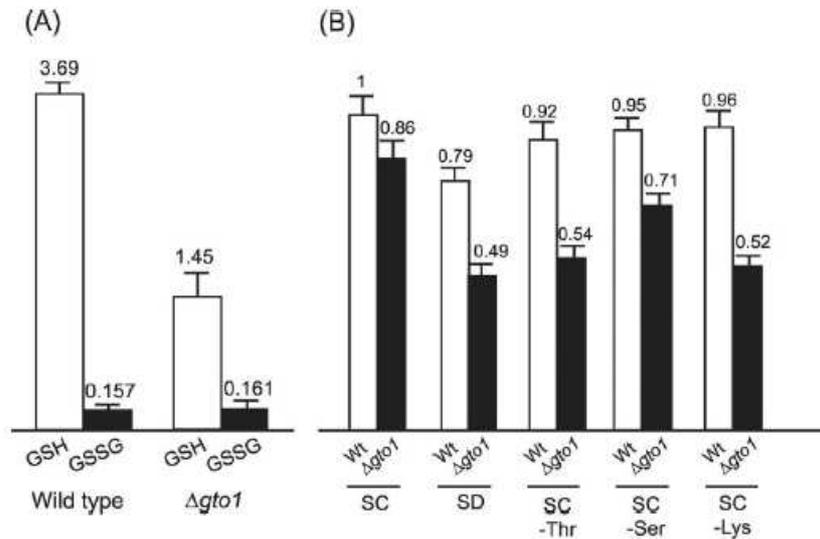


FIG. 7. The absence of *GTO1* causes an imbalance in the synthesis of reduced glutathione and a number of amino acids. (A) Intracellular millimolar concentrations of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione in wild-type (W303-1A) and $\Delta gto1$ (MML535) cells. Absolute levels of both glutathione forms were determined in exponentially growing cells in YPD medium at 30°C. The intracellular glutathione concentration was calculated after the cell volumes were measured. Values are the means of three independent experiments (the standard deviation is indicated). (B) Growth rate of exponentially growing cultures at 30°C of wild-type (W303-1A [□]) and $\Delta gto1$ (MML535 [■]) cells in SC and SD medium and in SC medium without the individual amino acids indicated. Values were determined relative to wild-type cells in SC medium, which have a growth rate of 0.62 doublings per h.

bolic process as *CHAI* and *GAPI* (see below) and which did not show significant differences in the DNA microarray experiments also did not display significant differences in the Northern analysis (Fig. 5).

Most of the genes whose expression was altered in the mutant are involved in the metabolism of sulfur amino acids (Fig. 6) (67). Thus, upregulated *CHAI* participates in removing L-serine as a precursor of cysteine by converting the former to pyruvate. In contrast, downregulated *SER3* is required for the conversion of 3-phosphoglycerate to L-serine. Four of the downregulated genes (*MET14*, *MET16*, *METS*, and *MET17*) participate in the sulfate assimilation pathway leading to homocysteine, which is the last common intermediate for the synthesis of cysteine and methionine. Finally, *GAPI*, *SAM3*, and *MUP1* are amino acid transporters, the latter two being specifically involved in the uptake of sulfur amino acids. Altogether, this pointed to a relationship between *Gto1* and the sulfur amino acids biosynthetic pathway, and it could be hypothesized that the intracellular levels of sulfur amino acids would be reduced in the *gto1* mutant (Fig. 6). L-Cysteine is one of the three amino acids of the GSH molecule, and modification of intracellular cysteine concentration influences the GSH pool in the *S. cerevisiae* cell (19, 23). We therefore measured the levels of oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione in wild-type and $\Delta gto1$ cells. The mutant had significantly reduced levels of GSH, whereas the GSSH pool was not affected (Fig. 7A).

