

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Ana Paula Dias Demasi



Estudo da Função de Tiorredoxina Peroxidase Citoplasmática I em *Saccharomyces cerevisiae*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ana Paula Dias Demasi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica

Luis E. S. Netto

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	I/unicamp
	D392e
V	EX
TOMBO BC/	52541
PROC.	16-124-23
C	☐
D	☒
PREÇO	216,11,00
DATA	13-03-03
Nº CPO	

CM001B0490-1

Sub id 284-12

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D392e

Demasi, Ana Paula Dias

Estudo da função de tiorredoxina peroxidase citoplasmática I em
Saccharomyces cerevisiae/

Ana Paula Dias Demasi.--

Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Luis Eduardo Soares Netto

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1.Stress. 2.Mitocondria. 3.Expressão genética.

I. Soares Netto, Luis Eduardo. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 18 de dezembro de 2002

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

Luis E. S. Netto

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Gonçalo A. G. Pereira

Prof. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Fernanda R. Gadelha

Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega

F. Gorgônio da Nóbrega

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

Roger Frigério Castilho

Prof. Dra. Denise Vaz de Macedo

Prof. Dr. Armindo Antonio Alves

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Luis Eduardo Soares Netto, pela oportunidade e pela valiosa orientação, pela confiança, compreensão e incentivo. Por ter me dado liberdade de sugerir novas direções para as nossas investigações. Pelo seu interesse indescritível pela Ciência, admirado por todos que dele se aproximam, estímulo constante ao nosso aprendizado.

Ao Professor Doutor Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, do Departamento de Genética e Evolução, por sua indispensável e concorrida atenção e por ceder-me um espaço em seu laboratório para o desenvolvimento deste projeto, o que seria impossível sem sua participação. Pela capacidade de enxergar um importante resultado onde poucas pessoas conseguem notar! Pelo incentivo e preciosas dicas em momentos difíceis...

Aos meus queridos amigos do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial Carlinha, Fernandinha, Marcos, Victor, Marquinhos, Anderson, Gisele, Bayki, Odalys Camila, Raquel, Diana, Bárbara, Anita, amigos de bancada, das extensões do laboratório (cantina e outros bares) e de coração! Pelo apoio técnico e científico, e por terem feito do nosso laboratório o ambiente de trabalho mais divertido e produtivo do mundo!

À Professora Fernanda Ramos Gadelha, pelo apoio científico e amizade.

Aos Professores Doutores Francisco Gorgônio da Nóbrega e Roger Frigério Castilho pelos comentários e sugestões feitos à tese.

À Paola, pela amizade e apoio inicial.

À Eliane e à Andrea, pela disponibilidade, eficiência e carinho.

Aos professores e funcionários dos departamentos de Bioquímica e de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao meu querido e amado marido Beto, pelo amor e compreensão. Pela paciência durante estes anos de desenvolvimento de tese. Por acreditar na minha capacidade sempre, me incentivando na busca dos meus objetivos. Por me ajudar nos “terríveis” momentos de decisões! Por ter me ensinado o quanto o amor torna a vida repleta de sentidos!

Por falar em sentidos, aos mais valiosos da minha vida, meus amados filhos Gabriela e Arthur, por encherem-na de alegrias indescritíveis e das mais intensas emoções, estímulos constantes para a superação de todos os momentos difíceis!

À Claudia, pela dedicação e carinho, por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho, cuidando da minha casa e dos meus filhos.

Aos meus queridos e maravilhosos pais, por serem as pessoas que mais contribuíram, e que continuam contribuindo, para a minha existência e tudo o que dela surgiu! Pelo amor e apoio incondicionais, nos mais variados aspectos da minha vida!

À toda minha família pela emocionante torcida, em especial à minha tia Maria e à minha avó Carmem, que acompanharam meu trabalho de perto desde o início e que, com muita fé e amor, sempre me transmitiram a segurança e a coragem necessárias para esta conquista!

À minha cunhada Fabiana, pelo carinho e apoio fundamentais para que eu pudesse enfrentar talvez o maior obstáculo da minha vida!

Ao Heitor, pelos “socorros” ao computador nas horas cruciais.

À FAPESP pelo apoio financeiro indispensável. Ao meu assessor (incógnito) pelas sugestões e avaliações.

ÍNDICE

<i>Abstract</i>	viii
<i>Resumo</i>	ix
<i>Introdução geral</i>	1
<i>Espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos</i>	1
O que são e fontes.....	1
Efeitos em sistemas biológicos.....	3
Danos oxidativos.....	3
Papéis fisiológicos e de sinalização celular.....	4
Sinalização celular em mamíferos.....	5
Sinalização celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Defesas celulares.....	9
Peroxirredoxinas, uma nova família de peroxidases.....	10
<i>Estado funcional da mitocôndria e a produção de EROs</i>	17
Mitocôndria funcional - Produção de energia: fosforilação oxidativa e o “vazamento” de elétrons a partir da cadeia respiratória.....	17
Mitocôndria disfuncional.....	20
Disfunções provocadas por agentes químicos.....	20
Disfunções provocadas por mutações: vulnerabilidade do genoma mitocondrial.....	23
<i>Objetivos</i>	27

