

UNIVERSITAT DE LLEIDA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES



**LAS GLUTAREDOXINAS MONOTIÓLICAS COMO
REGULADORAS REDOX DE PROTEÍNAS:
ESTUDIOS FUNCIONALES Y EVOLUTIVOS EN
*Saccharomyces cerevisiae***

Memoria para optar al Grado de Doctora por
la Universitat de Lleida presentada por
MARIA MICAELA MOLINA NAVARRO

Lleida, octubre de 2005

El Director de la Tesis

Dr. Enrique Herrero Perpiñán

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Parecía que este momento no iba a llegar nunca y ya está a punto de acabar...

Han sido cinco años de mi vida transcurridos en Lleida que han dado de sí muchísimo, resultando ser muy fructíferos tanto a nivel personal como profesional. Y por ello, qué menos que escribir este capítulo de la tesis que para muchos es referencia obligada (y espero que no la única) de lectura.

En primer lugar, querría agradecer a Mariela aquel día en que me informó en Valencia de la existencia de la posibilidad de investigar y ver qué era un laboratorio aún no habiendo acabado la carrera. Por supuesto, agradecerle a Lucas el haberme acogido en su laboratorio y la oportunidad que me brindó de realizar mis pequeños pinitos en científicos. Sabéis que a los dos os considero las personas que me bautizaron en ciencia.

De ahí todo derivó a la realización de una tesis doctoral en Lleida. Así que agradecer a Enrique Herrero, mi director de tesis, su acogida en esta universidad y su ayuda y consejo durante todo este tiempo para que día a día, pudiese ir avanzando en el terreno científico. Te considero un gran científico, y tu orden e ideas claras hacia un objetivo concreto son en mí un ejemplo a seguir.

Agradecer a mis compañeras de laboratorio esos buenos ratos durante tantas horas y horas de trabajo juntas codo con codo. A Maite, gracias por tu ayuda y amistad en aquella época en que coincidimos en el laboratorio, y gracias también en estos momentos aunque estemos lejos. A Vanessa, por ser una de mis primeras amistades al llegar a Lleida. A Lina, por nuestras grandes conversaciones filosóficas nocturnas entre cientos de matraces. A Ana, por sus consejos y nuestros anhelados viajes algunos fines de semana hacia la millor terreta del món. A Lidia, por ser la mejor de las brujas, por su inestimable ayuda y por sus consejos. Y en general, a todos los que han compartido poyata durante tanto tiempo conmigo.

Cómo no, gracias a las otras dos predoctorales de otros laboratorios, compañeras de fatigas, Gema y Judit, por vuestra amistad, apoyo, grandes cenas y escapadas a Madrid. Gracias por teñir de colores alegres todo el tiempo que hemos compartido juntas realizando nuestras respectivas tesis. Gracias también a Olga, por ofrecerme un hueco en su casa cuando llegué a Lleida, por su amistad y por sus enseñanzas culinarias.

Y gracias al resto de miembros del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques por la ayuda ofrecida en temas laborales y burocráticos.

Gracias a José Enrique, por su ayuda prestada durante mi estancia en Valencia. A Pepe por su humor y sus consejos radioactivos, y a todo el grupo por esas charlas entre desayunos y comidas.

Gracias a mis amigos de Lleida, por vuestra comprensión y amistad, por tantos buenos ratos que hemos compartido y por todo lo que hemos aprendido juntos. En especial gracias a Raquel, David y Almudena.

Por otro lado, agradecer a mis amigos alicantinos y valencianos los ánimos y esa fuerza que ofrecéis casi sin daros cuenta. A Virtu por tu amistad incondicional. A Guadalupe, Amparo, Cristina, Javi Mari, M^a Carmen, Sonia, Maite, Judit, Natalia, Rosana, por nuestros buenos aunque escasos encuentros multitudinarios. A Lorena y Marga por su amistad y el alojamiento ofrecido durante mi estancia en Valencia. A Sonia G. por sus ánimos constantes.

Finalmente, gracias a toda mi familia por su apoyo desde la distancia a toda empresa que me propongo realizar, y a ésta en particular. Sobre todo a mis padres, que han sido el pilar en aquellos días en que las cosas iban menos bien. Gracias al resto de la familia, por la confianza depositada en mí y porque sé que siempre estáis ahí. A mi hermano y mi cuñada por escucharme, a mi abuela por su comprensión y sus deliciosas cocas, y a mis tíos y primos por su confianza y amistad. Y en especial a Enric, por su apoyo en lo que quiera hacer, su ayuda y su paciencia.

RESUMEN

Las glutaredoxinas son tiol oxidoreductasas que regulan el estado redox de los grupos sulfidrilo de las proteínas. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Grx1 y Grx2 son glutaredoxinas ditiólicas localizadas en el citosol, mientras que Grx3, Grx4 y Grx5 son monotiólicas. Grx5 se localiza en la matriz mitocondrial y está involucrada en la síntesis de centros hierro/azufre (Fe/S). En su ausencia, enzimas con centros Fe/S como la aconitasa son inactivas, no hay crecimiento en condiciones respiratorias, hay acumulación de hierro intracelular y se produce una oxidación constitutiva de proteínas. Mientras que Grx5 contiene un dominio glutaredoxina simple, Grx3 y Grx4 poseen un dominio tipo tioredoxina fusionado al dominio glutaredoxina. Estas dos últimas proteínas se localizan en el núcleo, siendo el dominio tioredoxina necesario para tal localización. Se ha utilizado el mutante nulo $\Delta grx5$ como modelo de células que manifiestan un estrés oxidativo endógeno constitutivo (opuesto a las situaciones de estrés provocadas por un estímulo externo) para estudiar el transcriptoma celular en dichas condiciones. Se ha observado que: (i) se inducen principalmente genes del regulón Aft1 involucrados en la captación y utilización de hierro, y (ii) se reprime la expresión de genes implicados en el metabolismo respiratorio dependientes del regulador Hap4. Este último efecto es suprimido por la sobreexpresión de *HAP4*, de modo que la inhibición del metabolismo respiratorio durante condiciones moderadamente oxidantes podría constituir una respuesta protectora por parte de las células de la levadura. Utilizando una construcción capaz de internalizar proteínas en la mitocondria gracias a la señal de localización mitocondrial de Grx5, se ha demostrado que las glutaredoxinas ditiólicas de *S. cerevisiae* no son capaces de rescatar los defectos de un mutante $\Delta grx5$, en tanto que las monotiólicas Grx3 y Grx4 sí lo hacen cuando son dirigidas a la matriz mitocondrial. Ello demuestra que las glutaredoxinas ditiólicas son funcionalmente divergentes de las monotiólicas, pero que estas últimas pueden intercambiar entre ellas sus actividades biológicas cuando se sobrepasan las barreras compartimentales. La conservación funcional entre glutaredoxinas monotiólicas se extiende a lo largo de toda la escala evolutiva, dado que los defectos del mutante $\Delta grx5$ de *S. cerevisiae* son también suprimidos por otras proteínas de la misma familia como son Grx4 de *Escherichia coli*, GrxC de *Synechocystis* sp. y las respectivas proteínas homólogas de pollo y de células humanas.

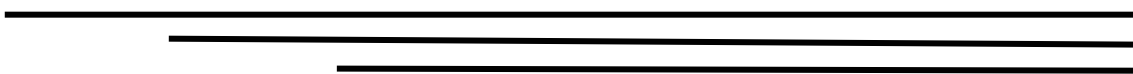
RESUM

Les glutaredoxines són tiol oxidoreductases que regulen l'estat redox dels grups sulfidril de les proteïnes. Al llevat *Saccharomyces cerevisiae* Grx1 i Grx2 són glutaredoxines ditiòliques localitzades al citosol, mentre que Grx3, Grx4 i Grx5 són monotiòliques. Grx5 es localitza a la matriu mitocondrial i participa en la síntesi de centres ferro/sofre (Fe/S). Quan és absent, enzims amb centres Fe/S com l'aconitasa són inactives, no hi ha creixement en condicions respiratòries, hi ha acumulació de ferro intracel·lular i es produeix una oxidació constitutiva de proteïnes. Grx5 conté un domini tioredoxina simple. En canvi, Grx3 i Grx4 posseeixen un domini de tipus tioredoxina unit al domini glutaredoxina. Aquestes darreres dues proteïnes es localitzen al nucli, éssent el domini tioredoxina necessari per aquesta localització. S'ha utilitzat el mutant nul $\Delta grx5$ com model de cèl·lules que manifesten un estrés oxidatiu endògen constitutiu (oposat a les situacions on l'estrés és provocat per un estímul extern) per tal d'estudiar el transcriptoma cel·lular en les esmentades condicions. Així, s'ha observat que: (i) s'indueixen principalment gens del reguló Aft1 involucrats en la captació i utilització de ferro, i (ii) es reprimeix l'expressió de gens implicats en el metabolisme respiratori depenents del regulador Hap4. Aquest darrer efecte és suprimit per la sobreexpressió de *HAP4*, de manera que la inhibició del metabolisme respiratori en condicions moderadament oxidants podria constituir una resposta protectora per part de les cèl·lules del llevat. Utilitzant una construcció capaç d'internalitzar proteïnes a la mitocondria mitjançant la senyal de localització mitocondrial de Grx5, s'ha demostrat que les glutaredoxines ditiòliques de *S. cerevisiae* no poden rescatar els defectes d'un mutant $\Delta grx5$, mentre que les monotiòliques Grx3 i Grx4 sí que ho fan quan són adreçades a la matriu mitocondrial. Això demostra que les glutaredoxines ditiòliques són funcionalment divergents de les monotiòliques, però que aquestes darreres poden intercanviar les seues activitats biològiques entre elles quan s'eliminen les barreres dels compartiments cel·lulars. La conservació funcional entre glutaredoxines monotiòliques s'extén al llarg de l'escala evolutiva, ja que els defectes del mutant $\Delta grx5$ de *S. cerevisiae* són també suprimit per altres proteïnes de la mateixa família com són Grx4 de *Escherichia coli*, GrxC de *Synechocystis sp.* i les respectives proteïnes homòlogues de pollastre i de cèl·lules humanes.

SUMMARY

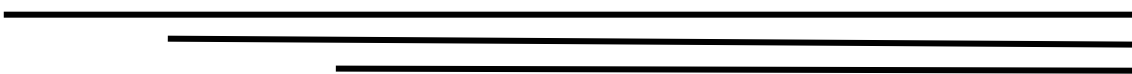
Monothiol glutaredoxins are thiol oxidoreductases that regulate the redox state of sulfhydryl groups in proteins. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Grx1 and Grx2 are dithiol glutaredoxins located at the cytosol, while Grx3, Grx4 and Grx5 are monothiol ones. Grx5 is located at the mitochondrial matrix and is involved in the synthesis of iron/sulfur (Fe/S) centers. In its absence, enzymes with Fe/S centers such as aconitase are inactive, there is no growth in respiratory conditions, iron is accumulated inside the cells and a constitutive oxidation of proteins occurs. While Grx5 contains a single glutaredoxin domain, Grx3 and Grx4 have a thioredoxin type domain fused to the glutaredoxin domain. These two proteins are located at the nucleus, the thioredoxin domain being necessary for such location. The null $\Delta grx5$ mutant has been used as a model for cells that display constitutive endogenous oxidative stress (as opposed to situations where the stress is caused by external stimulus), in order to study the cell transcriptome in such conditions. Thus, it has been observed that: (i) there is a general induction of the Aft1 regulon genes involved in iron uptake and utilization, and (ii) there is a repression of genes required for respiratory metabolism that depend on the Hap4 regulator. This latter effect is suppressed by the overexpression of *HAP4*. It is proposed that inhibition of respiratory metabolism during moderately oxidative conditions would constitute a protective response by the yeast cells. By using a genetic construction that is able to internalize proteins into the mitochondria by means of the mitochondrial targeting sequence of Grx5, it has been demonstrated that the *S. cerevisiae* monothiol glutaredoxins are unable to rescue the defects of a $\Delta grx5$ mutant, while the monothiol ones Grx3 and Grx4 rescue such defects when internalized into the mitochondrial matrix. This fact demonstrates that dithiol glutaredoxins are functionally divergent from monothiol ones, but these latter can interchange their biological activities when the compartment barriers are surpassed. Functional conservation among monothiol glutaredoxins extends along the evolutive scale, since the defects of the $\Delta grx5$ mutant of *S. cerevisiae* are also suppressed by other proteins of the same family such as Grx4 of *Escherichia coli*, GrxC of *Synechocystis* sp. and the respective homologues of chicken and human cells.

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. ESTRÉS OXIDATIVO	3
1.1. DEFINICIÓN Y EFECTOS GENERALES SOBRE LAS CÉLULAS	3
1.2. ORIGEN Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS ROS	4
1.2.1. Origen y reactividad de las ROS	4
1.2.2. Efectos sobre las macromoléculas celulares	7
1.3. MECANISMOS DETOXIFICADORES DE ROS EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.3.1. Antioxidantes no enzimáticos	10
1.3.1.1. Glutación	10
1.3.1.2. Poliaminas	10
1.3.1.3. Ácido eritroascórbico	10
1.3.1.4. Antioxidantes solubles en lípidos	11
1.3.2. Antioxidantes enzimáticos	11
1.3.2.1. Componentes de la cadena de transporte mitocondrial	12
1.3.2.2. Flavohemoglobina	13
1.3.2.3. Metalotioneínas	13
1.3.2.4. Catalasa	14
1.3.2.5. Superóxido dismutasa	14
1.3.2.6. Peroxiredoxinas	16
1.3.2.7. Glutación peroxidasas	17
1.3.2.8. Sulfiredoxina	18
1.3.2.9. Metionina sulfóxido reductasa	19
1.3.2.10. Tioredoxinas	19
1.3.2.11. Glutaredoxinas	22
1.3.2.12. Relación entre tioredoxinas y glutaredoxinas	25
1.3.2.13. Glutación transferasas	27
1.4. FACTORES TRANSCRIPCIONALES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
1.4.1. Yap1 y sus homólogos	27
1.4.2. Skn7	30
1.4.3. Msn2/Msn4	32
2. CENTROS Fe/S	34
2.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	34
2.2. BIOSÍNTESIS DE CENTROS Fe/S EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2.3. HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
OBJETIVOS	47
ARTÍCULO 1	51
ARTÍCULO 2	63
ARTÍCULO 3	73
DISCUSIÓN	93
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	109

INTRODUCCIÓN



1. ESTRÉS OXIDATIVO

1.1. DEFINICIÓN Y EFECTOS GENERALES SOBRE LAS CÉLULAS

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por *reactive oxygen species*) es un proceso natural, inevitable y constante. Todas las células, independientemente del tipo, están permanentemente produciendo estas moléculas con electrones desapareados. El daño que los radicales libres provoquen en los diferentes tejidos dependerá del balance entre las ROS y las defensas antioxidantes de que disponen las células. El estrés oxidativo ocurre cuando se pierde el equilibrio entre la producción de radicales libres y la producción y/o acción de los antioxidantes.

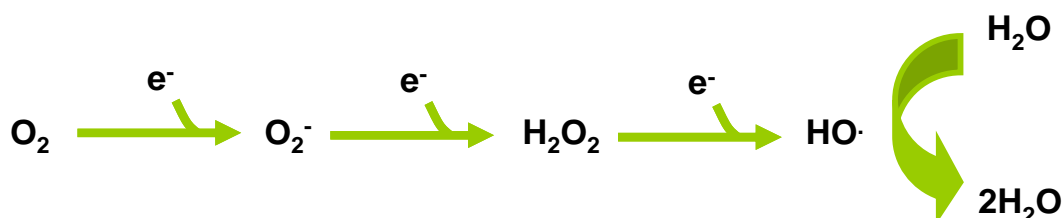
El estrés oxidativo se define como un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir, una situación en la que existe un aumento en la velocidad de generación de ROS y/o una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en situación de equilibrio, de ROS. En esta situación de estrés oxidativo se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres al reaccionar químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos, DNA y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, lleva a la muerte celular.

Numerosas enfermedades han sido vinculadas al estrés oxidativo (Enns, 2003). En la actualidad se tienen evidencias de que el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes está asociado a la fisiopatología de entre otras enfermedades, aterosclerosis, cáncer, porfirias, cataratas, sobrecarga de hierro y cobre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, diabetes, malaria, artritis, enfermedades autoinmunes e inflamaciones crónicas. Así mismo, el proceso biológico del envejecimiento se acelera en relación directa con la magnitud del estrés oxidativo.

1.2. ORIGEN Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS ROS

1.2.1. ORIGEN Y REACTIVIDAD DE LAS ROS

Los radicales libres más abundantes en las células son los derivados del oxígeno. Las ROS se generan como consecuencia del metabolismo aeróbico de las células a través de diferentes reacciones. Está bien descrito que la membrana interna de la mitocondria es la principal fuente de radicales libres derivados del oxígeno dentro de las células (Brand *et al.*, 2004). Los propios electrones de la cadena respiratoria pueden convertir el oxígeno a agua a través de la formación de los intermediarios ión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($HO\cdot$) por reducción parcial del oxígeno molecular, tal y como se puede apreciar en el esquema siguiente:



En sí, el radical superóxido (O_2^-) no es el más tóxico pero su importancia radica en que es la fuente mayoritaria de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno no es un radical libre pero sí un agente oxidante y, además, a partir de él se genera el radical más tóxico: el radical hidroxilo ($HO\cdot$). Entre un 1 y un 5% de estas ROS se pueden escapar de la cadena de transporte de electrones y dañar componentes celulares como DNA, proteínas y lípidos (Kelly *et al.*, 1998).

Otras ROS presentes en la célula y generadas como consecuencia de las anteriores o durante otros procesos son: el oxígeno singlete (1O_2) generado en ausencia de oxígeno o bien en sistemas fotosintéticos (Briviba *et al.*, 1997), el radical peroxilo ($ROO\cdot$), el óxido nítrico ($NO\cdot$), el peróxido nítrico ($ONOO^-$) precursor de otros potentes oxidantes que reciben el nombre de especies reactivas del nitrógeno, y el ácido hipocloroso ($HOCl$) (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La Figura 1 muestra la cadena de transporte electrónico de la mitocondria de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La ubisemiquinona es

un componente importante de la NADH deshidrogenasa y el complejo citocromo bc1; por ello a nivel de estos complejos enzimáticos es donde se genera ión superóxido, sobre todo a nivel de la NADH deshidrogenasa (Dröge, 2002).

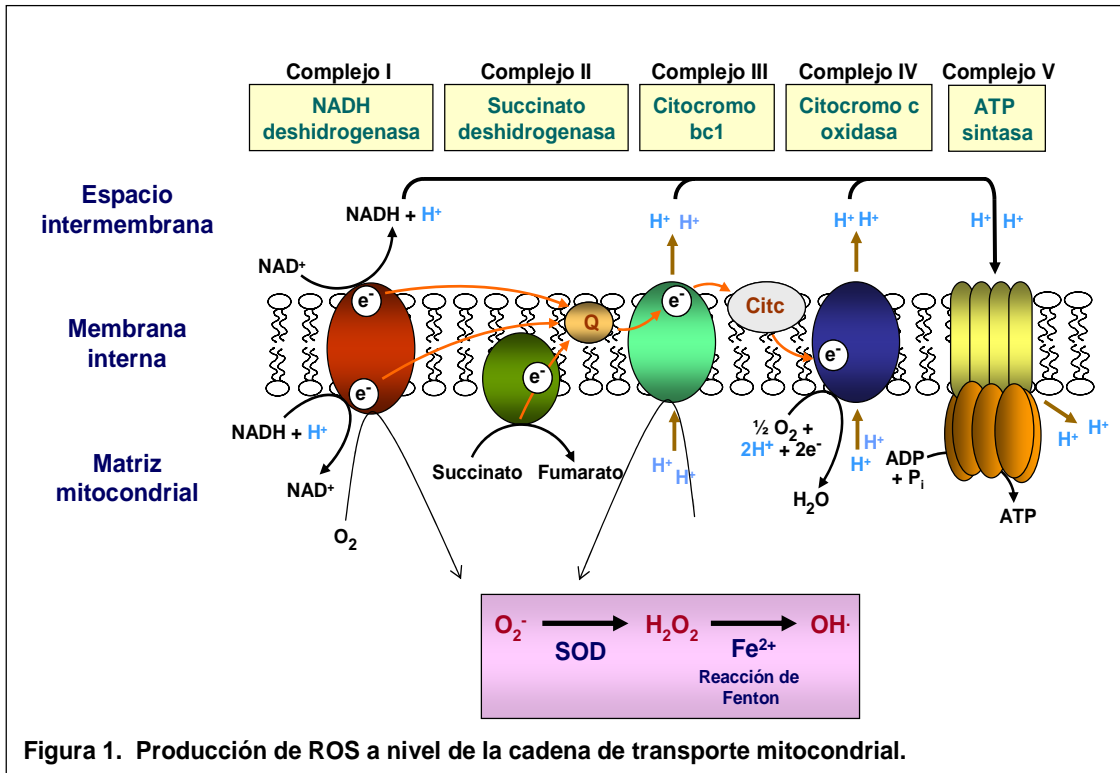


Figura 1. Producción de ROS a nivel de la cadena de transporte mitocondrial.

Otras fuentes minoritarias y puntuales de radicales libres son la autooxidación de moléculas como la hemoglobina, catecolaminas o mioglobina, que generan radicales superóxido, o bien sistemas enzimáticos como la xantina oxidasa, prostaglandina sintasa, lipooxigenasa, la aldehído oxidasa, la óxido nítrico sintasa, la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa. La oxidación de metales como el hierro o el cobre también puede generar radicales hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Por otro lado, la generación de radicales libres también puede tener causas exógenas, como puede ser el contacto con compuestos químicos oxidantes, o la radiación ionizante o ultravioleta, donde se producen daños importantes en el DNA y, de manera indirecta, estrés oxidativo, fototoxicidad y fotosensibilidad (Zagarese *et al.*, 2001).

Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

La mayor parte del radical superóxido que se genera en las células procede de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, aunque hay autores que proponen también el retículo endoplásmico como fuente importante de ROS durante el plegamiento de las proteínas (Tu y Weissman, 2004). La forma protonada de $O_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} , es de alguna manera más reactiva que la del superóxido. Por ejemplo, el HO_2^{\cdot} puede iniciar la peroxidación lipídica (Kanner *et al.*, 1987). También existen compuestos extracelulares como la menadiona o el paraquato que son reducidos por el NADPH y NADH de las células, y seguidamente son oxidados por el oxígeno generándose el radical superóxido (Hassan y Fridovich, 1979; Kappus y Sies, 1981).

En las células eucariotas, el complejo I (NADH deshidrogenasa), el complejo II (succinato deshidrogenasa) y el complejo III (ubiquinona-citocromo c reductasa) de la cadena respiratoria (Turrens, 2003), así como las reacciones detoxificadoras del citocromo P450 (Coon *et al.*, 1992) parecen ser las principales fuentes de $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, como ya se ha comentado, en la levadura *S. cerevisiae* la NADH deshidrogenasa es la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$.

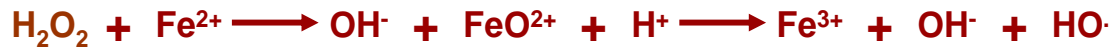
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bien sea espontáneamente o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Sin embargo, el peróxido de hidrógeno también puede tener un origen independiente de la dismutación del radical superóxido; por ejemplo, los peroxisomas de las células eucariotas contienen flavin oxidasas que generan peróxido de hidrógeno como consecuencia de la β -oxidación de los ácidos grasos (Chance *et al.*, 1979).

Radical hidroxilo (HO^{\cdot})

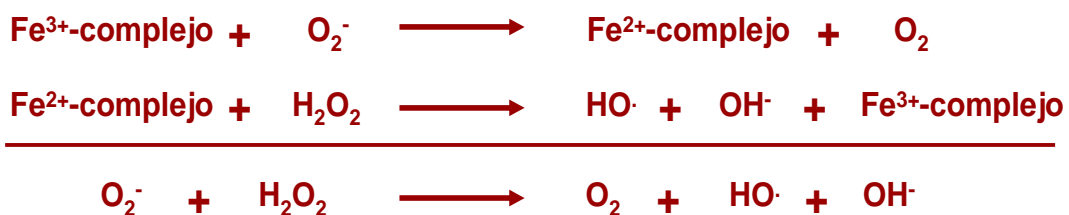
El radical hidroxilo es un radical libre altamente tóxico para las células puesto que puede dañar directamente muchas biomoléculas. En el interior de la célula el peróxido de hidrógeno puede reaccionar con iones de hierro, y posiblemente con iones de cobre, para formar especies mucho más peligrosas como el radical hidroxilo OH^{\cdot} . Además, esta conversión también puede tener lugar gracias a la luz ultravioleta. El radical hidroxilo se forma cuando el hierro

ferroso transfiere un electrón al peróxido de hidrógeno. Esta reacción se conoce como reacción de Fenton. El hierro que cataliza la reacción de Fenton se encuentra en forma libre, es decir, no incorporado en enzimas o en proteínas de almacenamiento de hierro (Imlay, 2003).



El cobre (Cu^{+1}) puede transferir electrones al peróxido de hidrógeno *in vitro*, pero, al parecer, *in vivo* tiene poca importancia puesto que su concentración intracelular es demasiado baja o porque se encuentra en forma inerte unido a grupos tioles (Gunther *et al.*, 1995).

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar también con el grupo prostético de metaloproteínas conteniendo hierro, como son la dihidroxiácido dehidrasa, la 6-fosfoglucanato deshidratasa, las fumarasas A y B o la aconitasa, de modo que tiene lugar lo que se conoce como reacción de Haber-Weiss:



1.2.2. EFECTOS SOBRE LAS MACROMOLÉCULAS CELULARES

El estrés oxidativo puede causar daños en todo tipo de biomoléculas, incluyendo DNA, proteínas y lípidos. La molécula sobre la que este tipo de estrés actúa preferentemente depende de la célula, las características del estrés y lo severo que sea éste (Cabiscol *et al.*, 2000).

La alta inestabilidad electrónica de las ROS las hace colisionar con las biomoléculas, les sustraen un electrón y las oxidan. Esto provoca un cambio estructural en la molécula que le lleva a perder la función biológica específica que desempeñaba en la célula.

Por lo que respecta a las proteínas, se oxidan preferentemente los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina. Se forman

entrecruzamientos de cadenas peptídicas y se produce la fragmentación de la proteína y la formación de grupos carbonilo (Cabiscol *et al.*, 2000). En consecuencia tiene lugar una pérdida de estructura que puede llevar a pérdida de función.

El radical superóxido puede disminuir la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa. En *E. coli* varios enzimas son dianas directas de este radical: 6-fosfogluconato deshidratasa, aconitasa, fumarasa, etc., pertenecientes al metabolismo energético del ciclo de Krebs. También inactiva a la ribonucleótido reductasa, enzima necesaria para proveer los precursores de la síntesis de DNA. Por último, el ión superóxido puede dañar la calcineurina, proteína que interviene en transmisión de señales (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Cabe destacar también la importancia del radical superóxido en su capacidad de oxidar los centros hierro-azufre que contienen diversas proteínas (Flint *et al.*, 1993; Liochev y Fridovich, 1999).

El peróxido de hidrógeno es poco reactivo a niveles fisiológicos al ser un oxidante débil; a pesar de ello, puede inactivar algunas enzimas directamente normalmente por oxidación de grupos tiol de los aminoácidos cisteína y metionina. Por ejemplo, puede inactivar la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Grant *et al.*, 1999) y, del mismo modo, la fructosa bisfosfatasa del cloroplasto. También puede oxidar ciertos ceto-ácidos como el piruvato y el 2-oxoglutarato.

El peróxido de hidrógeno oxida los residuos de cisteína creando grupos de ácido sulfénico que a su vez pueden formar puentes disulfuro con otras cisteínas o bien ser oxidados a ácido sulfínico (Imlay, 2003). También está descrita la oxidación de los residuos de metionina a metionina sulfóxido por el peróxido de hidrógeno, siendo esta modificación reversible por la enzima metionina sulfóxido reductasa (Vogt, 1995; Stadtman *et al.*, 2003).

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos y provocar la formación de grupos carbonilo (Stadtman y Levine, 2003). Al igual que el radical superóxido, también puede oxidar directamente enzimas con centros hierro-azufre (Flint *et al.*, 1993), degradar por ejemplo ciertas proteínas con grupos hemo (mioglobina, hemoglobina, citocromo c) para liberar iones de hierro y de ese modo favorecer

la producción de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton. También cabe destacar el papel del radical hidroxilo en la formación de grupos carbonilo en las proteínas.

En el caso del DNA, cuando el sistema detector de errores falla se producen mutaciones que pueden generar en último término células tumorales. Los radicales libres atacan a los ácidos nucleicos causando modificaciones de las purinas y pirimidinas; también atacan a los azúcares que los forman, rompiendo o entrecruzando las hebras del DNA (Sies y Menck, 1992; Sies, 1993; Rai *et al.*, 2001). El ataque por especies reactivas de oxígeno generadas en la mitocondria es la mayor fuente de lesiones espontáneas del DNA. Por otra parte, oxidantes ambientales tales como agentes químicos cancerígenos y las radiaciones ultravioleta e ionizante (Dizdaroglu *et al.*, 2002) pueden lesionar los ácidos nucleicos produciendo mutaciones y alteraciones en la expresión génica que conducen a procesos cancerígenos.

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse se convierte en un radical de ácido graso con capacidad de oxidar otras moléculas y presenta un mayor carácter hidrofílico. Ello conlleva cambios en su estructura y función dentro de la bicapa lipídica de los sistemas membranosos celulares, además de la generación de productos de degradación, como el hidroxinonenal o el malondialdehído. Estos compuestos de por sí tienen propiedades cancerígenas e incluso son muy reactivos y pueden dañar otras moléculas tales como proteínas o DNA (Humphries y Szweda, 1998). Iones metálicos como el cobre pueden inducir la peroxidación de lípidos promoviendo estrés oxidativo sobre las membranas (Howlett y Avery, 1997).

1.3. MECANISMOS DETOXIFICADORES DE ROS EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Dado que el trabajo experimental descrito en esta memoria se centra en la levadura *S. cerevisiae*, en los próximos apartados se hará especial énfasis en los sistemas de defensa frente a estrés oxidativo en este organismo.

1.3.1. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Se consideran antioxidantes no enzimáticos a moléculas que no son enzimas y que son capaces de actuar frente al estrés oxidativo.

1.3.1.1. GLUTATIÓN

El glutatión (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) es un tripéptido que se forma a través de la actuación consecutiva de dos enzimas, la γ GCS (γ -L-glutamil-L-cisteína sintetasa) que es la responsable de la formación de la molécula intermediaria γ -L-glutamil-L-cisteína, y la GS (glutatión sintetasa) encargada de formar la molécula de glutatión propiamente dicha a partir de la adición de una glicina al intermediario de la reacción anterior. El glutatión posee un grupo tiol, y actúa como una molécula esencial en la defensa frente a estrés oxidativo en organismos aerobios. Aunque en tal función puede actuar como molécula libre independiente de otros sistemas antioxidantes, mayoritariamente lo hace como molécula reductora de diversos sistemas enzimáticos, por lo que su papel se tratará en el apartado 1.3.2.

1.3.1.2. POLIAMINAS

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son pequeñas moléculas derivadas de aminoácidos que al estar cargadas positivamente se unen con gran afinidad a DNA y RNA y también a algunas proteínas. Son compuestos nitrogenados alifáticos implicados en la protección de la levadura contra el estrés oxidativo. Las poliaminas actúan como antioxidantes al atrapar diversas ROS, en especial al radical superóxido. De hecho, la espermina y la espermidina son esenciales para el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae*, ya que un mutante nulo en *SPE2* (gen necesario para la síntesis de poliaminas) es hipersensible al oxígeno (Balasundaram *et al.*, 1991; Balasundaram *et al.*, 1993).

1.3.1.3. ÁCIDO ERITROASCÓRBICO

El ácido eritroascórbico ha sido identificado en *S. cerevisiae* (Nick *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1998; Huh *et al.*, 1998) como un compuesto con propiedades antioxidantes similares al ácido ascórbico. El ácido ascórbico actúa como un buen agente reductor al reaccionar con el radical hidroxilo, el

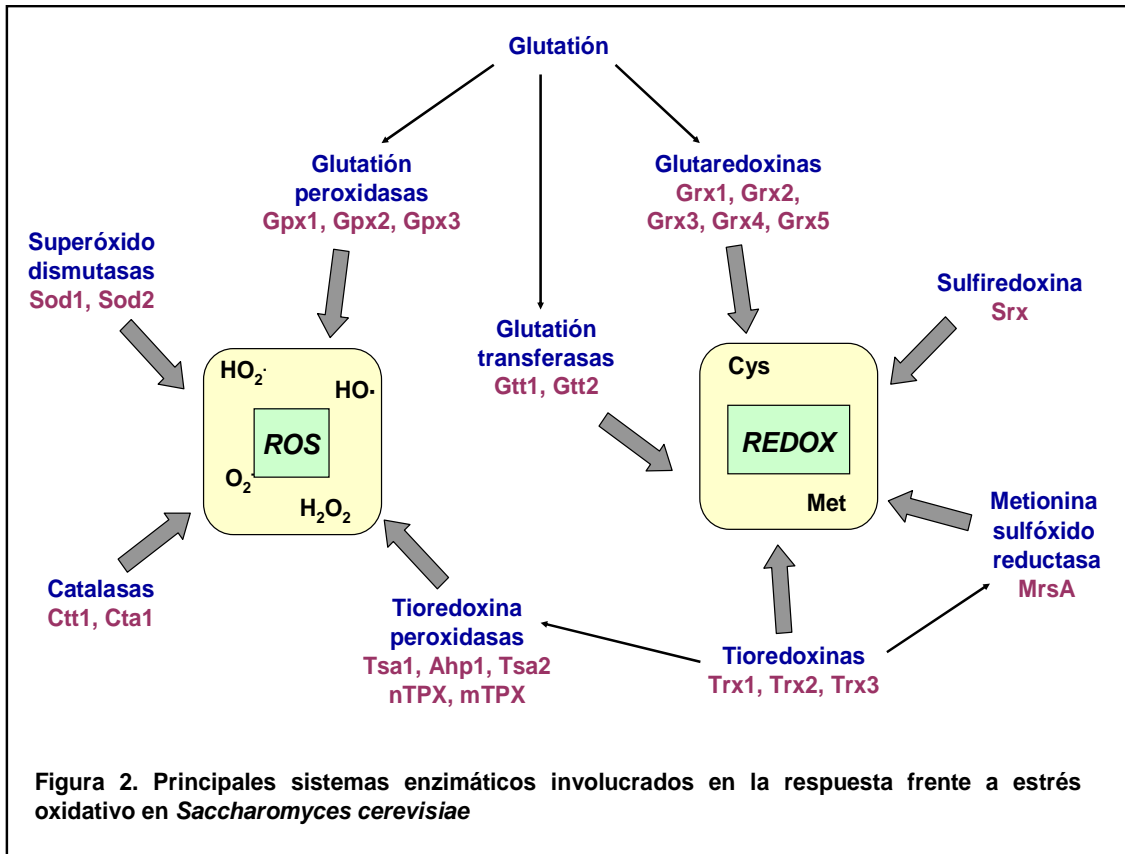
radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. También inactiva al oxígeno singlete y reduce los radicales tiilo. El ácido ascórbico es un antioxidante importante en eucariotas superiores, particularmente en plantas, mientras que en el caso del ácido eritroascórbico, a pesar de haber sido identificado en *S. cerevisiae*, su papel específico no ha sido esclarecido y hay autores que defienden un papel antioxidante poco relevante por parte del mismo (Spickett *et al.*, 2000).

1.3.1.4. ANTIOXIDANTES SOLUBLES EN LÍPIDOS

Aunque hasta la fecha no se conoce mucho acerca de este tipo de antioxidantes en *S. cerevisiae*, se ha observado que la composición de los lípidos de membrana en la levadura es importante para conferir resistencia ante el estrés oxidativo. Células con mayor porcentaje de ácidos grasos saturados son más resistentes que aquellas con mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana (Steels *et al.*, 1994; Howlett y Avery, 1997). Por otra parte, hay estudios que demuestran que antioxidantes de este tipo como son el α -tocoferol (vitamina E) o el β -caroteno protegen a las células de levadura frente al estrés oxidativo exógeno (Okai *et al.*, 2000; Sohn *et al.*, 2004). Por último, la forma reducida de la ubiquinona, además de ser un componente de la cadena de transporte, puede tener un segundo papel como antioxidante soluble en lípidos; así, el mutante *coq3*, que carece del gen que en *S. cerevisiae* codifica una O-metiltransferasa de la ruta de síntesis de la ubiquinona, es hipersensible a la autooxidación producida por el tratamiento con ácidos grasos poliinsaturados (Do *et al.*, 1996).

1.3.2. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Los sistemas enzimáticos de protección frente al estrés oxidativo se pueden subdividir entre aquellos que detoxifican directamente las ROS y aquellos que actúan regulando el estado redox de las proteínas (Figura 2). En los siguientes apartados se tratan con más detalles los respectivos sistemas centrándonos en *S. cerevisiae*.



1.3.2.1. COMPONENTES DE LA CADENA DE TRANSPORTE MITOCONDRIAL

El citocromo c se considera un agente antioxidante puesto que es capaz de eliminar el ión superóxido, generando oxígeno en el proceso (Butler, 1975). Posteriormente, el citocromo c reducido transfiere los electrones a la citocromo c oxidasa (complejo IV). De este modo algunos de los electrones que se escapan de la cadena de transporte mitocondrial produciendo ión superóxido pueden volver a reducir al citocromo c y contribuir de nuevo a la producción de energía a través del complejo IV, por lo que al citocromo c se le ha llamado el “antioxidante ideal” (Pereverzev *et al.*, 2003). El complejo IV ha sido propuesto también como un agente antioxidante en el sentido de que puede actuar como peroxidasa, aunque dada su alta K_m para el peróxido de hidrógeno puede que esta reacción no sea relevante (Orii, 1982).

El coenzima Q o ubiquinona también tiene un papel antioxidante, ya que interviene en la eliminación de varios peróxidos en presencia de succinato (Bindoli *et al.*, 1982; Eto *et al.*, 1992). También protege contra la modificación

de proteínas integrales de membrana y la oxidación del DNA (Ernster y Dallner, 1995).

1.3.2.2. FLAVOHEMOGLOBINA

La flavohemoglobina de *S. cerevisiae*, codificada por el gen *YHB1*, es una metaloproteína con un posible papel en la protección contra el estrés oxidativo y/o en su detección. Mutantes *yhb1* son hipersensibles a estrés oxidativo y, además, se induce la expresión del gen *YHB1* bajo condiciones de crecimiento aeróbico o de estrés oxidativo (Crawford *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1996). Se ha propuesto que la flavohemoglobina podría funcionar detoxificando las ROS directamente, o bien como un sensor de estrés oxidativo (Zhao *et al.*, 1996).

1.3.2.3. METALOTIONEÍNAS

Las metalotioneínas comprenden una familia de proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteínas y que pueden unir diferentes iones metálicos. Están presentes tanto en procariotas como en eucariotas e intervienen en la homeostasis y detoxificación de metales pesados, así como en la protección frente al estrés oxidativo (Hamer, 1986; Thiele, 1992).

Las metalotioneínas de *S. cerevisiae* están codificadas por los genes *CUP1* y *CRS5*. *CUP1* se induce principalmente por cobre (Karin *et al.*, 1984), y en menor intensidad por el ión plata (Furst *et al.*, 1988). Además, el cadmio puede inducir o reprimir ligeramente la transcripción de *CUP1* (Jeyaprakash *et al.*, 1991). Aparte de su papel detoxificador de metales pesados, se ha propuesto que el producto del gen *CUP1* protege a las células de levadura del estrés oxidativo puesto que sus niveles de transcripción aumentan bajo dichas condiciones de estrés, aunque el mecanismo a través del cual actúa no haya sido esclarecido todavía (Tamai *et al.*, 1993; Viarengo *et al.*, 2000).

Sin embargo, a pesar del papel antioxidante de Cup1, la otra metalotioneína de *S. cerevisiae*, Crs5, reprime su expresión en presencia de oxígeno y, por tanto, su papel como metalotioneína lo ejercería exclusivamente a nivel de detoxificación de metales (Culotta *et al.*, 1994).

1.3.2.4. CATALASA

La catalasa es una enzima que protege a las células de los efectos tóxicos que pueda generar el peróxido de hidrógeno al catalizar su descomposición en oxígeno y agua. Son hemoproteínas homotetraméricas en las que cada monómero contiene un grupo Fe (III) en su centro catalítico, y NADPH o un dominio de tipo flavodoxina para prevenir la acumulación de una forma inactiva de Fe (IV) (Kirkman *et al.*, 1987).



S. cerevisiae posee dos catalasas, la catalasa A (por *atypical peroxisomal catalase*) y la catalasa T (por *typical cytosolic catalase*), codificadas por los genes *CTA1* y *CTT1* respectivamente (Hartig y Ruis, 1986; Cohen *et al.*, 1988). La catalasa T se encuentra localizada en el citoplasma, mientras que la catalasa A se localiza tanto en el peroxisoma como en la mitocondria dependiendo de las condiciones de crecimiento (Petrova *et al.*, 2002; Petrova *et al.*, 2004). La función de la catalasa T no está muy clara, pero parece actuar en la respuesta a estrés oxidativo, estrés osmótico y carencia de nutrientes (Davidson *et al.*, 1996). En cuanto a la catalasa A, su función en el peroxisoma es eliminar el peróxido de hidrógeno que se forma durante la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que en la mitocondria se encarga de eliminar el peróxido formado durante la respiración mitocondrial (Petrova *et al.*, 2004).

Se cree que en *S. cerevisiae* las catalasas, a pesar de tener una baja afinidad por el sustrato, tienen una gran eficiencia catalítica. Por tanto, son excelentes detoxificadoras del peróxido de hidrógeno ante condiciones extremas, pero también ejercen un papel protector frente a las ROS en condiciones de crecimiento respiratorio (Izawa *et al.*, 1996; Lushchak y Gospodaryov, 2005).

1.3.2.5. SUPERÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa es la enzima encargada de la dismutación del ión superóxido a peróxido de hidrógeno y agua.



En *S. cerevisiae* existen dos formas de superóxido dismutasa, la CuZnSOD y la MnSOD, codificadas por los genes *SOD1* y *SOD2* respectivamente (Autor, 1982; Bermingham-McDonogh *et al.*, 1988). La MnSOD se encuentra en la matriz mitocondrial, mientras que la CuZnSOD se localiza en el citosol y en el espacio intermembrana de la mitocondria (Sturtz *et al.*, 2001).

La CuZnSOD posee el 90-95% de la actividad superóxido dismutasa en *S. cerevisiae*. Por ello, la mutación en el gen *SOD1* tiene efectos más importantes que la mutación en *SOD2*, pero está demostrado que ambas enzimas protegen a las células de levadura de las ROS. Se sabe que la actividad superóxido dismutasa es esencial para la supervivencia durante la fase estacionaria, pero se conoce menos acerca de su papel en protección frente al estrés oxidativo en fases más tempranas de crecimiento, dado que no es esencial dicha actividad para el crecimiento aeróbico (Longo *et al.*, 1996). MnSOD protege a la mitocondria de las ROS generadas durante la respiración y la exposición a etanol (Costa *et al.*, 1997). También se ha visto que la CuZnSOD contribuye a evitar la oxidación de algunas proteínas mitocondriales junto con la MnSOD (O'Brien *et al.*, 2004).

Los mutantes de los genes reguladores de la homeostasis de iones metálicos *BSD1* y *BSD2* (por *bypass sod defects*) suprimen los defectos de un mutante *sod1* en *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 1992). *BSD1* presenta homología con el gen *PMR1* y su relación con el estrés oxidativo se establece a través del control de los niveles intracelulares de manganeso (Liu *et al.*, 1992). *PMR1* codifica un miembro de la familia de las ATPasas tipo P que se encuentra en el aparato de Golgi y está implicada en el metabolismo del calcio y manganeso, así como en el transporte de proteínas de secreción (Lapinskas *et al.*, 1995). A través de la función de *PMR1* de regular el transporte de manganeso en el aparato de Golgi se establece una relación con el estrés oxidativo, ya que su inactivación también suprime los defectos de un mutante *sod1* (Lapinskas *et al.*, 1995).

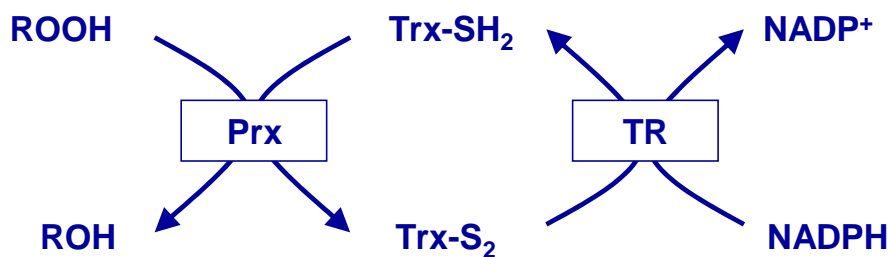
Por otra parte, *BSD2*, que codifica para una proteína transmembranal del retículo endoplásmico, controla la homeostasis de iones Cu y Cd, así como las ROS mediante el control de la distribución intracelular de iones Cu (Liu y Culotta, 1994).

Por último, los defectos fenotípicos observados en el mutante *sod1* también se suprimen por la sobreexpresión de los genes *ATX1* y *ATX2* (por anti-oxidant). *ATX1* es otro gen que interviene en la homeostasis del cobre y protege a las células de *S. cerevisiae* frente al estrés oxidativo, ya que el mutante *atx1* es hipersensible al ión superóxido generado mediante tratamiento con paracuato y al peróxido de hidrógeno (Lin y Culotta, 1995). El gen *ATX2*, también supresor del mutante *sod1*, regula la homeostasis del ión Mn a través del transportador Smf1 (Lin y Culotta, 1996).