A $\Delta gto1$ mutant shows defective growth in SD minimal medium supplemented with the auxotrophic requirements com-

pared to wild-type cells (Fig. 7B). Such a defect is not observed in SC defined medium supplemented with the 20 amino acids. In order to determine the amino acid deficiencies that provoked the slow growth rate of the mutant, growth in SC medium separately depleted of each of the amino acids was tested. The absence of serine caused a moderate growth defect in the mutant, whereas the absence of threonine or lysine caused a larger defect that was similar to that observed in SD medium (Fig. 7B). Therefore, the $\Delta gto1$ mutant has an imbalance in the biosynthesis of these three amino acids. The absence of cysteine or methionine in the growth medium did not lead to slow growth (not shown).

Transulfuration requires a peroxisomal function in *S. cerevisiae*. The relationship between *Gto1* and the metabolism of sulfur amino acids suggested a role of the peroxisome in this metabolic pathway. In fact, the *S. cerevisiae* enzyme cystathionine β -lyase (the product of the *STR3* gene) contains a PTS1 sequence at the C end and has been experimentally detected at the peroxisome (61, 82). Other enzymes of the sulfur amino acid biosynthetic pathway do not display PTS motifs nor have been detected at the peroxisome. *Str3* participates in the transulfuration pathway from cysteine to homocysteine (67), a process that occurs in bacteria, fungi, and plants but not in animals (37), by converting the intermediate cystathionine into homocysteine. In the absence of *Str3* yeast cells are unable to grow on cysteine or cystathionine as the sole sulfur source (33). We reasoned that *Gto1* could regulate the activity of *Str3* through its redox modulator properties. *Str3* has 10 cysteine residues and 3 of them (located at the C-terminal half of the molecule,

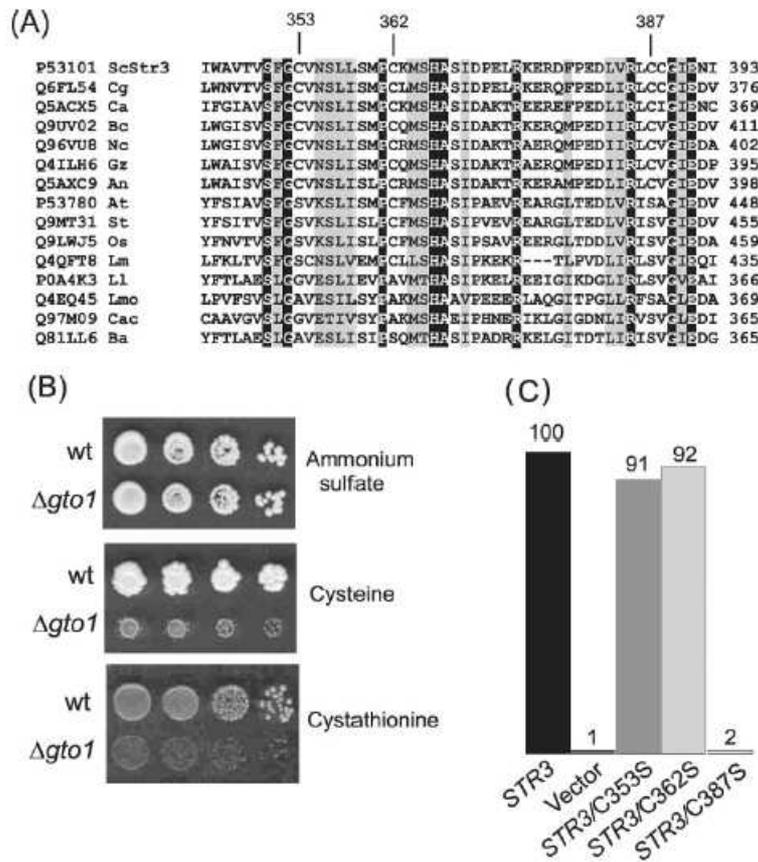


FIG. 8. Functional relationship between Gto1 and Str3 cystathionine β -lyase. (A) CLUSTAL W multiple alignment of a region of cystathionine β -lyase molecules from diverse organisms that included three conserved cysteine residues (position marked for the residues in *S. cerevisiae* Str3). The abbreviations for the organisms were as follows: Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Cg, *Candida glabrata*; Ca, *Candida albicans*; Bc, *Botrytis cinerea*; Nc, *Neurospora crassa*; Gz, *Gibberella zeae*; An, *Aspergillus nidulans*; At, *Arabidopsis thaliana*; St, *Solanum tuberosum*; Os, *Oryza sativa*; Lm, *Leishmania major*; LI, *Lactococcus lactis*; Lmo, *Listeria monocytogenes*; Cac, *Clostridium acetobutylicum*; Ba, *Bacillus anthracis*. (B) Growth of wild-type (W303-1A) and $\Delta gto1$ (MML535) cells on plates containing medium B, with glucose and ammonium sulfate, cysteine, or cystathionine as the sulfur source, after 3 days (for ammonium sulfate and cysteine) or 5 days (for cystathionine) at 30°C. (C) Mutant *str3* cells (strain MML826) transformed with plasmid pMM756 (carrying wild-type *STR3* gene), pCM188 (void vector), pMM758 (*STR3* with the C353S mutation), pMM760 (*STR3* with the C362S mutation), or pMM762 (*STR3* with the C387S mutation) were grown exponentially in SC medium, centrifuged and resuspended in B medium with cysteine at a concentration of 3×10^6 cells/ml. Cultures were incubated at 30°C and growth (optical density at 600 nm) was recorded 24 h later. Values are expressed relative to the *str3* mutant transformed with the plasmid with wild-type *STR3*.

at positions 353, 362, and 387) are conserved in other fungal cystathionine β -lyase molecules (Fig. 8A), which points to their functional importance. To test the hypothesis that Str3 is functionally defective in the absence of Gto1, we studied the ability of a $\Delta gto1$ mutant to grow on cysteine or cystathionine as the sole sulfur source. In fact, compared to wild-type cells, the mutant shows growth deficiency on cysteine or cystathionine, with the deficiency being more intense in the latter (Fig. 8B). Cysteine at high concentrations is toxic to yeast cells (42). However, increasing the cysteine concentration up to tenfold over the standard concentration in medium B did not cause higher toxicity in the $\Delta gto1$ mutant than in wild-type cells (data

not shown). Therefore, the growth deficiency in the mutant cannot be attributed to increased toxicity of cysteine (and probably cystathionine) on the mutant but to a defect in conversion of cysteine or cystathionine into homocysteine.

The three-dimensional structure of cystathionine β -lyase from *Arabidopsis thaliana* has been determined, and no cysteine residue is present at the enzyme binding site (7). However, the thiol-blocking inhibitor *N*-ethylmaleimide inhibits the enzyme activity, which points to the importance of some cysteine residues in the molecule (58), maybe for maintaining the functional tertiary structure. To test the importance of the three conserved cysteine residues in *S. cerevisiae* Str3, we sep-

arately mutated these residues and reintroduced the mutated Str3 versions in an $\Delta str3$ mutant (Fig. 8C). Wild-type Str3 and the C353S and C362S versions restored the ability of $str3$ cells to grow on cysteine as the sole sulfur source. In contrast, the Str3(C387S) protein was not functional. Therefore, the Str3 Cys387 residue seems to be essential for cystathione β -lyase function, which supports the importance of redox regulation in the enzyme.

DISCUSSION

A large number of *S. cerevisiae* genes are grouped in families whose products share significant sequence homology. Gene (or protein) families may reflect an evolutionary relationship among their members, although these do not necessarily have overlapping biological functions. Thus, differential compartmentalization may play an important role in functional divergence among family members sharing an enzyme activity, as is the case for the three *S. cerevisiae* monothiol glutaredoxins Grx3/Grx4 (nuclear) and Grx5 (mitochondrial) (49, 59). The three Gto proteins here described are another example of *S. cerevisiae* proteins that share enzymatic properties as GSTs with glutaredoxin activity (25), although they are located at different compartments and probably carry out different biological functions. The fact that to different extents all three GTO genes are induced by agents causing oxidative stress probably points to a function in the defense against oxidant conditions for the proteins. However, only the function of Gto1 has been approached in the present study.