En resumen, diversos genes reguladores de la homeostasis de iones metálicos como Cu o Zn controlan la actividad de las proteínas Sod al regular los niveles de los iones que actúan como cofactores de dichas proteínas.

1.3.2.6. PEROXIREDOXINAS

Las peroxiredoxinas (Prxs) forman una familia de proteínas antioxidantes conservada evolutivamente desde procariontas a eucariotas. Su función consiste en reducir el H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos a agua o el correspondiente alcohol (Rhee *et al.*, 1999). También se ha descrito que tienen capacidad para reducir peroxinitritos (Rhee *et al.*, 2005). Todas las peroxiredoxinas contienen una cisteína conservada en el extremo N-terminal donde se produce la oxidación por parte de los peróxidos que detoxifican. Además, pueden tener otra cisteína adicional, y por este motivo se clasifican en Prxs 1-Cys y 2-Cys. Las Prxs de *S. cerevisiae* también se denominan tioredoxinas peroxidadasas o tior peroxidadasas porque usan a la tioredoxina como donador de electrones.



S. cerevisiae posee cuatro Prxs 2-Cys y una Prx 1-Cys localizadas en diferentes compartimentos celulares y con distinta especificidad por el tipo de peróxido a detoxificar. La única Prx 1-Cys o mTPxl, codificada por *PRX1* (Pedrajas *et al.*, 2000), es una peroxiredoxina mitocondrial cuyo nivel de expresión es más elevado cuando la levadura crece en un medio respiratorio.

Por tanto, actuaría como mecanismo de defensa frente a las ROS que se producen en la mitocondria (Monteiro *et al.*, 2002).

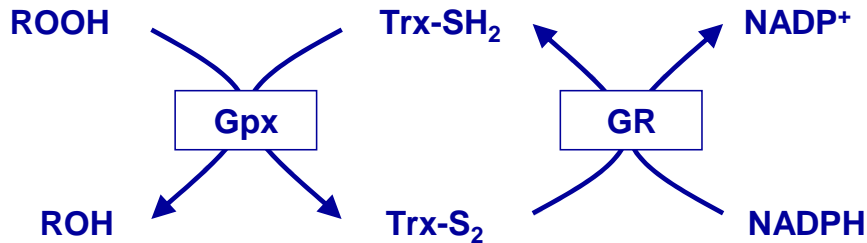
Por lo que respecta a las Prxs citosólicas, *TSA1* (también denominado *TPX1*), codifica para la proteína cTPxI, que fue la primera Prx identificada en *S. cerevisiae* (Chae *et al.*, 1994). Es una Prx muy abundante que, a parte de su papel antioxidante constitutivo, también está implicada en el control de la expresión y actividad de otros genes controlados por el regulador transcripcional Yap1 como son *GSH1* (γ -glutamylcisteína sintetasa), *GPX2* (glutación peroxidasa), *GLR1* (glutación reductasa), *TRX2* (tioredoxina) o *TRR1* (tioredoxina reductasa) (Inoue *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 2000). cTPxIII, también llamada Ahp1 (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999), es una Prx citosólica que, a pesar de presentar una homología de un 86% con cTPxI, posee una actividad seis veces menor que ésta última (Park *et al.*, 2000). Por otro lado, aunque el nivel de expresión de cTPxIII es muy bajo en condiciones basales a diferencia de cTPxI, ambas proteínas son igualmente importantes en la defensa frente a las ROS (Hong *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002). Por último, cabe señalar que Ahp1 parece ser activa únicamente a concentraciones bajas de peróxidos, ya que en presencia de elevados niveles de éstos, la proteína se inactiva por la oxidación irreversible de la Cys62 mediante la formación de un ácido sulfínico o sulfónico (Prouzet-Mauleon *et al.*, 2002). Esta oxidación de la Cys catalítica permitiría que bajo condiciones hiperoxidantes el peróxido pudiera actuar como molécula señalizadora (Wood *et al.*, 2003).

cTPxII, la tercera Prx citosólica codificada por el gen *TSA2*, muestra menor homología con el resto de Prx, junto con la Prx nuclear nTPxI. Ambas proteínas parecen tener mayor especificidad por hidroperóxidos orgánicos que por H₂O₂, así como un papel importante en la fase estacionaria de crecimiento de *S. cerevisiae* (Park *et al.*, 2000; Cha *et al.*, 2003).

1.3.2.7. GLUTATIÓN PEROXIDASAS

Las glutación peroxidasas (GPxs) son una familia de proteínas que realizan la misma tarea que las peroxiredoxinas dentro de la célula, es decir, reducen el H₂O₂ y los hidroperóxidos orgánicos a agua o el correspondiente alcohol, pero en este caso utilizan como poder reductor la molécula de glutación. Existen dos tipos de GPxs caracterizados, las GPxs clásicas y las

GPxs específicas de peróxidos de la membrana lipídica (PHGPxs). Las GPxs son multiméricas (normalmente tetraméricas) y solubles, mientras que las PHGPxs son monoméricas y se encuentran asociadas a membranas (Ursini *et al.*, 1995).



En *S. cerevisiae* se identificaron tres GPxs basándose en comparaciones de secuencia, a las que se denominaron Gpx1, Gpx2 y Gpx3 (Inoue *et al.*, 1999). Sin embargo, al realizar alineamientos de secuencia de estas proteínas con GPxs de eucariotas superiores, se ha visto que en realidad las tres glutatión peroxidasas de *S. cerevisiae* son PHGPxs. Además, se comprobó que tenían actividad PHGPx *in vivo*, observándose un crecimiento defectuoso del triple mutante en un medio que contenía ácidos grasos poliinsaturados (puesto que *S. cerevisiae* no los sintetiza de forma natural) y siendo este defecto revertido por la adición de α -tocoferol (Avery y Avery, 2001).

Gpx3 parece ser la glutatión peroxidasa más importante, puesto que el mutante nulo en esta peroxidasa, a diferencia de las otras dos, es hipersensible a hidroperóxidos y su nivel de expresión basal es más elevado. *GPX3* no se induce por ningún estrés de los estudiados hasta ahora, mientras que *GPX1* se induce por carencia de glucosa y *GPX2* aumenta su nivel de expresión en condiciones de estrés oxidativo de manera dependiente de Yap1 (Inoue *et al.*, 1999).

1.3.2.8. SULFIREDOXINA

Aunque durante bastante tiempo se pensó que la oxidación de los residuos de cisteína a ácido sulfínico o sulfónico era un proceso irreversible, recientemente se ha demostrado que existe una proteína en *S. cerevisiae* capaz de reducir el ácido sulfínico de la peroxiredoxina Tsa1 (Biteau *et al.*, 2003). Dicha proteína se denomina sulfiredoxina (Srx) y está presente en eucariotas superiores tales como la especie humana (Woo *et al.*, 2003).

Parece ser que la Srx actúa específicamente sobre las Prxs 2-Cys (Chang *et al.*, 2004; Jonsson *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2005). Se ha propuesto que la acción de la Srx sobre las Prxs ejercería una regulación celular a altas concentraciones de H₂O₂, de modo que en estas condiciones las Prxs permanecerían oxidadas permitiendo que el H₂O₂ mandara señales intracelulares antioxidantes (Wood *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2005).

1.3.2.9. METIONINA SULFÓXIDO REDUCTASA

La metionina sulfóxido reductasa es una enzima que se encarga de revertir la oxidación del sulfóxido de metionina hasta metionina (Moskovitz *et al.*, 1997; Moskovitz *et al.*, 1998). Este tipo de enzima tiene como función reparar la oxidación de la metionina, puesto que, junto con la cisteína, forman un grupo de aminoácidos susceptibles de oxidación por las ROS. Se ha demostrado que el donador de electrones para la reacción que catalizan es la tioredoxina (Mouaheb *et al.*, 1998).

La metionina sulfóxido reductasa (MrsA) de *S. cerevisiae* puede reducir tanto la metionina libre como los residuos de metionina que forman parte de las proteínas. Uno de los factores que participarían en su transcripción es CPBP, un homólogo del factor de elongación 1-γ (Hanbauer *et al.*, 2003). Además, hay estudios que parecen indicar que existe otra metionina sulfóxido reductasa que se encargaría solamente de reducir la metionina libre (Moskovitz *et al.*, 1997; Moskovitz *et al.*, 1998). Se ha demostrado que este tipo de enzimas en *S. cerevisiae* son estereoespecíficas para el isómero S del sulfóxido de metionina (Moskovitz *et al.*, 1999; Moskovitz *et al.*, 2000).

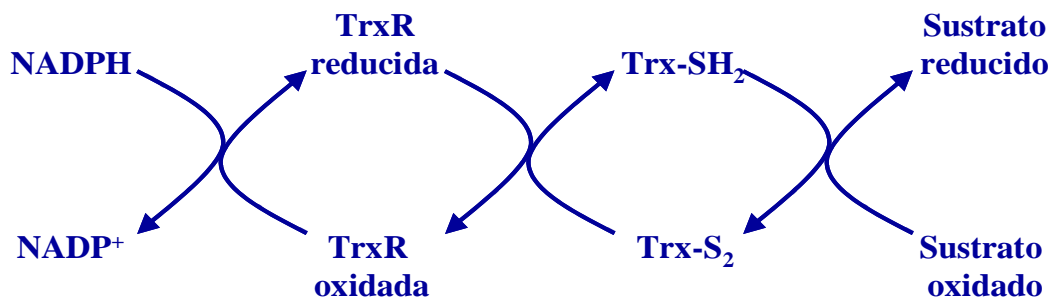
Se postula que estas enzimas funcionarían como reguladores enzimáticos, o puede que también como defensa antioxidante, tanto reparando el daño oxidativo en ciertas proteínas como ejerciendo un efecto protector mediante el ciclo de oxidación-reducción de las metioninas (Levine *et al.*, 1996).

1.3.2.10. TIOREDOXINAS

Las tioredoxinas son enzimas diméricas de pequeño tamaño que poseen dos cisteínas en el centro activo, siendo la secuencia del mismo: Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (Holmgren, 1985). Tienen actividad tioloxidoreductasa, es

decir, son capaces de reducir puentes disulfuro de proteínas a partir de los residuos de cisteína reducidos de su centro activo. Las tioredoxinas de todos los organismos, desde arqueas hasta humanos, poseen entre un 27 y un 69% de homología y se caracterizan por tener la misma estructura tridimensional, el llamado dominio tioredoxina, el cual consiste en cinco hojas β rodeadas por tres o cuatro hélices- α (Holmgren, 1985; Eklund *et al.*, 1991).

La enzima tioredoxina reductasa (TrxR) se encarga de transferir electrones procedentes de la flavoenzima NADPH para reducir a las tioredoxinas. En conjunto, estos dos elementos (tioredoxina y TrxR) forman el denominado sistema tioredoxina. Una vez reducidas, las tioredoxinas participan en reacciones de transferencia de electrones a través de la oxidación reversible de las dos cisteínas del centro activo mediante un ciclo bioquímico junto con los demás elementos del sistema tioredoxina (Holmgren, 1989).



S. cerevisiae posee un sistema citosólico de tioredoxinas que consiste en dos isoformas Trx1 y Trx2 (Gan, 1991; Muller, 1991) y una tioredoxina reductasa TrxR1 (Chae *et al.*, 1994). Por otro lado, también se encuentra en las células de esta levadura un sistema mitocondrial compuesto por la Trx3 y la tioredoxina reductasa TrxR2 (Pedrajas *et al.*, 1999).

Inicialmente, las tioredoxinas fueron descubiertas en *E. coli* como agentes reductores de la ribonucleótido reductasa y desde entonces se ha visto que también participan en la reducción y asimilación del sulfato, como dadoras de electrones de la metionina sulfóxido reductasa o de la peroxiredoxina, y como reparadoras de puentes disulfuro de las proteínas ante un estrés oxidativo (Fernando *et al.*, 1992; Arner y Holmgren, 2000; Carmel-Harel y Storz, 2000).

Mientras que los mutantes simples *trx1* o *trx2* de *S. cerevisiae* no muestran un fenotipo aparente en condiciones normales de crecimiento, se ha visto que el doble mutante *trx1 trx2* es auxótrofo para la metionina y cisteína al

no poder asimilar el sulfato [las tioredoxinas son dadoras de electrones en la reducción de PAPS (3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato) a sulfito]. El doble mutante también muestra una capacidad limitada para usar la metionina sulfóxido como fuente de metionina, hipersensibilidad a peróxido de hidrógeno, alteraciones en el ciclo celular (alargamiento de la fase S y casi desaparición de la fase G1), defectos en la herencia de las vacuolas, un aumento en el tiempo de generación (al aumentar la velocidad de síntesis de DNA) y un aumento en el tamaño celular (Muller, 1991; Muller, 1994; Muller, 1995; Muller, 1996; Xu y Wickner, 1996; Mouaheb *et al.*, 1998). Todo ello denota la importancia de las tioredoxinas de levadura en diversos procesos biológicos que requieran un adecuado estado redox de residuos de cisteína de ciertas proteínas.

Sin embargo, Trx2 parece ser la tioredoxina que tiene un papel predominante, ya que un mutante *trx2* es mucho más sensible a hidroperóxidos que un mutante *trx1*, y cepas que sobreexpresan esta proteína son más resistentes a este tipo de estrés. Además, Trx2 juega un papel crucial en respuesta a peróxidos al aumentar su transcripción a través de los activadores transcripcionales de respuesta a estrés Yap1 y Skn7 (Kuge y Jones, 1994; Morgan *et al.*, 1997). A pesar de ello, ambas tioredoxinas tienen un papel redundante como antioxidantes, ejerciendo su actividad sobretudo en la fase estacionaria de crecimiento, donde actuarían como cofactores de la peroxiredoxina Tsa1 (Garrido y Grant, 2002). Por otra parte, el mutante *trr1* es hipersensible a peróxido de hidrógeno o *t*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH), muestra un crecimiento dependiente de la temperatura y es auxótrofo para metionina (Machado *et al.*, 1997; Pearson y Merrill, 1998; Lee *et al.*, 1999). Por último, se ha demostrado que el sistema citosólico de tioredoxinas protege también a las células de *S. cerevisiae* de un estrés reductor (Trotter y Grant, 2002).

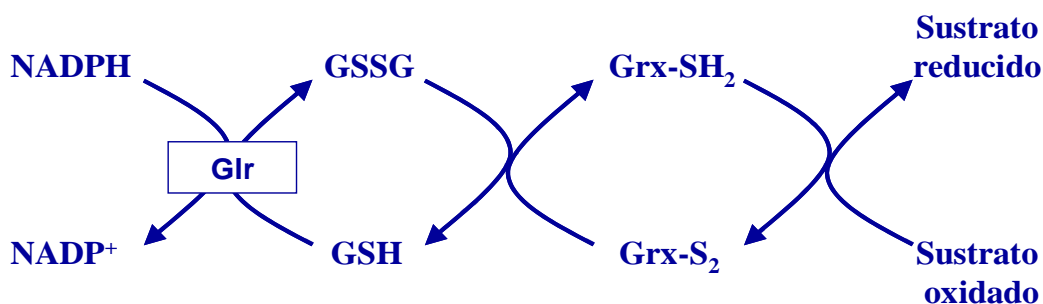
En lo concerniente al sistema tioredoxina mitocondrial, el mutante *trx3* no es hipersensible a agentes oxidantes, mientras que el mutante *trr2* sí lo es. Se cree que este sistema mitocondrial tiene un papel como donador de electrones de la peroxiredoxina mitocondrial, además de actuar frente a las ROS o regular la actividad de ciertas proteínas mitocondriales mediante un sistema de oxidación-reducción (Pedrajas *et al.*, 1999). Se ha descrito recientemente que

tanto Trr2 como Glr1 (que codifica para la glutatión reductasa del sistema de glutaredoxinas) pueden reducir la tioredoxina mitocondrial, de modo que parece existir una interacción directa entre ambos sistemas enzimáticos (Trotter y Grant, 2005).

1.3.2.11. GLUTAREDOXINAS

Las glutaredoxinas (Grx) son oxidoreductasas que fueron caracterizadas inicialmente en *E. coli* como donadoras de hidrógeno dependientes de GSH para la ribonucleótido reductasa (Holmgren, 1976). Las glutaredoxinas se encuentran presentes a lo largo de la escala evolutiva en todos los organismos que contienen GSH y, como excepción, también se encuentran en un organismo sin GSH, la arqueobacteria *Methanobacterium thermoautotrophicum* (McFarlan *et al.*, 1992).

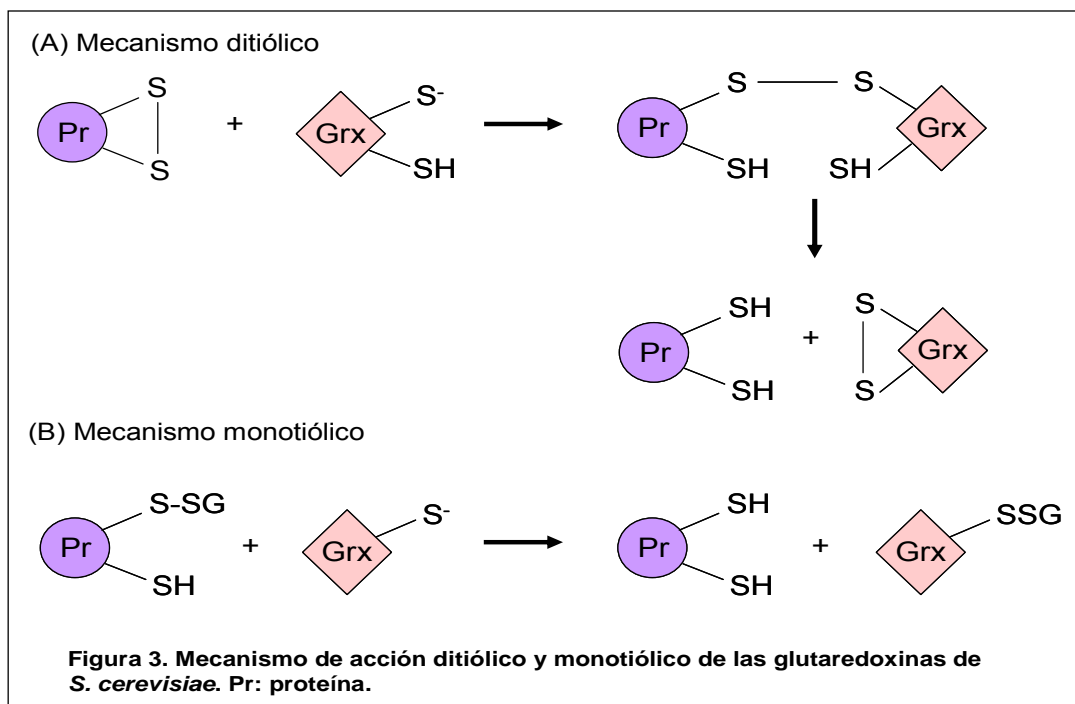
Estas enzimas forman parte del denominado sistema de glutaredoxinas junto con el NADPH, el GSH y la glutatión reductasa. En este sistema enzimático, los electrones se transfieren desde el NADH a las glutaredoxinas a través del GSH, y la glutatión reductasa (Glr) se encarga, finalmente, de restablecer el GSH en su forma oxidada (Holmgren, 1989; Grant y Dawes, 1996).



Las glutaredoxinas reducen tanto puentes disulfuros que se pueden formar entre grupos tiol de las proteínas como puentes disulfuro mixtos entre grupos tiol de proteínas y la molécula de GSH (Figura 3). *S. cerevisiae* posee dos tipos de glutaredoxinas en función de la estructura del centro activo. Por un lado las ditiólicas, Grx1 y Grx2, que poseen la secuencia conservada Cys-Pro-Tyr-Cys en el centro activo y se encargan de la reducción de los disulfuros de las proteínas mediante el mecanismo ditiol. Por otra parte, las glutaredoxinas monotiólicas, Grx3, Grx4 y Grx5, contienen la secuencia Cys-Gly-Phe-Ser en el centro activo y llevan a cabo la reducción de los disulfuros mixtos entre las

proteínas y la molécula de GSH a través del mecanismo monotiólico (Yang y Wells, 1991; Bushweller *et al.*, 1992).

Para la reducción de los puentes disulfuro de las proteínas a través del mecanismo ditiólico, la cisteína situada en el extremo N-terminal del centro activo de la Grx ataca uno de los átomos de azufre implicados en el puente disulfuro, formándose un disulfuro mixto entre la Grx y la proteína a reducir. En el siguiente paso, la segunda cisteína del centro activo rompe el puente disulfuro intermolecular formado anteriormente, liberándose una Grx oxidada con un puente disulfuro intramolecular y la proteína reducida (Figura 3A). En cuanto a la reducción de puentes disulfuro entre GSH y las proteínas a través del mecanismo monotiólico (proceso de desglutationilación), la Grx sólo utiliza un residuo de cisteína, mediante el cual forma un puente disulfuro con GSH y libera la proteína reducida (Figura 3B). Finalmente, la glutaredoxina glutationilada es reducida por otra molécula de GSH (Herrero y Ros, 2002; Fernandes y Holmgren, 2004). Sin embargo, se ha descrito recientemente que el mecanismo de acción de Grx5 podría incluir una segunda cisteína únicamente conservada en aproximadamente la mitad de las glutaredoxinas monotiólicas identificadas hasta el momento. En este caso, se formaría en el segundo paso un puente disulfuro en Grx5 tras ser glutationilada, necesitando un agente reductor que todavía no se conoce *in vivo* para devolverla a su estado reducido (Tamarit *et al.*, 2003).



Las dos glutaredoxinas ditiólicas de *S. cerevisiae*, Grx1 y Grx2, comparten gran homología con glutaredoxinas de otras especies desde bacterias hasta humanos. Mutantes simples en estos dos genes, así como el doble mutante, son viables, no presentan actividad oxidoreductasa sobre HED (disulfuro de β -hidroxietileno), y no son esenciales para el crecimiento aeróbico en medio rico, en medio con una fuente de carbono no fermentable (glicerol) o en medio mínimo. A pesar de ello y sorprendentemente, la mayor parte de la actividad oxidoreductasa en la célula corre a cargo de Grx2, sobretodo durante el crecimiento exponencial (Luikenhuis *et al.*, 1998). La sobreexpresión de *GRX1* no afecta al crecimiento, mientras que la de *GRX2* produce un enlentecimiento del mismo aunque el motivo no está todavía esclarecido (Luikenhuis *et al.*, 1998). También se ha visto que la sobreexpresión de estas proteínas aumenta la resistencia de las células a agentes oxidantes. Ambas glutaredoxinas aumentan su expresión frente a diferentes tipos de estrés: oxidativo, osmótico, por calor y en fase estacionaria. *GRX1* contiene un elemento de respuesta a estrés STRE en la región promotora y *GRX2* presenta dos elementos de este tipo. De acuerdo con la presencia de estos elementos en los promotores, la expresión de *GRX1* y *GRX2* es activada por la vía de la MAP quinasa Hog1 y regulada negativamente por la vía Ras-proteín quinasa A (Grant *et al.*, 2000).

A pesar de ello, estas glutaredoxinas presentan algunas diferencias ya que, por ejemplo, *GRX1* se induce mucho más que *GRX2* en respuesta a un estrés osmótico y por calor. Por otro lado, el mutante *grx1* es más sensible a estrés oxidativo inducido por el ión superóxido, mientras que el mutante *grx2* es más sensible a estrés oxidativo provocado por H_2O_2 (Luikenhuis *et al.*, 1998). Por último, cabe destacar que Grx1 y Grx2 también presentan actividad glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa (GST). Grx1 reduce hidroperóxidos con mayor eficiencia catalítica que Grx2, mientras que ésta última tiene mayor eficiencia catalítica como GST. Para dichas reacciones sólo sería esencial la cisteína N-terminal del centro activo, de modo que en este caso Grx1 y Grx2 actuarían mediante un mecanismo monotiol (Collinson *et al.*, 2002; Collinson y Grant, 2003). De todo ello, podemos concluir que a pesar de la homología de secuencia entre estas dos proteínas, parece ser que ambas glutaredoxinas ejercen papeles un tanto diferentes durante el crecimiento

normal de *S. cerevisiae*, así como ante diferentes condiciones de estrés. Se podrían justificar estas diferencias funcionales por el hecho de que ambas glutaredoxinas presentan en parte diferente localización subcelular, estando localizada Grx1 en el citosol y Grx2 en citosol y mitocondria (Pedrajas *et al.*, 2002).

En cuanto a las glutaredoxinas monotiólicas de *S. cerevisiae*, Grx3 y Grx4 presentan localización nuclear, mientras que Grx5 está localizada en la mitocondria (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Estas tres proteínas están incluidas en la superfamilia que conserva el dominio estructural PICOT, primeramente descubierto en la proteína PICOT humana (Isakov *et al.*, 2000). Grx5 es la glutaredoxina monotiólica más importante en cuanto a protección frente a estrés oxidativo tanto durante condiciones normales de crecimiento como de estrés oxidativo. Un mutante *grx5* presenta crecimiento deficiente en medio rico y medio mínimo, crecimiento nulo bajo una fuente de carbono respirable como es el glicerol, acumulación de proteínas carboniladas e hipersensibilidad a agentes oxidantes (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Por otro lado, Grx5 está implicada en la síntesis de los centros hierro-azufre de las proteínas en la mitocondria. En ausencia de Grx5 se observa una acumulación de hierro en la célula e inactivación de enzimas que contienen centros hierro-azufre (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999; Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). En cuanto a la función de Grx4, ésta es desconocida, aunque es fosforilada en el núcleo por la proteína quinasa Bud32, cuya función tampoco se conoce en *S. cerevisiae* (Lopreiato *et al.*, 2004).

Finalmente cabe decir que los mutantes *grx2 grx5* y *grx3 grx4 grx5* son inviables. Se establece así una relación funcional solapante entre Grx2 y Grx5 (quizás debido a la localización mitocondrial de ambas proteínas), y se pone de manifiesto la importancia funcional de las glutaredoxinas monotiólicas en *S. cerevisiae* dada la inviabilidad del triple mutante (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999).

1.3.2.12. RELACIÓN ENTRE TIOREDOXINAS Y GLUTAREDOXINAS

Se puede afirmar que en *S. cerevisiae* existe una relación funcional entre el sistema de tioredoxinas y el de glutaredoxinas basándonos en una serie de evidencias. En primer lugar, mutantes *glr1* necesitan una de las dos

tioredoxinas citosólicas para ser viables, y a la inversa, mutates *trx1 trx2* necesitan la glutatión reductasa funcional para crecer en condiciones aerobias (Muller, 1996). De ello podemos deducir que las tioredoxinas podrían funcionar junto con Glr1 en el mantenimiento de una relación adecuada GSH/GSSG dentro de la célula, sobre todo en condiciones en donde la capacidad reductora de la Glr1 es insuficiente para mantener niveles reducidos de GSH. También se ha constatado que la sobreexpresión de *TRX1* rescata parcialmente la auxotrofia para GSH en un mutante *gsh1*, retrasando durante unas pocas generaciones la parada en el crecimiento que experimenta dicho mutante (Sharma *et al.*, 2000). Sin embargo, en el mutante *glr1* el estado redox de las tioredoxinas no se ve alterado, y el estado redox de las glutaredoxinas no se ve afectado por la pérdida de las tioredoxinas, de modo que no parece existir una relación recíproca entre ambos sistemas (Trotter y Grant, 2003). Además, se ha observado que los mutantes en las tioredoxinas presentan niveles elevados de GSH y GSSG, lo que apoya de algún modo la existencia de una relación entre ambos sistemas (Muller, 1996; Garrido y Grant, 2002), aunque la relación GSH/GSSG final sea similar a la presente en una cepa salvaje (Trotter y Grant, 2003).

Por otro lado, el cuádruple mutante *trx1 trx2 grx1 grx2* no es viable. Así, al menos una tioredoxina o una glutaredoxina es necesaria y suficiente para la viabilidad de *S. cerevisiae* (Draculic *et al.*, 2000). Del mismo modo, cepas sin el sistema tioredoxina (*trx1 trx2 trr1*) o el sistema glutaredoxina (*gsh1 glr1*) son viables, pero si se deleccionan simultáneamente componentes de ambos sistemas los mutantes resultantes son inviables (*gsh1 trx1 trx2* y *glr1 trr1*) (Trotter y Grant, 2003).

Finalmente, cabe señalar que dado que Glr1 colocaliza en el citoplasma y la mitocondria (Outten y Culotta, 2004), las tioredoxinas mitocondriales precisan del sistema glutaredoxina. De hecho, el mutante *trr2 glr1* es viable, pero es hipersensible a H₂O₂ y presenta un crecimiento lento en condiciones respiratorias, de modo que ambas proteínas presentan función solapante en cuanto a la reducción de Trx3 (Trotter y Grant, 2005).

1.3.2.13. GLUTATIÓN TRANSFERASAS

Las glutatión transferasas son enzimas encargadas de proteger a las células de los efectos tóxicos de compuestos xenobióticos. En *S. cerevisiae* se han identificado dos genes que codifican dos glutatión-S-transferasas funcionales: *GTT1* y *GTT2*. Ambas comparten baja homología de secuencia entre ellas y con glutatión-S-transferasas de otras especies. Son enzimas unidas a membrana en el retículo endoplásmico y funcionan como homodímeros. *GTT1* se induce por estrés osmótico y xenobióticos aunque no por agentes oxidantes, y de manera más significativa tras la fase diáuxica de crecimiento. Los mutantes *gtt1*, *gtt2* y *gtt1 gtt2* crecen lentamente a 39°C y además son sensibles a choque térmico en fase estacionaria (Choi *et al.*, 1998).

Recientemente se ha visto que el cuádruple mutante *gtt1 gtt2 grx1 grx2* es mucho más sensible que los mutantes *gtt1 gtt2* y *grx1 grx2* frente a condiciones de estrés oxidativo. Por ello, las glutatión-S-transferasas podrían ejercer un papel protector ante este tipo de estrés (Collinson y Grant, 2003).

1.4. FACTORES TRANSCRIPCIONALES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO EN *S. cerevisiae*

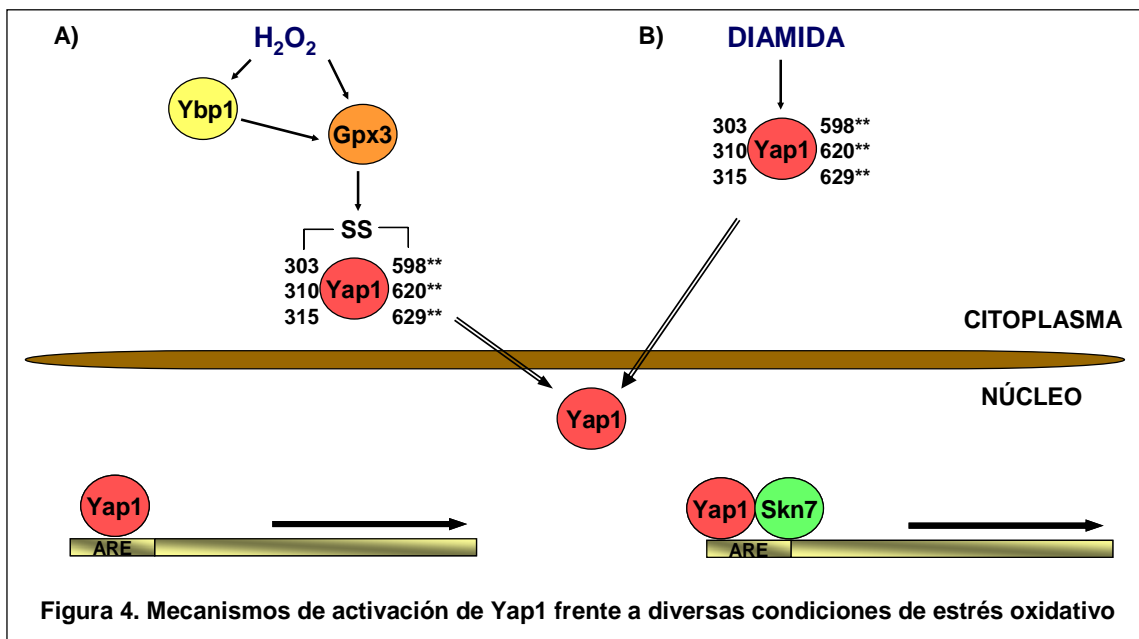
Se conocen una serie de factores transcripcionales cuya función es regular, generalmente activándolos, diferentes mecanismos de respuesta frente a estrés oxidativo. A continuación se detallará de qué factores se trata, aunque cabe señalar que algunos de estos factores transcripcionales responden además a otra serie de estreses y, por tanto, presentan respuestas amplias y complejas.

1.4.1. YAP1 Y SUS HOMÓLOGOS

El factor de transcripción Yap1 forma parte, junto con otras siete proteínas (Yap2, Yap3, Yap4, Yap5, Yap6, Yap7 y Yap8) de una familia de transactivadores que contienen un dominio básico con una cremallera de leucina (b-ZIP). La respuesta frente a estrés oxidativo la ejerce fundamentalmente Yap1 y en menor medida Yap2.

Yap1 fue el primer miembro descrito de esta familia de proteínas. Inicialmente se identificó por su capacidad de unirse y activar el elemento ARE (AP-1 recognition element) en el promotor del virus SV-40, el cual es muy similar al de familia de transactivadores de mamíferos c-Jun (Harshman *et al.*, 1988). La secuencia de unión que reconoce Yap1 es T(C/G)ACTAA (Kuge y Jones, 1994; Wu y Moyer-Rowley, 1994). La falta de *YAP1* no causa ningún fenotipo aparente bajo condiciones normales de crecimiento (Moyer-Rowley *et al.*, 1989). Sin embargo, el mutante *yap1* es hipersensible a agentes oxidantes, mientras que su sobreexpresión confiere hiperresistencia a los mismos, incluido el cadmio (Schnell *et al.*, 1992; Kuge y Jones, 1994). Los genes diana de Yap1 codifican en su mayoría para defensas antioxidantes así como para reguladores del control redox celular. Algunos genes diana de Yap1 son *TRX2* (Kuge y Jones, 1994), *GHS1* (Wu y Moyer-Rowley, 1994), *YCF1* (proteína transportadora del tipo ABC) (Wemmie *et al.*, 1994), *TPS1* (trealosa-6-fosfato sintetasa) (Gounalaki y Thireos, 1994), *SSA1* (chaperona Hsp70) (Stephen *et al.*, 1995), *GPX2* (Tsuzi *et al.*, 2004), *GLR1* (Grant *et al.*, 1996) y *TRR1* (Machado *et al.*, 1997) entre otros (véase también la revisión de Toledano *et al.*, 2003). En total, forman un regulón de al menos 32 genes, siendo algunos de éstos también regulados por el transactivador Skn7, del que se hablará más ampliamente en el siguiente apartado. Yap1 se encuentra en citoplasma y núcleo, pero en respuesta a estrés oxidativo se acumula en el núcleo (Kuge *et al.*, 1997). El control del movimiento de Yap1 entre el núcleo y el citoplasma sucede a nivel de la salida del núcleo. Pse1 es la importina de Yap1, pero la importación nuclear no está regulada por condiciones de estrés oxidativo, en otras palabras, es constitutiva (Isoyama *et al.*, 2001). Sin embargo, la exportina Crm1 se une a la señal nuclear de exportación (NES) de Yap1 y así se impide su salida al citoplasma en condiciones oxidantes (Yan *et al.*, 1998). La retención nuclear de Yap1 es mediada por dos dominios ricos en cisteínas, uno formado por los residuos C598, C620 y C629 en el extremo C-terminal (c-CRD) donde solapa con la NES (Kuge *et al.*, 1997), y el otro hacia el extremo N-terminal (n-CRD) conteniendo las cisteínas C303, C310 y C315 (Delaunay *et al.*, 2000). La actividad de Yap1 está regulada postraduccionalmente, pero parece ser que el mecanismo regulador a través de sus dos dominios ricos en cisteínas varía según el tipo de oxidante (Figura 4). Así, en respuesta a H₂O₂,

Yap1 no es oxidado directamente por H_2O_2 , sino que Gpx3 transduce la señal creando un puente disulfuro mixto con la C598, que a su vez se resuelve creándose un puente intramolecular con la C303 (Kuge *et al.*, 2001; Delaunay *et al.*, 2002). Además, se cree que la proteína Ybp1 (por “Yap1 binding protein”) también está implicada en este tipo de respuesta y actuaría de manera paralela a Gpx3, aunque el mecanismo concreto no se haya caracterizado (Veal *et al.*, 2003) (Figura 4A). Por otro lado, en respuesta a agentes que alteren el estado redox de los grupos tioles tales como la diamida, la modificación de las cisteínas del c-CRD es suficiente para translocar Yap1 al núcleo (Azevedo *et al.*, 2003) (Figura 4B). Adicionalmente, se postula que las Trx ejercen un papel en la regulación de Yap1, dado que ellas serían las encargadas de mantener las cisteínas del c-CRD reducidas bajo condiciones no oxidantes, y así permitir la unión de Yap1 a Crm1 con la consiguiente salida al citoplasma. A su vez, bajo condiciones oxidantes, se induciría la síntesis de Trx por Yap1, y éstas actuarían reduciendo el c-CRD y permitiendo de nuevo que Crm1 se una a Yap1 y se exporte al citoplasma (Izawa *et al.*, 1999).



En cuanto a Yap2, el mutante no presenta ningún fenotipo, pero análisis con microarrays (microordenamientos) de DNA indican que Yap2 regula ciertas proteínas implicadas en la estabilización y plegamiento de proteínas en un ambiente oxidante (Cohen *et al.*, 2002). Se sabe que Yap4 y Yap6 responden

principalmente ante un estrés osmótico, aunque también pueden responder a otro tipo de estreses, entre ellos el oxidativo (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004). Se ha visto que Yap8 se acumula en núcleo tras exponer las células a arsénico. Por último, del resto de transactivadores de esta familia (Yap3, Yap5 y Yap7) no se conoce apenas cual es su función (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004).

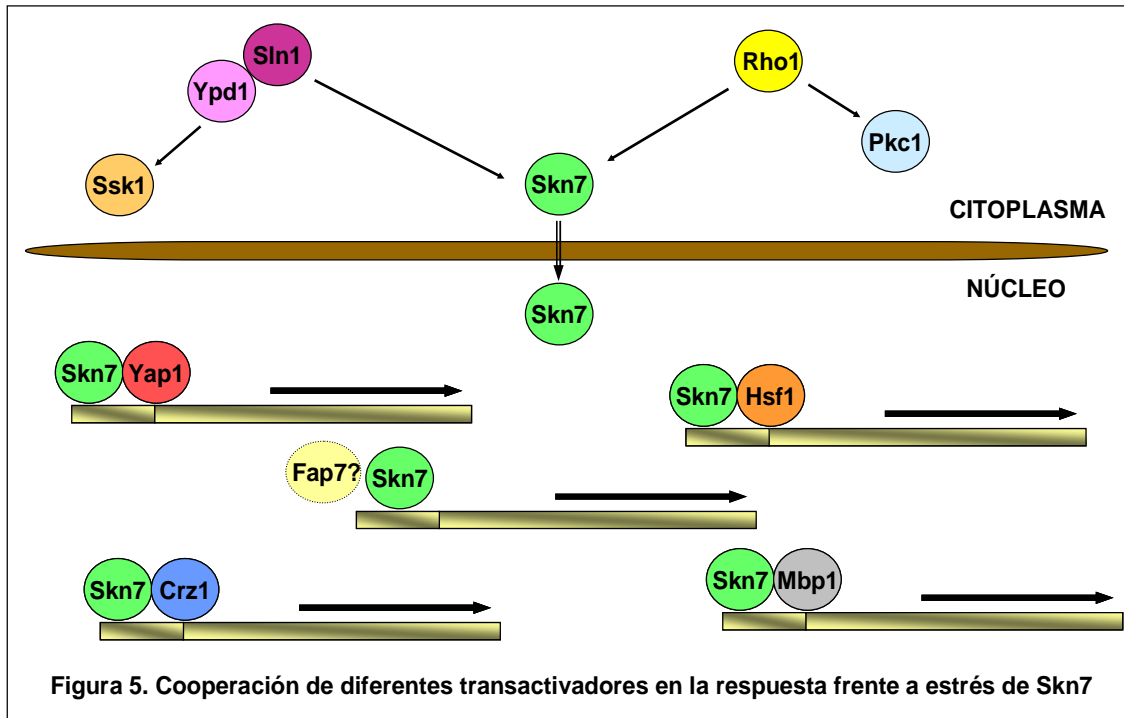
1.4.2. SKN7

Skn7 es, al igual que Yap1, un factor que posee un dominio básico con una cremallera de leucina (b-ZIP). Forma parte de un sistema de dos componentes en *S. cerevisiae*. La proteína sensora es Sln1, la cual se fosforila en una histidina ante un estímulo externo y posteriormente transfiere el fosfato a un residuo de aspartato de la proteína reguladora, que en este caso es Skn7 (Ota y Varshavsky, 1993; Brown *et al.*, 1993). Skn7 contiene dos regiones homólogas con otras secuencias: un segmento homólogo al dominio de unión a DNA de Hsf1 (factor de choque térmico) y un dominio receptor que tiene el residuo de aspartato presente también en otras proteínas reguladoras de sistemas de dos componentes (Brown *et al.*, 1993). Skn7 se encuentra localizado constitutivamente en el núcleo (Raitt *et al.*, 2000) y recientemente se ha identificado la secuencia a la que podría unirse en respuesta a estrés oxidativo: GGC(C/T)GGC (Tsuzi *et al.*, 2004).

Skn7 se relacionó por primera vez con la respuesta a estrés oxidativo cuando se encontró en un estudio de búsqueda de genes cuya mutación provocaba hipersensibilidad a H₂O₂ (Krems *et al.*, 1995). Existen también estudios que demuestran un papel activo de Skn7 frente al estrés oxidativo independiente de la fosforilación por Sln1 (Li *et al.*, 1998).

Los primeros genes que se identificaron sujetos a una regulación frente a condiciones oxidantes por Skn7 son *TRX2* y *TRR1* (Machado *et al.*, 1997), los cuales están también regulados por Yap1. En consecuencia, se puede observar cierta convergencia funcional entre Yap1 y Skn7 frente al estrés oxidativo. Muestra de ello es que el doble mutante *yap1 skn7* presenta hipersensibilidad a oxidantes comparada con los mutantes simples (Krems *et al.*, 1996). Sin embargo, no siempre actúan juntos, de modo que se pueden identificar tres regulones de genes: los controlados independientemente bien

por Yap1 o bien por Skn7, y los regulados por ambos transactivadores cooperativamente frente dicho estrés (Lee *et al.*, 1999). Se ha identificado una proteína nuclear llamada Fap7 que es necesaria para la activación de Skn7 en respuesta a estrés oxidativo, aunque el mecanismo a través del cual actúa esta proteína no se conoce todavía (Juhnke *et al.*, 2000).



Más allá del estrés oxidativo, Skn7 está implicado en respuesta a otros tipos de estrés mediante rutas complejas y aún no bien determinadas (Figura 5). Por ejemplo, se ha visto que Skn7 puede unirse a la GTPasa Rho1 implicada en la síntesis de la pared celular, de modo que esta proteína podría regular a Skn7 además de a Pkc1 (Alberts *et al.*, 1998). También se ha visto que Skn7 interacciona con el regulador transcripcional Hsf1, presentando ambos un mecanismo cooperativo de regulación transcripcional. Skn7 y Hsf1 poseen homología estructural, sobre todo a nivel del dominio de unión a DNA, y Skn7 permite la inducción de los genes que regula Hsf1 en respuesta a estrés oxidativo (Raitt *et al.*, 2000). Por otro lado, Skn7 se asocia con el factor transcripcional de ciclo celular Mbp1 y ambos intervienen en el proceso de emergencia de la yema (Bouquin *et al.*, 1999). También se ha demostrado que Skn7 estabiliza el factor Crz1 de la vía de la calcineurina (vía importante para regular la tolerancia celular a iones) y que además podría existir cierta relación

entre esta vía y el estrés oxidativo, ya que mutantes dobles en el gen de la calcineurina *CNB1* y en *SKN7* son mucho más sensibles a H_2O_2 que los mutantes simples (Williams y Cyert, 2001). Finalmente, la fosfotransferasa Ypd1 interviene en la transferencia de grupos fosfato desde la quinasa Sln1 a los reguladores Ssk1 y Skn7 en respuesta a estrés osmótico (Posas *et al.*, 1996; Ketela *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998), lo que relaciona a Skn7 con estrés osmótico. Por todo lo expuesto anteriormente, se puede decir que Skn7 está implicado en diversas respuestas metabólicas y frente a estreses de varios tipos.

1.4.3. MSN2/MSN4

S. cerevisiae posee dos transactivadores, Msn2 y Msn4, que responden ante muchos tipos de estreses: estrés por calor, privación de nitrógeno, privación de glucosa, estrés oxidativo, estrés por etanol y estrés osmótico entre otros (Estruch y Carlson, 1993; Marchler *et al.*, 1993; Schuller *et al.*, 1994). Se ha introducido, así, el concepto de “respuesta general a estrés” (Gasch *et al.*, 2000), en la cual participan Msn2 y Msn4. Fueron identificados inicialmente como supresores de un mutante de la proteína quinasa Snf1 (aunque Snf1 no está incluida en el regulón de estos genes) (Estruch y Carlson, 1993; Schmitt y McEntee, 1996). Msn2 y Msn4 son proteínas similares con un 41% de identidad, que contienen dos dedos de zinc del tipo Cys₂His₂ en el extremo C-terminal. Los mutantes simples *msn2* o *msn4* no presentan ningún fenotipo, con lo que la función de ambos parece ser redundante, mientras que resultan ser más severos los defectos del doble mutante (Estruch y Carlson, 1993; Martínez-Pastor *et al.*, 1996). Éste es hipersensible a varios tipos de estrés como son el estrés por calor o el estrés oxidativo [a excepción del estrés osmótico, que principalmente responde al transactivador de estrés osmótico Hog1, aunque parte del regulón Msn2/Msn4 está regulados por la vía HOG (Rep *et al.*, 2000)]. A su vez, células que sobreexpresan Msn2 o Msn4 muestran mayor resistencia a estrés térmico o privación de glucosa, aunque también muestran defectos en el crecimiento, posiblemente como consecuencia de la activación inapropiada de mecanismos de defensa bajo condiciones no estresantes (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). Por otro lado, la contribución de cada factor depende del contexto en los promotores de los

genes que regulan, además del tipo de estrés frente al que actúan. Por ejemplo, la regulación por parte de Msn2/Msn4 frente al estrés por calor es específica de cada gen (Treger *et al.*, 1998b). Se han visto diferencias en fosforilación y en la cantidad de mRNA entre Msn2 y Msn4 ante diferentes estreses, de modo que podrían tener diferente susceptibilidad y especificidad funcional (Garreau *et al.*, 2000). Por último, se ha propuesto que Msn2 podría funcionar en condiciones bajas de estrés, mientras que Msn4 respondería ante un estrés más elevado (Garreau *et al.*, 2000; Jacquet *et al.*, 2003).