The peroxisomal location of Gto1 is relevant, since among the large GST superfamily only two mammalian peroxisomal enzymes had been described to date: a kappa class GST in human cells (50) and a microsomal-type GST in rat liver cells (40). Among the *S. cerevisiae* Gto1 homologues in other fungi, only those from hemiascomycetous yeasts closely related to *S. cerevisiae* (20) are predicted to be peroxisomal as well. This may reflect the functional versatility of peroxisomes along evolution and the fact that only a core of functions is shared between *S. cerevisiae* peroxisomes and those of other eukaryotes (24, 38, 77). The presence of a GST at the peroxisome implies that GSH must be present at the organelle as the substrate of the enzyme. Little is known about partitioning of the GSH pool inside the yeast cell compartments and how the cell regulates subcellular concentrations of GSH (53). However, GSH has been detected in the peroxisomes of methylotrophic yeast *Candida boidinii* (39). Glutathione peroxidases have been described in mammalian peroxisomes (62) and glutathione reductases and glutathione peroxidases in plant peroxisomes (12, 16). Therefore, mechanisms must exist in eukaryotic cells to transport GSH into peroxisomes to act as the substrate for a diversity of antioxidant enzymes.

The present study indicates that Gto1 probably has a specific role in *S. cerevisiae* peroxisomes related to the metabolism of sulfur amino acids. Besides the involvement in the β -oxidation of fatty acids (38), yeast peroxisomes participate in other cellular functions, such as lysine biosynthesis. In fact, Lys1 and Lys4 enzymes have been detected in *S. cerevisiae* peroxisomes (45) and probably Lys12 is also peroxisomal (8), whereas other enzymes of the pathway are cytosolic. Yeast cells negatively affected in peroxisome biogenesis upregulate lysine biosynthe-

sis genes, although peroxisome-deficient *S. cerevisiae* cells are still able to synthesize lysine, probably through alternative reactions (8). The cystathionine β -lyase Str3 is a second example of a peroxisomal *S. cerevisiae* enzyme involved in amino acid metabolism, in this case in the transsulfuration pathway from cysteine to homocysteine (Fig. 6). This is the only enzyme in the entire metabolic pathway that has been detected at the peroxisomes (45) and contains a PTS1 sequence at the C-terminus (28). Therefore, at least two cell compartments seem to participate in the metabolism and interconversion of sulfur amino acids in *S. cerevisiae*, implying the need for transport of intermediates into and out of peroxisomes. The reason for the organelle compartmentalization of a specific reaction of the pathway might be related to the toxicity of strong reductant intermediates such as cystathionine. Only hemiascomycetous yeasts evolutionary close to *S. cerevisiae* (such as *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata*, and *Ashbya gossypii*) have a cystathionine β -lyase protein with a C-terminal PTS1 sequence. Therefore, as occurs with lysine biosynthesis, the participation of *S. cerevisiae* peroxisomes in cysteine transsulfuration seems to be a recent specialization of some hemiascomycetous yeasts.