Ambos factores transcripcionales reconocen los mismos sitios de unión a DNA. Se caracterizan por unirse a una secuencia conservada denominada STRE (stress response element) compuesta por los siguientes nucleótidos: CCCCT (en esta orientación o en la inversa: AGGGG), y que se ha encontrado en gran cantidad de genes regulados por cambios ambientales, entre ellos el estrés oxidativo (Moskvina *et al.*, 1998). No obstante, la presencia de un elemento STRE en el promotor no implica que éste sea funcional como tal (Alepuz *et al.*, 1997). Originalmente, esta secuencia se identificó como implicada en la respuesta frente a estrés en los genes *CTT1* (Wieser *et al.*, 1991) y *DDR2* (Kobayashi y McEntee, 1993). Suelen encontrarse en dos o más copias en los promotores de los genes regulados por Msn2/Msn4 (Moskvina *et al.*, 1998). Una copia del elemento STRE es suficiente para activar la transcripción de los genes que la contienen, aunque dos o más copias concedan un efecto aditivo a dicha expresión (Kobayashi y McEntee, 1993; Treger *et al.*, 1998a).

Msn2/Msn4 se encuentran distribuidos en el citoplasma y en el núcleo de las células bajo condiciones normales de crecimiento, y ante un estrés se acumulan en el núcleo de manera rápida y reversible (Gorner *et al.*, 1998), estando regulados negativamente por la vía de la PKA (proteín quinasa A) (Marchler *et al.*, 1993). Msn2 se une al DNA al ser fosforilado *in vitro* por la subunidad catalítica de PKA (O'Brien *et al.*, 1995). Además, se ha visto que la mutación en el sitio potencial de modificación por parte de PKA en Msn2 provoca una localización nuclear constitutiva del transactivador (Gorner *et al.*, 1998). Por otro lado, la rapamicina, a través de la vía TOR, también induce la localización nuclear de Msn2/Msn4. El mecanismo consiste en liberar a estos transactivadores de la proteína citoplásmica Bmh2 (Beck y Hall, 1999). La

exportación nuclear a través del producto del gen *MSN5* (que codifica una exportina nuclear) también regula el transporte núcleo-citoplásmico de estos transactivadores (Alepuz *et al.*, 1999; Gerner *et al.*, 2002).

En resumen, Msn2/Msn4 parecen estar involucrados en la respuesta general a estrés, más que en la activación específica por estrés oxidativo, haciendo que las células paren el crecimiento y permitiendo su supervivencia frente a duras condiciones ambientales. Por otro lado, también parece que Msn2/4 se encuentran más bien involucrados en la capacidad de respuesta a fuertes condiciones de estrés (Boy-Marcotte *et al.*, 1999) o en la recuperación tras un estrés agudo, por ejemplo con H₂O₂ (Hasan *et al.*, 2002).

2. CENTROS Fe/S

Los centros Fe/S son grupos prostéticos presentes en muchas proteínas y que se caracterizan por su versatilidad funcional. Existen muchos tipos de proteínas que los contienen y también diversos tipos de centros Fe/S, de modo que hay una gran variedad funcional y estructural de los mismos en la naturaleza (Beinert, 2000). Además, este tipo de proteínas están presentes en todos los organismos. Ejercen funciones necesarias para el mantenimiento de la vida, ya que intervienen en los procesos de respiración, fijación de nitrógeno y fotosíntesis. Trabajos de los últimos años [revisados en (Rouault y Tong, 2005)] indican que los centros Fe/S participan también en procesos biológicos como el metabolismo del carbono, la biosíntesis de aminoácidos y vitaminas, la biogénesis de ribosomas o la reparación del DNA.

2.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las formas más comunes de centros Fe/S que se encuentran en la naturaleza son la [2Fe-2S] y [4Fe-4S], las cuales se unen a las proteínas mediante cuatro ligandos que normalmente son cisteínas. También se suele encontrar, aunque más raramente, una variante de la forma [4Fe-4S] con un ión de hierro eliminado, la [3Fe-4S]. Ésta última se produce por la oxidación de la forma [4Fe-4S], que tiene como ligando tres cisteínas, además de una

asparragina, histidina o grupo hidroxilo como cuarto ligando (Beinert, 2000). A partir de estas formas simples se sintetizan en la naturaleza toda una serie de estructuras mucho más complejas. Además, se producen fisiológicamente conversiones entre las diferentes formas de los centros en diversas proteínas; éstos pueden experimentar reacciones que cambien el ligando al que están unidos. Los centros Fe/S son muy sensibles ante condiciones oxidativas (Beinert, *et al.*, 1997; Beinert, 2000). Sin embargo, si los mismos se encuentran en una región de la proteína protegida e inaccesible a oxidantes, dichos centros pueden no ser sensibles a oxidación (Rouault y Klausner, 1996). Estos centros también son muy sensibles al exceso de hierro, puesto que a través de la reacción de Fenton (véase apartado 1.2.1.), este metal provoca la generación de radicales libres que dañan los componentes celulares y los propios centros Fe/S (Imlay *et al.*, 1988).

En cuanto a la función, la capacidad de deslocalizar los electrones alrededor de los átomos de Fe y S hace que los centros constituídos por dichos átomos sean ideales para el transporte electrónico en los seres vivos. Este transporte de electrones tiene lugar en proteínas solubles o unidas a membrana, con centros que poseen la estructura [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S] o [8Fe-7S] (Johnson *et al.*, 2005). El transporte suele ser de un electrón, a excepción de la forma [8Fe-7S] de las nitrogenasas, que puede transportar dos electrones (Peters *et al.*, 1997). Por otro lado, los centros Fe/S se localizan en el sitio activo de enzimas redox y no redox, y su unión hace que estas enzimas sean activas. Así, estos centros participan en la transferencia de electrones (por ejemplo, en ciertas proteínas de la cadena de transporte mitocondrial o del cloroplasto), activación y catálisis proteica, como es el caso de las hidratasas y deshidratasas (Flint y Allen, 1996), y en respuesta ante condiciones ambientales donde se oxida o degrada el centro (Beinert y Kiley, 1999; Kiley y Beinert, 2003). También se han descrito ejemplos de centros Fe/S implicados en la regulación transcripcional o traduccional de la expresión génica. Por ejemplo, la proteína bacteriana SoxR percibe el estrés oxidativo y se activa en respuesta al mismo a través de la oxidación de su centro Fe/S (Hidalgo y Demple, 1996). La aconitasa de mamíferos pasa a la forma de IRP1 (iron-regulatory protein) para modular los niveles de hierro regulando la traducción de la ferredoxina y la estabilidad del mRNA de la transferrina (Beinert y Kiley,

1996). Se cree que los centros Fe/S podrían funcionar como almacén de hierro, por ejemplo en el caso de las ferredoxinas de procariotas que pueden contener múltiples centros, o bien podría ocurrir que estas ferredoxinas ayudasen al ensamblaje de los centros Fe/S en procariotas anaerobios (Johnson *et al.*, 2005). Por último, en ciertos casos, se ha demostrado que los centros Fe/S controlan la estructura de la proteína en las cercanías de donde se encuentran dichos centros; por tanto, se les adjudica también un papel estructural y regulador de estas proteínas (Johnson *et al.*, 2005).

En procariotas se ha propuesto un modelo de regulación por retroalimentación donde la demanda de proteínas con centros Fe/S maduros controla la expresión de los genes cuyos productos son necesarios para la formación de dichos centros compitiendo con el represor IscR (Schwartz *et al.*, 2001; Frazzon y Dean, 2001).

2.2. BIOSÍNTESIS DE CENTROS Fe/S EN *Saccharomyces cerevisiae*

La biosíntesis de los centros Fe/S tiene lugar en las mitocondrias de *S. cerevisiae*. En éste orgánulo se sintetizan tanto los centros Fe/S de las proteínas mitocondriales como los de las proteínas citoplásmicas y nucleares (Gerber y Lill, 2002; Muhlenhoff *et al.*, 2003; Balk y Lill, 2004; Lill y Muhlenhoff, 2005). La maquinaria de biosíntesis de dichos centros está muy conservada desde procariotas hasta eucariotas superiores, lo que sugiere que los respectivos genes eucarióticos son de origen bacteriano y se adquirieron antes de la aparición de los eucariotas (Muhlenhoff y Lill, 2000). Concretamente, muchos de los genes implicados en la síntesis de los centros Fe/S en las mitocondrias de *S. cerevisiae* son homólogos de los genes bacterianos *nif* (nitrogen fixation specific) e *isc* (iron sulfur center assembly) (Jacobson *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1998), especialmente de éstos últimos. El hecho de que los genes bacterianos sean capaces de complementar las funciones en cepas mutadas para los homólogos de dichos genes en *S. cerevisiae* es una prueba de que esta homología estructural puede que lo sea también funcional entre ellos. Además, esta complementación también ocurre en el caso de los homólogos de estos genes en la especie humana, lo cual nos indica que estos genes están altamente conservados a lo largo de la evolución, desde

procariotas hasta eucariotas. En la Tabla 1 se muestran los componentes de la maquinaria mitocondrial de formación de los centros Fe/S. La primera columna muestra las proteínas de formación de los centros en la levadura *S. cerevisiae*, la segunda en las bacterias y, por último, la tercera columna indica los homólogos de las proteínas en la especie humana implicadas en este proceso de biosíntesis.

<i>S. cerevisiae</i>	BACTERIAS	HUMANOS	FUNCIÓN
Nfs1	NifS, IscS	hNfs1	Cisteín desulfurasa
Isc1	Nif U (N- t), IscU	IscU (cit)	Sitio de anclaje para la formación de los centros Fe/S
Isc2	Nif U (N- t), IscU	IscU (mit)	
Nfu1	NifU (C-t)	hNfu1	Maduración de los centros Fe/S (?)
Yfh1		Frataxina	Maduración de los centros Fe/S (?)
Yah1	Fdx	Adrenodoxina	Reacciones redox
Arh1	Fdx reductasa	Adrenodoxina reductasa	Reduce a Yah1
Isa1	IscA, HesB	hIsa1	Transferencia de los centros Fe/S a las apoproteínas (?)
Isa2	IscA, HesB		
Ssq1	Hsc66 (HscA)		Protección de residuos proteicos en Isu1
Jac1	Hsc20 (HscB)		Proporciona especificidad de sustrato a Ssq1
Grx5	Grx4	hGRXM1	Mantenimiento del estado redox
Atm1	Atm1 (<i>R. prowazekii</i>)	hABC7	Transportador ABC. Transporte del centro Fe/S al citosol
Erv1		Alr	Sulfidril oxidasa. Transporte del centro Fe/S al citosol
Bat1		BCAT	Exportación del centro Fe/S al citosol (?)
Bat2			

Tabla 1. Homología y función de los componentes implicados en la biosíntesis de centros Fe/S en *S. cerevisiae*, bacterias y humanos.

Sin embargo, en las células eucariotas como *S. cerevisiae*, la maquinaria de formación de centros Fe/S incluye además otros genes específicos para la exportación de los centros Fe/S destinados a proteínas citoplásmicas y nucleares. Se trata de genes que codifican proteínas para el transporte fuera de la mitocondria de los centros Fe/S a través de un cargo todavía no bien definido. Entre las proteínas involucradas en este transporte extramitocondrial están: Atm1 (transportador ABC), Erv1 (sulfidril oxidasa) y las proteínas Bat1 y Bat2, denominándose a este conjunto de proteínas “maquinaria de exportación

de ISC” (Muhlenhoff y Lill, 2000). Otras proteínas que se cree que pueden intervenir también en la formación de los centros Fe/S directamente en el citoplasma son Cfd1, Nbp35 o Nar1 (Lill y Muhlenhoff, 2005). Por último, *S. cerevisiae* contiene en la mitocondria otras proteínas que no tienen su correspondiente homólogo en bacterias, pero que también están involucradas en la maduración de los centros Fe/S como Mge1 (factor liberador de nucleótidos que estimula la actividad ATPasa de la chaperona Ssq1) e Yfh1 (homólogo de la frataxina humana).

Para explicar el mecanismo de formación de los centros Fe/S, se describirán primero cada uno de los componentes de la maquinaria de formación de los mismos en *S. cerevisiae*. Dicho mecanismo puede verse esquematizado en la Figura 6.

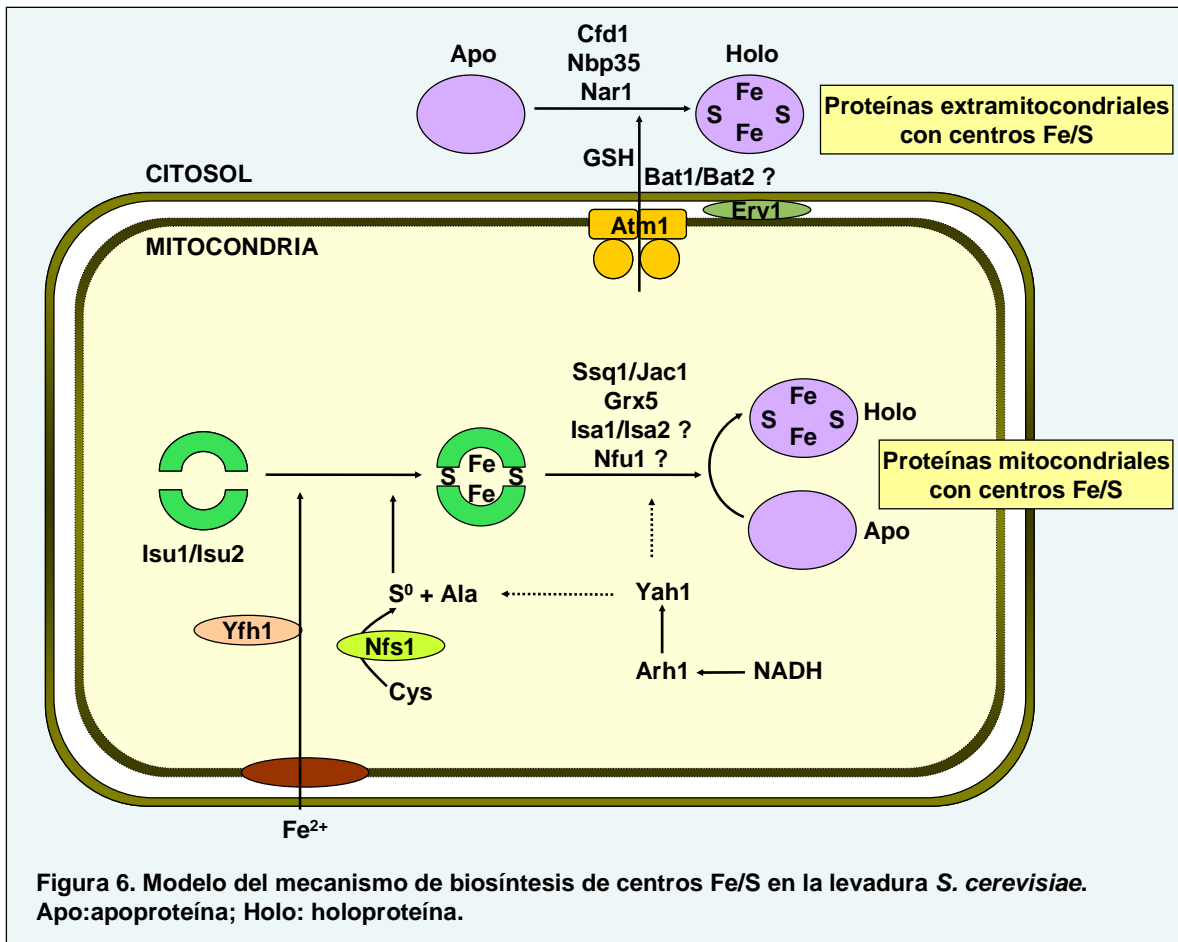


Figura 6. Modelo del mecanismo de biosíntesis de centros Fe/S en la levadura *S. cerevisiae*. Apo:apoproteína; Holo: holoproteína.

Nfs1

Nfs1 es una proteína esencial de la matriz mitocondrial de *S. cerevisiae* (Nakai *et al.*, 1998; Kispal *et al.*, 1999), aunque también presenta una señal de localización nuclear (Nakai *et al.*, 2001), donde es necesaria para proveer el

azufre para la producción de tionucleótidos de tRNAs (Nakai *et al.*, 2004). Fue identificada como el producto de un gen cuyo mutante nulo suprimía la sensibilidad a oxígeno y los defectos auxotróficos en un mutante *sod1* (Strain *et al.*, 1998). Nfs1 es una desulfurasa que cataliza la desulfuración de la L-cisteína a L-alanina y azufre elemental, de modo que es el componente de la maquinaria de formación de los centros Fe/S encargado de proveer el azufre.

Isu1 e Isu2

S. cerevisiae posee dos proteínas homólogas Isu1 e Isu2 localizadas también en la matriz mitocondrial (Garland *et al.*, 1999). La delección en uno de los dos genes no presenta defectos en la biogénesis de los centros Fe/S, mientras que la doble delección es letal (Schilke *et al.*, 1999; Muhlenhoff y Lill, 2000). Isu1 es más abundante que Isu2, y la expresión de ambas está regulada diferencialmente a lo largo de las diferentes fases de crecimiento. Isu1 es más abundante que Isu2 en las fases exponencial y estacionaria, mientras que Isu2 solamente puede detectarse en la fase exponencial (Garland *et al.*, 1999). Estas proteínas forman un dímero y poseen tres residuos de cisteína conservados y esenciales para su función, los cuales al igual que en los homólogos bacterianos, son el sitio de unión para la formación del centro (Muhlenhoff *et al.*, 2003). Estas proteínas servirían como sitio de anclaje para la formación de los centros Fe/S, aunque no se conoce todavía el mecanismo molecular a través del cual llevan a cabo esta función.

Nfu1

La proteína Nfu1 posee un dominio de 60 aminoácidos que presenta gran homología con el extremo C-terminal de la proteína bacteriana NifU (Schilke *et al.*, 1999). El mutante *nfu1* no es esencial en *S. cerevisiae* puesto que no provoca consecuencias graves en la biosíntesis de centros Fe/S ni conlleva otros fenotipos asociados. En cambio, la inactivación conjunta de *NFU1* e *ISU1* sí provoca defectos en la maduración de los centros Fe/S (Schilke *et al.*, 1999). Además, se ha detectado una interacción genética entre Nfu1 e Isu1, y se ha visto que el doble mutante *nfu1 ssq1* (la proteína Ssq1 es una chaperona de la que se hablará más adelante) es inviable (Schilke *et al.*, 1999). Por ello, Nfu1 podría tener como función el ensamblaje de los centros

Fe/S y/o su inserción en las apoproteínas. A pesar de todo, el papel concreto de esta proteína en *S. cerevisiae* todavía no se conoce.

Yfh1

Se ha visto que la proteína Yfh1 (yeast frataxin homologue) está implicada en la maduración de los centros Fe/S, puesto que en su ausencia ésta se ve comprometida (Chen *et al.*, 2002; Muhlenhoff *et al.*, 2002). Yfh1 interacciona con Isu1 y Nsf1 durante la formación de los centros Fe/S, y es necesaria para transferir el hierro a Isu1 (Gerber *et al.*, 2003; Ramazzotti *et al.*, 2004). Se cree que, ya que Yfh1 puede secuestrar iones de hierro, podría intervenir como almacén proporcionando los átomos de hierro necesarios para la formación de los centros Fe/S (Gakh *et al.*, 2002).

Yah1 y Arh1

Los genes *YAH1* y *ARH1* codifican para una ferredoxina y una ferredoxina reductasa respectivamente (Manzella *et al.*, 1998; Barros y Nobrega, 1999), siendo esenciales en *S. cerevisiae* (Lange *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Las proteínas Yah1 y Arh1 están localizadas en la matriz mitocondrial y en la membrana interna de la mitocondria respectivamente (Lacour *et al.*, 1998; Barros y Nobrega, 1999). Yah1 es una ferredoxina con un centro Fe/S del tipo [2Fe-2S] que interviene a su vez en la formación de los centros Fe/S, puesto que parece ser que al menos uno de los pasos de la biosíntesis dichos centros requiere una reducción (Lange *et al.*, 2000). Yah1, a su vez, recibe los electrones del NADH (Zhao *et al.*,) a través de la ferredoxina reductasa Arh1 (Manzella *et al.*, 1998). La molécula que reduce Yah1 no se conoce todavía, pero se postula que los electrones podrían ser necesarios para la producción de azufre elemental, para evitar la precipitación del hierro tras su importación a la mitocondria en forma de ión férrico soluble, o bien para la reducción de proteínas de la maquinaria durante la biosíntesis de los centros Fe/S como Isu1, Isu2 o Nfu1 (Lange *et al.*, 2000).

Isa1 e Isa2

Las proteínas Isa1 e Isa2 están localizadas en la matriz mitocondrial, donde realizan su función (Kaut *et al.*, 2000; Pelzer *et al.*, 2000). Sin embargo,

se ha descrito que Isa2 podría estar localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria (Jensen y Culotta, 2000). Hay que tener en cuenta, no obstante, que estos últimos experimentos se realizaron en condiciones de sobreexpresión de ISA2. La delección del gen que codifica una de las dos proteínas provoca alteraciones en la formación de los centros Fe/S. Sin embargo, la delección de ambos genes no intensifica el fenotipo observado, de modo que estas proteínas realizan funciones solapantes y además no son esenciales para *S. cerevisiae* (Kaut *et al.*, 2000). Ambas proteínas contienen tres residuos de cisteína conservados y necesarios para su función (Jensen y Culotta, 2000). La función de estas proteínas es desconocida pero se postula que el hierro podría unirse a los residuos de cisteína conservados y transferirlo a las proteínas Isu1 e Isu2 (Jensen y Culotta, 2000) o bien, podrían transferir el centro Fe/S desde las proteínas Isu a las apoproteínas (Pelzer *et al.*, 2000).

Ssq1 y Jac1

La biosíntesis de los centros Fe/S depende de dos chaperonas, Ssq1 y Jac1. Ssq1 fue identificada como una chaperona que tenía que ver con la regulación de los niveles de hierro (Schilke *et al.*, 1996). Posteriormente, los mutantes nulos de ambas proteínas fueron identificados como supresores de la sensibilidad a oxígeno en el mutante *sod1* (Strain *et al.*, 1998). Ssq1 no es un gen esencial para *S. cerevisiae*, pero su delección provoca que las células crezcan lentamente a bajas temperaturas (23°C) y pierdan el DNA mitocondrial (Schilke *et al.*, 1996). Por otro lado, está implicada en la biogénesis de Yfh1, pero de manera indirecta puesto que ésta última no parece ser su sustrato directo (Voisine *et al.*, 2000). Jac1 sí es esencial para *S. cerevisiae* (Lutz *et al.*, 2001), y junto con Ssq1 está involucrada en la síntesis de los centros Fe/S, puesto que cuando faltan ambas a la vez los centros no pueden incorporarse, por ejemplo, a la ferredoxina (Lutz *et al.*, 2001). Existe una interacción genética entre Ssq1 y Nfu1 (Schilke *et al.*, 1999), pero también entre Ssq1 y Jac1 (Kim *et al.*, 2001). El sustrato de ambas chaperonas parece ser Isu1, de modo que Jac1 dirigiría la formación de un complejo proteico entre Isu1 y Ssq1 (Dutkiewicz *et al.*, 2003).

Grx5

Grx5 se identificó como una glutaredoxina mitocondrial que ejerce una función protectora frente al estrés oxidativo en *S. cerevisiae* (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). La delección de *GRX5* hace que se inactiven enzimas mitocondriales que contienen centros Fe/S (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Por otro lado, los defectos fenotípicos de un mutante *grx5* se suprimen sobreexpresando *SSQ1* o *ISA2*, de modo que Grx5 también forma parte de la maquinaria de formación de los centros Fe/S (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Más concretamente, Grx5 intervendría tras el ensamblaje de los centros Fe/S sobre Isu1, y su función, igual que la de las chaperonas Ssq1 y Jac1, podría ser la de disociar el centro Fe/S de Isu1 y/o transferirlo a la apoproteína (Muhlenhoff *et al.*, 2003). En todo caso, parece lógico pensar que la función desglutacioniladora de Grx5 es necesaria para mantener en un estado redox adecuado algunos residuos de cisteína de la maquinaria biosintética mitocondrial de los centros Fe/S. Recientemente se ha demostrado que el homólogo de Grx5 en el pez cebra es necesario también en este organismo, y que su falta se manifiesta en forma de anemia hipocrómica que conduce a la muerte a los pocos días de la embriogénesis (Wingert *et al.*, 2005).

Todos los componentes mitocondriales de la maquinaria de formación de los centros Fe/S descritos hasta aquí son necesarios para la biosíntesis de proteínas con centros Fe/S tanto mitocondriales como citoplásmicas y nucleares en *S. cerevisiae*. A partir de ahora se describirán los componentes de esta maquinaria necesarios únicamente para la síntesis de proteínas Fe/S extramitocondriales.

Atm1

Los transportadores del tipo ABC (ATP binding cassette) catalizan el transporte activo de una gran variedad de sustratos a través de las membranas. En *S. cerevisiae*, Atm1 es un transportador ABC que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria con el dominio de unión de nucleótidos hacia la matriz mitocondrial, lo que indica que funciona exportando sustratos desde la matriz al espacio intermembrana (Leighton y Schatz, 1995).

Actúa como un homodímero, cuya formación depende de la unión de ATP (Chloupkova *et al.*, 2004). La delección del gen *ATM1* provoca, entre otros efectos, una pérdida de proteínas citosólicas con centros Fe/S, lo que indica que es un gen esencial para la biosíntesis de estas proteínas (Kispal *et al.*, 1999). No se conoce qué sustrato exporta *Atm1*, pero sería una molécula necesaria para la formación de los centros Fe/S destinados a las proteínas extramitocondriales. El sustrato exportado podrían ser los mismos centros o bien las apoproteínas con el centro unido, pero esto no está esclarecido todavía (Gerber y Lill, 2002).

Erv1

Erv1 es una sulfidril oxidasa localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria que está involucrada en la síntesis de centros Fe/S para proteínas extramitocondriales (Lange *et al.*, 2001). Esta proteína presenta homólogos en todos los organismos eucariotas, pero no en bacterias, indicando su esencialidad en eucariotas para la maduración de las proteínas extramitocondriales con centros Fe/S. No se conoce el sustrato sobre el que actúa, pero debe actuar subsecuentemente a *Atm1* (Lange *et al.*, 2001). *Erv1* podría unir la molécula transportadora de centros Fe/S hasta el citosol, o bien su actividad sulfidril oxidasa actuaría sobre otra proteína desconocida que interviniese en la maduración de los centros Fe/S citosólicos (Gerber y Lill, 2002).

Bat1 y Bat2

Las proteínas *Bat1* y *Bat2* están localizadas en la mitocondria y citosol respectivamente y fueron identificadas como transaminasas que catalizan el último paso de la síntesis de isoleucina, leucina y valina (Eden *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1996). A pesar de ello, se les ha asignado una función en la síntesis de centros Fe/S para las proteínas extramitocondriales, puesto que en su ausencia hay defectos en la actividad y ensamblaje de las mismas (Prohl *et al.*, 2000). Esta función es posible dado que se ha descrito una interacción genética entre *ATM1* y *BAT1* (Kispal *et al.*, 1996). Su función bioquímica no se conoce, pero se postula que podrían catalizar la síntesis de un quelante de bajo

peso molecular que facilitara la exportación de los centros Fe/S al citosol (Kispal *et al.*, 1996).

El glutatión

El GSH es necesario para la biosíntesis *de novo* de las proteínas con centros Fe/S extramitocondriales, pero no para las mitocondriales. El mutante *gsh1* (carente de γ -L-glutamyl-L-cisteína sintetasa, enzima implicada en la biosíntesis de GSH) presenta, igual que los mutantes *atm1* y *erv1*, defectos en la maduración de las proteínas citoplásmicas con centros Fe/S (Sipos *et al.*, 2002). Podría actuar conjuntamente con Atm1 y Erv1, puesto que se ha descrito una interacción genética entre *ATM1* y *GSH1* (Sipos *et al.*, 2002). Aunque su función exacta no se conoce, el GSH podría facilitar el paso de la molécula que transporte Atm1 hacia el citosol, transferir el centro Fe/S a la apoproteína citosólica y/o proteger las cisteínas de la apoproteína de la formación de puentes disulfuro (Sipos *et al.*, 2002).

Por otro lado, también parece existir una maquinaria citoplásmica de formación de centros Fe/S para proteínas citoplásmicas y nucleares en *S. cerevisiae* denominada CIA (cytosolic iron-sulfur protein assembly). Hasta el momento se conocen tres proteínas formando parte de esta maquinaria: Cdf1, Nbp35 y Nar1. Cdf1 y Nbp35 son ATPasas con una asa P, mientras que Nar1 es una hidrogenasa (Roy *et al.*, 2003; Balk *et al.*, 2004; Balk *et al.*, 2005; Hausmann *et al.*, 2005). Están codificadas por genes esenciales para *S. cerevisiae* y se encuentran localizadas en citosol y núcleo (Nar1 y Nbp35 en el núcleo, mientras que Cdf1 en el núcleo y citosol). Se ha visto que existe una interacción genética entre ellas (Hausmann *et al.*, 2005), y que actúan en la biosíntesis de centros Fe/S para proteínas citoplásmicas y nucleares. Nar1 y Nbp35 son proteínas que contienen centros Fe/S en su estructura, por lo que en cierto modo son necesarias para su propia biosíntesis. De hecho, se ha descrito recientemente que uno de los sustratos de Nar1 es Nbp35 (Balk *et al.*, 2005).

2.3. HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN *Saccharomyces cerevisiae*

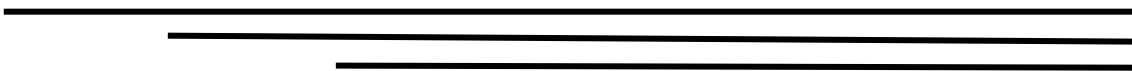
El hierro es un metal que forma parte de una serie de proteínas que son fundamentales para todos los seres vivos. No obstante, su exceso es perjudicial para las células, ya que en cantidades elevadas resulta tóxico. Por ejemplo, puede catalizar la reacción de Fenton y generar ROS (ver apartado 1.2.1.). Así pues, la homeostasis del hierro ha de estar muy bien regulada. Está descrito que mutantes en bastantes de los genes de la maquinaria de síntesis de centros Fe/S incrementan la concentración de hierro en la mitocondria, acompañado de un descenso en la concentración de hierro citosólica y un aumento en la captación de dicho metal (Li *et al.*, 2001). En algunos casos la concentración de hierro mitocondrial puede elevarse hasta 30 veces. Las proteínas de la maquinaria de centros Fe/S cuya eliminación del gen que las codifica provoca este fenotipo son: Nfs1, Ssq1, Jac1, Yah1, Arh1, las proteínas Ixu e Isa, Grx5, Atm1, Erv1 y también la falta de glutatión (Gerber y Lill, 2002; Rodríguez-Manzanares *et al.*, 2002). Además, la falta de proteínas con centros Fe/S citosólicas también estimula la captación de hierro por parte de la mitocondria.

S. cerevisiae cuenta con dos reguladores transcripcionales para controlar la homeostasis del hierro: Aft1 y Aft2. Aft1 regula la expresión de los genes del sistema de alta afinidad de captación de hierro (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). *S. cerevisiae* posee también un sistema de baja afinidad para la captación del hierro que es activo cuando las concentraciones de hierro son elevadas en el medio (Dancis *et al.*, 1992; Eide *et al.*, 1992). En él interviene el producto del gen *FET4* (Dix *et al.*, 1994), pero éste no depende del control transcripcional de Aft1 (Dix *et al.*, 1997). Aft1 se expresa constitutivamente en el citoplasma y se localiza en el núcleo cuando la concentración de hierro es baja en la célula (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). Por su parte, Aft2 también se activa en respuesta a bajas concentraciones celulares de hierro y tiene funciones solapantes con Aft1 (Blaiseau *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2001). El mutante *aft1* presenta defectos en crecimiento a bajas concentraciones de hierro, y tampoco es capaz de crecer sobre fuentes de carbono respirables (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996; Casas *et al.*, 1997), mientras que el mutante *aft2* no muestra ningún fenotipo en estas condiciones.

No obstante, el doble mutante *aft1 aft2* es más sensible al crecimiento en condiciones de bajas concentraciones de hierro (y a estrés oxidativo) (Blaiseau *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2001). Por ello, ambos transactivadores controlan la homeostasis de hierro, es decir, tienen funciones solapantes, pero no redundantes (Rutherford *et al.*, 2001). De hecho, mantienen cierta especificidad en la activación génica puesto que el perfil transcripcional que regulan es distinto para cada transactivador (Rutherford *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito que Aft1 activa la transcripción de genes involucrados en la captación de hierro, mientras que Aft2 activa la transcripción de genes implicados en la compartimentalización y utilización del hierro en la vacuola y la mitocondria (Courel *et al.*, 2005). También se ha descrito recientemente que Aft1 y Aft2 no responden directamente a hierro, sino a centros Fe/S o a una molécula que contenga dichos centros (Chen *et al.*, 2004). Más concretamente, se ha visto que la respuesta de estos transactivadores se activa o no en función de la exportación por parte de la mitocondria de una molécula que contenga los centros Fe/S (Rutherford *et al.*, 2005).

Por otro lado, hay estudios que indican que Yfh1 podría estar implicada también en la homeostasis del hierro en *S. cerevisiae*. El mutante *yfh1* activa la expresión de genes de captación de hierro del sistema de alta afinidad, de genes de captación de hierro a través de sideróforos y de genes que codifican transportadores de hierro en vacuola y retículo endoplásmico (Foury y Talibi, 2001). Pese a todo, existen controversias acerca del posible papel directo de Yfh1 en la homeostasis del hierro (Schueck *et al.*, 2001).

OBJETIVOS



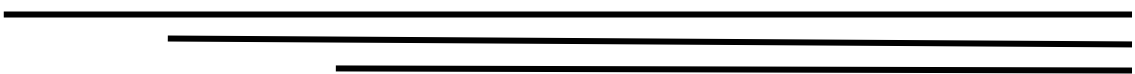
Este trabajo representa la continuación de otros estudios realizados por componentes de mi grupo de investigación en épocas anteriores. Tras la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae*, el grupo se interesó por el estudio de una familia de proteínas en dicho organismo que poseía homología con las glutaredoxinas ditiólicas. Por tener una sólo cisteína en el centro activo, a éstas nuevas proteínas se les denominó glutaredoxinas monotiólicas (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Así, a lo largo de esta memoria se expondrán las investigaciones realizadas durante mi estancia como becaria predoctoral en el grupo en relación a la función de esta familia de glutaredoxinas monotiólicas.

Los eucariotas inferiores como la levadura *S. cerevisiae* han aportado un gran número de conocimientos en muchos aspectos biológicos debido a su sencilla manipulación genética y bioquímica, su facilidad al trabajar con muchísimas técnicas moleculares de análisis y la capacidad de control preciso de las condiciones de crecimiento de estos organismos. De modo que esta levadura representa un modelo biológico adecuado para estudiar, por ejemplo, la familia de glutaredoxinas, tema principal en esta memoria.

Los objetivos concretos a alcanzar en esta memoria son los siguientes:

- i. Analizar el transcriptoma del mutante nulo de la glutaredoxina mitocondrial Grx5 mediante macroarrays de DNA en colaboración con el grupo del Dr. J. E. Pérez-Ortín de la Universitat de València.
- ii. Estudiar la localización y función de las glutaredoxinas monotiólicas nucleares Grx3 y Grx4, así como examinar los componentes de la estructura de estas proteínas que determinan su localización y función.
- iii. Realizar estudios funcionales y evolutivos de las glutaredoxinas monotiólicas a través de experimentos de complementación fenotípica del mutante *grx5* de *S. cerevisiae* con las glutaredoxinas monotiólicas de organismos tanto procariotas como eucariotas.

ARTÍCULO 1



Saccharomyces cerevisiae* Glutaredoxin 5-deficient Cells Subjected to Continuous Oxidizing Conditions Are Affected in the Expression of Specific Sets of Genes

Received for publication, October 29, 2003, and in revised form, December 24, 2003
Published, JBC Papers in Press, January 13, 2004, DOI 10.1074/jbc.M311879200

Gemma Bellí‡, María Micaela Molina‡§, José García-Martínez¶, José E. Pérez-Ortín¶, and Enrique Herrero‡¶

From the ‡Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Rovira Roure 44, 25198-Lleida and the ¶Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas and Servicio de Chips de DNA-S.C.S.I.E., Universitat de València, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

The *Saccharomyces cerevisiae* GRX5 gene codes for a mitochondrial glutaredoxin involved in the synthesis of iron/sulfur clusters. Its absence prevents respiratory growth and causes the accumulation of iron inside cells and constitutive oxidation of proteins. Null $\Delta grx5$ mutants were used as an example of continuously oxidized cells, as opposed to situations in which oxidative stress is instantaneously caused by addition of external oxidants. Whole transcriptome analysis was carried out in the mutant cells. The set of genes whose expression was affected by the absence of Grx5 does not significantly overlap with the set of genes affected in respiratory petite mutants. Many Aft1-dependent genes involved in iron utilization that are up-regulated in a frataxin mutant were also up-regulated in the absence of Grx5. *BIO5* is another Aft1-dependent gene induced both upon iron deprivation and in $\Delta grx5$ cells; this links iron and biotin metabolism. Other genes are specifically affected under the oxidative conditions generated by the *grx5* mutation. One of these is *MLP1*, which codes for a homologue of the Slt2 kinase. Cells lacking *MLP1* and *GRX5* are hypersensitive to oxidative stress caused by external agents and exhibit increased protein oxidation in relation to single mutants. This in turn points to a role for Mlp1 in protection against oxidative stress. The genes of the Hap4 regulon, which are involved in respiratory metabolism, are down-regulated in $\Delta grx5$ cells. This effect is suppressed by *HAP4* overexpression. Inhibition of respiratory metabolism during continuous moderately oxidative conditions could be a protective response by the cell.

Cells growing aerobically are subjected to oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS)¹ produced at the respiratory chain in the presence of oxygen (1). Cells have devel-

oped a number of enzymatic and non-enzymatic mechanisms to counteract the damage that ROS cause to the different cellular macromolecules. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, addition of external oxidants such as hydrogen peroxide or menadione (a generator of superoxide anion) cause a rapid and generally transient transcriptional response (2, 3). This consists of the induction of genes involved in hydrogen peroxide and superoxide detoxification, as well as those related to redox homeostasis within the cell. In the case of hydrogen peroxide, observations at the transcriptome level confirm studies carried out at the proteome level (4, 5). Two transcriptional regulators that respond to oxidative stress, Yap1 and Skn7, are important in such a response to hydrogen peroxide (5, 6). The Yap1 regulon involves two types of proteins as follows: those required for antioxidant scavenging, and enzymes that participate in the metabolic pathways that regenerate cell reducing power in the form of glutathione and NADPH. The first subset of proteins is also Skn7-dependent, whereas the second is not (5). Msn2 and Msn4 are two transcription factors that respond to different stresses, including oxidative stress, by regulating gene expression through binding to STRE promoter elements (7, 8). The defense function of Msn2/4 partially overlaps with that of Yap1. However, Yap1 seems to be more important for the adaptive response induced by moderate concentrations of hydrogen peroxide, whereas Msn2/4 would be preferentially implicated in recovery from acute exposure to the oxidant (9). This is consistent with the specific role that Msn2/4 has in regulating expression of genes involved in protein degradation pathways (9).

Most studies into the results of oxidative stress on yeast cells have involved adding external oxidants to cell cultures. However, this does not necessarily reproduce the physiological effect caused by aerobic respiration or other types of oxidation at moderate but constant levels. Proteins of *S. cerevisiae* cells growing under aerobic conditions are more exposed to continuous oxidation than proteins from anaerobic cultures (10). The latter demonstrated continuous oxidative stress under aerobic conditions. However, the gene expression pattern of cells that shift from fermentative to respiratory metabolism at the diauxic transition (11, 12) is very different from that of cells subjected to external aggression by oxidants such as hydrogen peroxide, menadione, or diamide (2, 3). Thioredoxins and glutaredoxins are two thiol oxidoreductases that play an important role in protecting sulfhydryl groups in proteins against oxidation and therefore in maintaining the protein activity under these conditions (13). Grx5 is a monothiol glutaredoxin of *S. cerevisiae* (a single cysteine at the active site) whose absence leads to high sensitivity to oxidative agents and to constitutive carbonylation of proteins (a parameter that meas-

* This work was supported in part by Grants GEN2001-4707-CO8-06 (to E. H.) and GEN2001-4707-CO8-07 from the Spanish Ministry of Science and Technology (to J. E. P.-O.) and by Grant 2001SGR00305 from the Generalitat de Catalunya (to E. H.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Recipient of a predoctoral grant from the Generalitat de Catalunya.
¶ To whom correspondence should be addressed: Dept. de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Rovira Roure 44, 25198-Lleida, Spain. Tel.: 34-973-702409; Fax: 34-973-702426; E-mail: enric.herrero@cmb.udl.es.

¹ The abbreviations used are: ROS, reactive oxygen species; KAPA, 7-keto 8-aminoperlarginic; *t*-BOOH, *t*-butyl hydroperoxide; MAP, mitogen-activated protein.

ures protein oxidation (10)) even in the absence of external oxidative injury (14). Accumulation of glutathionated proteins has also been observed in the absence of *Grx5* (15, 16). This monothiol glutaredoxin is located at the mitochondria, where it is involved in the formation of iron-sulfur clusters (17). As occurs with other proteins of the iron-sulfur assembly complex, lack of *Grx5* causes iron accumulation within the cell. This could be related to the observed constitutive protein oxidation due to the formation of high levels of ROS via the Fenton reaction (17). A $\Delta grx5$ mutant is therefore an appropriate model for studying the effect of continuous oxidative stress on gene expression. In this work, we carried out transcriptome analysis of the *Grx5*-defective mutant. The results show that under these conditions the expression program was significantly different from the transcription pattern described in response to external oxidants, the inhibition of respiratory genes being a relevant response.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and Growth Conditions—Wild type *S. cerevisiae* strain W303-1A (*MATa ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1*) was employed in this study. MML100 is a $\Delta grx5::kanMX4$ derivative of W303-1A (17). MML511 is an isogenic derivative of W303-1A that contains the $\Delta pet117::kanMX4$ disruption. It was constructed using the short flanking homology approach following PCR amplification of the *kanMX4* cassette (resistance for geneticin) from plasmid pFA6a-*kanMX4* with appropriate oligonucleotides (18). The resulting *PET117* deletion covers exactly from the initial to the stop codon. Disruption was confirmed by PCR analysis (18). The same strategy was employed for disruption of *YKL161C (MLP1)* in the W303-1A background, although in this case the *natMX4* marker cassette (resistance for nourseothricin) was used (19). The resulting $\Delta mlp1::natMX4$ strain (MML524) was crossed with the *MATa* $\Delta grx5::kanMX4$ mutant MML289 (17), and the double W303-1A $\Delta mlp1::natMX4$ $\Delta grx5::kanMX4$ mutant (MML533) was segregated. The W303-1A *aft1- Δ 5::URA3* (MML348) and W303-1A *yfh1::kanMX4* (MML298) strains have been described previously (17). Plasmid pMT15 is a derivative of the multicopy vector pCM189 (20) that contains *HAP4* under the control of the doxycycline-regulated *tetO₇* promoter.

Cells were generally grown in rich YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 30 °C. In some experiments 3% glycerol was used instead of glucose (YPGly medium). Synthetic complete medium (SC) contains 0.67% yeast nitrogen base (Difco), 2% glucose, and the amino acids and nitrogen base additions indicated in Ref. 21. In some experiments, SC medium was prepared by adding the individual components at the standard concentrations, with the exception of biotin, which was included at the indicated final concentrations.

Array Hybridizations and Data Analyses—Experiments representing a particular situation were independently carried out in triplicate. Total RNA from W303-1A wild type strain and the $\Delta grx5$ and $\Delta pet117$ mutants was used to obtain labeled cDNA. About 30–40 μ g of RNA were retrotranscribed into cDNA by adding 200 units of RT polymerase SuperScript II (Invitrogen), 500 ng of oligo(dT) primer (5'-T₁₅VN-3'), 1 μ l of RNaseOUT (Invitrogen), 6 μ l of 5 \times First Strand Buffer (Invitrogen), 1.5 μ l of dNTP mix (16 mM dATP, dTTP, dGTP, and 100 μ M dCTP), and 5 μ l of [³²P]dCTP (10 mCi/ml) in a final reaction volume of 30 μ l. Labeling reaction was allowed for 1 h at 43 °C. One microliter of EDTA 0.5 M was added to stop the reaction. The labeled sample was purified using an S300-HR MicroSpin column (Amersham Biosciences).

Macroarrays were made in nylon membranes containing PCR products representing full-length open reading frames for 6,049 genes of *S. cerevisiae*. They were prepared at the Servicio de Chips de DNA of the University of Valencia. After pre-hybridizing nylon membranes for 1 h in 5 \times SSC, 5 \times Denhardt's, 0.5% SDS, hybridizations were performed using the same solution containing labeled cDNA (3.5 \times 10⁶ dpm/ml) for 16–18 h. After hybridization, the filters were washed once in 2 \times SSC, 0.1% SDS for 30 min, and twice in 0.2 \times SSC, 0.1% SDS for 30 min. They were exposed to an imaging plate (BAS-MP, Fujifilm) for 24 h and read in a PhosphorImager (FLA-3000, Fujifilm) at 50 μ m resolution.

The images were quantified by using ArrayVision 7.0 software (Imaging Research, Inc.). Each mutant replicate was normalized against the corresponding wild type hybridized in the same membrane (to eliminate the membrane variability factor) following the Lowess method. Reproducibility of the replicates was tested by the ArrayStat software (Imaging Research, Inc.). The data were considered as inde-

pendent, and the program was allowed to take a minimum number of two valid replicates in order to calculate mean values for every gene. Only one of the three replicates was allowed to be removed from further calculations. A Z test for independent data was applied in order to detect differences in individual gene expression between each mutant and the wild type. Then a Z score was obtained for every gene. A *p* value of 0.05 and the False Discovery Rate method were used to monitor the overall false positive error rate. Genes that changed at least two times in the mutant with respect to the wild type strain were considered for further analyses and discussion.

Detailed macroarray data reported in this work were deposited at the GEO data base (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) with accession numbers GSM13717, GSM13719, GSM13722, GSM13727, GSM729, GSM13730, GSM13732, GSM13733, and GSM13734.

Data Base Analyses—Data on the expression of individual genes from global genome analyses were obtained from the Yeast Microarray Global Viewer (yMGV, transcriptome.ens.fr/ymgv). Analysis of genes whose expression is modulated throughout the cell cycle (22) was carried out with the Saccharomyces Genome Data base (genome-www.stanford.edu).

Northern Blot Studies—RNA electrophoresis, probe labeling with digoxigenin, hybridization, and signal detection was carried out as described previously (20). Signals were quantified using the Lumi-Imager equipment (Roche Applied Science) software. Gene probes were generated from genomic DNA by PCR, using oligonucleotides designed to amplify internal open reading frame regions.

Sensitivity Tests—Exponential cultures in YPD medium at 30 °C (about 2 \times 10⁷ cells per ml) were serially diluted (5-fold dilution factor), and 2 μ l drops of each dilution were spotted onto YPD plates containing inhibitory agents at various concentrations. Growth was tested after 3 days of incubation at 30 °C. In parallel, growth was also recorded in YPD plates without an inhibitor after incubation in the same conditions.

Protein Carbonylation Analyses—Protein carbonyl groups in cell extracts were derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine. This was followed by SDS-PAGE and the immunodetection of peptides using an anti-dinitrophenylhydrazone antibody, according to Ref. 10.

RESULTS

Wild type and isogenic $\Delta grx5$ cells were grown exponentially in rich YPD medium at 30 °C. Transcriptome analyses were carried out in three independent experiments in these growth conditions for each of the strains. Table I lists the genes that showed expression levels in $\Delta grx5$ cells that were at least twice as high as in wild type cells. Table II shows the genes whose expression levels in $\Delta grx5$ cells were at least 50% lower than the expression levels in wild type cells. Cells lacking *GRX5* exhibit a ρ^- petite phenotype, that is they do not grow under respiratory conditions (17). It has also been shown that *S. cerevisiae* mitochondrial DNA ρ^o mutants have an altered expression profile (23). As expression pattern for $\Delta grx5$ cells could have been influenced by their petite defects, we carried out a parallel transcriptome analysis of $\Delta pet117$ cells with the same W303-1A genetic background. The total number of genes either up or down-regulated in the $\Delta grx5$ mutant was considerably lower than in the $\Delta pet117$ cells. This is clearly seen in Fig. 1A, where points are more widely distributed along the *x* axis ($\Delta pet117$ relative profile) than along the *y* axis ($\Delta grx5$ profile). Both Tables I and II indicate the genes affected in $\Delta grx5$ cells that were up- or down-regulated, respectively, in $\Delta pet117$ with respect to wild type cells. The proportion of these genes was very low in both cases, and we can therefore conclude that the transcriptome profile of *Grx5*-deficient cells was not significantly influenced by the petite character of the mutant. As revealed by fluorescence-activated cell sorter analysis,² the $\Delta grx5$ mutant accumulated a large proportion of cells at the G₁ stage of the cell cycle. This fact could have influenced the expression profile of those genes whose expression changed throughout the cell cycle (22). However, the proportion of these cell cycle-dependent genes whose expression is up- or down-

² M. A. de la Torre, G. Bellí, and E. Herrero, unpublished data.

TABLE I
Genes induced in $\Delta grx5$ cells

Values are averages for three independent experiments. Genes in boldface type were not induced by hydrogen peroxide, menadione, or diamide treatment in experiments reported in Refs. 2 and 3. Induction was considered to exist only when at least two consecutive time points gave significantly increased levels under the experimental conditions employed in these studies.

Gene	Induction fold	Function/characteristics	$\Delta yfh1^a$	Atf1-dependent ^b	Cell cycle ^c
Ion homeostasis					
<i>FIT3</i>	52.2	Siderochrome transport	+	+	M
<i>ARN2</i>	10.4	Siderochrome transport	+	+	
<i>FRE3</i>	10.2	Ferric chelate reductase	+	+	
<i>FIT1</i>	7.9	Siderochrome transport	+	+	
<i>ARN1</i>	7.3	Siderochrome transport	+	+	
<i>FIT2</i>	6.0	Siderochrome transport	+	+	
<i>FTR1</i> ^{*d}	5.4	Iron ion transport	+	+	M
<i>SIT1</i>	3.8	Siderophore transport	+	+	M
<i>PCA1</i>	3.2	Copper ion homeostasis			
<i>FTH1</i>	3.0	Ftr1 homologue	+	+	
<i>HMX1</i>	2.9	Heme oxygenase, iron homeostasis	+	+	
<i>CCC2</i>	2.8	Copper ion transport	+	+	
<i>CTR2</i>	2.3	Copper ion transport	+		
<i>ATX2</i>	2.2	Manganese ion homeostasis	+		
<i>CUP1-1</i>	2.1	Copper ion binding			
Transport					
<i>MUP3</i> [*]	8.1	Methionine permease	+		
<i>AUS1</i>	4.1	Sterol transport			
<i>VHT1</i>	3.4	Biotin transporter		+	M
<i>HXT2</i>	2.1	Hexose transporter			
Biosynthesis					
<i>BIO5</i>	7.3	Biotin biosynthesis		+	
<i>SNZ1</i>	3.0	Vitamin B ₆ biosynthesis			
<i>THI21</i>	2.9	Thiamine biosynthesis			
<i>NCP1</i>	2.7	NADP-cytochrome P450 reductase, ergosterol biosynthesis			
<i>ADE16</i>	2.2	Purine biosynthesis			
<i>CYS3</i>	2.2	Cysteine biosynthesis			
Carbon and lipid catabolism					
<i>AMS1</i>	3.5	Vacuolar α -mannosidase			
<i>IDH2</i>	2.5	Isocitrate dehydrogenase subunit II			
<i>IDH1</i>	2.4	Isocitrate dehydrogenase subunit I			M
<i>OLE1</i>	2.3	Stearoyl-CoA desaturase			M/G ₁
<i>PDA1</i>	2.2	Pyruvate dehydrogenase			
Mitochondrial biogenesis and functions					
<i>MRS4</i>	3.4	Mitochondrial carrier protein			
<i>ISU1</i>	3.3	Iron-sulfur cluster assembly	+	+	
<i>MMT2</i>	2.2	Mitochondrial iron transport			
Protein targeting					
<i>AKR1</i>	2.6	Palmitoyltransferase, endocytosis	+		
<i>PMT3</i>	2.2	Dolichyl-phosphate-mannose protein mannosyltransferase			G ₁
<i>SEC61</i>	2.2	Protein transporter			
<i>STV1</i>	2.2	Hydrogen-transporting ATPase, Golgi apparatus			
Protein degradation					
<i>LAP4</i>	3.0	Aminopeptidase I	+		G ₁
<i>UBC8</i>	2.4	Ubiquitin-conjugating enzyme			
<i>PRE2</i>	2.4	Proteasome endopeptidase			
<i>PRB1</i>	2.3	Serine-type endopeptidase	+		S
Stress responses					
<i>HSP26</i>	8.5	Heat shock protein			S
<i>SLT2</i>	2.1	PKC-dependent MAP kinase			
Cell wall					
<i>TIR3</i>	8.3	Mannoprotein, cold shock-induced			M
<i>TIR1</i>	6.4	Mannoprotein, cold shock-induced			
<i>TIR2</i>	3.2	Mannoprotein, cold shock-induced			
<i>GSC2</i>	2.8	β -1,3 Glucan biosynthesis			
Others					
<i>APG16</i> [*]	14.8	Autophagy			
<i>ENT4</i>	2.7	Cytoskeletal adaptor			
Unknown function					
<i>DAN1</i>	15.0	Induced under anaerobic conditions			
<i>YKL161C</i>	11.0	Strong similarity to Slt2			
<i>PAU7</i>	8.7	Member of the seripauperin protein/gene family			
<i>YHL035C</i>	7.4				
<i>YDR476C</i>	7.0				
<i>YOL161C</i>	6.9				
<i>YPL272C</i>	5.9				
<i>LSB3</i> [*]	5.4				
<i>YPR076W</i> [*]	5.4				
<i>YMR325W</i>	5.3				
<i>PRY1</i>	5.2				M
<i>YGL039W</i>	5.2	Dihydrokaempferol 4-reductase			
<i>PAU1</i>	5.1	Member of the seripauperin protein/gene family			

TABLE I—continued

Gene	Induction fold	Function/characteristics	$\Delta yfh1^a$	Aft1-dependent ^b
<i>TIS11</i>	5.1		+	+
<i>PAU3</i>	4.9	Member of the seripauperin protein/gene family		
<i>YBR047W</i>	4.9			
<i>PAU6</i>	4.7	Member of the seripauperin protein/gene family		
<i>YIR041W</i>	4.5			
<i>PAU2</i>	4.4	Member of the seripauperin protein/gene family		
<i>YPR039W*</i>	4.3			
<i>YFR024C</i>	4.2			
<i>YGR294W</i>	4.1			
<i>YGL261C</i>	4.0			
<i>PAU5</i>	3.8	Member of the seripauperin protein/gene family		
<i>YHL046C</i>	3.7			
<i>YKR104W</i>	3.6			
<i>NFT1</i>	3.6	Putative ABC transporter		
<i>YOR394W</i>	3.6			
<i>YNL190W</i>	3.6			
<i>YIL176C</i>	3.6			
<i>YGR160W</i>	3.4			
<i>YKL162C*</i>	3.3			
<i>YDR271C</i>	3.2			
<i>YLL064C</i>	3.2			
<i>YDR319C</i>	3.1			
<i>YOL087C</i>	3.0			
<i>PRM4</i>	3.0	Pheromone-regulated membrane protein		
<i>YMR041C</i>	2.7			
<i>YHR199C</i>	2.6			
<i>YOR389W</i>	2.4			
<i>YGR160W</i>	2.4			
<i>YOR385W</i>	2.3			
<i>YNL208W</i>	2.3			
<i>YCL027C</i>	2.2			
<i>YPL278C</i>	2.1			
<i>YPR090W</i>	2.1			
<i>NOG1</i>	2.1	Nucleolar GTPase		
<i>YKL224C</i>	2.0			
<i>DAN3</i>	2.0	Putative cell wall protein		
<i>SNA3</i>	2.0			

^a Genes up-regulated in a $\Delta yfh1$ mutant (data from Ref. 27) are marked with a +.

^b Genes whose expression is Aft1-dependent are marked with a +.

^c For genes with a cell cycle-dependent expression (22), the stage with the greatest expression is indicated.

^d Asterisks indicate genes up-regulated in a $\Delta pet117$ -defective mutant.

regulated in the $\Delta grx5$ cells was low (Tables I and II), and overall, this did not significantly affect the analyses.

Overexpressed Genes in $\Delta grx5$ Cells—A total of 99 genes showed at least 2-fold induction of expression in cells lacking Grx5 as opposed to wild type cells (Table I). For some of these genes, the results were confirmed by Northern analysis (Fig. 2A). A group of genes implicated in ion homeostasis, especially in iron and copper transport, was induced in $\Delta grx5$ cells. Most of these genes were controlled by the transcriptional activator Aft1, which responds to iron deprivation by inducing the expression of genes coding for plasma membrane metalloredutases (*FRE1–3*), the multicopper ferroxidase (*FET3*), the iron permease (*FTR1*), copper ion transporters (*ATX1*, *CCC2*), components of the siderophore-iron uptake system (*ARN1–4*), cell wall-associated facilitators of iron uptake (*FIT1–3*), and heme oxygenase (*HMX1*) (24–29). Most of these genes are also up-regulated in a yeast $\Delta yfh1$ mutant, which lacks the yeast homologue of human frataxin (27). Absence of frataxin causes mitochondrial accumulation of iron in a form that is not available to the cells (30), and this probably signals the activation of Aft1 (27). We had shown previously that disruption of iron-sulfur cluster assembly through Grx5 inactivation also caused iron accumulation (17), and the results presented in Table I support the idea that this iron pool is also in a form that is not available to the cell.

Two genes associated with biotin transport were up-regulated in Grx5-deficient cells, *VHT1* and *BIO5*. *VHT1* has been characterized as coding for a plasma membrane high affinity biotin transporter, and its expression is repressed in media

with high biotin levels (31). It has been reported recently (29) that this gene is an Aft1 target. This suggests that its up-regulation in $\Delta grx5$ cells could also be a consequence of iron deficiency in these cells. More intriguing is the up-regulation of the *BIO5* gene (Table I and Fig. 2A). *S. cerevisiae* cells require an external source of biotin as they lack the first enzyme of the pathway that converts pimelic acid into biotin (32). However, they are able to grow on the biotin vitamers 7-keto 8-aminoperlarginic acid (KAPA), 7,8-diaminoperlarginic acid, and dethiobiotin, which are sequential intermediates in the pathway that leads to biotin (32). The last enzyme in the pathway (biotin synthase) converts dethiobiotin into biotin and is the product of *BIO2* in *S. cerevisiae*. This enzyme contains iron/sulfur centers (33, 34), and its activity therefore would be very low in $\Delta grx5$ cells. We have observed that $\Delta grx5$ cell growth was no more dependent on biotin concentration in the SC medium than growth of wild type cells under the same conditions (data not shown). This seems to dissociate the absence of an active Bio2 protein from biotin requirement and is in accordance with the fact that in laboratory growth conditions biotin precursors are not able to substitute for biotin. The *BIO5* product has been characterized as the transporter of KAPA, which is a vitamer that is probably not present in either natural or laboratory yeast cell growth media (32). We examined whether *BIO5* expression was also dependent on biotin levels in the growth medium, as in the case of *VHT1*. However, this was not the case (Fig. 2B). On the other hand, *BIO5* expression was up-regulated upon iron chelation by ferrozine, similarly to the well known Aft1-dependent gene *FET3* (Fig. 2C). This up-regulation

TABLE II
Genes repressed in $\Delta grx5$ cells

Values are averages for three independent experiments. Genes in boldface type were not repressed by hydrogen peroxide, menadione, or diamide treatment in experiments reported in Ref. 2 and 3. Repression was only considered when at least two consecutive time points gave significantly reduced levels under the experimental conditions employed in these studies.

Gene	Change	Function/characteristics	Cell cycle ^a
Ion homeostasis			
YFH1	3.3	Frataxin, iron homeostasis	
CCC1	3.3	Fe, Ca, and Mn ion homeostasis	
Biosynthesis			
<i>CYB5</i>	7.7	Sterol biosynthesis	M
<i>GLT1</i>	7.4	Glutamate synthase	
<i>ILV3</i>	4.7	Isoleucine and valine biosynthesis	
<i>DPH2</i>	3.2	Diphthamide biosynthesis	
<i>LYS4</i>	2.6	Lysine biosynthesis	
<i>ERG11</i>	2.0	Sterol metabolism	
Carbon and lipid catabolism			
<i>DLA1</i>	2.8	D-Lactate dehydrogenase	
<i>PDC5</i>	2.1	Pyruvate decarboxylase	
Mitochondrial biogenesis and functions			
MEF2	25.0	Mitochondrial translation elongation factor	
<i>CYC1^{b*}</i>	9.6	Cytochrome <i>c</i> isoform 1	
<i>CYT1</i>	7.0	Electron transporter	G ₂
QCR10	6.7	Ubiquinol-cytochrome <i>c</i> oxidoreductase subunit	
MHR1	6.2	Mitochondrial transcription regulator	
RIP1	5.9	Ubiquinol-cytochrome <i>c</i> reductase	
COX7	5.7	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit	
QCR8	5.0	Ubiquinol-cytochrome <i>c</i> oxidoreductase subunit	
NDI1	4.2	NADH dehydrogenase	M
COX6	3.8	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit	
SDH4	3.3	Succinate dehydrogenase	
QCR7	3.7	Ubiquinol-cytochrome <i>c</i> oxidoreductase subunit	
QCR6	3.1	Ubiquinol-cytochrome <i>c</i> oxidoreductase subunit	
COX5A^b	3.1	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit	
QCR9	2.9	Ubiquinol-cytochrome <i>c</i> oxidoreductase subunit	
COX13	2.7	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit	
COX12	2.6	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit	
COX9	2.5	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit	
OAC1	2.4	Oxalacetate carrier activity	
COX17[*]	2.3	Cytochrome <i>c</i> oxidase assembly	
Cell cycle and mating			
<i>AGA2</i>	3.5	α -Agglutinin subunit	M/G ₁
<i>APC5</i>	3.4	Subunit of anaphase-promoting complex	
MAD1[*]	2.9	Mitotic spindle checkpoint	
<i>TEC1</i>	2.8	Transcription factor involved in M/G ₁ pseudohyphal growth	
<i>BAR1</i>	2.6	α -factor protease	
BUB1	2.6	Mitotic spindle checkpoint	G ₁
MOB2	2.4	Establishment of cell polarity	
Stress responses			
<i>GRX4</i>	4.8	Glutaredoxin, oxidative stress response	
<i>PHO5</i>	3.0	Acid phosphatase, response to M phosphate starvation	
Others			
<i>PDR15[*]</i>	3.4	ABC transporter involved in multidrug resistance	
<i>MLP2[*]</i>	3.4	Nuclear protein targeting	
CWP2	3.1	Cell wall organization	G ₂
<i>PHO3</i>	2.6	Acid phosphatase, thiamine uptake	M
<i>BAT1</i>	2.6	Branched chain amino acid degradation	G ₂
<i>GAP1</i>	2.4	General amino acid transport	
<i>PHO12</i>	2.1	Acid phosphatase	
Unknown function			
<i>YDR316W[*]</i>	4.2		
YER182W[*]	3.8		
<i>YER156C[*]</i>	3.7		
<i>YJL200C</i>	3.1		
<i>KRR1[*]</i>	3.0		
CTH1	3.0		
YEL033W	2.9		
<i>YJL018W</i>	2.9		
<i>YMR102c[*]</i>	2.9		
ABM1	2.8		
<i>YAL046C</i>	2.7		
YNL144C[*]	2.7		
<i>YPL146C[*]</i>	2.7		
<i>YBR028C</i>	2.6		
<i>YLR198C</i>	2.5		
<i>YOL109W</i>	2.5		
<i>YHR045W</i>	2.4		
<i>YBR025C</i>	2.1		

^a For genes with a cell cycle-dependent expression (22), the stage with the greatest expression is indicated.

^b Genes repressed in a $\Delta yfh1$ mutant (data from Ref. 27).

^c Asterisks indicate genes down-regulated in a $\Delta pet117$ -defective mutant.

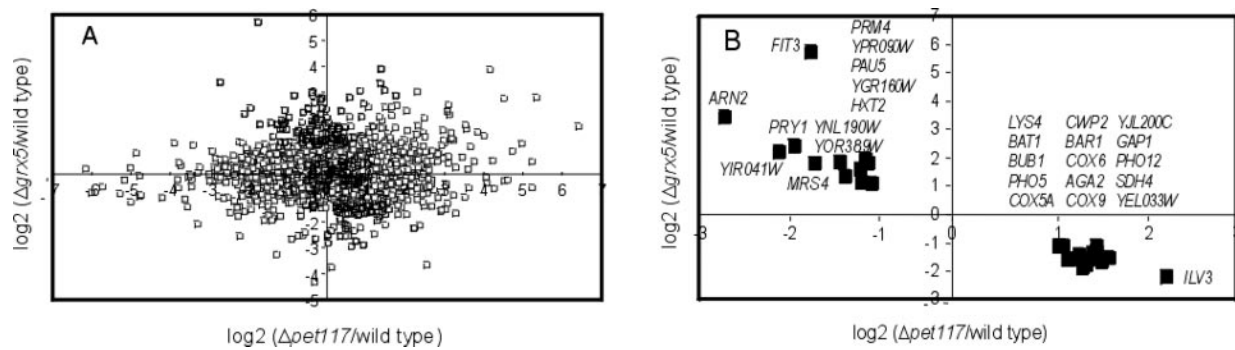


FIG. 1. **Comparative expression of *S. cerevisiae* genes in $\Delta grx5$ and $\Delta pet117$ cells.** A, expression of each individual gene (marked by a square) in $\Delta grx5$ cells (MML100) in relation to its expression in $\Delta pet117$ cells. Values result from normalizing the expression level of the gene in the respective mutant by its expression in wild type cells (\log_2 of the ratio). B, genes whose relative expression was significantly modified in divergent ways in $\Delta grx5$ and $\Delta pet117$ mutants. Only induction and repression ratios (mutant versus wild type) of two or more were considered significant.

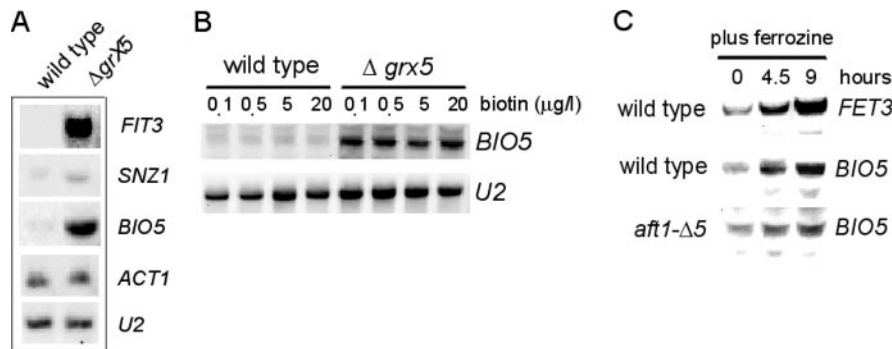


FIG. 2. **Representative genes up-regulated in $\Delta grx5$ cells relative to wild type cells.** A, Northern blot analysis of some of the genes that were induced (Table I) in the $\Delta grx5$ mutant (strain MML100) relative to wild type cells (W303-1A). The small nuclear U2 mRNA served as a loading control, and *ACT1* is representative of genes whose expression did not vary in the mutant. Samples were taken from exponential cultures in YPD medium at 30 °C. B, Northern blot analysis of *BIO5* expression in exponential cultures of wild type and $\Delta grx5$ cells in SC medium at 30 °C, with biotin at the indicated concentrations. C, Northern blot analysis of *FET3* and *BIO5* expression in wild type (W303-1A) and *aft1- $\Delta 5$* (MML348) cells. Samples were obtained from exponential cultures in YPD medium at 30 °C; ferrozine was added at 2 mM final concentration at time 0. Same amounts of RNA were loaded per lane, as determined by small nuclear U2 mRNA analysis (not shown).

did not occur in a null *aft1* mutant (Fig. 2C), which is consistent with the recent demonstration that *BIO5* is overexpressed in an *aft1^{up}* strain (35). Therefore, *BIO5* could be a member of the Aft1 regulon, although the fact that the *BIO5* promoter does not contain consensus Aft1-binding sites (35) could indicate that the relationship between *BIO5* expression and Aft1 is indirect. Nevertheless, these results confirm the previous suggestion (29) that biotin synthesis and transport are related to iron metabolism in yeast cells.

SNZ1 transcription was increased in $\Delta grx5$ cells (Table I and Fig. 2A). This gene is involved in vitamin B₆ (pyridoxine) biosynthesis and has orthologues in various prokaryotes and eukaryotes (36). Its up-regulation in the absence of Grx5 (from almost undetectable levels in wild type cells) could be related to the proposed effect of pyridoxine as a quencher of singlet oxygen (37). This hypothesis is supported by the fact that yeast *snz* mutants are hypersensitive to the singlet oxygen generator methylene blue (38).

YKL161C (*MLP1*) is one of the genes that showed highest relative induction fold in $\Delta grx5$ cells (Table I). The Mlp1 protein is homologous to the Slt2 (Mpk1) MAP kinase, although it lacks the conserved active site of MAP kinases (39). Overexpression of *MLP1* suppresses the caffeine sensitivity phenotype of a *bck1* mutant in the signal transduction pathway leading to Slt2, whereas a null *mlp1* mutant has additive effects on caffeine sensitivity when combined with a *slt2* mutation (39). However, a single null *mlp1* mutant does not show apparent phenotype. These observations suggest that Mlp1 acts in a pathway parallel to the Slt2 pathway in the regulation of downstream targets involved in cell integrity such as Rlm1

(40). On the basis that the *grx5* mutant overexpresses *MLP1*, we reasoned that the absence of the latter could enhance defects in cells lacking *GRX5*. The double $\Delta grx5 \Delta mlp1$ mutant (strain MML533) was no more sensitive to caffeine, to the cell wall inhibitor calcofluor white, or to heat shock (growth at 38 °C) than either the single $\Delta mlp1$ mutant or the wild type cells (not shown). The latter are phenotypic defects characteristic of cells where the Slt2 MAP kinase pathway is affected. However, the double mutant was more sensitive than the single $\Delta grx5$ mutant to *t*-BOOH and menadione (Fig. 3A). The *MLP1* function could therefore play a protective role against oxidative stress in $\Delta grx5$ cells. Most important, hypersensitivity to external oxidants was not observed in the single $\Delta mlp1$ mutant (Fig. 3A). We then tried to correlate sensitivity to oxidants with protein oxidation for the different genetic backgrounds. Carbonylation of protein residues (see "Experimental Procedures" for determination) was used as a measure of protein oxidation (10, 14). As expected from previous studies (14), under normal growth conditions $\Delta grx5$ cells contained more carbonyl groups in proteins than wild type cells. In contrast, $\Delta mlp1$ cells exhibited even fewer carbonyl groups in total protein extracts than wild type cells (Fig. 3B). Protein carbonylation in the double $\Delta grx5 \Delta mlp1$ mutant was slightly higher than in the single $\Delta grx5$ mutant (Fig. 3B). When total carbonyl groups were quantified (10, 14), the double mutant consistently gave values about 30% higher than $\Delta grx5$ cells. These differences were much larger after treatment with *t*-BOOH; under these conditions we observed an additive effect between the two mutations on protein carbonyl content (Fig. 3B). It is also interesting that protein oxidation in the treated single $\Delta mlp1$

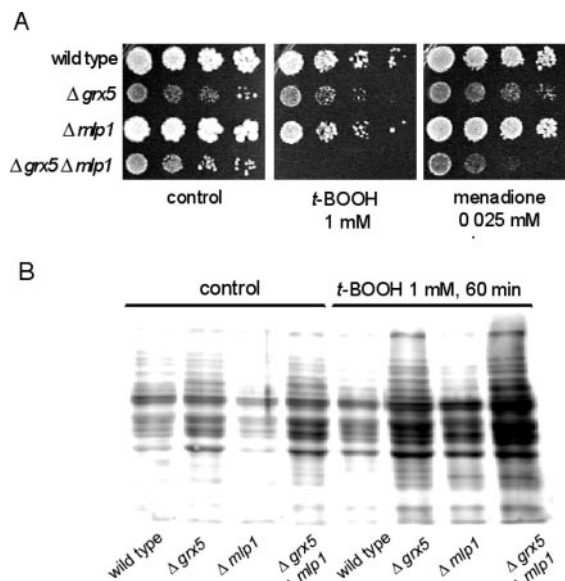


FIG. 3. Sensitivity of null mutants in the *GRX5* and *MLP1* genes to oxidative stress. *A*, wild type (W303-1A), $\Delta grx5$ (MML100), $\Delta mlp1$ (MML524), and $\Delta grx5 \Delta mlp1$ (MML533) cells were tested for sensitivity to *t*-BOOH or menadione, on YPD plates containing the oxidative agent at the indicated concentration. *B*, protein oxidative damage in the indicated strains, as measured by the presence of side carbonyl groups. Total protein extracts were obtained from untreated or *t*-BOOH-treated cultures and analyzed by Western blot (20 mg of total protein per lane) using antibodies against anti-2,4-dinitrophenylhydrazones (10).

mutant was greater than in wild type cells but less than in $\Delta grx5$ -treated cells. Altogether these results support the protective role of *MLP1* against external oxidants, particularly when the *Grx5* function is absent.

Genes of the *Yap1* and *Msn2/4* Regulons Were Not Constitutively Induced in the Absence of *Grx5*—In yeast, oxidative stress by external agents such as hydrogen peroxide, menadione, or diamide causes up-regulation of genes involved in glutathione and thioredoxin-based defense and repair systems against oxidative damage, and also of other antioxidants such as superoxide dismutases and catalases (see Ref. 6 for details). This induction is regulated by one or several of the transcriptional factors *Msn2/4*, *Yap1*, and *Skn7*. None of the above genes appeared to be up-regulated in the experiments shown in Table I for $\Delta grx5$ cells. We confirmed these results by Northern blot analysis for a number of genes that are known to be up-regulated by external oxidants: *DDR2* (41), *GSH1* (42), *HSP12* (43), *CTT1* (41), *TRX2* (44), and *TRR1* (5). Basal expression in $\Delta grx5$ cells did not differ significantly from wild type cells in any of these cases (Fig. 4A). However, the *Yap1* and *Msn2/4* regulatory systems remained functional in the mutant, because *GSH1* (whose induction by oxidants is *Yap1*-dependent (5, 42)) and *DDR2* (*Msn2/4*-dependent (7)³) were inducible by menadione in wild type and $\Delta grx5$ cells (Fig. 4B).

Repressed Genes in $\Delta grx5$ Cells—A total of 64 genes had an expression level in $\Delta grx5$ cells that was 50% or less with respect to wild type cells (Table II). Thirty four of these genes were also down-regulated by external oxidants, as shown in Refs. 2 and 3. This confirmed that the $\Delta grx5$ cells were subjected to metabolic oxidative stress. However, the remaining 30 genes in Table I were specifically down-regulated in the mutant. These included the *YFH1* frataxin gene. Decreased expression of the latter was confirmed by Northern blot analysis (Fig. 5). Twenty of the down-regulated genes were nuclear genes involved in mito-

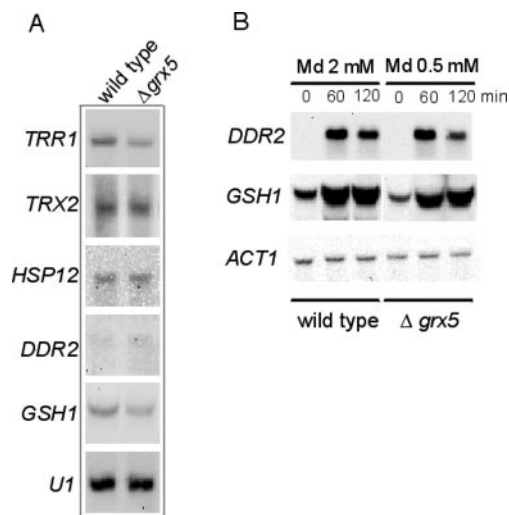


FIG. 4. Expression of oxidative stress-inducible genes in a $\Delta grx5$ genetic background. *A*, Northern blot analysis of the indicated genes in exponentially growing wild type (W303-1A) and $\Delta grx5$ (MML100) cells in YPD medium. Small nuclear U1 mRNA was included as a loading control. *B*, induction of *DDR2* and *GSH1* expression by menadione (*Md*) at the indicated concentrations, in wild type and $\Delta grx5$ cells growing exponentially in YPD medium. The expression of a non-inducible gene (*ACT1*) is also shown.

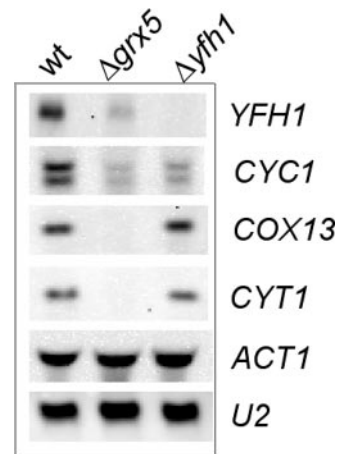


FIG. 5. Representative genes down-regulated in $\Delta grx5$ cells relative to wild type (*wt*) cells. Northern blot analysis of some of the genes that were repressed (Table I) in the $\Delta grx5$ mutant (strain MML100) relative to wild type cells (W303-1A). Expression in the $\Delta yfh1$ mutant MML298 is shown in parallel. The small nuclear U2 mRNA served as a loading control, and *ACT1* is representative of genes whose expression did not vary in the mutant. Samples were taken from exponential cultures in YPD medium at 30 °C.

chondrial functions, mostly in respiration (Table II). Among these, we confirmed the down-regulation of *CYC1*, *COX13*, and *CYT1* in the $\Delta grx5$ cells by Northern blot analysis. Of the three genes, only *CYC1* was also down-regulated in the $\Delta yfh1$ mutant, although to a lesser extent than in the $\Delta grx5$ mutant (Fig. 5). This confirms the results described in Ref. 27. It has been reported that petite cells display decreased expression of a number of genes related to mitochondria (23). However, none of the genes reported in that study were among the genes down-regulated in the present work. Only three of the mitochondrial function genes in Table II (*CYC1*, *COX5A*, and *COX17*) displayed decreased expression in the $\Delta pet117$ mutant. We therefore concluded that for most of these mitochondrial function genes, the decreased expression in the null *grx5* mutant is not due to the petite character of the latter. It can be deduced that this is a specific response of genes involved in respiration and other mitochondrial energy metabolism functions caused by

³ G. Bellí and E. Herrero, unpublished observations.

TABLE III
Expression of $\Delta grx5$ -repressed genes involved in mitochondrial functions under respiratory conditions

Gene	Post-diauxic phase ^a	Hap4 overexpression ^b
<i>COX5A</i>	+ ^c	
<i>COX6</i>	+	+
<i>COX9</i>	+	+
<i>COX13</i>	+	
<i>COX17</i>		+
<i>CYC1</i>	+	+
<i>CYT1</i>	+	+
<i>NDI1</i>	+	+
<i>QCR6</i>	+	+
<i>QCR7</i>	+	
<i>QCR9</i>		+
<i>QCR10</i>		+
<i>RIP1</i>	+	+
<i>SDH4</i>	+	+
<i>YDR316W</i>		+
<i>YER182W</i>		+

^a Data from Ref. 11.

^b Data from Ref. 12.

^c + denotes significant induction under the experimental conditions reported.

the continuous generation of ROS in *Grx5*-deficient cells. Hap4 is a transcriptional factor that up-regulates *S. cerevisiae* respiratory functions and that is important in the shift from fermentative to respiratory metabolism, which occurs at the diauxic shift (12, 45). We analyzed previous reports (11, 12) to determine whether there were any changes in the expression pattern of mitochondrial function genes down-regulated in $\Delta grx5$ cells during the diauxic shift (11) or after overexpression of Hap4 (12). In fact, the expression of 16 of these genes is up-regulated after the diauxic shift and/or by Hap4 overexpression (Table III). Two of the unknown function open reading frames (*YDR316W* and *YER182W*) showing strong down-regulation in $\Delta grx5$ cells (Table II) are also Hap4-dependent (12).

We studied the expression of one of these genes, *CYC1*, in conditions in which *HAP4* was overexpressed in order to demonstrate that down-regulation of Hap4-dependent genes in cells deficient in *Grx5* was not indirect. As expected from previous studies (46), overexpressing *HAP4* in wild type cells led to an increased expression of *CYC1* (Fig. 6A). Under the same conditions, $\Delta grx5$ cells expressed *CYC1* at almost the same level (only 20% reduction) as the wild type cells, contrasting significantly with the situation in non-overexpression conditions (which experienced a 3-fold reduction) (Fig. 6A). This confirmed that the observed down-regulation of Hap4-dependent genes occurred as a direct consequence of the absence of *Grx5*.

Based on the hypothesis that down-regulation of respiratory genes is a response to the continuous oxidation of cell molecules that occurs in the absence of *Grx5*, it would be expected that a shift to respiratory metabolism by *HAP4* overexpression would have a negative effect on the physiology of $\Delta grx5$ cells. Although these cells have no functional respiratory chains due to defects in iron-sulfur cluster biogenesis (17), ROS could still be produced as a consequence of incomplete electron transfer. The overexpression of *HAP4* caused increased carbonylation of cell proteins even in a wild type background, although this effect was higher in $\Delta grx5$ cells (Fig. 6B). This confirmed that respiratory conditions are a source of ROS able to cause oxidative damage on proteins, and also that there are additive effects between the absence of *Grx5* activity and the increased expression of respiratory genes. In accordance with these observations, overexpression of *HAP4* in the $\Delta grx5$ mutant significantly lowered growth rate compared with mutant cells displaying normal levels of *HAP4* expression. In contrast, this effect of *HAP4* overexpression on cell growth was not observed

in wild type cells (Fig. 6C). Altogether, these observations support the biological significance of the observed down-regulation of respiratory genes in the absence of *Grx5*.

DISCUSSION

In this work we used a *Grx5*-deficient mutant as a model for yeast cells continuously subjected to moderate oxidative stress, in order to study the genes whose expression was significantly modified under these conditions. As the $\Delta grx5$ mutant exhibits a petite phenotype (17), we had to first distinguish between the genes whose modified expression was specifically due to the petite character of the cells and those genes affected by other physiological effects of the *grx5* mutation. Very few of the genes affected in the $\Delta pet117$ mutant were also affected in the $\Delta grx5$ mutant cells (Tables I and II). Furthermore, there was no overlap with the genes shown to be differentially expressed in ρ^o cells in a previous study (23). Therefore, most of the expression changes seen in $\Delta grx5$ cells do not seem to be due to the respiratory deficiencies in these cells. It is also interesting that a small set of genes displayed significantly altered expression in opposite ways when both mutants were compared (Fig. 1B). Most of the 12 genes that were up-regulated in $\Delta grx5$ cells and down-regulated in the petite mutant are of unknown function, although the group also included two genes (*FIT3* and *ARN2*) related to iron uptake. Of the 16 genes up-regulated in the $\Delta pet117$ mutant and down-regulated in the $\Delta grx5$ cells, four (*ILV3*, *LYS4*, *BATI*, and *GAP1*) are involved in amino acid metabolism and transport. This could be related to the fact that up to 32 genes involved in amino acid metabolism and transport were induced in the $\Delta pet117$ mutant. This is a situation that extends to genes for purine and pyrimidine biosynthesis (data not shown in detail). The up-regulation of genes in these functional categories was not observed in ρ^o cells (23).

A subset of the genes up-regulated in the absence of *Grx5* is also up-regulated in the frataxin *yfh1* mutant (27). These genes are regulated by the transcriptional activator Aft1. The latter responds to iron deprivation by regulating its nuclear localization and activating genes that participate in iron and copper utilization (24–29, 47). In this study we added *BIO5* to the list of genes that are regulated by Aft1 in a way that is dependent on iron concentration in the medium. This confirmed the previously reported relationship between biotin metabolism and iron assimilation (29). The up-regulation of Aft1-dependent genes in the yeast frataxin mutant was taken as evidence that the iron accumulating in the mitochondria of the mutant cells is in a non-metabolizable form, and that *yfh1* cells are therefore nutritionally depleted of iron (27). Similarly, iron accumulates intracellularly at abnormally high levels in the $\Delta grx5$ mutant (17), probably as a consequence of the disruption of the *Grx5* function in the iron-sulfur cluster assembly. The results shown here suggest that the accumulated iron in the *grx5* cells is not available for cell metabolism. There is, however, an alternative explanation, which is based on the fact that the *YFH1* gene was down-regulated in cells lacking *Grx5* (Table I and Fig. 5). This could make the $\Delta grx5$ cells phenotypically similar to a $\Delta yfh1$ mutant. In this case, iron accumulation in the $\Delta grx5$ mutant would not be a direct consequence of disruption of iron-sulfur cluster assembly but secondary to depletion of Yfh1 molecules. We, however, favor the first alternative, because iron accumulation is common to many mutants in genes involved in the assembly of iron-sulfur clusters (48). At this respect, recent studies indicate that the primary function of yeast frataxin is the synthesis of iron-sulfur clusters (49, 51) and heme groups (52). In order to carry out this function, Yfh1 would act as an iron chaperone and an iron store to provide Fe(II) (53) to the assembly complexes.

It has been reported that iron-mediated generation of ROS in

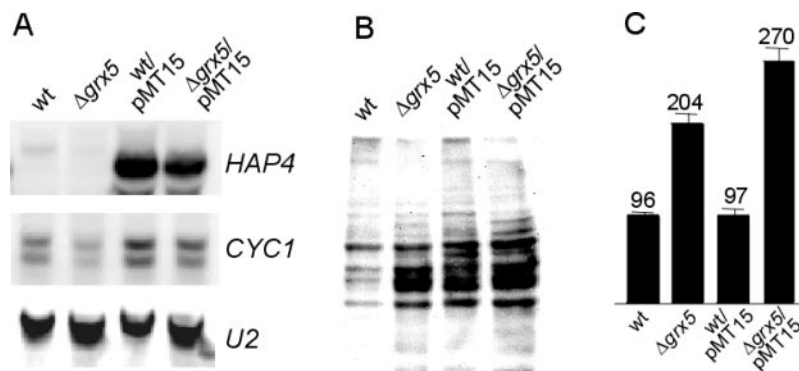


FIG. 6. Effect of *HAP4* overexpression in wild type (*wt*) and $\Delta grx5$ cells. Wild type (W303-1A) and $\Delta grx5$ (MML100) cells were transformed with plasmid pMT15 (that overexpresses *HAP4* under the *tet* promoter). Non-transformed and pMT15-transformed cells were grown in liquid SC medium at 30 °C. Samples were taken in exponential conditions. A, Northern blot analysis of *HAP4* and *CYC1* expression. Small nuclear U2 mRNA is shown as a loading control. B, carbonyl groups in total cell proteins, after Western blot analysis (20 μ g of total protein per lane). C, growth rates of the respective cultures (mean of three experiments). Values over bars indicate the optical density (at 600 nm) doubling times in minutes, in exponential growth conditions.

the yeast frataxin mutant causes nuclear DNA damage (54), although this does not lead to significant induction of DNA repair genes (27). Similarly, DNA damage could also occur in $\Delta grx5$ cells, where iron accumulation is not limited to the mitochondrial compartment (17). However, also in this case DNA repair genes are not up-regulated.

Two genes that could be related to protection against the oxidative stress generated in these conditions were up-regulated in the absence of Grx5. One of these is *SNZ1*, through its role in the biosynthesis of pyridoxine (36), a vitamin that acts as a protector against single oxygen (37). The second is *MLP1*, which codes for a homologue of the Slt2 MAP kinase (39). Slt2 plays a central role in the *S. cerevisiae* cell integrity pathway by activating at least two transcriptional factors, Rlm1 and SBF (55). These factors respond to stimuli that alter the integrity of the cell envelope by respectively activating the expression of cell wall biosynthesis genes and cell cycle genes (56, 57). However, genes that protect against oxidants do not appear to be targets of Rlm1 or SBF. Genetic interactions between *SLT2* and *MLP1* suggest the existence of some parallel functions between the two gene products (39), but the hypothetical targets for the Mlp1 function are unknown. Our results showed additivity between the $\Delta grx5$ and $\Delta mlp1$ mutants in their sensitivity to oxidants and in their levels of both constitutive and oxidant-induced protein carbonylation. This supports a functional relationship between Grx5 and Mlp1. The single $\Delta mlp1$ mutant was no more sensitive to oxidative stress than wild type cells. Therefore, the Mlp1 hypothetical protective role against oxidative stress was only manifested under the continuous stress conditions occurring in the absence of the Grx5 function. Transcriptome analysis of the *mlp1* mutant and of cells overexpressing *MLP1* could help to reveal more details about the role of Mlp1 relative to oxidative stress.

On the other hand, *Msn2/4*, *Yap1*, and *Skn7* regulon genes were not constitutively up-regulated in $\Delta grx5$ cells. This indicates that either the stress signal generated in the glutaredoxin mutant was not sufficient to activate the respective transcriptional activators, or that these were in fact only acting in response to instantaneously generated external signals and not to a sustained stress signal.

A significant number of genes whose expression was down-regulated in the $\Delta grx5$ background are Hap4-regulated. Hap4 is the activator component of a complex in which the Hap2/3/5 proteins also participate. These are necessary for binding of the complex to specific promoter sites. The Hap complex is required for expression of respiratory genes (58). Overexpression of Hap4 is sufficient to cause the shift from fermentative to res-

piratory metabolism, through induced expression of respiratory genes (12, 46). We have shown in the present work that overexpression of *HAP4* suppresses the down-regulation of the Hap4-dependent gene *CYC1* in $\Delta grx5$ cells. This supports the idea that expression of the respiratory genes is repressed in the mutant cells through the inhibition of Hap4 activity. Heme could initially be proposed as the mediator involved in the process. In fact, it is required for the activation of Hap4-dependent genes (29, 58). In $\Delta grx5$ cells, depletion of metabolically available iron and consequent up-regulation of the heme oxygenase gene *HMX1* (29) could lead to heme depletion and eventually to Hap4 inactivation. However, we have shown previously (17) that heme levels are not different in the $\Delta grx5$ cells with respect to wild type cells. Therefore, this points to additional factors being responsible for regulating the Hap complex activity under conditions of moderate continuous oxidative stress. Iron accumulation in the $\Delta grx5$ mutant is not limited to the mitochondria, and proteins from different cellular compartments are oxidized in this mutant (14, 17). Therefore, it is not necessary to hypothesize an oxidative damage signal transduction from mitochondria (the location of Grx5) to the nuclear Hap complex. Many aspects of the regulation of this complex remain to be elucidated, and other regulators besides heme seem to exist (58). Further studies are required to determine whether the oxidative signal acts directly on the Hap complex.