The peroxisomal location of the Gto1 GST could parallel that of Str3, and it could have occurred after the whole genome duplication in a hemiascomycete ancestor of *S. cerevisiae* (81) would have allowed functional specialization of the resulting paralogues through differential compartmentalization of the respective products. Gto1 acts as a glutaredoxin that would regulate the redox state of target cysteine residues through its deglutathionylating activity (25). Cys387 in *S. cerevisiae* Str3 could be such a target. In fact, this residue is conserved in fungal cystathionine β -lyase molecules, and here we have shown it to be essential for the transsulfuration pathway. Peroxisomes are a source of reactive oxygen species that create an oxidizing environment inside the organelle (16, 62). In these conditions, essential cysteine residues would be oxidized (for instance, through reversible glutathionylation) leading to transient protein inactivation. Gto1 could restore the activity of Str3 (and maybe of other peroxisomal targets) through its redox regulation role. Consistent with this, the absence of Gto1 causes growth defects with cysteine or cystathionine as the only sulfur sources and depleted levels of intracellular GSH. The hypersensitivity of a triple *gtt1 gtt2 gto1* mutant to Cd would result from the combination of reduced GSH levels (this tripeptide is required for Cd detoxification in *S. cerevisiae* by forming Cd-GSH complexes [45, 63]) and the absence of functional Gtt proteins with GSH-conjugating activity. In addition, the imbalance of the metabolic fluxes in the sulfur amino acid metabolic pathway in the $\Delta gto1$ mutant indirectly causes alterations in the biosynthesis of serine and threonine. In fact, the serine/threonine dehydratase activity of Cha1 besides converting serine into pyruvate (Fig. 6) also converts threonine into 2-oxobutanoate (52). It is therefore to be expected that overexpression of CHA1 reduces the intracellular pools of both amino acids and makes the cell partially dependent on their external supply. The observed deficiency of the $\Delta gto1$ mutant for lysine biosynthesis could be a consequence of altered peroxisomal functioning in the mutant (maybe because of the accumulation of reactive oxygen species in the organelle) and the role of this organelle in lysine biosynthesis in *S. cerevisiae* (8).

The present study shows how the defect in a peroxisomal

GST/glutaredoxin function causes a number of phenotypes, probably as a consequence of the alteration in the sulfur amino acid metabolic pathway. The expression of most genes of this pathway is regulated by *S*-adenosylmethionine through the Met4 transcription factor (10, 67). Recently, it has been shown that *S*-adenosylmethionine has to be converted into cysteine for the ubiquitylation-dependent regulation of Met4 activity (48), confirming previous suggestions (33). Met4 participates in two different complexes (together with Met28/Cbf1 or Met31/Met32) for recognition of two respective promoter elements located in *MET* and other genes (5, 43). The genes downregulated in the *Δgto1* mutant contain one or both elements (Table 2). The list includes *SER3*, *GAPI*, *SAM3*, and *MUP1*, which do not directly mediate the conversion of sulfur into cysteine and methionine (Fig. 6) and contain elements putatively recognized by the Met4/Met31/Met32 complex. However, the downregulation of genes observed in the *Δgto1* mutant probably is not a consequence of increased cysteine levels, since this would be difficult to reconcile with the observed low levels of GSH in the mutant. Some other metabolite accumulating in the mutant (such as cystathionine) could be the effector of the transcriptional changes. The hypersensitivity of the *Δgto1* mutant to oxidants could be a consequence of the reduced GSH levels. However, a complex relationship must exist between Gto and Gtt proteins and other hypothetical related functions, for instance with respect to the increased resistance of the mutant lacking all Gto and Gtt proteins to hydroperoxides and 4-nitroquinolone. A partially similar situation has been reported for *S. pombe*, where single or multiple *gst* mutants are hyper-resistant to diamide compared to wild-type cells (72). The induction of other uncharacterized systems protecting against compound toxicity in these conditions could explain these observations. Alternatively, in the case of 4-nitroquinolone the Gto proteins could convert the Gtt2-mediated GSH conjugate to a more toxic derivative. More studies are needed in order to further elucidate the relationship between the peroxisomal regulatory functions mediated by Gto1, sulfur amino acid metabolism, and defense against oxidative stress.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (BFU2004-03167) and the Generalitat de Catalunya (2005SGR00677) to E.H. and from the Swedish Research Council for Science and Technology (2003-3189) to P.S. A.G. was recipient of a postdoctoral grant from the Generalitat de Valencia.

The technical support from Lidia Piedrafitra is acknowledged.

REFERENCES

- Adams, P. D. B., D. S. Gomes, M. L. C. C. Pinto, A. D. Panek, and E. C. A. Eleuterio. 2004. The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol. Lett.* 154:81–88.
- Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10:2–18.
- Avery, S. V. 2001. Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 49:111–142.
- Awasthi, Y. C., G. A. S. Ansari, and S. Awasthi. 2005. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione *S*-transferases. *Methods Enzymol.* 401:379–407.
- Blaiseau, P. L., and D. Thomas. 1998. Multiple transcriptional activation complexes tether the yeast activator Met4 to DNA. *EMBO J.* 17:6327–6336.
- Board, P. G., M. Coggan, G. Chelvanagayam, S. Easteal, L. S. Jermiin, G. K. Schulte, D. E. Danley, L. R. Hoth, M. C. Griffor, A. V. Kamath, M. H. Rosner, B. A. Chrunyk, D. E. Perregaux, C. A. Gabel, K. F. Geoghegan, and J. Pandit. 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275:248–24806.
- Breitinger, U., T. Clausen, S. Ehlert, R. Huber, B. Laber, F. Schmidt, E. Pohl, and A. Messerschmidt. 2001. The three-dimensional structure of cystathionine β -lyase from *Arabidopsis* and its substrate specificity. *Plant Physiol.* 126:631–642.
- Breitling, R., O. Sharif, M. L. Hartman, and S. K. Krisans. 2002. Loss of compartmentalization causes misregulation of lysine biosynthesis in peroxisome-deficient yeast cells. *Eukaryot. Cell* 1:978–986.
- Brennan, R. J., and R. H. Schiestl. 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res.* 356:171–178.
- Cherest, H., and Y. Surdin-Kerjan. 1992. Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* 130:51–58.
- Choi, J. H., W. Lou, and A. Vancura. 1998. A novel membrane-bound glutathione *S*-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273:29915–29922.
- Churin, Y., S. Schilling, and H. Börner. 1999. A gene encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Lett.* 459:33–38.
- Claros, M. G., and P. Vincens. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241:770–786.
- Collinson, E. J., and C. M. Grant. 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione *S*-transferases. *J. Biol. Chem.* 278:22492–22497.
- Collinson, E. J., G. L. Wheeler, E. Ocon-Garrido, A. M. Avery, S. V. Avery, and C. M. Grant. 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* 277:16712–16717.
- Del Rio, L. A., F. J. Corpas, L. M. Sandalio, J. M. Palma, and J. B. Barroso. 2003. Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism, and nitric oxide. *IUBMB Life* 55:71–81.
- Deponte, M., and K. Becker. 2005. Glutathione *S*-transferase from malarial parasites: structural and functional aspects. *Methods Enzymol.* 401:241–253.
- Diekert, K. A. I. P. M. de Kroon, G. Kispal, G., and R. Lill. 2001. Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol.* 68:37–51.
- Dormer, U. H., J. Westwater, N. F. McLaren, N. A. Kent, J. Mellor, and D. J. Jamieson. 2000. Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *J. Biol. Chem.* 275:32611–32616.
- Dujon, B. 2005. Hemiascomycetous yeasts at the forefront of comparative genomics. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 15:1–7.
- Erdmann, R., and S. J. Gould. 2002. Visualization and purification of yeast peroxisomes. *Methods Enzymol.* 351:365–381.
- Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:469–486.
- Fauchon, M., G. Lagniel, J. C. Ande, L. Lombardina, P. Soularue, C. Petat, G. Marguerie, A. Sentenac, M. Werner, and J. Labarre. 2002. Sulfur sparging in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol. Cell* 9:713–723.
- Gabaldon, T., B. Snel, F. Zimmerer, W. Hemrika, H. Tabak, and M. A. Huynen. 2006. Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biol. Direct.* 1:8.
- Garcerá, A., L. Barreto, L. Piedrafitra, J. Tamarit, and E. Herrero. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega-class glutathione transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem. J.* 398:187–196.
- Gari, E., L. Piedrafitra, M. Aldea, and E. Herrero. 1997. A set of vectors with the tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:837–848.
- Gasch, A. P. 2003. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses, p. 11–70. *In* S. Hohman and P. W. H. Mager (ed.), *Topics in current genetics: yeast stress responses*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Geraghty, M. T., D. Bassett, J. C. Morrell, G. J. Gatto, Jr., J. Bai, B. V. Geisbrecht, P. Hieter, and S. J. Gould. 1999. Detecting patterns of protein distribution and gene expression in silico. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2937–2942.
- Gietz, R. D., and A. Sugino. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74:305–307.
- Girardini, J., A. Amirante, K. Zenzoumi, and E. Serra. 2002. Characterization of an omega-class glutathione *S*-transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities. *Eur. J. Biochem.* 269:5512–5521.
- Goldstein, A. L., X. Pan, and J. H. McCusker. 1999. Heterologous *URA3MYX* cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:507–511.
- Goldstein, A. L., and J. H. McCusker. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:1541–1553.
- Hansen, J., and P. F. Johannessen. 2000. Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 263:535–542.
- Hayes, J. D., J. U. Flanagan, and I. R. Jowsey. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45:51–88.