We have shown by macroarray and Northern analysis that a number of the respiratory genes that are down-regulated in the $\Delta grx5$ cells are not affected in the frataxin mutant, in accordance with previous studies (27). The *yfh1* mutant shows lower carbonylation of cellular proteins than the $\Delta grx5$ mutant.⁴ This adds support to the specificity of the Hap-related transcriptional response observed in the Grx5-deficient cells.

Based on the role of Grx5 in the biogenesis of iron-sulfur clusters, the respiratory deficiency of $\Delta grx5$ cells (17) could be initially explained by the absence of Rip1 activity. Rip1 is the iron-sulfur Rieske protein that is part of complex III in the yeast respiratory chain (59). *S. cerevisiae* cells have no respiratory complex I, which in mammalian cells also contains iron-sulfur proteins. In yeast, complex I is replaced by the mitochondrial inner membrane Ndi1 NADH-dehydrogenase (60, 61). In mammalian cells, both complex I and complex III are sources of ROS, whose production is enhanced by cytochrome oxidase inhibition (50, 62). It can therefore be hypothesized that incomplete respiratory chains in Grx5-deficient cells are a source of

⁴ G. Belli, M. M. Molina, and E. Herrero, unpublished observations.

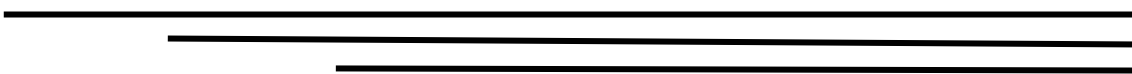
ROS with substrates such as NADH or succinate, unless all chain components are depleted, for instance through Hap4 inhibition. The situation observed in cells lacking Grx5, in which expression of the different components of the respiratory chain (including the *NDI1* gene) seems to be down-regulated through Hap4 activity, could be extrapolated to other situations in which ROS-mediated stress exists. This could be a general response to prevent respiratory production of ROS. Other models for metabolically generated continuous oxidative stress need to be tested to confirm this hypothesis.

Acknowledgments—We thank Lidia Piedrafita for excellent technical assistance and Maria Angeles de la Torre for discussions.

REFERENCES

- Storz, G., and Imlay, J. A. (1999) *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 188–194
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257
- Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S., and Young, R. A. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 323–337
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., and Labarre, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22480–22489
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16040–16046
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., and Azevedo, D. (2003) in *Topics in Current Genetics* (Hohmann, S., and Mager, P. W. H., eds) Vol. 1, pp. 241–303, Springer-Verlag, Berlin
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G. C. S., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. (1996) *EMBO J.* **15**, 2227–2235
- Schmitt, A. P., and McEntee, K. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5777–5782
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A. D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., and Toledano, M. B. (2002) *Mol. Microbiol.* **45**, 233–241
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27393–27398
- De Risi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997) *Science* **278**, 680–686
- Lascaris, R., Bussemaker, H. J., Boorsma, A., Piper, M., van der Spek, H., Grivell, L., and Blom, J. (2002) *Genome Biol.* **4**, R1–R10
- Trotter, E. W., and Grant, C. M. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 184–188
- Rodríguez-Manzanique, M. T., Ros, J., Cabiscol, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8180–8190
- Shenton, D., Perrone, G., Quinn, K. A., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16853–16859
- Shenton, E. W., and Grant, C. M. (2003) *Biochem. J.* **374**, 513–519
- Rodríguez-Manzanique, M. T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109–1121
- Wach, A., Brachet, A., Pöhlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* **13**, 1793–1808
- Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999) *Yeast* **15**, 1541–1553
- Bellí, G., Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 942–947
- Sherman, F. (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 3–21
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M., Brown, P. O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 3273–3297
- Travençolo, A., Wong, J. M. S., Xu, D., Sopta, M., and Ingles, C. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 4020–4027
- Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., and Klausner, R. D. (1995) *EMBO J.* **14**, 1231–1239
- Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., and Klausner, R. D. (1996) *EMBO J.* **15**, 3337–3384
- Yun, C. W., Tiedman, J. S., Moore, R. E., and Philpott, C. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 16354–16359
- Foury, F., and Talibi, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 7762–7768
- Protchenko, O., Ferea, T., Rashford, J., Tiedman, J., Brown, P. O., Botstein, D., and Philpott, C. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 49244–49250
- Protchenko, O., and Philpott, C. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 36582–36587
- Babcock, M., De Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997) *Science* **276**, 1709–1712
- Stolz, J., Hoja, U., Meier, S., Sauer, N., and Schweizer, E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18741–18746
- Phalip, V., Kuhn, I., Lemoine, Y., and Jeltsch, J.-M. (1999) *Gene (Amst.)* **232**, 43–51
- Ugulava, N. B., Gibney, B. R., and Jarrett, J. T. (2001) *Biochemistry* **40**, 8343–8351
- Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J., and Lill, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 29810–29816
- Rutherford, J. C., Jaron, S., and Winge, D. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 27636–27643
- Rodríguez-Navarro, S., Llorente, B., Rodríguez-Manzanique, M. T., Ramne, A., Uber, G., Marchesan, D., Dujon, B., Herrero, E., and Pérez-Ortín, J. E. (2002) *Yeast* **19**, 1261–1276
- Bilski, P., Li, M. Y., Ehrenshaft, M., Daub, M. E., and Chignell, C. F. (2000) *Photochem. Photobiol.* **71**, 129–134
- Padilla, P. A., Fuge, E. K., Crawford, M. E., Errett, A., and Werner-Washburne, M. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 5718–5726
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., and Matsumoto, K. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2615–2623
- Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J., and Levin, D. E. (2002) *Mol. Microbiol.* **46**, 781–789
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G., and Ruis, H. (1993) *EMBO J.* **12**, 1997–2003
- Wu, A., and Moye-Rowley, W. S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5832–5839
- Charizanis, C., Juhnke, H., Krens, B., and Entian, K. D. (1999) *Mol. Genet.* **261**, 740–752
- Kuge, S., and Jones, N. (1994) *EMBO J.* **13**, 655–664
- Gancedo, J. M. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 334–361
- Blom, J., De Mattos, M. J., and Grivell, L. A. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1970–1973
- Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., and Sasaki, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 18914–18918
- Lill, R., and Kispal, G. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352–356
- Chen, O. S., Hemenway, S., and Kaplan, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12321–12326
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., and Lesnfsky, E. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 36027–36031
- Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J., and Lutz, T. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2635–2643
- Lesuisse, E., Santos, R., Matzkanke, B. F., Knight, A. A. B., Camadro, J. M., and Dancis, A. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 879–889
- Park, S., Gakh, O., O'Neill, H. A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G. C., and Isaya, G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31340–31351
- Karthikeyan, G., Lewis, L. K., and Resnick, M. A. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1351–1362
- Hohmann, S. (2002) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 300–372
- Jung, U. S., and Levin, D. E. (1999) *Mol. Microbiol.* **34**, 1049–1057
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., and Francois, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20345–20357
- Kwast, K. E., Burke, P. V., and Poyton, R. O. (1998) *J. Exp. Biol.* **201**, 1177–1195
- Beckmann, J. D., Ljungdahl, P. O., Lopez, J. L., and Trumpower, B. L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8901–8909
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000) *EMBO J.* **19**, 1777–1783
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., and Wood, P. M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 179–195
- Young, T. A., Cunningham, C. C., and Bailey, S. M. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **405**, 65–72

ARTÍCULO 2



Nuclear Monothiol Glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* Can Function as Mitochondrial Glutaredoxins*

Received for publication, September 7, 2004
Published, JBC Papers in Press, September 28, 2004, DOI 10.1074/jbc.M410219200

María Micaela Molina‡, Gemma Bellí, María Angeles de la Torre§, María Teresa Rodríguez-Manzanque, and Enrique Herrero¶

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

Glutaredoxins are thiol oxidoreductases that regulate protein redox state. In *Saccharomyces cerevisiae*, Grx1 and Grx2 are cytosolic dithiol glutaredoxins, whereas Grx3, Grx4, and Grx5 are monothiol glutaredoxins. Grx5 locates at the mitochondrial matrix and is needed for iron/sulfur cluster biogenesis. Its absence causes phenotypes such as inactivation of iron/sulfur enzymes and sensitivity to oxidative stress. Whereas Grx5 contains a single glutaredoxin domain, in Grx3 and Grx4 a thioredoxin-like domain is fused to the glutaredoxin domain. Here we have shown that Grx3 locates at the nucleus and that the thioredoxin-like domain is required for such location. We have addressed the functional divergence among glutaredoxins by targeting Grx2/3/4 molecules to the mitochondrial matrix using the Grx5 targeting sequence. The mitochondrial forms of Grx3 and Grx4 partially rescue the defects of a *grx5* null mutant. On the contrary, mitochondrially targeted Grx2 does not suppress the mutant phenotype. Both the thioredoxin-like and glutaredoxin domains are needed for the mitochondrial activity of Grx3, although none of the cysteine residues at the thioredoxin-like domain is required for rescue of the *grx5* phenotypes. We have concluded that dithiol glutaredoxins are functionally divergent from monothiol ones, but the latter can interchange their biological activities when compartment barriers are surpassed.

Glutaredoxins (Grx)¹ are small (~10 kDa) thiol disulfide oxidoreductases that catalyze glutathione (GSH)-disulfide redox reactions (1, 2). They reduce protein disulfides through a dithiol mechanism that involves two cysteine residues in the active site of the glutaredoxin molecule, or they deglutathionylate GSH-protein mixed disulfides through a monothiol mechanism of action involving a single cysteine at the active site (2). In contrast to glutaredoxins, thioredoxins employ NADPH directly as hydrogen donor. Besides glutaredoxins and GSH, the glutaredoxin system also includes glutaredoxin reductases that regenerate GSH from glutathione disulfide. Glutaredoxins

have a number of biological roles. These include activation of ribonucleotide reductase (1, 3) and 3'-phosphoadenylylsulfate reductase (4), reduction of ascorbate (5), GSH-mediated reduction of dihydrolipoamide (6), regulation of the DNA binding activity of nuclear factors (7), neuronal protection against dopamine-induced apoptosis (8) and excitotoxic mitochondrial damage (9), and regulation of signal cascades that protect against oxidative stress (10, 11). Glutaredoxins play an important role in protecting against protein oxidative damage by regulating the glutathionylated state of essential sulfhydryl groups (12). To carry out the above functions, glutaredoxins are present in various different cell compartments. In human cells, Grx1 glutaredoxin is cytosolic (13), whereas a second glutaredoxin (Grx2) has two isoforms that are, respectively, located at the nucleus and the mitochondria (14, 15). In plants, glutaredoxins have also been described at the cytosol and mitochondria (16). The existence of cross-talk between the glutaredoxin and thioredoxin systems is illustrated by the fact that human Grx2 is able to deglutathionylate GSH-protein mixed disulfides through thioredoxin reductase as an alternative to GSH (17).

The thioredoxin and glutaredoxin systems are also present in yeasts (18–20). *Saccharomyces cerevisiae* contains both a cytosolic and a mitochondrial thioredoxin system (21, 22) whose functions may overlap with those of the glutaredoxin system (23). *S. cerevisiae* contains two glutaredoxins (Grx1 and Grx2) with conserved CPYC motifs in their active sites (24). Both are cytosolic, though a minor fraction of Grx2 molecules is located at the mitochondria (25). A single glutathione reductase (Grr1) shares a cytosolic and mitochondrial location (26). In addition to the dithiol glutaredoxins, *S. cerevisiae* cells contain three monothiol glutaredoxins (Grx3, Grx4, and Grx5) with the motif CGFS in their active sites (27, 28). Grx5 is located at the mitochondrial matrix and participates in the biogenesis of iron/sulfur (Fe/S) clusters (29, 30). The absence of Grx5 causes the inactivation of enzymes containing Fe/S clusters, intracellular iron accumulation, hypersensitivity to external oxidants, high levels of protein oxidation, auxotrophy for a number of amino acids, and low growth rates in rich medium (27, 29). A number of proteins also become hyperglutathionylated in null *grx5* mutants (31). All of these phenotypes are probably a consequence of disruption of the Grx5 function in the biogenesis of Fe/S clusters because most of the alterations are shared by other mutants affected in the biogenesis of the clusters (32, 33). Grx3 and Grx4 molecules are larger than Grx5 because they contain a thioredoxin-like domain that is N-terminal located relative to the glutaredoxin domain, with a linking region between the two domains (28, 34).

Yeast monothiol glutaredoxins are members of a large group of proteins present in organisms ranging from bacteria to higher eukaryotes (28, 35). The human member is the PICOT

* This work was supported in part by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2001-1213-C02-01) and from the Generalitat de Catalunya (2001SGR00305). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Recipient of a predoctoral grant from the Generalitat de Catalunya.
§ Supported by a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Ciencia y Tecnología.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-973-702409; Fax: 34-973-702426; E-mail: enric.herrero@cmb.udl.es.

¹ The abbreviations used are: Grx, glutaredoxin; GSH, reduced glutathione; GFP, green fluorescent protein; Trx, thioredoxin.

TABLE I
Strains employed in this work

Strain	Relevant phenotype	Comments
W303-1A	<i>MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15</i>	Wild type
W303-1B	As W303-1A but <i>MATa</i>	Wild type
MML100	<i>MATa grx5::kanMX4</i>	Ref. 29
MML240	<i>MATa grx5::kanMX4</i> [pMM54(<i>GRX5-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Ref. 29
MML241	<i>MATa grx5::kanMX4</i>	As MML100, but derived from W301-1B
MML443	<i>MATa</i> [pMM227(<i>GRX3-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM227 in W303-1A
MML446	<i>MATa</i> [pMM229(<i>GRX4-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM229 in W303-1A
MML458	<i>MATa</i> [pMM225(<i>GRX2-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM225 in W303-1B
MML454	<i>MATa grx5::kanMX4</i> [pMM227(<i>GRX3-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML241 × MML443
MML456	<i>MATa grx5::kanMX4</i> [pMM229(<i>GRX4-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML241 × MML446
MML465	<i>MATa grx5::kanMX4</i> [pMM225(<i>GRX2-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML100 × MML458
MML488	<i>MATa</i> pMM338: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM338 in W303-1B
MML490	<i>MATa</i> pMM340: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM340 in W303-1B
MML492	<i>MATa</i> pMM342: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM342 in W303-1B
MML500	<i>MATa grx5::kanMX4</i> pMM338: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML100 × MML488
MML502	<i>MATa grx5::kanMX4</i> pMM340: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML100 × MML490
MML504	<i>MATa grx5::kanMX4</i> pMM342: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML100 × MML492
MML507	<i>MATa</i> [pMM344(<i>GRX3-C72S-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM344 in W303-1B
MML509	<i>MATa</i> [pMM349(<i>GRX3-C211S-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM349 in W303-1B
MML514	<i>MATa grx5::kanMX4 a</i> [pMM349(<i>GRX3-C211 S-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML100 × MML509
MML516	<i>MATa grx5::kanMX4 a</i> [pMM344(<i>GRX3-C72S-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML100 × MML507
MML563	<i>MATa</i> [pMM387(<i>GRX3-C2S-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM387 in W303-1B
MML566	<i>MATa grx5::kanMX4 a</i> [pMM387(<i>GRX3-C2S-3HA</i>)]: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML100 × MML563
MML607	<i>MATa</i> pMM221: <i>LEU2</i>	Integration of linear pMM221 in W303-1A
MML614B	<i>MATa grx5::kanMX4</i> pMM221: <i>LEU2</i>	Spore from a cross MML241 × MML607

protein, a negative regulator of protein kinase θ in the pathway that controls c-Jun N-terminal kinase (36). This translocates from the cytosol to the nucleus in response to oxidative stress (37). The mouse PICOT homologue is differentially expressed at stages of mouse embryogenesis concomitant with neural tube closure (38).

Some functional interactions may exist between monothiol and dithiol glutaredoxins in *S. cerevisiae*. However, they do not fully substitute each other because the overexpression of Grx3 or Grx4 does not rescue the above defects of *grx5* cells (29). It has recently been shown that Grx4 is located at the nucleus and that it interacts with the Bud32 protein kinase (39). In the current work we have demonstrated that Grx3 is also located at the nucleus and that its thioredoxin-like domain is required for nuclear targeting. We have also shown that when either Grx3 or Grx4 are targeted to the mitochondria they can substitute for Grx5 function, unlike dithiol glutaredoxins. Therefore, differential compartmentalization determines separate biological functions for the members of the monothiol glutaredoxin family.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains and Plasmids—The yeast strains employed in this work are described in Table I. Plasmid pMM221 was based on the *LEU2* integrative vector YIplac128 (40), with the doxycycline-controlled tTA transactivator and *tetO₂* promoter regions from pCM188 (41), the mitochondrial targeting sequence of *GRX5* from pCM318 (29), and the 3HA/His₆ tag from pCM265 (42), plus a polylinker created with adequate complementary oligonucleotides. Plasmid pMM225 contains the *GRX2* coding sequence from the nucleotide at position +103 to the last coding nucleotide, which is in-frame with the 3HA/His₆ tag. It was cloned between the NotI and PstI sites of the vector pMM221. Similarly, plasmids pMM227 and pMM229, respectively, contain the *GRX3* and *GRX4* coding sequences from the second to the last coding codon, cloned between the NotI and PstI sites of pMM221. Plasmids pMM338, pMM340, and pMM342 derive from pMM221 by, respectively, cloning the sequences of *GRX3* coding from amino acid 2 to 133 (including the Trx domain), 2 to 198 (Trx domain plus linker), or 199 to 285 (Grx domain) between the NotI and PstI sites of the vector. pMM344, pMM349, pMM387, and pMM451 are pMM227 derivatives with the following respective point mutations in the Grx3 sequence: C72S, C211S, C2S, and C18A. Plasmid pMM453 also derives from pMM227 and contains the three point mutations C2S, C18A, C72S in the coding sequence for Grx3. GFP fusions to different regions of Grx3 were constructed under the control of the *MET25* promoter in pUG35 (from W. H. Hegemann, Institute of Microbiology, Duesseldorf, Germany),

using the EcoRI and HindIII vector sites. pMM423 and pMM421, respectively, contain the *GRX3* coding sequences from amino acid 1 to 133 and 199 to 285, in-frame with the GFP sequence at the C terminus. Plasmid pMM425 is a pUG35 derivative with the whole *GRX3* sequence C-terminal tagged with GFP.

Growth Conditions—YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) was usually employed. YPGly and YPGal media are similar to YPD except that they, respectively, contain 3% glycerol and 2% galactose instead of dextrose. Synthetic S.D. medium contains 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, and the auxotrophic requirements. Doxycycline was added to the medium at the indicated concentrations to modulate expression from the *tetO₂* promoter. Cells were exponentially grown at 30 °C under the required conditions for at least 10 generations before samples were taken for analysis.

Genetic Methods—Standard methods were employed for DNA manipulation, transformation, crosses between yeast strains, and tetrad analyses. PCR-amplified *S. cerevisiae* genomic DNA was used for cloning with appropriate oligonucleotides for amplification that created the required restriction sites. Point mutants to yield the different amino acid replacements were constructed by the ExSite method (43). In this case, oligonucleotides for PCR amplifications were designed in such a way that a restriction site not altering the translation product was introduced as a marker near the desired point mutation. Introduction of the mutations was confirmed by DNA sequencing. Integrative plasmids were made linear by EcoRV digestion before transformation of the wild type cells to yield the respective derivatives.

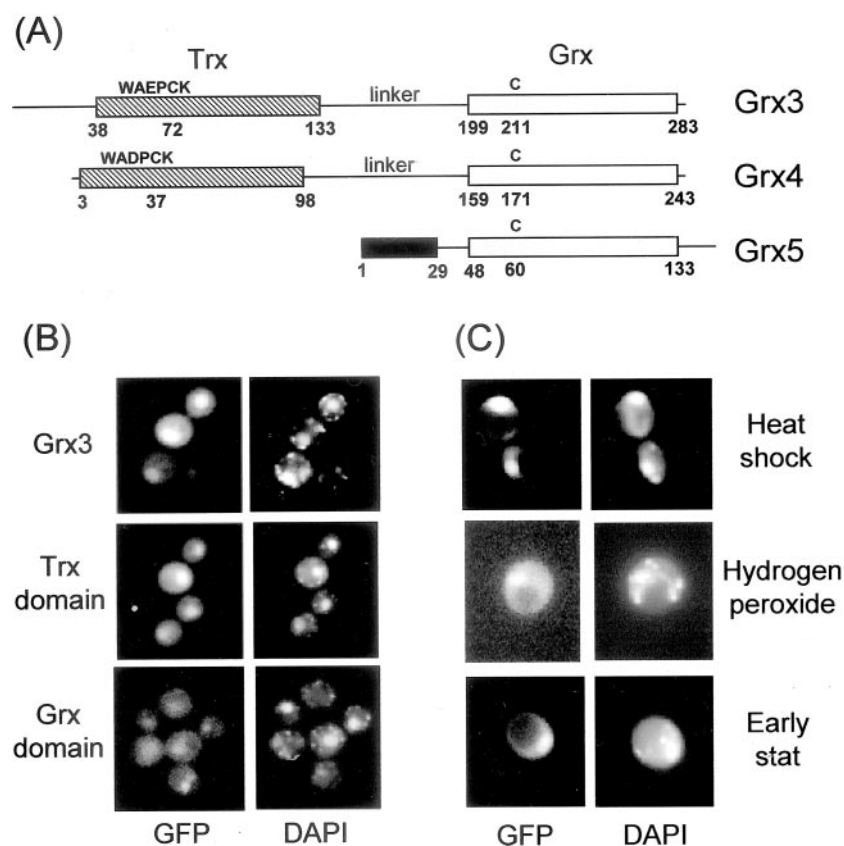
Other Methods—Mitochondria were purified and fractionated from cell cultures in lactate medium as described in Ref. 44. Western blot analyses were done as in Ref. 29, with 12CA5 anti-HA monoclonal antibody (Roche Diagnostics) at a 1:5,000 dilution and anti-lipoic acid antibody at 1:50,000 dilution. Aconitase and malate dehydrogenase were assayed following the methods described in Ref. 45. Extracts from cells growing exponentially in YPGal medium were prepared in 0.1 M Tris buffer, pH 8.0, plus protease inhibitors (2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2 mM tolylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone, 2 μ M pepstatin A, final concentrations), using glass beads to break the cells. Microscopic localization of GFP-labeled proteins in living cells was done by standard techniques (46).

RESULTS

The Thioredoxin-like Domain of Grx3 Is Required for Targeting the Protein to the Nucleus—The three monothiol glutaredoxins of *S. cerevisiae* share a Grx domain that displays partial homology with dithiol glutaredoxins and contains the single cysteine active site (27, 28) (Fig. 1A). This conserved domain has also been termed PICOT after its presence in the human PICOT protein (34). In addition, Grx3 and Grx4 contain

FIG. 1. Nuclear localization of Grx3.

A, domains of the monothiol glutaredoxins Grx3, Grx4, and Grx5. The thioredoxin-like (*Trx*) and glutaredoxin (*Grx*) domains are indicated with the positions of the initial and final amino acids at each domain (see Ref. 34 for more details). The conserved sequences at the Trx domain of Grx3 and Grx4 that are reminiscent of the thioredoxin active site are also shown. The position of the cysteine at the active site of the Grx domain is indicated. The black box corresponds to the mitochondrial targeting sequence of Grx5. B, fluorescence micrographs of exponentially growing cells in S.D. medium without methionine at 30 °C expressing the whole Grx3 sequence (pMM425) or the Trx (pMM423) or Grx (pMM421) domains of Grx3, tagged at the C terminus with GFP. Cells were also 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained; images are shown in parallel. C, exponentially growing cells in S.D. medium at 30 °C expressing Grx3-GFP (pMM425) were subjected to heat shock (30 min at 38 °C), hydrogen peroxide treatment (0.5 mM, 1 h), or cultured until early stationary phase (72 h at 30 °C). GFP fluorescent and DAPI-stained cells are shown.



an N-terminal extension that is highly homologous to thioredoxin sequences (Trx domain in Fig. 1A). This domain is not present in Grx5, which instead contains a mitochondrial targeting sequence (29). The Trx domain contains a WAD/EPCK sequence that is reminiscent of the authentic thioredoxin active site motif WCGPCK (47). The Trx domain is conserved in many members of the Grx3/Grx4 protein family in other eukaryotic organisms (28, 35). A non-conserved linker region is present between the Trx and Grx domains (Fig. 1A). It has recently been shown that Grx4 is located at the nucleus (39). Using a C terminus GFP-tagged construction under the control of the *MET25* promoter, we have observed that Grx3 is also targeted to the nucleus in conditions of maximum expression from the promoter (Fig. 1B). When the expression level of the Grx3-GFP fusion protein was reduced by adding intermediate methionine concentrations (up to 25 μ M) to the growth medium, Grx3 was still concentrated at the nucleus (not shown), discarding any possible abnormal location caused by overexpression. We concluded that Grx3 and Grx4 are both nuclear glutaredoxins, which suggests that their functions could be redundant.

To determine the region of Grx3 responsible for its nuclear localization, the Trx and Grx domains were separately tagged with GFP in the same *MET25*-based vector as above. Cells expressing the Trx-GFP construction showed a nuclear fluorescence pattern, whereas those with the Grx-GFP construction showed diffuse fluorescence (Fig. 1B). This indicates that the Trx domain (but not the Grx domain) contains a nuclear location signal for Grx3 and is able to be directed to the nucleus on its own. Analysis of the Trx region amino acid sequence did not reveal either a simple or bipartite canonical nuclear localization signal (48). We addressed the possibility of Grx3 location being regulated by external stresses in a similar way to the external conditions-controlled nuclear location of several transcription factors that mediate stress responses (*Msn2/4*, *Yap1*, *Aft1*) (19, 49, 50). However, neither heat shock, hydrogen per-

oxide-mediated oxidative stress, nor entry into the post-diauxic stage of the growth curve affected the nuclear location of Grx3 (Fig. 1C). We have therefore concluded that Grx3 has a constitutive nuclear location.

Grx3 and Grx4, but Not Grx2, Rescue the Defects of Cells Lacking Grx5—The fact that overexpression of native Grx3 or Grx4 glutaredoxins does not rescue the defects of a null Δ *grx5* mutant (29) could be a consequence of their different cellular compartmentalizations with respect to Grx5. We wondered what would happen in a situation in which Grx3 or Grx4 was targeted to the mitochondria in the absence of Grx5. We were also interested in determining the ability of a mitochondrially targeted form of the dithiol glutaredoxin Grx2 to substitute for Grx5 function when overexpressed. Grx2 is mostly located at the cytosol, although a minor fraction could be mitochondrial (25). With this objective, we constructed a vector (Fig. 2A) in which the desired gene was fused to the coding sequence of the mitochondria targeting signal of the Grx5 protein. In this vector (pMM221), expression of the HA-tagged chimeric protein was controlled by a *tetO₂* promoter that also made it possible to modulate its expression according to doxycycline concentration. pMM221 was employed to clone the *GRX2*, *GRX3*, and *GRX4* sequences. In the case of *GRX2*, the sequence cloned began at the codon coding for methionine at position 35 in the open reading frame. In other words, the resulting construct consisted of the Grx5 mitochondrial targeting sequence fused to the Grx2 form that predominantly compartmentalizes at the cytosol (25). In the case of the two monothiol glutaredoxin genes, the initial ATG codons in the respective open reading frames were omitted in the pMM221-based constructions.

Yeast cells transformed with either of the respective constructions in the pMM221 vector were able to direct Grx2, Grx3, or Grx4 to the mitochondria. When identical amounts of total mitochondrial protein were analyzed from cultures grown in the absence of doxycycline, the levels of the HA-tagged forms

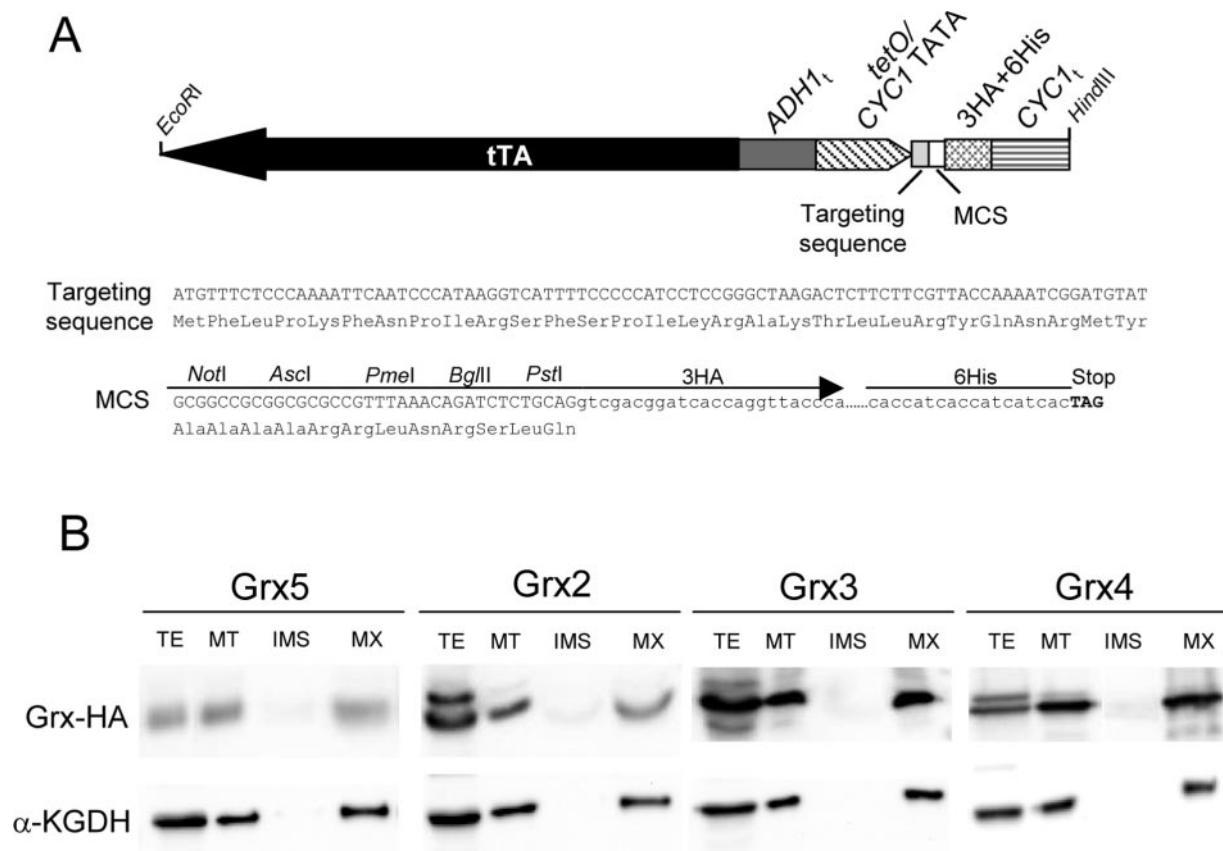


FIG. 2. Plasmid pMML240 compartmentalizes proteins in the mitochondrial matrix through the Grx5 mitochondrial targeting sequence. A, the plasmid is based on pCM318 (29), which contains the *GRX5*-3HA-*His₆* region under the tTA-mediated control of the *tetO₂* promoter. From this plasmid, the *GRX5* open reading frame (except the sequence coding for the initial 29 amino acids corresponding to the mitochondrial targeting sequence) was replaced by a synthetic multiple cloning site (MCS) generated with complementary oligonucleotides. The whole expression cassette (EcoRI-HindIII fragment) was then moved to the *LEU2* integrative vector YIplac128. For more details on the tTA-*ADH1* terminator *tetO₂* and 3HA-*His₆* regions, see Refs. 41 and 42, respectively. B, derivatives of pMML240 are able to compartmentalize Grx2 (pMML225, integrated in strain MML458), Grx3 (pMML227, strain MML443), and Grx4 (pMML229, strain MML446) at the mitochondrial matrix. Cultures of the respective strains were exponentially grown in lactate medium at 30 °C to an A₆₀₀ of about 0.6 before mitochondrial isolation and subfractionation. Strain MML240 expressing a Grx5-3HA protein under its own promoter was employed as a control. TE, total cell extract; MT, mitochondrial fraction; IMS, intermembrane space; MX, matrix. Ten micrograms of protein were loaded in the TE lanes, whereas 1 μ g was loaded in the other lanes. Anti-HA antibodies were used in the Western blot analyses to detect the HA-tagged proteins in the respective fractions, whereas anti-lipoic acid antibodies were used to detect the matrix marker α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH). Coomassie Blue staining confirmed that submitochondrial fractions were not significantly cross-contaminated (not shown).

of the above glutaredoxins were considerably higher than the level of endogenous Grx5-HA (Fig. 2B). This confirmed that *tetO₂* is a strong promoter (41) and is responsible for protein overexpression even when it is present in a single copy integrative plasmid such as pMML240. Importantly, all the mitochondrial glutaredoxin molecules were compartmentalized at the matrix, as occurs with Grx5 (Fig. 2B and Ref. 29). This compartmentalization pattern was the same as that of the matrix lipoic-containing protein α -ketoglutarate dehydrogenase. The respective mobilities of the Grx-HA bands in the mitochondrial fraction corresponded to the expected sizes of the mature proteins once the Grx5 targeting sequence had been processed. In some cases, a lower mobility band was present in minor amounts in the total extract fraction (Fig. 2B); this probably corresponded to the non-processed precursor form of the mitochondrial molecules.

Mitochondrially expressed Grx2 was not able to rescue the growth defects of a mutant lacking Grx5 (Fig. 3, A and B). In contrast, these defects were rescued when either Grx3 or Grx4 was targeted to the mitochondrial matrix. In fact, in rich (YP-Gal) media, these cells exhibited growth rates similar to wild type cells (Fig. 3A) and were able to grow in minimal S.D. medium or in respiratory conditions in which glycerol was the only carbon source (Fig. 3B).

To quantify the ability of the mitochondrial Grx3 or Grx4 forms to substitute for the biological function of Grx5, we determined aconitase activity (relative to malate dehydrogenase) in the respective strains. Aconitase is a mitochondrial enzyme that contains Fe/S clusters and whose activity is depleted in null *grx5* mutants (29), whereas malate dehydrogenase, which is also mitochondrial, lacks such clusters. Because the activity of mitochondrial enzymes is significantly decreased in glucose media, experiments were done in a rich medium with galactose as the carbon source. These are conditions compatible with growth competence of all the strains employed in this study. Importantly, absolute levels of malate dehydrogenase did not significantly vary from one strain to another (data not shown), which indicated the absence of any nonspecific mitochondrial dysfunction. In accordance with the previously described growth phenotypes, overexpressed mitochondrial Grx2 did not rescue the aconitase activity defect in the Δ *grx5* background (Fig. 4). However, overexpression of Grx3 or Grx4 did rescue this defect. To know whether aconitase activity was also restored when either Grx3 or Grx4 was expressed at levels equivalent to those of Grx5, we modulated the expression of the *GRX3*-HA or *GRX4*-HA constructs from the *tetO₂* promoter with intermediate concentrations of doxycycline. When expressed levels of Grx3 or Grx4 were similar to those of endog-

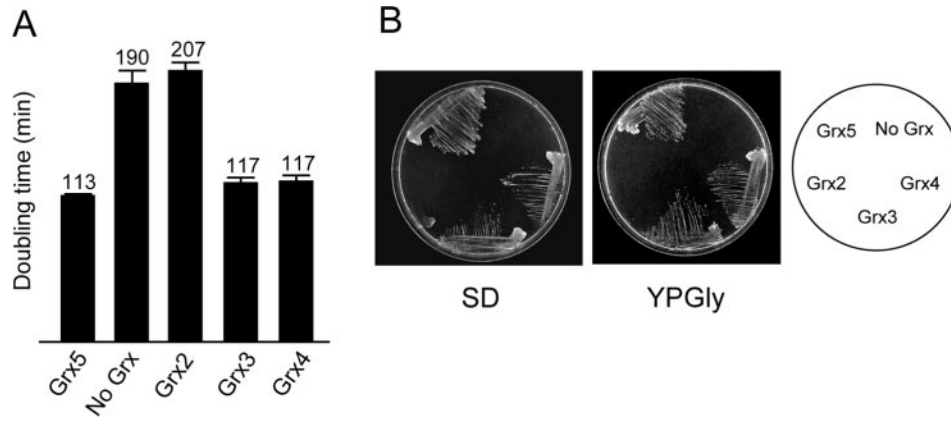


FIG. 3. Rescue of the $\Delta grx5$ mutant growth defects by mitochondrial forms of glutaredoxins. A, doubling times in min (bars, means of three experiments) were calculated from exponential cultures in liquid YPD medium at 30 °C. The strains employed carry a chromosomal null *grx5* allele and express the following mitochondrial glutaredoxin forms: MML240 (*Grx5*, endogenous promoter), MML100 (*No Grx*), MML465 (*Grx2*, pMM221-based), MML454 (*Grx3*, pMM221-based), MML456 (*Grx4*, pMM221-based). B, growth on S.D. or YPGly plates after 3 days at 30 °C of the following chromosomal $\Delta grx5$ strains expressing the indicated mitochondrial glutaredoxins: MML240 (*Grx5*), MML614B (*No Grx*), MML465 (*Grx2*), MML454 (*Grx3*), MML456 (*Grx4*).

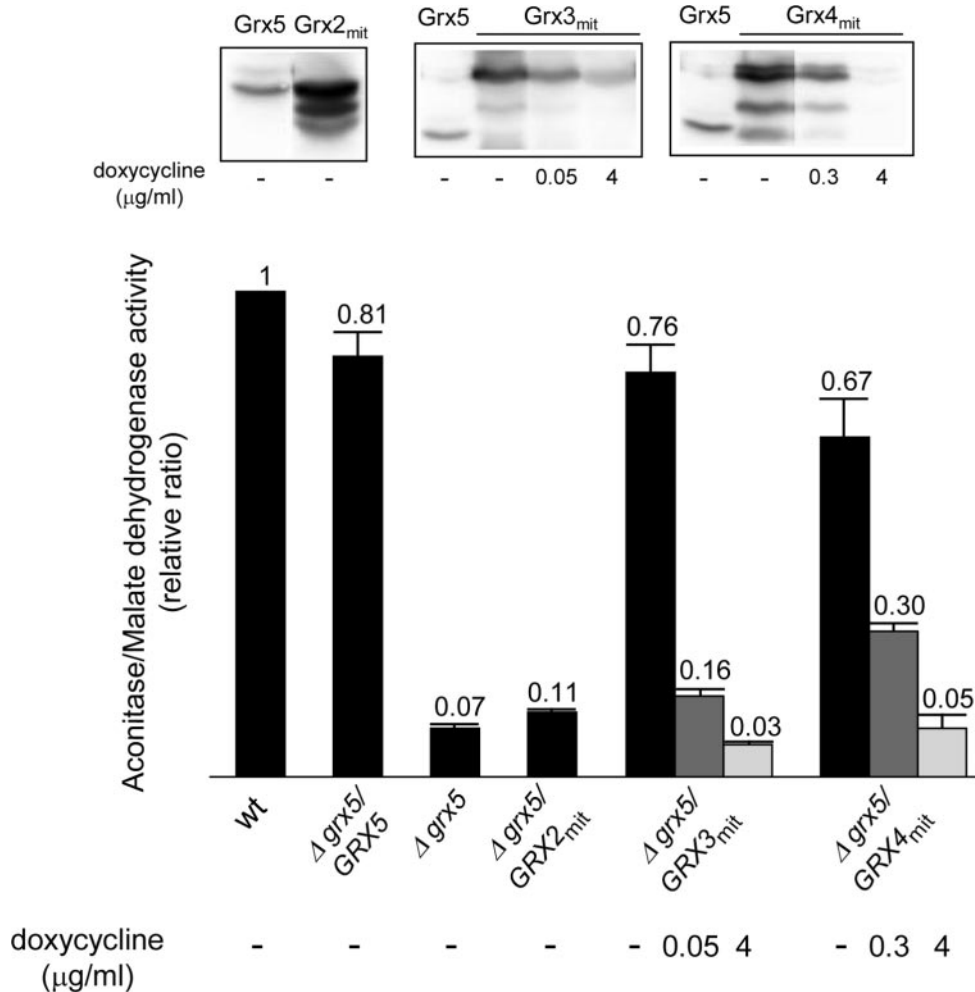


FIG. 4. Ratio between aconitase and malate dehydrogenase activities in exponential cells at 30 °C in YPGal medium. Strains that express different mitochondrial HA-tagged glutaredoxin forms were employed: W303-1A (*wild type*), MML240 ($\Delta grx5/GRX5$, endogenous *GRX5* promoter), MML100 ($\Delta grx5$), MML465 ($\Delta grx5/GRX2_{mit}$, pMM221-based), MML454 ($\Delta grx5/GRX3_{mit}$, pMM221-based), MML456 ($\Delta grx5/GRX4_{mit}$, pMM221-based). Doxycycline was employed at the indicated concentrations in the growth medium to modulate expression from the *tetO₂* promoter. Values are normalized with respect to the ratio in the wild type strain (unit value). Upper panels show the Western blot analyses of HA-tagged glutaredoxins in total cell extracts from the following strains: MML240 (*Grx5*), MML465 (*Grx2_{mit}*), MML454 (*Grx3_{mit}*), and MML456 (*Grx4_{mit}*).

enous Grx5 (Fig. 4, upper panels), aconitase activity was only partially restored in the $\Delta grx5$ cells. High concentration of doxycycline (4 μg/ml) almost totally switched off expression from the *tet* promoter; in these conditions, aconitase activity

was comparable with that in $\Delta grx5$ cells (Fig. 4). The two monothiol glutaredoxins, Grx3 and Grx4, were therefore only able to completely substitute the mitochondrial Grx5 function when they were overexpressed.

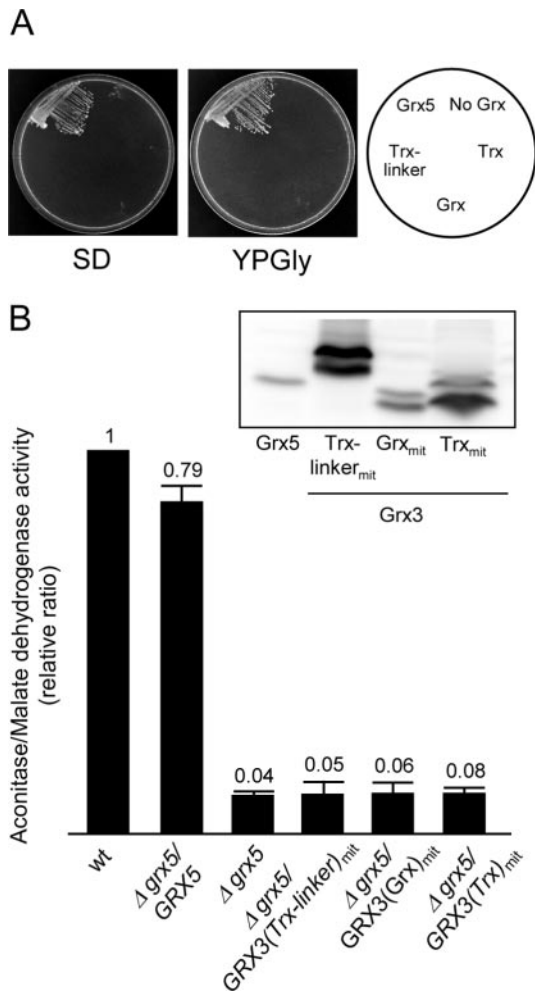


FIG. 5. Rescue of the growth defects of a $\Delta grx5$ mutant by mitochondrial truncated derivatives of Grx3. A, growth on S.D. or YPGly plates (3 days at 30 °C) of the following strains carrying the chromosomal $\Delta grx5$ allele and expressing the indicated mitochondrial glutaredoxin forms: MML240 (*Grx5*, endogenous promoter), MML614B (*No Grx*), MML500 (*Trx* domain of Grx3, pMM221-based), MML502 (*Trx* plus linker domain of Grx3), and MML504 (*Grx* domain of Grx3). B, ratio between aconitase and malate dehydrogenase activities in exponential cells at 30 °C in YPGal medium expressing *GRX5* or truncated derivatives of *GRX3* coding for the respective mitochondrial forms: W303–1A (*wild type*), MML240 ($\Delta grx5/GRX5$), MML100 ($\Delta grx5$), MML502 ($\Delta grx5/GRX3(Trx-linker)_{mit}$), MML504 ($\Delta grx5/GRX3(Grx)_{mit}$), and MML500 ($\Delta grx5/GRX3(Trx)_{mit}$). Values are normalized with respect to the ratio in the wild type strain (unit value). The upper panel shows the Western blot analysis of the HA-tagged forms in the respective strains: MML240 (*Grx5*), MML502 (*Trx-linker*_{mit}), MML504 (*Grx*_{mit}), and MML500 (*Trx*_{mit}).