35. He, X. J., and J. S. Fassier. 2005. Identification of novel Yap1p and Ska7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 58:1454–1467.
36. Heiland, I., and R. Erdmann. 2005. Biogenesis of peroxisomes: topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* 272:2362–2372.
37. Hesse, H., and R. Hoefgen. 2003. Molecular aspects of methionine biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 8:259–262.
38. Hiltunen, J. K., A. M. Mursula, H. Rottensteiner, R. K. Wierenga, A. J. Kastaniotis, and A. Gurtitz. 2003. The biochemistry of peroxisomal β -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:35–64.
39. Horiguchi, H., H. Yurimoto, N. Kato, and Y. Sakai. 2001. Antioxidant system within yeast peroxisome: biochemical and physiological characterization of CbPmp20 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J. Biol. Chem.* 276:14279–14288.
40. Islinger, M., G. H. Lüters, H. Zischka, M. Ueffing, and A. Vöhl. 2006. Insights into the membrane proteome of rat liver peroxisomes: microsomal glutathione-S-transferase is shared by both subcellular compartments. *Proteomics* 6:804–816.
41. Jakubowski, W., T. Bilinski, and G. Bartosz. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* 28:659–664.
42. Kumar, A., L. John, M. M. Alam, A. Gupta, G. Sharma, B. Pillai, and S. Sengupta. 2006. Homocysteine- and cysteine-mediated growth defect is not associated with induction of oxidative stress response genes in yeast. *Biochem. J.* 396:61–69.
43. Kuras, L., R. Barbey, and D. Thomas. 1997. Assembly of a bZIP-bHLH transcription activation complex: formation of the yeast Cbf1-Met4-Met28 complex is regulated through Met28 stimulation of Cbf1 DNA binding. *EMBO J.* 16:2441–2451.
44. Lametschwandner, G., C. Brocard, M. Fransen, P. van Veldhoven, J. Berger, and A. Hartig. 1998. The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J. Biol. Chem.* 273:33635–33643.
45. Li, Z., Y. Lu, R. Zhen, M. Szczyrka, D. Thiele, and P. A. Rea. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionate)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:42–47.
46. Mannervik, B., P. G. Board, J. D. Hayes, I. Listowsky, and W. R. Pearson. 2005. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401:1–8.
47. McGoldrick, S., S. M. O'Sullivan, and D. Sheehan. 2005. Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol. Lett.* 242:1–12.
48. Menant, A., P. Baudouin-Cornu, C. Peyraud, M. Tyers, and D. Thomas. 2006. Determinants of the ubiquitin-mediated degradation of the Met4 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 281:11744–11754.
49. Molina, M. M., G. Belli, M. A. de la Torre, M. T. Rodriguez-Manzanique, and E. Herrero. 2004. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 279:1923–1930.
50. Morel, F., C. Ranch, E. Petit, A. Pilon, N. Theret, B. Coles, and A. Guillouzo. 2004. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* 279:16246–16253.
51. Oakley, A. J. 2005. Glutathione transferases: new functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:716–723.
52. Petersen, J. G., M. C. Kiehlbrandt, T. Nilsson-Tillgren, C. Bornaes, and S. Holmberg. 1988. Molecular genetics of serine and threonine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 119:527–534.
53. Pécsi, L., R. A. Prade, and M. J. Penninckx. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 49:1–76.
54. Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm, and B. Seraphin. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24:218–229.
55. Purdue, P. E., and P. B. Lazarow. 2001. Peroxisome biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:701–752.
56. Rai, R., and T. G. Cooper. 2005. In vivo specificity of Ure2 protection from heavy metal ion and oxidative cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22:343–358.