The Mitochondrially Located Trx or Grx Domains of Grx3 Do Not Rescue the $\Delta grx5$ Defects When Expressed Separately—The partial ability of Grx3 or Grx4 to substitute for the Grx5 biological function at the mitochondria could be caused by impairment of the function of the Grx domain because of the bulky Trx domain. Alternatively, this could be the result of partial enzymatic activity of the Grx domain of Grx3 or Grx4 in contrast with the mature Grx5 protein. To distinguish between the two possibilities, we separately targeted the Trx, Trx plus linker, or Grx domains of Grx3 to the mitochondria using the pMM221 vector. The three domains were detected as overexpressed proteins (Fig. 5B) and became localized at the matrix (data not shown). However, neither the Trx nor the Grx regions alone nor the Trx plus linker region could complement the phenotypes caused by the absence of Grx5. Growth in minimal S.D. medium or in glycerol respiratory conditions (Fig. 5A) and aconitase/malate dehydrogenase activities were defective in $\Delta grx5$ cells expressing the truncated versions of Grx3 (Fig. 5B). This indicated that the Grx domain of Grx3 is not functionally equivalent to Grx5 and that the partial biological activity of Grx3 compared with Grx5 is not exclusively because of interference between the Trx and Grx domains.

Only the Cysteine Residue at the Glutaredoxin Domain Is Required for the Biological Activity of Grx3—Grx3 contains two cysteine residues at positions 72 (Trx domain) and 211 (Grx domain) that are conserved at equivalent positions in Grx4 and in homologues present in other organisms (28, 34). Cys-72 is in the context of the partially conserved thioredoxin active site (Fig. 1A). The observation that both the Trx and Grx domains are required if Grx3 is to replace the biological activity of Grx5 at the mitochondria could be explained by the need for both Cys-72 and Cys-211. If this were the case, Grx3 would, in fact, act through a dithiol mechanism of action. To test this hypothesis, we separately mutated the two cysteine residues and targeted the respective Grx3 derivatives to the mitochondria of $\Delta grx5$ cells. Only the C211S substitution eliminated the Grx3 activity, as well as aconitase/malate dehydrogenase activities, when we measured growth in minimal medium or under respiratory conditions (Fig. 6, A and B). Cellular fractionation analyses showed that this mutant form still localizes at the mitochondrial matrix (data not shown). This indicates that the conserved cysteine at the Trx domain does not play a significant role at the mitochondria. Two other cysteine residues that are present in the context of the Trx domain of Grx3 at positions 2 and 18 are not conserved in Grx4 or in other members of the same family. We decided to test whether either of these two residues could have an active role in Grx3, at least in the absence of Cys-72. We therefore constructed single point mutants in both of these cysteines, along with a triple C2S,C18A,C72S mutant, and expressed them as mitochondrial Grx3 forms in $\Delta grx5$ cells. The single C2S or C18A mutant Grx3 forms as well as the triple mutant derivative behave like the wild type Grx3 form once internalized into the mitochondria of $\Delta grx5$ cells when the aconitase/malate dehydrogenase activity ratio (Fig. 6B) or the ability for growth in minimal or glycerol medium (not shown) were determined. We concluded that cysteine at position 211 is required for the biological activity of Grx3 at the mitochondria and that the cysteine residues at the Trx region are not required for the redox function of the Grx moiety.

DISCUSSION

Grx3, Grx4, and Grx5 are monothiol glutaredoxins that localize at different cellular compartments in *S. cerevisiae* cells. We had previously shown that Grx5 is located at the mitochondrial matrix (29); the present study has demonstrated the nuclear location of Grx3, which is similar to that of Grx4 (39). This nuclear location is not affected by a number of stresses. These glutaredoxins are an example of a protein family whose members are differentially compartmentalized, therefore pointing to divergent biological functions. Protein families may emerge from duplication events affecting genome regions of variable lengths. They are a source of functional diversification and allow organisms to adapt to their environments with greater efficiency (51). *S. cerevisiae* contains a large number of families, ranging from 2 to more than 100 gene members (52). An ancient polyploidization event, which could have occurred about 200 million years ago, may have been the origin of such a large number of gene families (53), although later, shorter, independent duplications could have contributed to the diversity of such families and also to the number and wide range of family members (54). Differential compartmentalization of the respective protein products of a gene family may play an im-

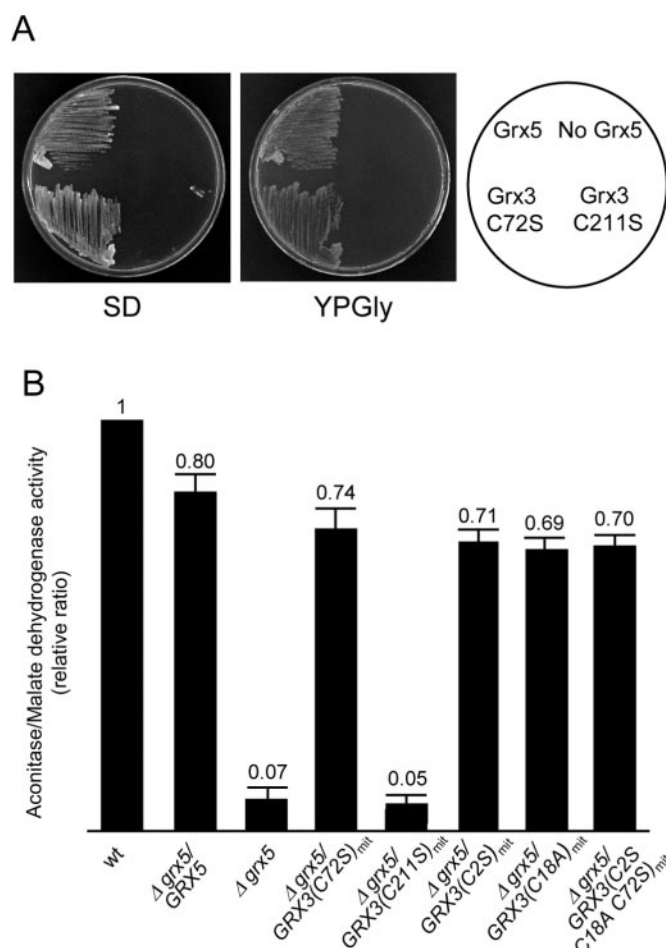


FIG. 6. Rescue of the growth defects of a $\Delta grx5$ mutant by mitochondrial derivatives of Grx3 carrying point mutations. *A*, growth on S.D. or YPGly plates (3 days at 30 °C) of the following strains carrying the chromosomal $\Delta grx5$ allele and expressing the indicated mitochondrial glutaredoxins: MML240 (*Grx5*), MML614B (*No Grx*), MML516 (*Grx3 C72S*), MML514 (*Grx3 C211S*). *B*, ratio aconitase/malate dehydrogenase in exponential cells at 30 °C in YPGal medium, corresponding to the following strains: W303-1A (*wild type*), MML240 ($\Delta grx5/GRX5$), MML100 ($\Delta grx5$), MML516 ($\Delta grx5/GRX3(C72S)_{mit}$), MML514 ($\Delta grx5/GRX3(C211S)_{mit}$), MML566 ($\Delta grx5/GRX3(C2S)_{mit}$), MML642 ($\Delta grx5/GRX3(C18A)_{mit}$), and MML644 ($\Delta grx5/GRX3(C2S, C18A, C72S)_{mit}$). Values are normalized with respect to the ratio in the wild type strain (unit value).

portant role in biological adaptation to changes in external conditions. Among proteins implicated in defense against oxidative stress in *S. cerevisiae*, there are several examples of molecules with the same enzyme activity having different locations (see Ref. 19 for a review). However, the picture may be more complicated than this. For instance, Sod1 Cu,Zn-dependent superoxide dismutase is located at both the cytosol (major form) and mitochondria (55). Alternative translation from two different start codons of *GLR1* mRNA generates mitochondrial or cytosolic isoforms of Glr1 glutathione reductase (26). Also, post-translational processing may lead to cytosolic and mitochondrial forms of the dithiol glutaredoxin Grx2 (25). Therefore, a single gene can code for products with alternative locations due to transcriptional or post-transcriptional events.

There are significant structural differences between members of the Grx3/Grx4/Grx5 family. The fusion of a thioredoxin-like domain to a glutaredoxin domain may have occurred in a eukaryotic common ancestor of *S. cerevisiae* and other yeasts (34) as an important event in the functional specialization of the Grx3/Grx4 pair (Trx-Grx structure) with respect to Grx5 (with only the glutaredoxin domain). In the present study we

have shown that the thioredoxin-like domain is essential for the nuclear location of Grx3 (and probably also for that of Grx4, given the similarity between the two proteins), although no canonical nuclear localization sequences are detectable in the Trx domains of Grx3 or Grx4. This is not the first example of a nuclear glutaredoxin, as an isoform of human Grx2 (of the dithiol class) also occurs at the nucleus (14, 15). In the case of thioredoxins, there are multiple examples of nuclear forms that, among other functions, could be involved in regulation of transcription factors (47). Although the possible regulatory role of nuclear glutaredoxins has not been determined, in particular of human Grx2, it is tempting to speculate that they also may regulate the redox state of essential cysteine residues of nuclear transcription factors via reversible glutathionylation. Related to this, it has been shown that glutathionylation of a cysteine residue from a NF- κ B subunit regulates the DNA binding activity of the latter (56).

Grx3 and Grx4 glutaredoxins are an example of how fusion of different protein domains may be a source of functional diversity. In the case of enzyme activities involved in oxidative stress responses, the existence of thiol peroxidase-glutaredoxin fusion proteins has recently been demonstrated in a number of different bacteria (57, 58). In these molecules, the glutaredoxin moiety acts as a donor of reducing power for the thiol peroxidase-mediated reduction of hydroperoxides. Thioredoxin domains can also be part of fusion proteins, for instance fused to nucleoside-diphosphate kinase domains (see Ref. 59 and citations therein). The hypothetical activity of the Trx moiety in Grx3 remains, however, unclear. One of the two cysteine residues that are essential for the thiol-oxidoreductase activity of these molecules is missing from the sequence reminiscent of the thioredoxin active site. Here, we have also shown that none of the cysteine residues in the Trx domain of Grx3 is required for the activity of the molecule; this includes the above mentioned cysteine. In contrast, the single cysteine residue in the Grx domain is essential. It is also important to note that Grx4 does not contain other cysteine residues apart from one in the Grx domain active site and another in the active site-like region of the Trx domain (Fig. 1A), and yet it is still able to rescue the $\Delta grx5$ phenotypes when targeted to the mitochondria. We have therefore concluded that Grx3 (and probably Grx4 also) is really a monothiol glutaredoxin and that although the Trx domain is required for nuclear targeting of the molecule, it does not actively participate in the thiol-oxidoreductase reaction. However, the Trx domain is required for the activity of the Grx3 molecules, at least when targeted to the mitochondria, probably because it stabilizes the conformation of the Grx domain in an active state. We have made *in silico* models of the Grx3 three-dimensional structure in which the Trx domain comes into close contact with the Grx domain in a stable conformation (data not shown).

In a previous study (27), we showed the synthetic lethality of the $\Delta grx2$ and $\Delta grx5$ mutations. However, Grx2 and Grx5 do not have overlapping functions, as we have demonstrated here that Grx2 does not substitute for the absence of Grx5 even when it is overexpressed at the mitochondria. The synthetic lethality between the two mutants could be because of less direct reasons, such as the fact that yeast cells lacking Grx2 cannot cope with the general oxidation of cellular proteins that occurs in the absence of Grx5 (27). The phenotype of a $\Delta grx2$ mutant discards the participation of Grx2 in the mitochondrial synthesis of iron/sulfur clusters, even though a small amount of this glutaredoxin compartmentalizes at the mitochondria (25). Results from physiological studies shown here reinforce the idea based on enzymatic analyses that dithiol and monothiol glutaredoxins have different mechanisms of action (1, 60, 61).

Dithiol glutaredoxins reduce both cysteine residues forming a disulfide bond, whereas monothiol glutaredoxins act by deglutathionylating GSH-protein mixed disulfides. At the mitochondrial iron-sulfur assembly complex, Grx5 seems to act in the later steps in the biosynthetic process, probably by maintaining the essential cysteine residues of the assembly complex in a reduced state (30). This would involve the deglutathionylation of mixed disulfides affecting such cysteine residues. *In vitro* studies have shown that dithiol glutaredoxin mutants that lack the most C-terminal of the cysteine residues at the active site are still able to deglutathionylate substrates (60); however, our results indicate that the mitochondrial function related to iron/sulfur cluster assembly cannot be carried out by a dithiol glutaredoxin such as Grx2.

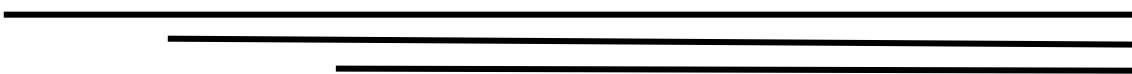
On the contrary, Grx3 and Grx4 are able to substitute for Grx5 at the mitochondria. This does not mean that they normally participate in the synthesis of iron/sulfur clusters, because this process occurs exclusively at the mitochondria in *S. cerevisiae* (62). However, when one of those glutaredoxins is addressed to the mitochondria, it is then able to acquire this new function in the iron/sulfur assembly complex although not as efficiently as Grx5 itself. The mitochondrial forms of Grx3 or Grx4 only totally rescue the absence of Grx5 as determined by aconitase activity levels when they are overexpressed. Surprisingly, both Trx and Grx domains are required for this function, though only the cysteine residue of the latter domain is biologically active. The molecule probably only adopts an active conformation that is sufficient to carry out the function in the iron/sulfur assembly complex when both domains are present. This is an example of molecules sharing the same enzyme activity that functionally diverge through acquisition of new protein domains and separate compartmentalization. We hypothesize that the function of Grx3/Grx4 at the nucleus has evolved from an ancient glutaredoxin participating in the biogenesis of the iron/sulfur clusters, based on (i) the similarity between the phylogenetic profiles of orthologs of Grx5 and other components of the iron/sulfur assembly complex among bacterial species and (ii) the absence of molecules with the Trx-Grx structure among bacteria and archaea (34). Following this reasoning, we propose that bacterial monothiol glutaredoxins are also involved in the biogenesis of iron/sulfur clusters. Experimental studies are required to confirm this hypothesis. In addition, determining the role of nuclear monothiol glutaredoxins at their original location will help to understand their function from an evolutive point of view.

Acknowledgments—We thank Lidia Piedrafitra for excellent technical assistance and José A. Bárcena for comments on the manuscript.

REFERENCES

- Holmgren, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13963–13966
- Fernandes, A. P., and Holmgren, A. (2004) *Antiox. Red. Sign.* **6**, 63–74
- Aslund, F., Ehn, B., Miranda-Vizuete, A., Pueyo, C., and Holmgren, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9813–9817
- Lillig, C. H., Prior, A., Schween, J. D., Aslund, F., and Holmgren, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7695–7698
- Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y. F., and Rocque, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15361–15364
- Porras, P., Pedrajas, J. R., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Johansson, C., Holmgren, A., and Bárcena, J. A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 1046–1051
- Bandyopadhyay, S., Starke, D. W., Mielay, J. J., and Gronostajski, R. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 392–397
- Daily, D., Vlamis-Gardikas, A., Offen, D., Mittelman, L., Melamed, E., Holmgren, A., and Barzilai, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 1335–1344
- Kenchappa, R. S., Diwakar, L., Boyd, M. R., and Ravindranath, V. (2002) *J. Neurosci.* **2**, 8402–8410
- Song, J. J., Rhee, J. G., Suntharalingam, M., Walsh, S. A., Spitz, D. R., and Lee, Y. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 46566–46575
- Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K., and Kondo, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 50226–50233
- Cotgreave, I. A., and Gerdes, R. G. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 1–9
- Padilla, C. A., Martínez-Galisteo, E., Bárcena, J. A., Spyrou, G., and Holmgren, A. (1995) *Eur. J. Biochem.* **227**, 27–34
- Gladyshev, V. N., Liu, A., Novoselov, S. V., Krysan, K., Sun, Q. A., Kryukov, V. M., Kryukov, G. V., and Lou, M. F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 30374–30380
- Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., and Holmgren, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26269–26275
- Rouhier, N., Gellhaye, E., and Jacquot, J. P. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**, 520–528
- Johansson, C., Lillig, C. H., and Holmgren, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 7537–7543
- Carmel-Harel, O., and Storz, G. (2000) *Annu. Rev. Microbiol.* **34**, 439–461
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., and Azevedo, D. (2003) in *Topics in Current Genetics* (Hohmann, S., and Mager, P. W. H., eds) Vol. 1, pp. 241–303, Springer-Verlag, Berlin
- Wheeler, G. L., and Grant, C. M. (2004) *Physiol. Plant.* **120**, 12–20
- Muller, E. G. D. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 9194–9202
- Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. A., Wright, A. P. H., and Spyrou, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6366–6373
- Trotter, E. W., and Grant, C. M. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 184–189
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 1081–1091
- Pedrajas, J. R., Porras, P., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Miranda-Vizuete, A., and Bárcena, J. A. (2002) *Biochem. J.* **364**, 617–623
- Outten, C. E., and Culotta, V. C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 7785–7791
- Rodríguez-Manzanique, M. T., Ros, J., Cabiscol, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8180–8190
- Belli, G., Polaina, J., Tamarit, J., de la Torre, M. A., Rodríguez-Manzanique, M. T., Ros, J., and Herrero, E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37590–37596
- Rodríguez-Manzanique, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109–1121
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., and Lill, R. (2003) *EMBO J.* **22**, 4815–4825
- Shenton, D., Perrone, G., Quinn, K. A., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16853–16859
- Lill, R., and Kispal, G. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352–356
- Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J., and Lill, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 29810–29816
- Vilella, F., Alves, R., Rodríguez-Manzanique, M. T., Belli, G., Swaminathan, S., Sunnerhagen, P., and Herrero, E. (2004) *Comp. Funct. Genom.* **5**, 328–341
- Isakov, N., Witte, S., and Altman, A. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 537–539
- Witte, S., Villalba, M., Bi, K., Liu, Y., Isakov, N., and Altman, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1902–1909
- Babichev, Y., and Isakov, N. (2001) *Adv. Exp. Med. Biol.* **495**, 41–45
- Greene, N. D. E., Leung, K. Y., Wait, R., Begum, S., Dunn, M. J., and Copp, A. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 41645–41651
- Lopreato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrigoni, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L. A., and Carignani, G. (2004) *Biochem. J.* **377**, 395–405
- Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988) *Gene* **74**, 3065–3073
- Gari, E., Piedrafitra, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) *Yeast* **13**, 837–848
- Arino, J., and Herrero, E. (2003) *Methods Enzymol.* **366**, 347–358
- Weiner, M. P., and Costa, G. L. (1995) 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, NY
- Diekert, K., de Kroon, A. I. P. M., Kispal, G., and Lill, R. (2001) *Methods Cell Biol.* **65**, 37–51
- Robinson, J. B., Jr., Brent, L. G., Sumegi, B., and Srere, P. A. (1987) in *Mitochondria: A Practical Approach* (Darley-Usmar, W. M., Rixkwood, D., and Wilson, M. T., eds), pp. 153–170, IRL Press, Oxford
- Tatchell, K., and Robinson, L. C. (2002) *Methods Enzymol.* **351**, 661–683
- Powis, G., and Montfort, W. R. (2001) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 261–295
- Mattaj, I. W., and Englmeier, L. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 265–306
- Estruch, F. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 469–486
- Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., and Sasaki, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 18914–18918
- Lynch, M., and Conery, J. S. (2000) *Science* **290**, 1151–1155
- Llorente, B., Durrens, P., Malpertuy, A., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., Dujon, B., de Montigny, J., Lepingle, A., Neuveglise, C., Ozier-Kalogeropoulos, O., Potier, S., Saurin, W., Tekaiia, F., Toffano-Nioche, C., Wesolowski-Louvel, M., Wincker, P., Weissenbach, J., Souciet, J., and Gaillardin, C. (2000) *FEBS Lett.* **487**, 122–133
- Wolfe, K. H., and Shields, D. C. (1997) *Nature* **387**, 708–713
- Hughes, A. L., and Friedman, R. (2003) *Genome Res.* **13**, 1259–1264
- Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., and Culotta, V. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 38084–38089
- Pineda-Molina, E., Klatt, P., Vázquez, J., Marina, A., García de Lacoba, M., Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (2001) *Biochemistry* **40**, 14134–14142
- Pauwels, F., Vergauwen, B., Vanrobaeys, F., Devreese, B., and van Beeumen, J. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16658–16666
- Cha, M. K., Hong, S. K., and Kim, I. H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11035–11041
- Sadek, C. M., Jimenez, A., Damdimopoulos, A. E., Kieselbach, T., Nord, M., Gustafsson, J. A., Spyrou, G., Davis, E. C., Oko, R., van der Hoorn, F. A., and Miranda-Vizuete, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 13133–13142
- Bushweller, J. H., Aslund, F., Wuthrich, K., and Holmgren, A. (1992) *Biochemistry* **31**, 9288–9293
- Tamarit, J., Belli, G., Cabiscol, E., Herrero, E., and Ros, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25745–25751
- Gerber, J., Neumann, K., Prohl, C., Mühlenhoff, U., and Lill, R. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 4848–4857

ARTÍCULO 3



PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC MONOTHIOIOL GLUTAREDOXINS ARE ABLE TO PERFORM THE FUNCTIONS OF Grx5 IN THE BIOGENESIS OF FE/S CLUSTERS IN THE *Saccharomyces cerevisiae* MITOCHONDRIA*

María Micaela Molina, Celia Casas, Lidia Piedrafita and Enrique Herrero

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

Running title : Monothiol Glutaredoxins and Fe/S Cluster Biosynthesis

Address correspondence to: Enrique Herrero, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, 25008-Lleida, Spain, Tel. 34-973-702409; Fax. 34-973-702426; E-mail: enric.herrero@cmb.udl.es

The *Saccharomyces cerevisiae* monothiol glutaredoxin Grx5 participates in the biogenesis of iron-sulfur clusters in the mitochondrial matrix. Homologues of Grx5 exist in organisms ranging from bacteria to humans. Chicken (cGRXM1) and human (hGRXM1) homologues contain a putative mitochondrial targeting sequence at the N-end, which also suggests a mitochondrial localization also for these two proteins. Using constructions involving the mitochondrial targeting sequence of yeast Grx5, we compartmentalized the *E. coli* (Grx4) and *Synechocystis* sp. (GrxC) homologues, and also cGRXM1 and hGRXM1, in the mitochondrial matrix of null *grx5* mutants. Albeit at different levels, all four heterologous proteins were able to rescue the defects of the mutant regarding maturation of the iron-sulfur enzyme aconitase, growth in respiratory conditions and sensitivity to external oxidants. The chicken *cGRXM1* gene was significantly expressed throughout the embryo stages in different tissues. In particular, high levels of expression were detected in different types of nervous cells. These results underline the biological significance of monothiol glutaredoxins and the functional conservation of Grx5 homologues throughout evolution.

Iron-sulfur (Fe-S) clusters are prosthetic groups involved in essential processes for life such as respiration, photosynthesis and nitrogen fixation (1, 2). They are usually present in proteins as [2Fe-2S] or [4Fe-4S]

clusters, although more complex structures may also exist. Their physico-chemical characteristics allow them to participate in electron-transfer reactions (respiratory or photosynthetic chains), and also in catalytic reactions, as is the case for aconitase. Fe-S clusters also act as oxidative stress sensors associated with transcription regulators, or carry out a purely structural role as protein cysteine ligands (2). Their formation *in vivo* requires the sequential participation of a complex set of proteins. In bacteria these are located at the cytosol. Although some debate still exists, it seems that in eukaryotic cells Fe-S cluster biogenesis mostly, if not exclusively, occurs at the mitochondrial matrix. Recent reviews are available on Fe-S cluster formation both in bacteria and eukaryotes (3-7). The importance of Fe-S clusters is illustrated by the existence of three different biosynthetic systems for them in bacteria (7). One of these (the Nif system) is exclusively dedicated to the formation of Fe-S clusters for nitrogenase molecules in nitrogen-fixing bacteria, while the Isc system is widely present in bacteria and participates in the formation of Fe-S clusters for a broad spectrum of proteins. The third (Suf) system was discovered more recently (8) and coexists with the Isc system in several bacterial groups besides Archaea.

Most components of the Isc system have homologues in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and other eukaryotes. This contrasts to the other two systems, which are exclusively prokaryotic (6, 7). In *S. cerevisiae*, Fe-S clusters are assembled at the mitochondrial matrix independently of their final destination at the cytosol, nucleus or the mitochondria

themselves (3, 4, 6). A complex formed by the Isu1 and Isu2 proteins act as a scaffold upon which the clusters are assembled with the participation of the frataxin protein Yfh1, the cysteine desulfurase Nfs1 (which releases sulfur from cysteine) and an electron transfer chain consisting of NADH, ferredoxin reductase (Arh1) and ferredoxin (Yah1) (9). Once formed, the transfer of the Fe-S complex from the Isu1/Isu2 scaffold to the apoprotein requires the participation of a chaperone system formed by Ssq1, Jac1 and Mge1. In these latter steps a yeast monothiol glutaredoxin (Grx5) is also needed, perhaps to maintain Fe-S acceptor cysteine residues in the appropriate redox state (9, 10). All these proteins are also required for the biogenesis of Fe-S clusters destined to extramitochondrial proteins. Although the details of the Fe-S exporting process from the mitochondria have not been extensively characterized, it is known that this exporting requires components of the mitochondrial envelope such as the ABC transporter Atm1 and the sulphhydryl oxidase Erv1 (3, 4, 6). A cytosolic machinery (Cfd1, Nbp35, Nar1, Cia1 proteins) then participates in the assembly of Fe-S clusters during the maturation of cytosolic and nuclear apoproteins. This Fe-S assembly mechanism implies that mitochondria are essential for the maturation of all Fe-S proteins in yeast cells (3, 4, 6, 11). Although the process may be similar to that observed in higher eukaryotes, the existence of an independent extramitochondrial system in the latter case cannot be discarded (5).

Glutaredoxins (Grx)¹ are thiol transferases that employ reduced glutathione (GSH) as a substrate and catalyze glutathionylation and deglutathionylation reactions on cysteinyl groups in proteins (12,13). They have a role in the maintenance of the appropriate redox state of protein sulphhydryl groups, although glutathionylation regulation may also be a mechanism for protecting against oxidative stress. According to the presence of two or one cysteine residue at the glutaredoxin active site, glutaredoxins have been divided into two categories: dithiol and monothiol glutaredoxins, respectively (14). Among glutaredoxins, *Escherichia coli* Grx2 has an unusual structure and would correspond to a

third category (15). Dithiol glutaredoxins catalyze the reduction of thiol disulfides involving two cysteinyl groups and also of mixed disulfides between a protein cysteine residue and a GSH group (14). In contrast, the monothiol glutaredoxin mechanism of action exclusively involves the deglutathionylation of mixed disulfides (16). In *S. cerevisiae* two dithiol glutaredoxins coexist (Grx1 and Grx2) plus three monothiol glutaredoxins (Grx3, Grx4 and Grx5) (17, 18). As indicated above, a monothiol glutaredoxin (Grx5) of *S. cerevisiae* participates in the maturation of Fe-S clusters (10). In the absence of Grx5, yeast cells are unable to maturate Fe-S proteins and consequently do not carry out respiratory metabolism. Furthermore, they accumulate intracellular iron and are hypersensitive to stress caused by external oxidants (10, 17). The other two monothiol glutaredoxins of *S. cerevisiae* are located at the nucleus and probably carry out different functions to Grx5 (19, 20). Even so, when Grx3 or Grx4 is internalized into the mitochondria of a null *grx5* mutant by using the mitochondrial targeting sequence of Grx5, it is able to substitute for the biological function of Grx5.

The growing number of sequenced genomes has evidenced that both dithiol and monothiol glutaredoxins exist in many aerobic bacterial species and in lower and higher eukaryotes (21-23). Two subgroups of monothiol glutaredoxins can be established: those constituted by a single glutaredoxin domain (Grx), and those in which the glutaredoxin domain is N-terminally extended by a thioredoxin (Trx)-like domain (20, 21). This latter domain displays significant homology with thioredoxins, although it lacks the conserved active site of this family of redox regulators. Yeast Grx5 is an example of the single Grx structure, while yeast Grx3 and Grx4 and the human PICOT protein (24) are examples of the Trx-Grx domain structure. Interestingly, proteins with a Trx-Grx structure have only been observed in eukaryotes, while those with the single Grx structure are present both in prokaryotes and eukaryotes. In plants, multiple glutaredoxins with the same general structure may coexist in a given organism (25). All these observations support the idea

of a complex pattern of glutaredoxin-dependent thiol transferase functions.

Analysis of the human genome reveals the existence of a gene coding for a putative monothiol glutaredoxin with a single Grx domain. A similar situation occurs in chicken and other multicellular eukaryotes, where the existence of Grx5 homologues has also been revealed from genomic sequencing. However, despite their widespread presence throughout the evolutive scale, few functional studies exist on both prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins with the single Grx structure, other than those on yeast Grx5. The parasite *Plasmodium falciparum* contains a glutaredoxin with structure and enzymatic characteristics similar to those of yeast Grx5, although its function is currently unknown (26, 27). The yeast Grx5 homologue in *Escherichia coli*, named Grx4, has recently been described as an essential protein that lacks *in vitro* activity on substrates characteristic of dithiol glutaredoxins such as hydroxyethyl disulfide (28, 29); this also occurs with Grx5 (30). In order to advance into the functional characterization of monothiol glutaredoxins, in this work we have studied the ability of various different prokaryotic and eukaryotic Grx proteins to substitute the biological function of *S. cerevisiae* Grx5 glutaredoxin. Our results show that diverse monothiol glutaredoxins can carry out the function of Grx5 in yeast mitochondria.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and Plasmids - The *S. cerevisiae* strains employed in this work are described in Table I. The *LEU2* integrative expression plasmid pMM221 is described in Ref. 20. It contains the sequence coding for the mitochondrial targeting signal of Grx5 followed by a polylinker region and a 3HA/His₆ tag, under the control of the doxycycline-regulatable *tetO₂* promoter (31). Plasmid pMM227 contains the *S. cerevisiae* *GRX3* gene cloned in pMM221, in frame with the upstream and downstream coding sequences present in the vector (20). Plasmid pMM509 contains the DNA coding sequence of *E. coli* Grx4 from aa +2 to the last coding nucleotide (PCR amplified from

Escherichia coli DH5alpha genomic DNA), that was cloned between the NotI and BglII sites of the pMM221 polylinker, in frame with the Grx5 mitochondrial targeting sequence and the 3HA/His₆ tag of the vector. Plasmid pMM521 contains the *Synechocystis* sp. GrxC coding sequence from aa +1 to the last coding nucleotide, PCR amplified from a pQE80-derived clone containing the entire GrxC ORF, which was a gift from F.J. Florencio, University of Sevilla. It was subcloned between the NotI and PmeI sites of pMM221. cDNA coding for the human homologue of yeast Grx5 (corresponding to ORF C14orf87, named here as *hGRXM1*) was obtained from the American Type Culture Collection (IMAGE clone no. 6066312, from a human testis cDNA library). The region coding from aa +32 to the last coding nucleotide was subcloned from it, between the NotI and PmeI sites of pMM221, in frame with upstream and downstream coding sequences. The resulting plasmid was named pMM540. cDNA coding for the chicken homologue of yeast Grx5 was amplified from chicken liver total RNA (a gift from R. Soler, University of Lleida), using the Invitrogen SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR, following purchaser recommendations and employing appropriate oligonucleotides to amplify from the first codon to the stop codon. The resulting fragment was cloned between the XhoI and BamHI sites of pBluescript SK+ (plasmid pMM626). The coding sequence from aa +33 to the last nucleotide preceding the stop codon was then subcloned into pMM221, using the NotI and PmeI polylinker sites, in frame with upstream and downstream coding sequences of the vector. The resulting plasmid was named pMM636. Plasmid pMM54 (10) contains a *GRX5-3HA* construction expressed under its own promoter. All constructions were checked by DNA sequencing.

Growth Conditions - *S. cerevisiae* cells were grown in the conditions described in Ref. 20. Expression from the *tetO₂* promoter was modulated with different concentrations of doxycycline, as indicated in each experiment. Samples for further analyses were taken from cells that had

been grown exponentially at 30°C for at least ten generations.

Genetic Methods - DNA manipulations, bacterial and yeast transformations, crosses between yeast strains and tetrad analyses were carried out by standard methods. Integrative plasmids were linearized by ClaI digestion before transformation of yeast cultures.

In Silico Analysis - Homologues of yeast protein Grx5 (Swiss-Prot entry Q02784) were searched using the BLASTP program with default parameters (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Multiple protein sequence alignments were done with ClustalW (32), using the European Bioinformatics Institute tools (www.ebi.ac.uk). The MITOPROT program (33) was employed to predict mitochondrial targeting sequences and cleavage sites.

In Situ Hybridization - Paraformaldehyde-fixed samples were cryoprotected with 20% sucrose at 4°C. Cryostat sections (16 µm-thick) were mounted on silane coated slides air-dried and stored at -80°C. A plasmid derived from pBluescript SK+ that contained the *cGRXM1* first exon coding sequence (directionally cloned between the HindIII and BamHI sites of the vector) was used to synthesize the antisense and sense (control) riboprobes. Antisense probe was obtained after plasmid digestion with HindIII and transcription with T3 RNA polymerase in the presence of dig RNA labelling mix digoxigenin UTP (Roche, Mannheim, Germany). Sense riboprobe was obtained by digesting the plasmid with BamHI and transcribing with T7 RNA polymerase. Further steps were carried out by standard procedures (34). Images were taken using an Olympus BX50 microscope with a Nikon Dmx1200 digital camera. Embryos were staged according to the Hamburger and Hamilton stage series (35)

Other Methods - Mitochondria were purified and subfractionated as described in Ref. 36, from exponential yeast cultures in lactate medium. Conditions for Western analyses were as in Ref. 20.

RESULTS

Among prokaryotic organisms, most proteobacteria and cyanobacteria species

whose genome has been sequenced contain genes coding for Grx5 homologues (22, 23). An exception among proteobacteria is the ϵ group. Other groups of grampositive and gramnegative bacteria also lack Grx5 homologues, as well as most Archaea. This distribution roughly parallels that of bacterial groups that are able to synthesize glutathione (37). In order to determine whether bacterial homologues of Grx5 were able to carry out the functions of the yeast protein, we focused our attention on *E. coli* Grx4 and *Synechocystis* sp. GrxC proteins, which are the respective homologues of Grx5 in these two bacteria. *E. coli* Grx4 is an essential protein that *in vitro* can act as a substrate for thioredoxin reductase, although its actual *in vivo* reductant and biological role remain unknown (28, 29). *Synechocystis* sp. is the only monothiol glutaredoxin present in this cyanobacterium, where it coexists with dithiol glutaredoxins GrxA and GrxB². However, the functional role of GrxC has not yet been characterized. Homology between yeast Grx5 and bacterial Grx4 and GrxC extends throughout the entire protein sequence (Fig. 1A), except that Grx5 contains a 29 aa N-terminal extension that targets the protein to the mitochondrial matrix (10). The characteristic CGFS region essential for the monothiol glutaredoxin activity (22, 30) is present in the three proteins. GrxC lacks the C-terminal region rich in acidic residues that is present in both *E. coli* Grx4 and yeast Grx5 (Fig. 1A). The importance of the acidic region for the role of the respective proteins remains unknown. This acidic region is also present in the human and chicken homologues (Fig. 1A) but its presence among bacterial representatives is variable (22, 29).

Bacterial Grx4 and GrxC were expressed in the mitochondria of a yeast $\Delta grx5$ mutant, using a *tet* promoter-based expression system that internalizes foreign proteins into *S. cerevisiae* mitochondria by means of the mitochondrial targeting sequence of Grx5 (20). Subfractionation studies indicated that almost the totality of the Grx4 or GrxC protein expressed in the $\Delta grx5$ cells was targeted to the mitochondria, where it was located at the matrix, as occurs with yeast Grx5 (Fig. 2A). A minor proportion of GrxC and a major

one of Grx4 at their respective mitochondrial fractions exhibited a lower electrophoretic mobility than expected for mature processed forms. They probably correspond to non-processed molecules that contain the mitochondrial targeting sequence, which nevertheless are internalized into the mitochondria and destined to the matrix compartment. These lower mobility forms are also observed in western analyses of total cell extracts (Fig. 2D). Comparing their mobility with that of mature Grx5 and considering the respective amino acid lengths of the respective molecules (Fig. 1A), this supports the notion that a fraction of Grx4 and GrxC expressed in yeast is not processed. *E. coli* Grx4 partially rescued the inability of yeast $\Delta grx5$ cells to grow in respiratory conditions (YPD-glycerol medium) (Fig. 2B), while *Synechocystis* sp. GrxC rescued the respiratory defects of the mutant with an efficiency comparable to that of yeast nuclear Grx3 glutaredoxin (Fig. 2B). With respect to sensitivity to external oxidants such as *t*-BOOH or diamide, bacterial Grx4 and GrxC were almost as efficient as yeast Grx3 in rescuing the hypersensitivity of a $\Delta grx5$ mutant (Fig. 2C). The ratio of the activities of the two mitochondrial enzymes aconitase (containing Fe-S clusters) and malate dehydrogenase (without Fe-S clusters) provides a measure of the efficiency of the Fe-S assembly in mitochondrial proteins (20). We determined this ratio in $\Delta grx5$ cells expressing Grx4 or GrxC in their mitochondria (Fig. 2D). In concordance with the growth pattern in YPD-glycerol medium, cyanobacterial GrxC was more efficient than *E. coli* Grx4 in its ability to synthesize active aconitase; in fact, relative aconitase levels in cells expressing GrxC were almost similar to those in cells expressing yeast Grx3 at their mitochondria (Fig. 2D). The fact that synthesis of mature aconitase in the $\Delta grx5$ mutant was due to the expression of the heterologous glutaredoxin was demonstrated by switching off expression of the Grx genes from the *tet* promoter by the addition of doxycycline, which abolished relative aconitase activity (Fig. 2D and box). It is important to stress that in the absence of doxycycline, that is, in the same conditions as in the experiments

shown in Fig. 2B and C showing growth patterns, the levels of both processed and unprocessed Grx4 and GrxC were at least comparable to those of Grx5 in wild type yeast cells (Fig. 2D, box).

To summarize, bacterial monothiol glutaredoxins such as Grx4 and GrxC are able to complement mutant phenotypes of yeast cells lacking Grx5, with cyanobacterial GrxC being more efficient in this respect.

BLASTP search of the human genome revealed the existence of a gene coding for a putative product that displays a large degree of homology with *S. cerevisiae* Grx5 (Fig. 1A). The gene is located at human chromosome 14 (position 14q32.13) and is called C14orf87 at www.ncbi.nih.gov/entrez (GeneBank accession number BC047680). Based on the homology of its putative product with other monothiol glutaredoxins with a single Grx domain, we propose the name *hGRXM1* for this gene. Its sequence predicts two exons separated by a single long intron that interrupts the coding sequence after nucleotide +297 (Fig. 1B). Sequencing its cDNA (IMAGE clone no. 6066312) confirmed the continuity of the proposed coding sequence in databases. It should be mentioned that although the hGRXM1 protein displays homology with the PICOT protein which is also present in human cells, the latter is a monothiol glutaredoxin of the Trx-Grx type (24). The MITOPROT program (33) predicts a mitochondrial targeting sequence for hGRXM1, with a cleavage site after position +31. We therefore subcloned the *hGRXM1* cDNA corresponding to the predicted mature form of the protein in the expression vector pMM221 and studied the ability of hGRXM1 to rescue the defects of the yeast $\Delta grx5$ mutant. The human protein was efficiently compartmentalized in the mitochondrial matrix of the mutant (Fig. 3A) and in these conditions complemented the defects of the mutant with respect to: growth under respiratory conditions (Fig. 3B), sensitivity to external oxidants such as *t*-BOOH or diamide (Fig. 3C), and synthesis of active aconitase (Fig. 3D). These results point to the conservation between human hGRXM1 and Grx5 regarding their functionality in the yeast mitochondria.

A similar BLASTP search using yeast Grx5 as bait revealed the presence of a gene located at chromosome 5 of the chicken genome, coding for a Grx5 homologue (named LOC423440, GeneBank accession number AJ720261). We propose calling this gene *cGRXM1*. Its predicted product displays extensive homology with hGRXM1 and also with other monothiol glutaredoxins (Fig. 1A). The gene has a structure similar to *hGRXM1*, with a single intron that interrupts the coding sequence after nucleotide +311 (Fig. 1B). MITOPROT analysis of *cGRXM1* also predicts a mitochondrial targeting sequence in it, with a cleavage site after aa +32. We were able to synthesize the *cGRXM1* cDNA by RT-PCR using total RNA from chicken brain or liver tissue, which indicates that this gene is expressed at such locations. Total liver RNA was then used to clone the cDNA expanding the entire *cGRXM1* coding sequence plus the stop codon, without flanking regions (see Material and Methods). This was followed by subcloning of the region coding for the predicted mature protein in pMM221. This allowed 3HA tagging plus mitochondrial matrix targeting of *cGRXM1* (Fig. 4A). Using the same strategy as above for other monothiol glutaredoxins, it was demonstrated that *cGRXM1* rescues the defects of the *S. cerevisiae grx5* mutant with respect to growth in glycerol medium, sensitivity to oxidants such as *t*-BOOH and the activity of the Fe/S enzyme aconitase (Fig. 4). However, restoration of growth in respiratory conditions and of aconitase levels was not as efficient as in the case of the human species.

Chicken is a useful model to study *in vivo* gene expression during embryogenesis. We therefore studied *cGRXM1* mRNA expression by *in situ* hybridization using different tissues from embryos at different stages of development. In 16-day embryos (stage 42 of development), a strong expression signal was observed in many tissues. In particular, various different types of nervous system cells (such as motoneurons in the spinal cord, Purkinje cells in cerebellum and granular cells in the visual cortex) displayed a strong signal (Fig. 5). Significant expression was also observed in muscle, kidney and lung cells,

in liver and in heart (not shown), among other tissues. We therefore conclude that *GRXM1* expression is required in different tissue cells during embryogenesis.

DISCUSSION

In addition to being essential for central biological processes such as respiration, photosynthesis or nitrogen fixation, more recent studies have shown that Fe-S clusters are also required for carbon metabolism, amino acid and vitamin biosynthesis, heme formation, ribosome biogenesis or DNA repair, among others (4-7). In eukaryotic cells, these functions require the participation of mitochondrial, cytosolic or nuclear Fe-S proteins. Redox sensing is also an important function of Fe-S clusters, based on the sensitivity of their structure to oxidative conditions. Thus, the *E. coli* SoxR protein contains a Fe-S cluster that senses superoxide and nitric oxide stress and transmits the signal to the SoxS regulator for activation of a set of antioxidant genes (38). FNR is another Fe-S associated bacterial sensor that controls gene expression in response to oxygen limitation (39). It has recently been shown that human glutaredoxin 2 contains a Fe-S cluster in its inactive form and that enzyme activation requires degradation of the cluster. From these observations, it has been suggested that the glutaredoxin 2 Fe-S cluster could act as a redox sensor of oxidative stress (40). Aft1 and Aft2-mediated iron assimilation in *S. cerevisiae* in response to deprivation of the metal also requires the participation of Fe-S clusters at the mitochondrial level (41, 42). Although the sensing mechanism and the specific protein that acts as a sensor have not been characterized yet, these observations could explain why yeast mutants affected in Fe-S biogenesis accumulate iron at their mitochondria (3, 6). In fact, in the mutants transcriptional control mediated by Aft1/Aft2 would become unregulated.

The mechanism for the biogenesis of Fe-S clusters in eukaryotic cells is mostly known from studies in *S. cerevisiae* cells. In yeast, it occurs at the mitochondria with the participation of components homologous to the bacterial Isc system (3-7). The *S. cerevisiae* monothiol glutaredoxin Grx5 is

required for the biosynthesis of these clusters (10). Isu1 and Isu2 play a central role in the biosynthetic pathway, acting as a scaffold for *de novo* synthesis of the clusters (9). While sulfur atoms are provided by the activity of cysteine desulfurase (Nfs1), how iron atoms are recruited and delivered to the Isu1/Isu2 scaffold is well-understood. Based on *in vitro* studies with *E. coli* components of the Isc machinery, it has recently been proposed that IscA, the bacterial homologue of yeast Isa1 and Isa2 proteins (3), could carry out the function of recruiting iron to the scaffold complex (43). In *S. cerevisiae* mitochondria, Grx5 would be required at a step after the formation of the Fe/S clusters on the Isu1/Isu2 scaffold, maybe during insertion of the former into apoproteins (9). Nevertheless, the fact that overexpression of Isa2 partially suppresses the defects of a *grx5* mutant (10) and that a physical interaction has been detected between Grx5 and Isa1 (23) suggest some kind of functional relationship between Grx5 and the Isa proteins. The specific role of Grx5 in the biosynthetic process is not known, although the requirement for an appropriate redox state of cysteine residues in proteins involved both in the biogenesis of the clusters on the Isu1/Isu2 scaffold and in the transfer of clusters to apoproteins seems evident. Several *in vitro* observations with components of the bacterial Isc system support this hypothesis. *E. coli* dithiolic glutaredoxins 1, 2 and 3 stimulate insertion of Fe/S clusters into the FNR apoprotein (44). Delivering iron atoms from the *E. coli* IscA protein into the IscU scaffold also requires the thioredoxin system (43). Although these observations cannot necessarily be extrapolated to *in vivo* conditions, they support the requirement for specific redox conditions for acceptor cysteine residues in the biosynthetic complexes. Grx5 acts as a deglutathionylation enzyme (30). It could act by repairing mixed disulfides formed between GSH and components of the biosynthetic complex under the oxidant conditions of the mitochondrial matrix, thus restoring the functionality of essential cysteine residues in the Fe-S biosynthetic machinery.

Monothiol glutaredoxins are present both in prokaryotes and eukaryotes (21-23), indicating an early evolutive diversification between the monothiolic and dithiolic mechanisms of glutaredoxin action. Yeast mitochondrial Grx5 can be taken as a model for a monothiol glutaredoxin with a single Grx domain, as opposed to Grx3 and Grx4 also in *S. cerevisiae* cells, which contain an additional Trx-like domain (22, 23). Another yeast species, *Schizosaccharomyces pombe*, also contains both types of monothiol glutaredoxins, and the absence of the *GRX5* counterpart leads to similar phenotypes to the *S. cerevisiae* *grx5* null mutant (45, 46). Among the Grx5-like proteins, only the biological role of Grx5 has so far been determined, although *in vitro* studies have also been performed with the *E. coli* Grx4 (28) and *P. falciparum* homologues (26). The biological role of *E. coli* Grx4 was not determined, but the protein was regarded as essential since null mutants in the *grx4* gene could not be obtained using various different genetic approaches (28). In the work presented here the *E. coli* Grx4 and the *Synechocystis* sp. GrxC proteins are able to substitute for Grx5 function when compartmentalized in the yeast mitochondria. Not all the defects of the *grx5* mutant are however rescued at the same level. For all of the phenotypic traits tested, cyanobacterial GrxC performs better than *E. coli* Grx4. The increase in aconitase activity over the mutant basal levels in the cells expressing the heterologous protein was only about two-fold in the case of Grx4, which could be taken as a measure of the relative efficiency of Fe-S cluster assembly in the apoprotein. However, this was sufficient to allow significant growth in glycerol medium (which requires the maturation of the Fe-S Rip1 protein present in the mitochondrial electron carrier chain) and resistance to diamide and *t*-BOOH treatment. In contrast, *Synechocystis* sp. GrxC protein and the eukaryotic homologue hGRXM1 made it possible to achieve aconitase levels close to those found in wild type cells, which is indicative of an efficient complementation of the *grx5* defects. Chicken cGRXM1 allowed achieving intermediate aconitase levels. Growth patterns in glycerol medium are in accordance with these relative

differences. Besides the cysteine residue at the active site, Grx5 contains a second cysteine at position 117. Many, although not all, Grx5 homologues also contain a cysteine residue at an equivalent position. By site directed mutagenesis, we have shown that the C117 residue is not essential for the biological activity of Grx5 (22), although it may participate in the activity of the enzyme in *in vitro* assays (30). Of the proteins tested in this study, only GrxC lacks that cysteine residue. In spite of this, this glutaredoxin is able to function at the yeast mitochondria, confirming the dispensability of the second cysteine *in vivo*. The glutamic acid-rich region at the C-end of Grx5 and other homologues (Ref. 22 and Fig. 1) is absent in GrxC, which also indicates its dispensability for monothiol glutaredoxin activity.

Overall, the above studies point to a functional conservation between Grx5 and its bacterial and eukaryotic homologues. They are in accordance with a recent report demonstrating the role of the zebra fish Grx5 homologue in Fe/S cluster synthesis and heme formation (47). Lack of Grx5 in this organism causes hypochromic anaemia.

Components of the bacterial Isc system are structurally conserved throughout evolution, and it seems that Fe-S assembly mostly, if not totally, occurs at the mitochondria in higher eukaryotes. In accordance with this, primary sequence analysis predicts a mitochondrial localization for hGRXM1 and cGRXM1. Our *in situ* hybridization experiments demonstrate that the *cGRXM1* gene is expressed in a variety of tissues, particularly in the nervous system, from early stages of chicken embryogenesis. This is accordance with the situation in zebra fish, where the Grx5 homologue is also expressed in a variety of tissues during embryogenesis (47). Although our results do not definitively prove the universal requirement for a monothiol glutaredoxin of the Grx type for mitochondrial Fe-S synthesis, they clearly demonstrate, for all the molecules tested, their ability to participate in the Fe-S biosynthetic complexes in yeast mitochondria. In other words, no functional barriers related to low molecular weight monothiol glutaredoxins have appeared along evolution.

REFERENCES

1. Beinert, H., Holm, R.H., and Münck, E. (1997) *Science* **277**, 653-659
2. Beinert, H. (2000) *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 2-15
3. Gerber, J., and Lill, R. (2002) *Mitochondrion* **2**, 71-86
4. Balk, J., Lill, R. (2004) *ChemBioChem* **5**, 1044-1049
5. Rouault, T.A., and Tong, W.H. (2005) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 345-351
6. Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2005) *Trends Biochem. Sci.* **30**, 133-141
7. Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005) *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 247-281
8. Takahashi, Y., and Tokumoto, U. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 28380-28383
9. Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003) *EMBO J.* **22**, 4815-4825
10. Rodríguez-Manzanares, M.T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109-1121
11. Balk, J., Aguilar Netz, D.J., Tepper, K., Pierik, A.J., and Lill, R. (2005) *Mol Cell Biol.* **25**, 18033-18041
12. Holmgren, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13963-13966
13. Fernandes, A.P., and Holmgren, A. (2004) *Antiox. Red. Sign.* **6**, 63-74
14. Vlamis-Gardikas, A., and Holmgren, A. (2002) *Methods Enzymol.* **347**, 286-296
15. Xia, B., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (2001) *J. Mol. Biol.* **310**, 907-918
16. Bushweller, J.H., Aslund, F., Wüthrich, K., and Holmgren, A. (1992) *Biochemistry* **31**, 9288-9293

17. Rodríguez-Manzanaque, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8180-8190
18. Wheeler, G.L., and Grant, C.M. (2004) *Physiol. Plant.* **120**, 12-20
19. Lopreiato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrigoni, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L.A., and Carignani, G. (2004) *Biochem. J.* **377**, 395-405
20. Molina, M.M., Bellí, G., de la Torre, M.A., Rodríguez-Manzanaque, M.T., and Herrero, E. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 51923-51930
21. Isakov, N., Witte, S., and Altman, A. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 537-539
22. Bellí, G., Polaina, J., Tamarit, J., de la Torre, M.A., Rodríguez-Manzanaque, M.T., Ros, J., and Herrero, E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37590-37596
23. Vilella, F., Alves, R., Rodríguez-Manzanaque, M.T., Bellí, G., Swaminathan, S., Sunnerhagen, P., and Herrero, E. (2004) *Comp. Funct. Genom.* **5**, 328-341
24. Witte, S., Villalba, M., Bi, K., Liu, Y., Isakov, N., and Altman, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1902-1909
25. Lemaire, S. (2004) *Photosynth. Res.* **79**, 305-318
26. Rahlfs, S., Fischer, M., and Becker, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **268**, 1404-1409
27. Deponte, M., Becker, K., and Rahlfs, S. (2005) *Biol. Chem.* **386**, 33-40
28. Fernandes, A.P., Fladvad, M., Berndt, C., Andrésen, C., Lillig, C.H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A., and Vlamis-Gardikas, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 24544-24552
29. Fladvad, M., Bellanda, M., Fernandes, A.P., Mammi, S., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., and Sunnerhagen, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 24553-24561
30. Tamarit, J., Bellí, G., Cabisco, E., Herrero, E., and Ros, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25745-25751
31. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) *Yeast* **13**, 837-848
32. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
33. Claros, M.G., and Vincens, P. (1996) *Eur. J. Biochem.* **241**, 770-786
34. Casanovas, A., Ribera, J., Hager, G., Kreutzberg, G.W., and Esquerda, J.E. (2001) *J. Neurosci. Res.* **63**, 469-479
35. Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951) *J. Morphol.* **88**, 49-92
36. Diekert, K., de Kroon, A.I.P.M., Kispal, G., and Lill, R. (2001) *Methods Cell Biol.* **65**, 37-51
37. Copley, S.D., and Dhillon, J.K. (2002) *Genome Biol.* **3**, 0025.1-0025.16
38. Demple, B., Ding, H., and Jorgensen, M. (2002) *Methods Enzymol.* **348**, 355-364
39. Kiley, P.J., and Beinert, H. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 181-185
40. Lillig, C.H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M.E., Hudemann, C., Bill, E., and Holmgren, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8168-8172
41. Chen, O.S., Crisp, R.J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D.R., and Kaplan, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 29513-29518
42. Rutherford, J.C., Ojeda, L., Balk, J., Mühlenhoff, U., Lill, R., and Winge, D.R. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 10135-10140
43. Ding, H., Harrison, K., and Lu, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 30432-30437
44. Achebach, S., Tran, Q.H., Vlamis-Gardikas, A., Müllner, M., Holmgren, A., and Uden, G. (2004) *FEBS Lett.* **565**, 203-206
45. Chung, W.H., Kim, K.D., and roe, J.H. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 604-610
46. Kim, H.G., Park, E.H., and Lim, C.J. (2005) *Mol. Cells* **20**, 43-50
47. Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K. et al. (2005) *Nature* **436**, 1035-1039

FOOTNOTES

* We thank F.J. Florencio and R. Soler for the gift of biological material. This article was supported in part by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (BFU2004-03167) and from the Generalitat de Catalunya (2001SGR00305). MMM was recipient of a grant from the Generalitat de Catalunya.

¹ The abbreviations used are: Grx, glutaredoxin; GSH, reduced glutathione; ORF, open reading frame; *t*-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide; Trx, thioredoxin

² F.C. Florencio, personal communication

LEGENDS TO THE FIGURES

FIG. 1. **Structure of various different monothiol glutaredoxins.** A. ClustalW multiple alignment analysis of the following monothiol glutaredoxins (SwissProt accession number into parenthesis): *S. cerevisiae* Grx5 (Q02784), *E. coli* Grx4 (P37010), *Synechocystis* sp. (P73056), *Gallus gallus* cGRXM1 (Q5ZK23), *Homo sapiens* hGRXM1 (Q86WY3). Asterisks mark positions with identical residues. The conserved active site sequence CGFS is boxed. B. Structure of the genes coding for the chicken (*cGRXM1*, GeneBank accession number AJ720261) and human (*hGRXM1*, GeneBank accession number BC047680) homologues of yeast Grx5. Dark boxes correspond to the 5' and 3' untranslated sequences, grey boxes to exons and lines to introns, as predicted in the respective genome pages at www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez (names into parenthesis correspond to the original description of the genes).

FIG. 2. **Rescue of the *S. cerevisiae* Δ grx5 mutant defects by the mitochondrial forms of *E. coli* Grx4 and *Synechocystis* sp. GrxC.** A. Derivatives of pMM221 are able to compartmentalize *E. coli* Grx4 (plasmid pMM509, integrated in strain MML673) or *Synechocystis* sp. GrxC (plasmid pMM521, integrated in strain MML681) in the mitochondrial matrix of *S. cerevisiae* cells. Cultures of the respective strains were exponentially grown in lactate medium (36) at 30°C to an absorbance (600 nm) of about 0.6 before mitochondrial isolation and subfractionation. Strain MML235 expressing a Grx5-3HA construct under its own promoter (10) was employed as a control. TE, total cell extract; MT, mitochondrial fraction; IMS, intermembrane space; MX, matrix; PM, post-mitochondrial fraction. Twenty micrograms of protein were loaded in the TE lines, and 5 μ g were loaded in the other lanes. Anti-HA antibodies were used in the Western blot analyses to detect the HA-tagged proteins in the respective fractions, whereas anti-lipoic acid antibodies were used to detect the matrix marker α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH). B. Growth on glucose (YPD plates) or glycerol (YPGly plates), after 3 days at 30°C, of strains with a chromosomal Δ grx5 background expressing no mitochondrial glutaredoxin (MML289) or the mitochondrial forms of *S. cerevisiae* Grx5 (Grx5_{sc}, MML241), *S. cerevisiae* Grx3 (Grx3_{sc}, MML455), *E. coli* Grx4 (Grx4_{ec}, MML707) or *Synechocystis* sp. GrxC (GrxC_{sy}, MML706). C. Sensitivity to *t*-BOOH or diamide of the strains described in part B. YPD plates containing the indicated oxidant concentrations were inoculated with 2 μ l drops of successive 1:5 dilutions of exponential cultures of the respective strains, and incubated at 30°C for 3 days. D. Ratio between aconitase and malate dehydrogenase activities in exponential cells at 30°C in YPGalactose medium. The same strains were employed as in part B (expressing the indicated mitochondrial forms of monothiol glutaredoxins). Doxycycline was used at the indicated concentrations in the growth medium to modulate expression from the *tetO*₂ promoter. Values are normalized with respect to strain MML241 that expresses yeast Grx5 under its own promoter (unit value). *Boxed panels* show the Western blot analyses of HA-tagged Grx in total cell extracts from the strains expressing the indicated Grx.

FIG. 3. Rescue of the *S. cerevisiae* *Agrx5* mutant defects by the mitochondrial form of human hGRXM1. A. A derivative of pMM221 (plasmid pMM540, integrated in strain MML725) is able to compartmentalize hGRXM1 in the mitochondrial matrix of *S. cerevisiae* cells. Experimental conditions were as in Fig. 2 (part A). B. Growth on glucose (YPD plates) or glycerol (YPGly plates), after 3 days at 30°C, of strains with a *Agrx5* background expressing no mitochondrial glutaredoxin (MML289) or the mitochondrial forms of *S. cerevisiae* Grx5 (Grx5_{sc}, MML241), *S. cerevisiae* Grx3 (Grx3_{sc}, MML455) or human hGRXM1 (MML731). C. Sensitivity to *t*-BOOH or diamide of the strains described in part B. YPD plates containing the indicated oxidant concentrations were inoculated with 2 µl drops of successive 1:5 dilutions of exponential cultures of the respective strains, and incubated at 30°C for 3 days. D. Ratio between aconitase and malate dehydrogenase activities in exponential cells at 30°C in YPGalactose medium. The same strains were employed as in part B (expressing the indicated mitochondrial forms of monothiol glutaredoxins). Doxycycline was used at the indicated concentrations in the growth medium to modulate expression from the *tetO*₂ promoter. Values are normalized with respect to strain MML241 that expresses yeast Grx5 under its own promoter (unit value). *Boxed panels* show the Western blot analyses of HA-tagged Grx in total cell extracts from the strains expressing the indicated Grx.

FIG. 4. Rescue of the *S. cerevisiae* *Agrx5* mutant defects by the mitochondrial form of chicken cGRXM1. A. A derivative of pMM221 (plasmid pMM636, integrated in strain MML760) is able to compartmentalize cGRXM1 in the mitochondrial matrix of *S. cerevisiae* cells. Experimental conditions were as in Fig. 2 (part A). B. Growth on glucose (YPD plates) or glycerol (YPGly plates), after 3 days at 30°C, of strains with a *Agrx5* background expressing no mitochondrial glutaredoxin (MML100) or the mitochondrial forms of *S. cerevisiae* Grx5 (Grx5_{sc}, MML240), *S. cerevisiae* Grx3 (Grx3_{sc}, MML454) or chicken cGRXM1 (MML771). C. Sensitivity to *t*-BOOH or diamide of the strains described in part B. YPD plates containing the indicated oxidant concentrations were inoculated with 2 µl drops of successive 1:5 dilutions of exponential cultures of the respective strains, and incubated at 30°C for 3 days. D. Ratio between aconitase and malate dehydrogenase activities in exponential cells at 30°C in YPGalactose medium. The same strains were employed as in part B (expressing the indicated mitochondrial forms of monothiol glutaredoxins). Doxycycline was used at the indicated concentrations in the growth medium to modulate expression from the *tetO*₂ promoter. Values are normalized with respect to strain MML240 that expresses yeast Grx5 under its own promoter (unit value). *Boxed panels* show the Western blot analyses of HA-tagged Grx in total cell extracts from the above strains expressing the indicated Grx.

FIG. 5. Expression analysis of *cGRXM1* during chicken embryogenesis. Images were taken from sections corresponding to different tissues of chick embryos at stage 42 (16 days) of development. Left and right panels correspond respectively to samples hybridized with the *cGRXM1* antisense and sense riboprobes. Arrows indicate types of cells showing significant labelling.

* MMM was recipient of a grant from the Generalitat de Catalunya. This article was supported in part by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (BFU2004-03167) and from the Generalitat de Catalunya (2001SGR00305).

Acknowledgements – We thank F.J. Florencio and R. Soler for the gift of biological material.

TABLE I
Strains employed in this work

Strain	Relevant phenotype	Comments
W303-1A	<i>MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15</i>	Wild type
W303-1B	As W303-1A but <i>MATα</i>	Wild type
MML100	<i>MATa grx5::kanMX4</i>	Ref. 10
MML235	<i>MATα [pMM54(GRX5-3HA)]::LEU2</i>	Integration of linear pMM54 in W303-1B
MML240	<i>MATa grx5::kanMX4 [pMM54(GRX5-3HA)]::LEU2</i>	Ref. 10
MML241	<i>MATα grx5::kanMX4 [pMM54(GRX5-3HA)]::LEU2</i>	Spore from a cross MML100 x MML235
MML289	<i>MATα grx5::kanMX4</i>	As MML100, but derived from W303-1B
MML443	<i>MATa [pMM227(GRX3-3HA)]::LEU2</i>	Ref. 20
MML454	<i>MATa grx5::kanMX4 [pMM227(GRX3-3HA)]::LEU2</i>	Ref. 20
MML455	<i>MATα grx5::kanMX4 [pMM227(GRX3-3HA)]::LEU2</i>	Spore from a cross MML241 x MML443
MML673	<i>MATα [pMM509(grx4-3HA)]::LEU2</i>	Integration of linear pMM509 in W303-1B
MML681	<i>MATα [pMM521(grxC-3HA)]::LEU2</i>	Integration of linear pMM521 in W303-1B
MML706	<i>MATα grx5::kanMX4 [pMM521(grxC-3HA)]::LEU2</i>	Spore from a cross MML100 x MML681
MML707	<i>MATα grx5::kanMX4 [pMM521(grx4-3HA)]::LEU2</i>	Spore from a cross MML100 x MML673
MML725	<i>MATa [pMM540(hGRXM1-3HA)]::LEU2</i>	Integration of linear pMM540 in W303-1A
MML731	<i>MATα grx5::kanMX4 [pMM540(hGRXM1-3HA)]::LEU2</i>	Spore from a cross MML289 x MML725
MML760	<i>MATα [pMM636(cGRXM1-3HA)]::LEU2</i>	Integration of linear pMM636 in W303-1B
MML771	<i>MATa grx5::kanMX4 [pMM636(cGRXM1-3HA)]::LEU2</i>	Spore from a cross MML100 x MML760

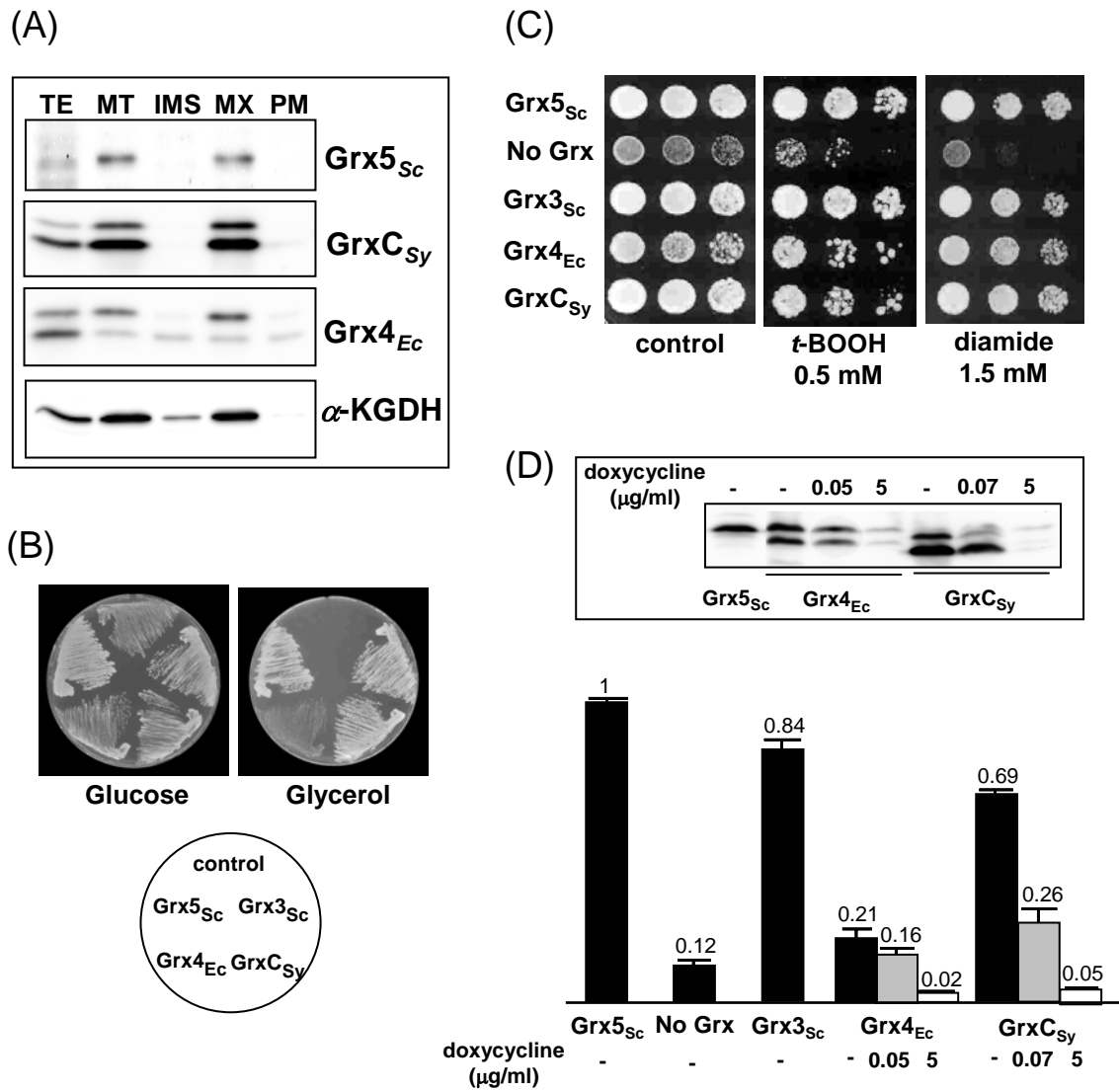


FIGURE 2

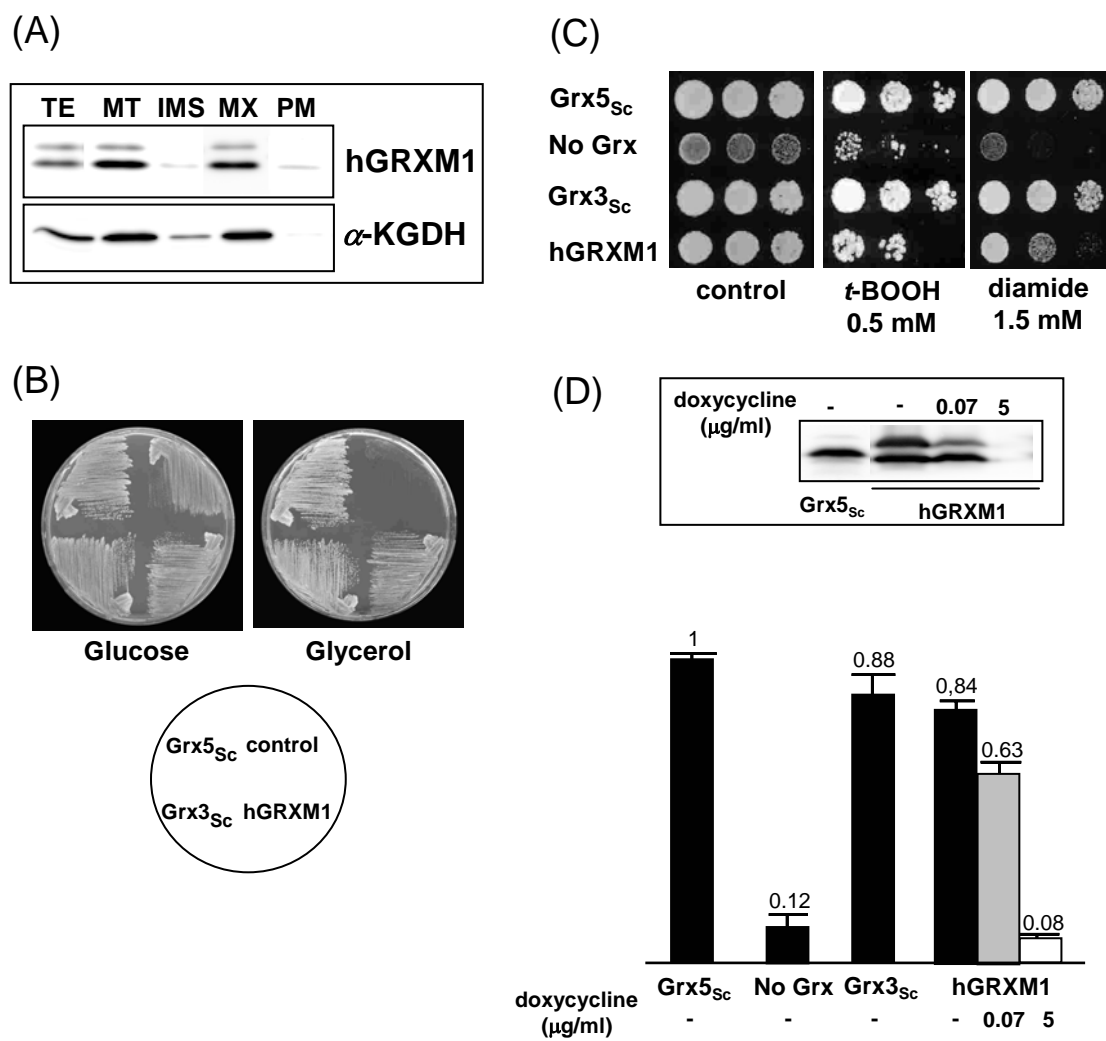


FIGURE 3

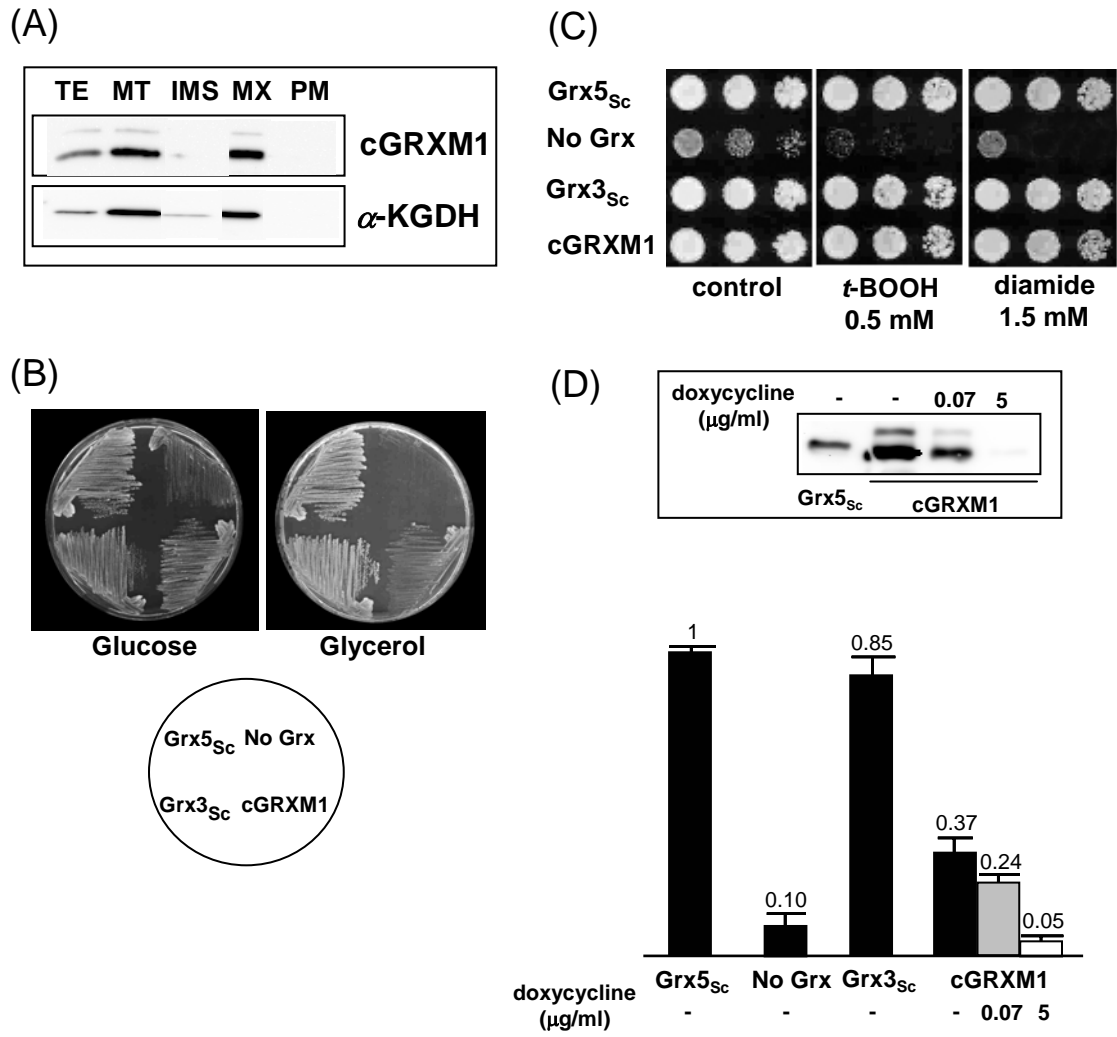


FIGURE 4

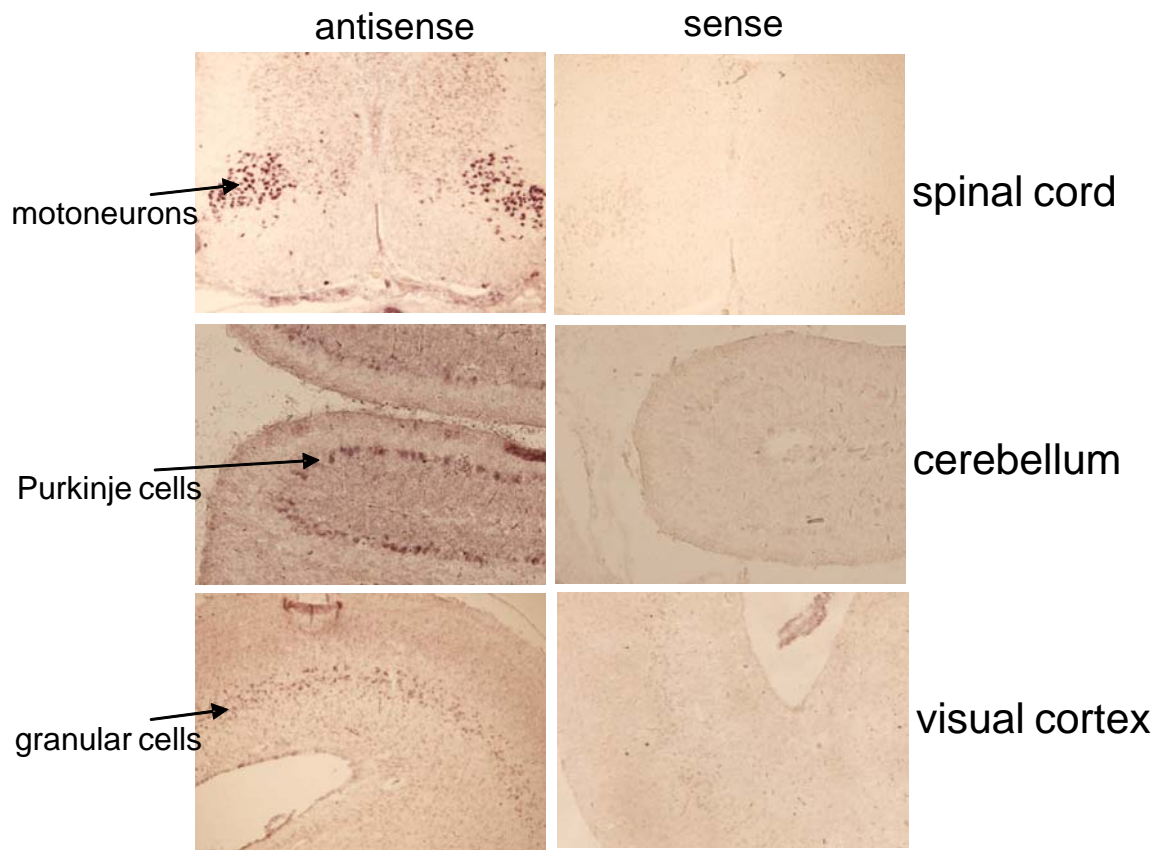
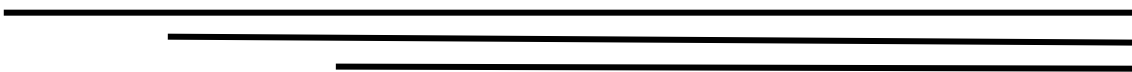


FIGURE 5

DISCUSIÓN



Las células de la levadura *S. cerevisiae* en ausencia del gen GRX5 muestran condiciones de estrés oxidativo continuo y alteración en la expresión de determinados genes

Los seres vivos vivimos en un ambiente oxidante desde hace cientos de millones de años. El oxígeno es requerido por muchos organismos para respirar y, por tanto, para poder vivir. Sin embargo, su utilización puede resultar perjudicial, ya que durante el metabolismo aeróbico pueden llegar a formarse especies reactivas del oxígeno nocivas para estos organismos. Para defenderse de este posible daño oxidativo, las células poseen, entre otras defensas antioxidantes, enzimas tiol oxidoreductasas.

Entre las tiol oxidoreductasas encontramos en estos seres vivos aerobios el sistema enzimático de las glutaredoxinas. Los componentes de este sistema catalizan reacciones redox donde interviene el GSH como poder reductor para reducir a través de las glutaredoxinas los puentes disulfuro entre grupos tiol de las proteínas (mecanismo ditiólico) o bien los puentes disulfuro mixtos entre grupos tiol de proteínas y el GSH (mecanismo monotiólico). De este modo, se mantiene el equilibrio redox en la célula y a la vez se protege ésta frente a condiciones de estrés oxidativo. La levadura *S. cerevisiae* posee dos tipos de glutaredoxinas en función de la estructura del centro activo, hecho que determina dos mecanismos diferentes de acción: las glutaredoxinas ditiólicas Grx1 y Grx2, y las glutaredoxinas monotiólicas Grx3, Grx4 y Grx5.

La ausencia de la glutaredoxina mitocondrial Grx5 produce una serie de fenotipos como son crecimiento deficiente en medio rico con glucosa como fuente de carbono o crecimiento nulo bajo una fuente de carbono respirable (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Este fenotipo se debe a que cuando se pasa del metabolismo fermentativo al respiratorio, o cuando las células ya crecen directamente en un medio respirable, se ve comprometida la viabilidad celular al haber mayor producción de ROS en la cadena de transporte mitocondrial durante la respiración. Posiblemente se producen ROS como consecuencia de un transporte de electrones incompleto, puesto que estas células no tienen una cadena respiratoria de transporte funcional al no poder sintetizar centros Fe/S, con lo que no poseen la proteína de Rieske (Rip1) madura (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Además, también se observa

que este mutante es mucho más sensible a agentes oxidantes externos (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Por otro lado, también produce una acumulación de proteínas glutationiladas, puesto que Grx5 no puede reducir los puentes disulfuro mixtos (Shenton *et al.*, 2002; Shenton y Grant, 2003), así como una carbonilación constitutiva de proteínas (parámetro que mide el estado de oxidación global de las proteínas) (Cabisco *et al.*, 2000). Así, el mutante *grx5* se encuentra bajo condiciones fisiológicas de oxidación endógena constante, lo que lo convierte en un modelo adecuado para estudiar el estrés oxidativo que tiene lugar en los organismos, en contraste con los estudios donde se aplica un estrés súbito por adición de un oxidante externo.

A nivel celular, la glutaredoxina monotiólica Grx5 de *S. cerevisiae* está implicada en la biosíntesis de centros Fe/S en la mitocondria (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). No se conoce exactamente en qué paso interviene, pero se cree que es necesaria una vez formados los centros Fe/S sobre el complejo Isu1/Isu2, posiblemente en el paso de inserción de los centros en las apoproteínas (Muhlenhoff *et al.*, 2002). En cualquier caso, Grx5 es necesaria para mantener el estado redox adecuado de algunos residuos de cisteína de la maquinaria de biosíntesis de los centros Fe/S. La falta de Grx5 provoca una acumulación de hierro en la célula, al igual que ocurre con la falta de otros componentes de la maquinaria de biosíntesis de centros Fe/S (Lill *et al.*, 1999). Además, su ausencia hace que las células de *S. cerevisiae* no puedan crecer en medio mínimo en ausencia de aminoácidos cuya ruta de biosíntesis contiene enzimas con centros Fe/S (glutamato, lisina y leucina). Globalmente, la falta de Grx5 conlleva una disminución generalizada de la actividad enzimática de proteínas con centros Fe/S, entre las cuales se halla la aconitasa, que se ha utilizado como medida de la eficiencia de formación de tales centros Fe/S (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002).

Al analizar el transcriptoma del mutante *grx5* se observan cambios en la expresión de algunos genes. En primer lugar se inducen genes controlados por el activador transcripcional Aft1 implicado en la homeostasis del hierro. A pesar de que se acumule hierro en el mutante *grx5*, dicha acumulación debe producirse en una forma no asimilable para la célula puesto que se inducen los genes de captación de hierro. Esta idea viene apoyada por el hecho de que en el mutante *yhf1* (carente de frataxina) también se acumule hierro y se induzcan

los genes de captación de hierro controlados por Aft1 (Foury y Talibi, 2001). Se ha planteado la hipótesis de que la molécula responsable de la homeostasis del hierro es una proteína con centros Fe/S (Rouault y Tong, 2005), de tal manera que en ausencia de Grx5 no se podrían formar los centros Fe/S y, por tanto, la proteína sensora de los niveles de hierro, de modo que se entraría en un círculo vicioso que tendría como resultado la acumulación de hierro en la célula. Alternativamente, podría ocurrir que la proteína sensora se activara al no formarse correctamente los centros Fe/S tal como se ha descrito recientemente con la Grx2 humana (Lillig *et al.*, 2005). Ello está en concordancia con trabajos recientes que demuestran que Aft1 y su homólogo Aft2 responden a la exportación de una molécula que posee centros Fe/S desde la mitocondria (Rutherford *et al.*, 2005). Desde este punto de vista, y dado que la Grx2 humana se encuentra en parte localizada en la mitocondria, esta proteína con centros Fe/S sería una candidata ideal en células humanas como proteína reguladora de la homeostasis de hierro bajo condiciones de estrés oxidativo (Rutherford *et al.*, 2005). No obstante, en *S. cerevisiae* no se ha demostrado que Grx5 pueda ejercer esta función. La Grx2 de *S. cerevisiae* se encuentra mayoritariamente en el citosol, aunque parte de la misma presenta localización mitocondrial (Pedrajas *et al.*, 2002). Por ello, esta fracción mitocondrial de Grx2 también podría llevar a cabo la función de proteína reguladora de la homeostasis del hierro (aunque no se sabe si presenta centros Fe/S en su estructura). O incluso ambas glutaredoxinas podrían funcionar conjuntamente, de manera que Grx5 actuaría de manera indirecta a través de Grx2 para controlar la homeostasis del hierro. El hecho de que el doble mutante *grx2 grx5* presente letalidad (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999) apoyaría esta idea. De todos modos, se necesitan realizar todavía más estudios para intentar averiguar la naturaleza de la proteína con centros Fe/S señalizadora de los niveles de hierro y, por tanto, reguladora de la homeostasis de este metal en células de levadura.

Otros genes que se inducen en el mutante *grx5* son *VHT1* y *BIO5*, implicados en el transporte de biotina. Ambos están bajo el control del transactivador Aft1. *VHT1* lo está directamente y *BIO5* podría estarlo aunque indirectamente, dado que su promotor no contiene sitios de unión de Aft1. Con ello se pone de manifiesto la relación que existe entre el metabolismo del hierro

y la biotina. En efecto, por un lado, *BIO5* se induce, cuando no hay hierro en el medio, de manera dependiente de Aft1 (Artículo 1) y, por otro, la enzima biotina sintasa de *E. coli* posee centros Fe/S al igual que la proteína Bio2 de la ruta de síntesis de biotina en *S. cerevisiae* (Ugulava *et al.*, 2001).

Por otro lado, también se observa inducción del gen *SNZ1* en el mutante *grx5*. Este gen está involucrado en la síntesis de la vitamina B₆, (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2002). Se ha descrito que esta vitamina actúa en la célula eliminando el oxígeno singlete (Bilski *et al.*, 2000), con lo que existe cierta relación entre el gen *SNZ1* y el estrés oxidativo. Este gen se induce sobretodo en las fases postdiáuxica y estacionaria de crecimiento, y aunque *GRX5* se expresa en la fase exponencial, *SNZ1* podría inducirse en el mutante para contrarrestar el defecto de *GRX5*, al igual que se ha demostrado que hace en ausencia de sus homólogos *SNZ2* y *SNZ3* (Padilla *et al.*, 1998). Dicha inducción, en condiciones de estrés oxidativo endógeno, podría conducir a una mayor eficiencia en la eliminación del oxígeno singlete.

Por último, en células desprovistas de *GRX5* se induce el gen *MLP1*. La proteína Mlp1 presenta una homología del 61% con Slt2, la cual es la MAP quinasa de la vía de integridad celular (Levin, 2005). Ésta vía se activa principalmente cuando hay algún daño en pared, y al llegar la señal a Slt2, ésta se activa por doble fosforilación en los residuos de tirosina y treonina de su dominio regulador. Sin embargo, el dominio regulador, el cual está altamente conservado entre las MAP quinasa, no está presente en Mlp1, puesto que de los tres residuos (treonina, glutamato y tirosina), tiene cambiado el aminoácido esencial treonina por una lisina. Ello hace que no se considere formalmente a Mlp1 como una MAP quinasa (Watanabe *et al.*, 1997). A pesar de ello, la proteína Mlp1 podría actuar de algún modo paralelamente a Slt2 y ejercer un papel protector frente al estrés oxidativo, al menos de manera más notable en el mutante *grx5*. De hecho, el doble mutante *grx5 mlp1* es hipersensible a *t*-BOOH y menadiona, aunque el mutante simple *mlp1* presente un fenotipo similar al de la cepa salvaje bajo estas condiciones de estrés. Parece lógico pensar que Mlp1 actuaría bajo condiciones continuas de estrés oxidativo. Por otro lado, *MLP1* podría estar actuando en una vía paralela a *GRX5* en respuesta a dicho estrés, de manera que la delección de ambos genes tiene efectos aditivos para las células de *S. cerevisiae*. Sin embargo, estudios del

transcriptoma del mutante simple *mlp1* llevados a cabo por nuestro grupo (en colaboración con el Dr. J.E. Pérez-Ortín de la Universitat de València) no permiten avanzar en la explicación del papel de la proteína Mlp1, puesto que el transcriptoma del mutante es muy similar al de una cepa salvaje.

En el mutante *grx5* los reguladores transcripcionales Msn2/4, Yap1 y Skn7 no están activados (puesto que no se inducen los genes regulados por los mismos), con lo que la situación de estrés en dicho mutante no llega al umbral de inducción de estos transactivadores, o bien los mismos responden sólo frente a estreses generados instantáneamente. Ello remarca el hecho de que un estrés oxidativo moderado permanente supone para la célula una situación totalmente diferente a la generada por un estrés oxidativo externo más intenso.

Entre los genes que se reprimen en el mutante *grx5* encontramos un grupo numeroso de genes involucrados en metabolismo respiratorio. También se observa represión de la expresión del gen *YFH1*, pero esta represión no es la causa de la bajada en la expresión de los genes del metabolismo respiratorio, puesto que en un mutante *yfh1* dicho grupo de genes se siguen expresando (Foury y Talibi, 2001). Nuestros trabajos sugieren que el transactivador Hap4, el cual está implicado en el control del metabolismo respiratorio, es el responsable de la represión de estos genes en el mutante *grx5*. Hap4 es la subunidad reguladora del complejo Hap2/3/4/5, de modo que el nivel de expresión de *HAP4* es el responsable de la actividad del complejo (Blom *et al.*, 2000). En condiciones normales, éste se activa en la fase postdiáuxica cuando la célula va a pasar de un metabolismo fermentativo a un metabolismo respiratorio. En ausencia de Grx5, existen condiciones de estrés oxidativo, que serían tan perjudiciales como la situación oxidante que se da en el metabolismo aeróbico, de modo que a la célula le conviene disminuir la expresión de los genes de dicho metabolismo para no acentuar los problemas oxidativos que ya ocasiona la delección del gen *GRX5*. Así, a través de Hap4 se reprimirían muchos de los genes del metabolismo respiratorio. Que ello es así, lo demuestra el hecho que la sobreexpresión de *HAP4* mediante el promotor *tetO₂* en el mutante *grx5* suprime la represión de la expresión de los genes respiratorios, aunque ello conlleve una menor velocidad de crecimiento celular y una mayor carbonilación de proteínas, es decir, efectos deletéreos

para la célula. Por último cabe indicar que no se conoce qué molécula regula a Hap4 en el mutante *grx5* y si la respuesta por parte de Hap4 se puede generalizar a otras situaciones de estrés oxidativo. En todo caso, cabe concluir que en condiciones de estrés oxidativo endógeno, las células de *S. cerevisiae* responden reprimiendo los genes responsables del metabolismo respiratorio.