57. Rai, R., J. J. Tate, and T. G. Cooper. 2003. Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from heavy metal ion and oxidant toxicity. *J. Biol. Chem.* 278:12826–12833.
58. Ravanel, S., D. Job, and R. Douce. 1996. Purification and properties of cystathionine β -lyase from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 320:383–392.
59. Rodriguez-Manzanique, M. T., J. Tamarit, J. G. Belli, J. Ros, and E. Herrero. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the maturation of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* 13:1109–1121.
60. Rouimi, P., P. Anglade, A. Benzekri, P. Costet, L. Debrauner, T. Pineau, and J. Tulliez. 2001. Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem. J.* 358:257–262.
61. Schafer, H., K. Nau, A. Sickmann, R. Erdmann, and H. E. Meyer. 2001. Identification of peroxisomal membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Electrophoresis* 22:2955–2968.
62. Schrader, M., and H. D. Fahimi. 2004. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* 122:383–393.
63. Sharma, K. G., D. L. Mason, G. Liu, P. A. Res, A. K. Bachhawat, and S. Michaelis. 2002. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot. Cell* 1:391–400.
64. Sheehan, D., G. Meade, V. M. Foley, and C. A. Dowd. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360:1–16.
65. Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350:3–41.
66. Tatchell, K., and L. C. Robinson. 2002. Use of green fluorescent protein in living yeast cells. *Methods Enzymol.* 351:661–683.
67. Thomas, D., and Y. Surdin-Kerjan. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:503–532.
68. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
69. Toleriano, M. B., A. Delaunay, B. Biteau, D. Spector, and D. Azevedo. 2003. Oxidative stress responses in yeast, p. 241–303. *In* S. Hohman and P. W. H. Mager (ed.), *Topics in current genetics: yeast stress responses*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
70. Townsend, D. M., V. L. Findlay, and K. D. Tew. 2005. Glutathione S-transferases as regulators of kinase pathways and anticancer drug targets. *Methods Enzymol.* 401:287–307.
71. Van Helden, J. 2003. Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 31:3593–3596.
72. Veal, E. A., W. M. Toone, N. Jones, and B. A. Morgan. 2002. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schistosoma cerevisiae pombe*. *J. Biol. Chem.* 277:35523–35531.
73. Veenhuis, M., F. A. Salomons, and I. J. Van der Klei. 2000. Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: a structure/function analysis. *Microsc. Res. Technol.* 51:584–600.
74. Viladevall, L., R. Serrano, A. Ruiz, G. Domenech, J. Giraldo, A. Barceló, and J. Arino. 2004. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279:43614–43624.
75. Vuilleumier, S. 1997. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J. Bacteriol.* 179:1431–1441.
76. Wach, A., A. Brachat, R. Pöhlmann, and P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:1793–1808.
77. Wanders, R. J. A., and H. R. Waterman. 2006. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* 75:295–332.
78. Warringer, J., and A. Blomberg. 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20:53–67.
79. Weiner, M. P., and L. Costa. 1995. Rapid PCR site-directed mutagenesis, p. 613–621. *In* C. W. Dieffenbach and G. S. Dvorkin (ed.), *PCR primer: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
80. Whitbread, A. K., A. Masoumi, N. Tetlow, E. Schmeck, M. Coggan, and P. G. Board. 2005. Characterization of the Omega-class of glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401:78–99.
81. Wong, S., G. Butler, and K. H. Wolfe. 2002. Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:708–713.
82. Yi, E. C., M. Marelli, H. Lee, S. O. Purvine, R. Aebersold, J. D. Aitchison, and D. R. Goodlett. 2002. Approaching complete peroxisome characterization by gas-phase fractionation. *Electrophoresis* 23:3205–3216.