Las glutaredoxinas monotiólicas de *S. cerevisiae*, así como de otros organismos tanto procariotas como eucariotas, pueden realizar la función de Grx5 cuando son compartimentalizadas en la mitocondria de *S. cerevisiae*

Grx5 presenta una localización mitocondrial, mientras que las otras dos glutaredoxinas monotiólicas de *S. cerevisiae*, Grx3 y Grx4, se encuentran localizadas en el núcleo. Grx3 y Grx4 tienen una estructura similar en tanto que están formadas por un dominio Trx con homología con las tioredoxinas y un dominio Grx de tipo glutaredoxina, unidos por una zona intermedia no conservada. A pesar de que estas proteínas tengan el dominio Trx, éste no es funcional como auténtica tioredoxina, puesto que le falta una de las dos cisteínas del centro activo conservadas en todas las tioredoxinas. Sin embargo, el dominio Trx de Grx3 (y probablemente también el de Grx4) es necesario para la internalización de esta proteína en el núcleo, aún cuando no contenga una secuencia consenso de localización nuclear. Por otro lado, la localización de Grx3 en el núcleo es constitutiva, puesto que ningún estrés de los aplicados alteró dicha localización (Artículo 2). Esta proteína no responde, pues, mediante su deslocalización ante condiciones de estrés, sino que su respuesta estaría mediada a través de interacciones con otras proteínas nucleares. A su vez, se ha visto que Grx4 es fosforilada por la proteína quinasa Bud32 en el núcleo (Lopreiato *et al.*, 2004). Está descrito que se producen interacciones entre tiol transferasas y proteínas quinasas en mamíferos (Morel y Barouki, 1999; Finkel y Holbrook, 2000). Por ejemplo, la proteína quinasa humana C θ interacciona con la glutaredoxina PICOT (Witte *et al.*, 2000), la cual es estructuralmente similar a Grx4. Debido a esta interacción y fosforilación de Grx4 por parte de la proteína quinasa Bud32, podríamos pensar que las

glutaredoxinas monotiólicas de *S. cerevisiae* se activan por fosforilación y sólo entonces serían capaces de regular a sus proteínas diana, posiblemente factores de transcripción de respuesta a estrés, mediante la regulación redox de sus cisteínas. Las glutaredoxinas monotiólicas Grx3 y Grx4 presentan una homología del 71% entre ellas (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999) y, aunque no esté definitivamente demostrado, probablemente sean funcionalmente redundantes. La presencia simultánea de estas proteínas en el genoma de *S. cerevisiae* se especula que podría ser consecuencia de la duplicación del genoma de un ancestro de esta especie (Lynch y Conery, 2000), que en este caso, y a diferencia de otros genes, no ha ido seguida de la pérdida de una de las dos copias resultado de dicha duplicación genómica. Hay que remarcar que la estructura Trx-Grx característica de Grx3 y Grx4 está presente en glutaredoxinas eucarióticas, pero no en procarióticas (Vilella *et al.*, 2004). Por tanto, la adquisición del dominio Trx por parte de las glutaredoxinas nucleares de *S. cerevisiae* ocurrió después de la aparición de los organismos eucariotas.

La familia de glutaredoxinas monotiólicas de *S. cerevisiae* está formada por miembros que presentan diferente localización subcelular. No obstante, en este estudio se ha demostrado que cuando se solventan las barreras de localización, las glutaredoxinas nucleares Grx3 y Grx4 pueden realizar la función de la glutaredoxina mitocondrial Grx5, mientras que la proteína ditiólica Grx2 no complementa los defectos fenotípicos del mutante *grx5* (Artículo 2). Esto parece indicar que dentro del sistema enzimático de glutaredoxinas, las glutaredoxinas monotiólicas difieren no sólo estructuralmente sino también funcionalmente de las ditiólicas en su función en *S. cerevisiae*, es decir, parece ser que el mecanismo de acción de cada tipo de glutaredoxina determina el tipo de función que estas proteínas pueden llevar a cabo en la célula. Por contra, Grx3 y Grx4 son capaces de sustituir la función mitocondrial de Grx5 cuando se sobreexpresan en dicho orgánulo bajo un promotor *tetO₂*, mientras que se observa una complementación parcial cuando sus niveles son similares a los de Grx5 en la cepa salvaje (Artículo 2). Ello hace pensar que esta complementación parcial podría deberse a la diferente estructura que presentan estas proteínas respecto a Grx5. El mayor tamaño de Grx3 y Grx4 podría entorpecer de algún modo la función mitocondrial que realizan en sustitución de Grx5, y así, el dominio Grx de estas proteínas podría ser la única

región de las mismas necesaria para dicha función. Sin embargo, en este trabajo se demostró que ambos dominios son necesarios para la funcionalidad de Grx3 en la mitocondria, a pesar de que solamente sea esencial la cisteína del centro activo de Grx3 localizada en el dominio Grx, y no lo sea ninguna de las tres cisteínas presentes en el dominio Trx. Con ello, Grx3 y Grx4 necesitan ambos dominios, posiblemente para adoptar una conformación adecuada, y la complementación parcial de la función de Grx5 que se observa al dirigir estas proteínas a la mitocondria podría deberse a la mayor complejidad estructural de estas proteínas una vez adquirieron el dominio Trx.

Sin embargo, la complementación fenotípica de los defectos del mutante *grx5*, no sólo tiene lugar por parte de las glutaredoxinas monotiólicas de *S. cerevisiae*, sino que se amplía a glutaredoxinas monotiólicas de otros organismos tanto procariotas como eucariotas. Se internalizaron en la mitocondria de un mutante *grx5* de *S. cerevisiae* dos glutaredoxinas monotiólicas procarióticas: Grx4 de *E. coli* y GrxC de *Synechocistis sp.* Se observó que ambas proteínas son capaces de realizar la función de la Grx5 de *S. cerevisiae* (Artículo 3). Las construcciones con las proteínas procarióticas mostraron una resistencia a agentes oxidantes semejante a la de una cepa salvaje, no obstante, el crecimiento en placa en medio respiratorio y la actividad aconitasa era mayor en el caso de GrxC. Paradójicamente, está descrito que la Grx4 procariótica aumenta su expresión en metabolismo respiratorio y podría estar implicada en la biosíntesis de centros Fe/S en *E. coli* (Fernandes *et al.*, 2005). Así, la menor complementación observada respecto de GrxC se podría explicar si tenemos en cuenta que la Grx4 de *E. coli* es una enzima esencial en este organismo con una alta especificidad de sustrato (Fernandes *et al.*, 2005), por lo que debe tener unas funciones bien definidas en *E. coli*. Pero estas funciones, por el hecho de que la proteína Grx4 de *E. coli* sea esencial, son todavía desconocidas, ya que no ha sido posible hasta la fecha obtener un mutante nulo de esta proteína y habrá que esperar a poder construir un mutante condicional de la misma. Por otro lado, la glutaredoxina GrxC presenta mayor conservación funcional con Grx5 que la Grx4 de *E. coli* al complementar mejor que ésta última los fenotipos de ausencia de centros Fe/S. Además, los niveles de complementación se acercan a los niveles mostrados por la Grx3 de *S. cerevisiae* y, dado que GrxC sólo contiene un dominio Grx, estudiando la

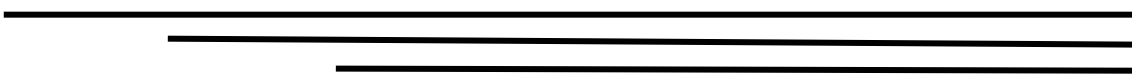
secuencia y estructura de esta glutaredoxina podríamos llegar a conocer de qué manera influye el dominio Trx para que Grx3 sea funcional. Paradójicamente, a GrxC le falta una segunda cisteína en el dominio C-terminal que sí está presente en la Grx5 de *S. cerevisiae* y otros homólogos de esta última. Mediante estudios con mutantes puntuales se demostró que esta segunda cisteína no es esencial para la actividad biológica de Grx5 (Belli *et al.*, 2002) y, dado que GrxC suprime los defectos fenotípicos de la falta de Grx5, ello nos confirma de nuevo que esta cisteína no se requiere para la actividad *in vivo* de las glutaredoxinas monotiólicas.

También se observa una complementación de los defectos fenotípicos del mutante *grx5* por parte de glutaredoxinas monotiólicas eucarióticas, concretamente glutaredoxinas pertenecientes a pollo (cGRXM1) y a humanos (hGRXM1) puesto que ambas proteínas internalizadas en la mitocondria complementan dichos defectos fenotípicos de manera semejante a una cepa salvaje (Artículo 3). Con ello podemos afirmar que se conserva la funcionalidad de las glutaredoxinas monotiólicas a lo largo de la evolución, desde organismos procariotas hasta organismos eucariotas.

Finalmente, al estudiar la expresión de esta glutaredoxina monotiólica de pollo *in vivo*, encontramos que dicha proteína se expresa ya desde la embriogénesis temprana y aumenta a medida que se va desarrollando el embrión de pollo. Principalmente se encuentra en tejido nervioso (motoneuronas de la médula espinal y células de Purkinje del cerebelo) y en las células granulares del córtex visual, aunque también se puede observar en células musculares. En relación a esta localización de cGRXM1, se ha descrito que la proteína PICOT se expresa en la embriogénesis durante la formación del tubo neural en ratón (Greene *et al.*, 2002). La proteína PICOT inhibe la activación de la quinasa c-Jun a través de su unión a la proteína quinasa PKC θ y, durante la embriogénesis de ratón, la presencia de ésta última está relacionada con la hematopoyesis (Wilda *et al.*, 2001). No está claro, no obstante, que las funciones de la proteína PICOT de eucariotas superiores (con una estructura Trx-Grx) sea similar a la de Grx5 de *S. cerevisiae*. En cambio, se ha descrito recientemente que la Grx5 del pez cebra puede complementar también un mutante *grx5* de *S. cerevisiae* y está involucrada en la formación de centros Fe/S y la síntesis de grupos hemo (Wingert *et al.*, 2005). La falta de

esta proteína conduce a una enfermedad denominada anemia hipocrómica, por lo que estos estudios ponen de manifiesto el interés biomédico de la investigación en glutaredoxinas monotiólicas. El hecho de que la glutaredoxina humana y la de pollo supriman eficientemente la falta de Grx5 en *S. cerevisiae* indica que su función está también conservada y, por tanto, es similar a la del pez cebra por lo que respecta a la síntesis de centros Fe/S y quizás también a la formación de grupos hemo. Así, podemos sugerir que la conservación evolutiva de la síntesis de centros Fe/S se extiende pues, desde bacterias heterótrofas como *E. coli* o fotosintéticas como *Synechocystis sp.* hasta eucariotas unicelulares como *S. cerevisiae* o pluricelulares como el pez cebra, el pollo o la especie humana.

CONCLUSIONES



De los estudios realizados a lo largo de este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

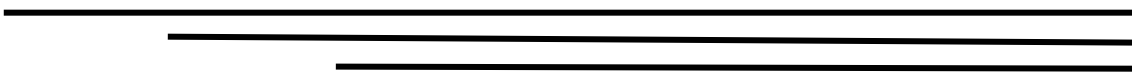
1. En un mutante *grx5* se inducen muchos de los genes del sistema de transporte de alta afinidad del hierro, los genes del transporte de biotina *VHT1* y *BIO5*, el gen *SNZ1* y el gen *MLP1* entre otros, mientras que se reprime la expresión del gen *YFH1* y de muchos genes del metabolismo respiratorio controlados por Hap4.
2. La inducción de los genes del regulón Aft1 en el mutante *grx5* apoya la hipótesis de la existencia de un sensor de los niveles de hierro que contendría centros Fe/S.
3. La represión de los genes del metabolismo respiratorio regulados por Hap4 es un mecanismo de respuesta ante condiciones de oxidación endógena constante como las presentes en un mutante *grx5*.
4. La glutaredoxina monotiólica Grx3 (y por homología Grx4) necesita el dominio Trx de la misma para la internalización de la proteína en el núcleo.
5. Las glutaredoxinas monotiólicas nucleares Grx3 y Grx4 pueden suplir en parte la actividad de la glutaredoxina monotiólica mitocondrial Grx5 cuando son dirigidas a la mitocondria.
6. Tanto el dominio Trx como el dominio Grx de Grx3 (y por homología los de Grx4) son necesarios para la actividad de esta proteína en la mitocondria rescatando los defectos de un mutante *grx5*.
7. Las cisteínas 2, 18 y 72 del dominio Trx de Grx3 no son esenciales para la actividad de Grx3, mientras que la cisteína 211 del dominio Grx de Grx3 sí lo es.

8. Las glutaredoxinas monotiólicas procarióticas Grx4 de *E. coli* y GrxC de *Synechocystis sp.* complementan los defectos fenotípicos de un mutante *grx5* cuando son dirigidas a la mitocondria.

9. En el genoma de pollo y en el de la especie humana se encuentran sendos genes que codifican glutaredoxinas monotiólicas que muestran elevada homología con la Grx5 de *S. cerevisiae*. Estos genes se han denominado cGRXM1 en pollo y hGRXM1 en la especie humana.

10. Las glutaredoxinas monotiólicas eucarióticas cGRXM1 de pollo y hGRXM1 de la especie humana complementan los defectos fenotípicos de un mutante *grx5* cuando son dirigidas a la mitocondria.

BIBLIOGRAFÍA



- Alberts, A. S., Bouquin, N., Johnston, L. H., Treisman, R. (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem* **273**: 8616-8622.
- Alepuz, P. M., Cunningham, K. W., Estruch, F. (1997). Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol* **26**: 91-98.
- Alepuz, P. M., Matheos, D., Cunningham, K. W., Estruch, F. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* RanGTP-binding protein msn5p is involved in different signal transduction pathways. *Genetics*: **153**: 1219-1231.
- Arner, E. S., Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6102-6109.
- Autor, A. P. (1982). Biosynthesis of mitochondrial manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. Precursor form of mitochondrial superoxide dismutase made in the cytoplasm. *J Biol Chem* **257**: 2713-2718.
- Avery, A. M., Avery, S. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **276**: 33730-33735.
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., Toledano, M. B. (2003). Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med* **35**: 889-900.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W., Tabor, H. (1991). Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5872-5876.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W., Tabor, H. (1993). Oxygen toxicity in a polyamine-depleted spe2 delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4693-4697.
- Balk, J., Lill, R. (2004). The cell's cookbook for iron--sulfur clusters: recipes for fool's gold? *Chembiochem* **5**: 1044-1049.
- Balk, J., Pierik, A. J., Aguilar Netz, D. J., Muhlenhoff, U., Lill, R. (2005). Nar1p, a conserved eukaryotic protein with similarity to Fe-only hydrogenases, functions in cytosolic iron-sulphur protein biogenesis. *Biochem Soc Trans* **33**: 86-89.
- Balk, J., Pierik, A. J., Netz, D. J., Muhlenhoff, U., Lill, R. (2004). The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *Embo J* **23**: 2105-2115.
- Barros, M. H., Nobrega, F. G. (1999). *YAH1* of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. *Gene* **233**: 197-203.
- Beck, T., Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692.
- Beinert, H. (2000). Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* **5**: 2-15.

Beinert, H., Holm, R. H., Munck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**: 653-659.

Beinert, H., Kiley, P. (1996). Redox control of gene expression involving iron-sulfur proteins. Change of oxidation-state or assembly/disassembly of Fe-S clusters? *FEBS Lett* **382**: 218-219; discussion 220-211.

Beinert, H., Kiley, P. J. (1999). Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 152-157.

Belli, G., Polaina, J., Tamarit, J., De La Torre, M. A., Rodríguez-Manzanque, M. T., Ros, J., Herrero, E. (2002). Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *J Biol Chem* **277**: 37590-37596.

Bermingham-McDonogh, O., Gralla, E. B., Valentine, J. S. (1988). The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 4789-4793.

Bilski, P., Li, M. Y., Ehrenshaft, M., Daub, M. E., Chignell, C. F. (2000). Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* **71**: 129-134.

Bindoli, A., Cavallini, L., Jocelyn, P. (1982). Mitochondrial lipid peroxidation by cumene hydroperoxide and its prevention by succinate. *Biochim Biophys Acta* **681**: 496-503.

Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M. B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**: 980-984.

Blaiseau, P. L., Lesuisse, E., Camadro, J. M. (2001). Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol Chem* **276**: 34221-34226.

Blom, J., De Mattos, M. J., Grivell, L. A. (2000). Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1970-1973.

Bouquin, N., Johnson, A. L., Morgan, B. A., Johnston, L. H. (1999). Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol Biol Cell* **10**: 3389-3400.

Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacquet, M., Labarre, J. (1999). The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol* **33**: 274-283.

Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L., Parker, L. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. **37**:755-767.

Briviba, K., Klotz, L. O., Sies, H. (1997). Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol Chem* **378**: 1259-1265.

Brown, J. L., North, S., Bussey, H. (1993). *SKN7*, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains

homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol* **175**: 6908-6915.

Bushweller, J. H., Aslund, F., Wuthrich, K., 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.

Butler, K. W. (1975). Drug-biomolecule interactions: spin-probe study of effects of anesthetics on membrane lipids. *J Pharm Sci* **64**: 497-501.

Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 27393-27398.

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3**: 3-8.

Carmel-Harel, O., Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* **54**: 439-461.

Casas, C., Aldea, M., Espinet, C., Gallego, C., Gil, R., Herrero, E. (1997). The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 621-637.

Cha, M. K., Choi, Y. S., Hong, S. K., Kim, W. C., No, K. T., Kim, I. H. (2003). Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 24636-24643.

Chae, H. Z., Chung, S. J., Rhee, S. G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* **269**: 27670-27678.

Chance, B., Schoener, B., Oshino, R., Itshak, F., Nakase, Y. (1979). Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem* **254**: 4764-4771.

Chang, T. S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S., Rhee, S. G. (2004). Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem* **279**: 50994-51001.

Chen, O. S., Crisp, R. J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D. R., Kaplan, J. (2004). Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem* **279**: 29513-29518.

Chen, O. S., Hemenway, S., Kaplan, J. (2002). Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12321-12326.

Chloupkova, M., Reaves, S. K., LeBard, L. M., Koeller, D. M. (2004). The mitochondrial ABC transporter Atm1p functions as a homodimer. *FEBS Lett* **569**: 65-69.

Choi, J. H., Lou, W., 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.

Cohen, B. A., Pilpel, Y., Mitra, R. D., Church, G. M. (2002). Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks. *Mol Biol Cell* **13**: 1608-1614.

Cohen, G., Rapatz, W., Ruis, H. (1988). Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur J Biochem* **176**: 159-163.

Collinson, E. J., 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., Grant, C. M. (2002). The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **277**: 16712-16717.

Coon, M. J., Ding, X. X., Pernecky, S. J., Vaz, A. D. (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb J* **6**: 669-673.

Costa, V., Amorim, M. A., Reis, E., Quintanilha, A., Moradas-Ferreira, P. (1997). Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143** (Pt 5): 1649-1656.

Courel, M., Lallet, S., Camadro, J. M., Blaiseau, P. L. (2005). Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Mol Cell Biol* **25**: 6760-6771.

Crawford, M. J., Sherman, D. R., Goldberg, D. E. (1995). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* flavohemoglobin gene expression. *J Biol Chem* **270**: 6991-6996.

Culotta, V. C., Howard, W. R., Liu, X. F. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 25295-25302.

Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., Hinnebusch, A. G., Klausner, R. D. (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3869-3873.

Davidson, J. F., Whyte, B., Bissinger, P. H., Schiestl, R. H. (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5116-5121.

Delaunay, A., Isnard, A. D., Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* **19**: 5157-5166.

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**: 471-481.

Dix, D., Bridgham, J., Broderius, M., Eide, D. (1997). Characterization of the Fet4 protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *J Biol Chem* **272**: 11770-11777.

- Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A., Eide, D. J. (1994). The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 26092-26099.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodríguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* **32**:1102-1115.
- Do, T. Q., Schultz, J. R., Clarke, C. F. (1996). Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7534-7539.
- Draculic, T., Dawes, I. W., Grant, C. M. (2000). A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **36**: 1167-1174.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95.
- Dutkiewicz, R., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E. A., Marszalek, J. (2003). Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J Biol Chem* **278**: 29719-29727.
- Eden, A., Simchen, G., Benvenisty, N. (1996). Two yeast homologs of *ECA39*, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J Biol Chem* **271**: 20242-20245.
- Eide, D., Davis-Kaplan, S., Jordan, I., Sipe, D., Kaplan, J. (1992). Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. The ferrireductase and Fe(II) transporter are regulated independently. *J Biol Chem* **267**: 20774-20781.
- Eklund, H., Gleason, F. K., Holmgren, A. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* **11**: 13-28.
- Enns, G. M. (2003). The contribution of mitochondria to common disorders. *Mol Genet Metab* **80**: 11-26.
- Ernster, L., Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* **1271**: 195-204.
- Estruch, F., Carlson, M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a *SNF1* protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 3872-3881.
- Eto, Y., Kang, D., Hasegawa, E., Takeshige, K., Minakami, S. (1992). Succinate-dependent lipid peroxidation and its prevention by reduced ubiquinone in beef heart submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* **295**: 101-106.
- Fernandes, A. P., Fladvad, M., Berndt, C., Andresen, C., Lillig, C. H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A., Vlamis-Gardikas, A. (2005). A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **280**: 24544-24552.

Fernandes, A. P., Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* **6**: 63-74.

Fernando, M. R., Nanri, H., Yoshitake, S., Nagata-Kuno, K., Minakami, S. (1992). Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur J Biochem* **209**: 917-922.

Finkel, T., Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.

Flint, D. H., Allen, R. M. (1996). Iron-sulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chem Rev* **96**: 2315-2334.

Flint, D. H., Tuminello, J. F., Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* **268**: 22369-22376.

Foury, F., Talibi, D. (2001). Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* **276**: 7762-7768.

Frazzon, J., Dean, D. R. (2001). Feedback regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14751-14753.

Furst, P., Hu, S., Hackett, R., Hamer, D. (1988). Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. *Cell* **55**: 705-717.

Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A. M., Twesten, R. D., Owen, W. G., Isaya, G. (2002). Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* **41**: 6798-6804.

Gan, Z. R. (1991). Yeast thioredoxin genes. *J Biol Chem* **266**: 1692-1696.

Garland, S. A., Hoff, K., Vickery, L. E., Culotta, V. C. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* *ISU1* and *ISU2*: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol Biol* **294**: 897-907.

Garreau, H., Hasan, R. N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M. (2000). Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **146**: 2113-2120.

Garrido, E. O., Grant, C. M. (2002). Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Microbiol* **43**: 993-1003.

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257.

Gerber, J., Lill, R. (2002). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* **2**: 71-86.

- Gerber, J., Muhlenhoff, U., Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* **4**: 906-911.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* **12**: 586-597.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E. L., Ammerer, G., Ruis, H., Schuller, C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *Embo J* **21**: 135-144.
- Gounalaki, N., Thireos, G. (1994). Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *Embo J* **13**: 4036-4041.
- Grant, C. M., Collinson, L. P., Roe, J. H., Dawes, I. W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol* **21**: 171-179.
- Grant, C. M., Dawes, I.W. (1996). Synthesis and role of glutathione in protection against oxidative stress in yeast. *Redox Rep.* **2**, 223-229.
- Grant, C. M., Luikenhuis, S., Beckhouse, A., Soderbergh, M., Dawes, I. W. (2000). Differential regulation of glutaredoxin gene expression in response to stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1490**: 33-42.
- Grant, C. M., Quinn, K. A., Dawes, I. W. (1999). Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol* **19**: 2650-2656.
- Greene, N. D., Leung, K. Y., Wait, R., Begum, S., Dunn, M. J., Copp, A. J. (2002). Differential protein expression at the stage of neural tube closure in the mouse embryo. *J Biol Chem* **277**: 41645-41651.
- Gunther, M. R., Hanna, P. M., Mason, R. P., Cohen, M. S. (1995). Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin-trapping study. *Arch Biochem Biophys* **316**: 515-522.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.
- Hamer, D. H. (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**: 913-951.
- Hanbauer, I., Boja, E. S., Moskovitz, J. (2003). A homologue of elongation factor 1 gamma regulates methionine sulfoxide reductase A gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8199-8204.
- Harshman, K. D., Moye-Rowley, W. S., Parker, C. S. (1988). Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell* **53**: 321-330.
- Hartig, A., Ruis, H. (1986). Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur J Biochem* **160**: 487-490.

- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A. D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., Toledano, M. B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol* **45**: 233-241.
- Hassan, H. M., Fridovich, I. (1979). Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J Biol Chem* **254**: 10846-10852.
- Hausmann, A., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Pierik, A. J., Muhlenhoff, U., Lill, R. (2005). The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 3266-3271.
- Herrero, E., Ros, J. (2002). Glutaredoxins and oxidative stress defense in yeast. *Methods Enzymol* **348**: 136-146.
- Hidalgo, E., Demple, B. (1996). Activation of SoxR-dependent transcription in vitro by noncatalytic or NifS-mediated assembly of [2Fe-2S] clusters into apo-SoxR. *J Biol Chem* **271**: 7269-7272.
- Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 2275-2279.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**: 237-271.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**: 13963-13966.
- Hong, S. K., Cha, M. K., Choi, Y. S., Kim, W. C., Kim, I. H. (2002). Msn2p/Msn4p act as a key transcriptional activator of yeast cytoplasmic thiol peroxidase II. *J Biol Chem* **277**: 12109-12117.
- Howlett, N. G., Avery, S. V. (1997). Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2971-2976.
- Humphries, K. M., Szweda, L. I. (1998). Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* **37**: 15835-15841.
- Huh, W. K., Lee, B. H., Kim, S. T., Kim, Y. R., Rhie, G. E., Baek, Y. W., Hwang, C. S., Lee, J. S., Kang, S. O. (1998). D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **30**: 895-903.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**: 395-418.
- Imlay, J. A., Chin, S. M., Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* **240**: 640-642.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 27002-27009.

- Isakov, N., Witte, S., Altman, A. (2000). PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. *Trends Biochem Sci* **25**: 537-539.
- Isoyama, T., Murayama, A., Nomoto, A., Kuge, S. (2001). Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 21863-21869.
- Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **320**: 61-67.
- Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y., Kimura, A. (1999). Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 28459-28465.
- Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E., Dean, D. R. (1989). Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet* **219**: 49-57.
- Jacquet, M., Renault, G., Lallet, S., De Mey, J., Goldbeter, A. (2003). Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **161**: 497-505.
- Jensen, L. T., Culotta, V. C. (2000). Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol* **20**: 3918-3927.
- Jeong, J. S., Kwon, S. J., Kang, S. W., Rhee, S. G., Kim, K. (1999). Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **38**: 776-783.
- Jeyaprakash, A., Welch, J. W., Fogel, S. (1991). Multicopy *CUP1* plasmids enhance cadmium and copper resistance levels in yeast. *Mol Gen Genet* **225**: 363-368.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., Johnson, M. K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **74**: 247-281.
- Jonsson, T. J., Murray, M. S., Johnson, L. C., Poole, L. B., Lowther, W. T. (2005). Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin. *Biochemistry* **44**: 8634-8642.
- Juhnke, H., Charizanis, C., Latifi, F., Krems, B., Entian, K. D. (2000). The essential protein Fap7 is involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **35**: 936-948.
- Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* **25**: 317-364.
- Kappus, H., Sies, H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**: 1233-1241.
- Karin, M., Najarian, R., Haslinger, A., Valenzuela, P., Welch, J., Fogel, S. (1984). Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the *CUP1* locus of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 337-341.

- Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G., Lill, R. (2000). Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem* **275**: 15955-15961.
- Kelly, K. A., Havrilla, D.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D. (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspectives*. **106**: 375-384.
- Ketela, T., Brown, J. L., Stewart, R. C., Bussey, H. (1998). Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Mol Gen Genet* **259**: 372-378.
- Kiley, P. J., Beinert, H. (2003). The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**: 181-185.
- Kim, S. T., Huh, W. K., Lee, B. H., Kang, S. O. (1998). D-arabinose dehydrogenase and its gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1429**: 29-39.
- Kim, R., Saxena, S., Gordon, D. M., Pain, D., Dancis, A. (2001). J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins. *J Biol Chem* **276**: 17524-17532.
- Kirkman, H. N., Galiano, S., Gaetani, G. F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* **262**: 660-666.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J* **18**: 3981-3989.
- Kispal, G., Steiner, H., Court, D. A., Rolinski, B., Lill, R. (1996). Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem* **271**: 24458-24464.
- Kobayashi, N., McEntee, K. (1993). Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 248-256.
- Krems, B., Charizanis, C., Entian, K. D. (1995). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr Genet* **27**: 427-434.
- Krems, B., Charizanis, C., Entian, K. D. (1996). The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet* **29**: 327-334.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* **21**: 6139-6150.
- Kuge, S., Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *Embo J* **13**: 655-664.
- Kuge, S., Jones, N., Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* **16**: 1710-1720.

- Lacour, T., Achstetter, T., Dumas, B. (1998). Characterization of recombinant adrenodoxin reductase homologue (Arh1p) from yeast. Implication in *in vitro* cytochrome p450_{11beta} monooxygenase system. *J Biol Chem* **273**: 23984-23992.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., Lill, R. (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1050-1055.
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G., Lill, R. (2001). An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* **2**: 715-720.
- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R., Culotta, V. C. (1995). Mutations in *PMR1* suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol Cell Biol* **15**: 1382-1388.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* **274**: 16040-16046.
- Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., Toledano, M. B. (1999). A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J Biol Chem* **274**: 4537-4544.
- Leighton, J., Schatz, G. (1995). An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *Embo J* **14**: 188-195.
- Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291.
- Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., Stadtman, E. R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 15036-15040.
- Li, J., Saxena, S., Pain, D., Dancis, A. (2001). Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J Biol Chem* **276**: 1503-1509.
- Li, S., Ault, A., Malone, C. L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L. H., Deschenes, R. J., Fassler, J. S. (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *Embo J* **17**: 6952-6962.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., Kispal, G. (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* **380**: 1157-1166.
- Lill, R., Muhlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **30**: 133-141.
- Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M. E., Hudemann, C., Bill, E., Holmgren, A. (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8168-8173.
- Lin, S. J., Culotta, V. C. (1995). The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3784-3788.

Lin, S. J., Culotta, V. C. (1996). Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Mol Cell Biol* **16**: 6303-6312.

Liochev, S. I., Fridovich, I. (1999). Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* **48**: 157-161.

Liu, X. F., Culotta, V. C. (1994). The requirement for yeast superoxide dismutase is bypassed through mutations in *BSD2*, a novel metal homeostasis gene. *Mol Cell Biol* **14**: 7037-7045.

Liu, X. F., Elashvili, I., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Lapinskas, P., Culotta, V. C. (1992). Yeast lacking superoxide dismutase. Isolation of genetic suppressors. *J Biol Chem* **267**: 18298-18302.

Longo, V. D., Gralla, E. B., Valentine, J. S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* **271**: 12275-12280.

Lopreiato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrigoni, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L. A., Carignani, G. (2004). Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem J* **377**: 395-405.

Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., 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.

Lushchak, V. I., Gospodaryov, D. V. (2005). Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* **29**: 187-192.

Lutz, T., Westermann, B., Neupert, W., Herrmann, J. M. (2001). The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J Mol Biol* **307**: 815-825.

Lynch, M., Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**: 1151-1155.

Machado, A. K., Morgan, B. A., Merrill, G. F. (1997). Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**: 17045-17054.

Manzella, L., Barros, M. H., Nobrega, F. G. (1998). *ARH1* of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast* **14**: 839-846.

Marchler, G., Schuller, C., Adam, G., Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *Embo J* **12**: 1997-2003.

Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., 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.

- McFarlan, S. C., Terrell, C. A., Hogenkamp, H. P. (1992). The purification, characterization, and primary structure of a small redox protein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, an archaebacterium. *J Biol Chem* **267**: 10561-10569.
- Monteiro, G., Pereira, G. A., Netto, L. E. (2002). Regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I expression by two different pathways: one dependent on cAMP and the other on heme. *Free Radic Biol Med* **32**: 278-288.
- Morel, Y., Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* **342 Pt 3**: 481-496.
- Morgan, B. A., Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S., Johnston, L. H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **16**: 1035-1044.
- Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M., Stadtman, E. R. (1997). The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9585-9589.
- Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M., Stadtman, E. R. (1999). Methionine sulfoxide reductase in antioxidant defense. *Methods Enzymol* **300**: 239-244.
- Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M., Stadtman, E. R. (1998). Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14071-14075.
- Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R., Stadtman, E. R. (2000). Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J Biol Chem* **275**: 14167-14172.
- Moskvina, E., Schuller, C., Maurer, C. T., Mager, W. H., Ruis, H. (1998). A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* **14**: 1041-1050.
- Mouaheb, N., Thomas, D., Verdoucq, L., Monfort, P., Meyer, Y. (1998). In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3312-3317.
- Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D., Parker, C. S. (1989). Yeast *YAP1* encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* **3**: 283-292.
- Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J* **22**: 4815-4825.
- Muhlenhoff, U., Lill, R. (2000). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 370-382.
- Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J., Lill, R. (2002). Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J Biol Chem* **277**: 29810-29816.

Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., Lill, R. (2002). The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* **11**: 2025-2036.

Muller, E. G. (1991). Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem* **266**: 9194-9202.

Muller, E. G. (1994). Deoxyribonucleotides are maintained at normal levels in a yeast thioredoxin mutant defective in DNA synthesis. *J Biol Chem* **269**: 24466-24471.

Muller, E. G. (1995). A redox-dependent function of thioredoxin is necessary to sustain a rapid rate of DNA synthesis in yeast. *Arch Biochem Biophys* **318**: 356-361.

Muller, E. G. (1996). A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell* **7**: 1805-1813.

Nakai, Y., Nakai, M., Hayashi, H., Kagamiyama, H. (2001). Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J Biol Chem* **276**: 8314-8320.

Nakai, Y., Umeda, N., Suzuki, T., Nakai, M., Hayashi, H., Watanabe, K., Kagamiyama, H. (2004). Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *J Biol Chem* **279**: 12363-12368.

Nakai, Y., Yoshihara, Y., Hayashi, H., Kagamiyama, H. (1998). cDNA cloning and characterization of mouse nifS-like protein, m-Nfs1: mitochondrial localization of eukaryotic NifS-like proteins. *FEBS Lett* **433**: 143-148.

Nick, J.A., Leung, C.T., Loewus, F.A. (1986). Isolation and identification of erythroascorbic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Lypomyces starkeyi*. *Plant Sci* **46**: 181-187.

O'Brien, K. M., Dirmeier, R., Engle, M., Poyton, R. O. (2004). Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem* **279**: 51817-51827.

O'Brien, R. M., Halmi, N., Stromstedt, P. E., Printz, R. L., Granner, D. K. (1995). Expression cloning of a zinc-finger cyclic AMP-response-element-binding protein. *Biochem J* **312**: 17-21.

Okai, Y., Higashi-Okai, K., Machida, K., Nakamura, H., Nakayama, K., Fijita, K., Tanaka, T., Taniguchi, M. (2000). Protective effects of alpha-tocopherol and beta-carotene on para-nonylphenol-induced inhibition of cell growth, cellular respiration and glucose-induced proton extrusion of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **187**: 161-165.

Orii, Y. (1982). The cytochrome c peroxidase activity of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **257**: 9246-9248.

Ota, I. M., Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* **262**: 566-569.

Outten, C. E., Culotta, V. C. (2004). Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* *GLR1* gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase. *J Biol Chem* **279**: 7785-7791.

- Padilla, P. A., Fuge, E. K., Crawford, M. E., Errett, A., Werner-Washburne, M. (1998). The highly conserved, coregulated *SNO* and *SNZ* gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation. *J Bacteriol* **180**: 5718-5726.
- Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W., Kim, I. H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 5723-5732.
- Pearson, G. D., Merrill, G. F. (1998). Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* *TRR1* gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J Biol Chem* **273**: 5431-5434.
- Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. A., Wright, A. P., Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 6366-6373.
- Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A., Spyrou, G. (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* **275**: 16296-16301.
- Pedrajas, J. R., Porras, P., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Miranda-Vizuete, A., Barcena, J. A. (2002). Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. *Biochem J* **364**: 617-623.
- Pelzer, W., Muhlenhoff, U., Diekert, K., Siegmund, K., Kispal, G., Lill, R. (2000). Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett* **476**: 134-139.
- Pereverzev, M. O., Vygodina, T. V., Konstantinov, A. A., Skulachev, V. P. (2003). Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans* **31**: 1312-1315.
- Peters, J. W., Stowell, M. H., Soltis, S. M., Finnegan, M. G., Johnson, M. K., Rees, D. C. (1997). Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry* **36**: 1181-1187.
- Peters, J. W., Stowell, M. H., Soltis, S. M., Finnegan, M.G., Johnson, M.K., Rees, D. C. (1997). Redox dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry* **36**: 1181-1187.
- Petrova, V. Y., Rasheva, T. V., Kujumdzieva, A. V. (2002). Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electron. J. Biotechnol.* **5**: 29-41.
- Petrova, V. Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V., Schmitt, M. J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J* **380**: 393-400.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**: 865-875.
- Prohl, C., Kispal, G., Lill, R. (2000). Branched-chain-amino-acid transaminases of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **324**: 365-375.

Prouzet-Mauleon, V., Monribot-Espagne, C., Boucherie, H., Lagniel, G., Lopez, S., Labarre, J., Garin, J., Lauquin, G. J. (2002). Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of a new stable variant of alkyl hydroperoxide reductase 1 (Ahp1) induced by oxidative stress. *J Biol Chem* **277**: 4823-4830.

Rai, P., Cole, T. D., Wemmer, D. E., Linn, S. (2001). Localization of Fe(2+) at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe(2+) and H₂O₂. *J Mol Biol* **312**: 1089-1101.

Raitt, D. C., Johnson, A. L., Erkine, A. M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D. S., Johnston, L. H. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* **11**: 2335-2347.

Ramazzotti, A., Vanmansart, V., Foury, F. (2004). Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **557**: 215-220.

Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**: 8290-8300.

Rhee, S. G., Chae, H. Z., Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* **38**: 1543-1552.

Rhee, S. G., Kang, S. W., Netto, L. E., Seo, M. S., Stadtman, E. R. (1999). A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors* **10**: 207-209.

Rodrigues-Pousada, C. A., Nevitt, T., Menezes, R., Azevedo, D., Pereira, J., Amaral, C. (2004). Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett* **567**: 80-85.

Rodríguez-Manzaneque, M. T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8180-8190.

Rodríguez-Manzaneque, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**: 1109-1121.

Rodríguez-Navarro, S., Llorente, B., Rodríguez-Manzaneque, M. T., Ramne, A., Uber, G., Marchesan, D., Dujon, B., Herrero, E., Sunnerhagen, P., Perez-Ortin, J. E. (2002). Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6. *Yeast* **19**: 1261-1276.

Ross, S. J., Findlay, V. J., Malakasi, P., Morgan, B. A. (2000). Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Mol Biol Cell* **11**: 2631-2642.

Rouault, T. A., Klausner, R. D. (1996). Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends Biochem Sci* **21**: 174-177.

- Rouault, T. A., Tong, W. H. (2005). Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 345-351.
- Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W., Walden, W. E. (2003). A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *Embo J* **22**: 4826-4835.
- Rutherford, J. C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P. O., Winge, D. R. (2001). A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14322-14327.
- Rutherford, J. C., Jaron, S., Winge, D. R. (2003). Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J Biol Chem* **278**: 27636-27643.
- Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff, U., Lill, R., Winge, D. R. (2005). Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* **280**: 10135-10140.
- Shenton, D., Grant, C. M. (2003). Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **374**: 513-519.
- Shenton, D., Perrone, G., Quinn, K. A., Dawes, I. W., Grant, C. M. (2002). Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 16853-16859.
- Schilke, B., Forster, J., Davis, J., James, P., Walter, W., Laloraya, S., Johnson, J., Miao, B., Craig, E. (1996). The cold sensitivity of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking a mitochondrial heat shock protein 70 is suppressed by loss of mitochondrial DNA. *J Cell Biol* **134**: 603-613.
- Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., Craig, E. (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10206-10211.
- Schmitt, A. P., McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5777-5782.
- Schnell, N., Krems, B., Entian, K. D. (1992). The *PAR1* (*YAP1/SNQ3*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* **21**: 269-273.
- Schueck, N. D., Woontner, M., Koeller, D. M. (2001). The role of the mitochondrion in cellular iron homeostasis. *Mitochondrion* **1**: 51-60.
- Schuller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C., 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.
- Schwartz, C. J., Giel, J. L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F. J., Beinert, H., Kiley, P. J. (2001). IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14895-14900.

- Sharma, K. G., Sharma, V., Bourbonloux, A., Delrot, S., Bachhawat, A. K. (2000). Glutathione depletion leads to delayed growth stasis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of a partially overlapping role for thioredoxin. *Curr Genet* **38**: 71-77.
- Sies, H. (1993). Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res* **299**: 183-191.
- Sies, H., Menck, C. F. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res* **275**: 367-375.
- Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R., Kispal, G. (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem* **277**: 26944-26949.
- Sohn, H. Y., Kwon, C. S., Kwon, G. S., Lee, J. B., Kim, E. (2004). Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicol Lett* **151**: 357-365.
- Spickett, C. M., Smirnoff, N., Pitt, A. R. (2000). The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* **28**: 183-192.
- Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25**: 207-218.
- Stadtman, E. R., Moskovitz, J., Levine, R. L. (2003). Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal* **5**: 577-582.
- Steels, E. L., Learmonth, R. P., Watson, K. (1994). Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* **140**: 569-576.
- Stephen, D. W., Rivers, S. L., Jamieson, D. J. (1995). The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **16**: 415-423.
- Strain, J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, D. T., Vickery, L. E., Culotta, V. C. (1998). Suppressors of superoxide dismutase (*SOD1*) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **273**: 31138-31144.
- Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., Culotta, V. C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for *SOD1* in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* **276**: 38084-38089.
- Tamai, K. T., Gralla, E. B., Ellerby, L. M., Valentine, J. S., Thiele, D. J. (1993). Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8013-8017.
- Tamarit, J., Belli, G., Cabisco, E., Herrero, E., Ros, J. (2003). Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J Biol Chem* **278**: 25745-25751.
- Thiele, D. J. (1992). Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **20**: 1183-1191.

- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector D., Azevedo, D. (2003). Oxidative stress responses in yeast, pp. 241-303. En *Topics in Current Genetics*, Vol. 1, Yeast Stress Responses (S. Hohmann, P. W. H. Mager, eds). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Treger, J. M., Magee, T. R., McEntee, K. (1998a). Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 13-19.
- Treger, J. M., Schmitt, A. P., Simon, J. R., McEntee, K. (1998b). Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 26875-26879.
- Trotter, E. W., Grant, C. M. (2002). Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **46**: 869-878.
- Trotter, E. W., Grant, C. M. (2003). Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO Rep* **4**: 184-188.
- Trotter, E. W., Grant, C. M. (2005). Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 392-400.
- Tsuzi, D., Maeta, K., Takatsume, Y., Izawa, S., Inoue, Y. (2004). Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase *GPX2* by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett* **565**: 148-154.
- Tu, B. P., Weissman, J. S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* **164**: 341-346.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**: 335-344.
- Ugulava, N. B., Gibney, B. R., Jarrett, J. T. (2001). Biotin synthase contains two distinct iron-sulfur cluster binding sites: chemical and spectroelectrochemical analysis of iron-sulfur cluster interconversions. *Biochemistry* **40**: 8343-8351.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohe, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* **252**: 38-53.
- Veal, E. A., Ross, S. J., Malakasi, P., Peacock, E., Morgan, B. A. (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem* **278**: 30896-30904.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**: 407-417.
- Vilella, F., Alves, R., Rodríguez-Manzaneque, M. T., Bellí, G., Swaminathan, S., Sunnerhagen, P., Herrero, E. (2004). Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comp Func Gen.* **5**: 328-341.
- Vogt, W. (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* **18**: 93-105.

Voisine, C., Schilke, B., Ohlson, M., Beinert, H., Marszalek, J., Craig, E. A. (2000). Role of the mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1. *Mol Cell Biol* **20**: 3677-3684.

Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 2615-2623.

Wemmie, J. A., Szczyпка, M. S., Thiele, D. J., Moye-Rowley, W. S. (1994). Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J Biol Chem* **269**: 32592-32597.

Wieser, R., Adam, G., Wagner, A., Schuller, C., Marchler, G., Ruis, H., Krawiec, Z., Bilinski, T. (1991). Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTT1* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**: 12406-12411.

Wilda, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Reisert, I., Utermann, G., Baier, G., Hameister, H. (2001). Protein kinase C isoenzyme: selective expression pattern of protein kinase C- θ ; during mouse development. *Mech Dev* **103**: 197-200.

Williams, K. E., Cyert, M. S. (2001). The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1p. *Embo J* **20**: 3473-3483.

Wingert, R. A., Galloway, J. L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J. L., Weber, G. J., Dooley, K., Davidson, A. J., Schmidt, B., Paw, B. H., Shaw, G. C., Kingsley, P., Palis, J., Schubert, H., Chen, O., Kaplan, J., Zon, L. I. (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* **436**: 1035-1039.

Witte, S., Villalba, M., Bi, K., Liu, Y., Isakov, N., Altman, A. (2000). Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J Biol Chem* **275**: 1902-1909.

Wong, C. M., Zhou, Y., Ng, R. W., Kung Hf, H. F., Jin, D. Y. (2002). Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* **277**: 5385-5394.

Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K. S., Kang, S. W., Kim, K., Rhee, S. G. (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* **300**: 653-656.

Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T. S., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S., Rhee, S. G. (2005). Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J Biol Chem* **280**: 3125-3128.

Wood, Z. A., Poole, L. B., Karplus, P. A. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**: 650-653.

Wu, A. L., Moye-Rowley, W. S. (1994). *GSH1*, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* **14**: 5832-5839.

- Xu, Z., Wickner, W. (1996). Thioredoxin is required for vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **132**: 787-794.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., Klausner, R. D. (1995). *AFT1*: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **14**: 1231-1239.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., Klausner, R. D. (1996). Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *Embo J* **15**: 3377-3384.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 18914-18918.
- Yan, C., Lee, L. H., Davis, L. I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J* **17**: 7416-7429.
- Yang, Y. F., Wells, W. W. (1991). Catalytic mechanism of thioltransferase. *J Biol Chem* **266**: 12766-12771.
- Zagarese, H. E., Diaz, M., Pedrozo, F., Ferraro, M., Cravero, W., Tartarotti, B. (2001). Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. *J Photochem Photobiol B* **61**: 35-45.
- Zhao, X. J., Raitt, D., P, V. B., Clewell, A. S., Kwast, K. E., Poyton, R. O. (1996). Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a role in the oxidative stress response. *J Biol Chem* **271**: 25131-25138.
- Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H., Dean, D. R. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **273**: 13264-13272.