<i>Capítulo 1 – Tiorredoxina peroxidase citoplasmática I é essencial para a defesa antioxidante de leveduras com disfunções mitocondriais.....</i>	<i>28</i>
<i>Capítulo 2 – cTPxI especificamente protege leveduras com deficiência respiratória contra estresse oxidativo: participação de EROs geradas endogenamente.....</i>	<i>34</i>
<i>Capítulo 3 – Resultados suplementares.....</i>	<i>63</i>
<i>Discussão geral.....</i>	<i>69</i>
<i>Apêndices.....</i>	<i>84</i>
<i>Referências bibliográficas.....</i>	<i>86</i>

Cytosolic thioredoxin peroxidase I (cTPxI) is a *Saccharomyces cerevisiae* antioxidant enzyme that belongs to peroxiredoxins family, conserved from bacteria to humans, able to reduce hydroperoxides in the presence of a thiol substrate. Our study concerning its role in yeast cells demonstrated that *CTPXI* is highly expressed in cells exposed to different H₂O₂ concentrations. Further results revealed that cTPx I is essential for the antioxidant defense of respiratory deficient cells, demonstrated by high sensitivity to H₂O₂ of *ctpxI* mutant cells with dysfunctional mitochondria. In addition, we have shown that lack of mitochondrial DNA or *COX10* deletion, gene required for cytochrome *c* oxidase assembly, lead to H₂O₂ increased generation. Regardless where or how mitochondrial function is perturbed, endogenous ROS production seems to be necessary to increase sensitivity of *ctpxI* cells to oxidative stress. This phenomenon was demonstrated by viability tests and by sulfhydryl content determinations. Accordingly, *CTPXI* expression was high in conditions where the corresponding protein was essential to antioxidant defense. Finally, we have obtained evidences suggesting that cTPxI specifically protects respiratory deficient cells against ROS, since deletion of genes encoding other peroxidases did not alter the sensitivity of cells with mitochondrial dysfunction to H₂O₂. Therefore, cTPxI seems to be remarkably important in the protection of cells exposed simultaneously to ROS generated by endogenous and exogenous sources.

Respiratory deficiencies are frequently associated with cancer, neurodegenerative diseases and aging in human cells. Our results suggest that peroxiredoxins, specially those with high similarity to yeast cTPxI, could exert decisive role in the destiny, survival or death, of cells affected by these disorders.

Tiorredoxina peroxidase citoplasmática I (cTPxI) é uma enzima antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* pertencente à família das peroxirredoxinas, conservada desde bactérias até humanos, capaz de reduzir hidroperóxidos às custas de um substrato contendo tiol. Nossos estudos a respeito de sua função em leveduras demonstraram que *CTPXI* é altamente expresso em células expostas a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Resultados posteriores revelaram que cTPxI é essencial para a defesa antioxidante de células com deficiências respiratórias, demonstrado pela elevada sensibilidade ao H_2O_2 de células mutantes em *CTPXI* ($\Delta ctpxI$) com disfunções mitocondriais. Além disso, mostramos que a remoção de DNA mitocondrial ou a deleção do gene *COX10*, necessário para a montagem de citocromo *c* oxidase, induzem a formação de H_2O_2 . Independentemente de como e onde a função mitocondrial é perturbada, a produção endógena de EROs parece ser necessária para o aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo de células $\Delta ctpxI$. Este fenômeno foi demonstrado por testes de viabilidade e por determinações dos níveis de grupos sulfidríla protéica e não protéica. Em acordo, a expressão de *CTPXI* é bastante elevada nas condições em que a proteína correspondente é essencial para a defesa antioxidante. Finalmente, obtivemos evidências de que cTPxI especificamente protege células com deficiência respiratória contra EROs, uma vez que deleções de genes que codificam outras peroxidases não promoveram alterações de sensibilidade de células com mitocôndrias funcionalmente defeituosas ao H_2O_2 . Portanto, cTPxI parece ser especialmente importante na proteção de células expostas simultaneamente a fontes de EROs endógenas e exógenas.

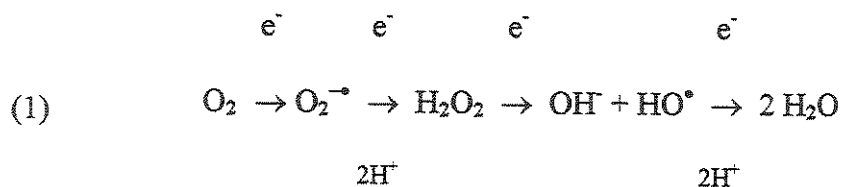
Deficiências respiratórias são frequentemente associadas ao processo de envelhecimento, doenças neurodegenerativas e câncer em células humanas. De acordo com nossos resultados, peroxirredoxinas, especialmente aquelas que apresentam elevada similaridade a cTPxI de levedura, poderiam exercer papel decisivo no destino, sobrevivência ou morte, de células afetadas por estas desordens.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos

1.1. O que são e fontes

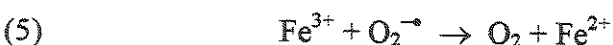
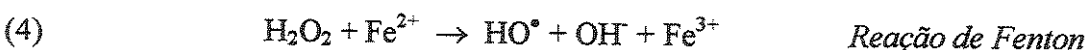
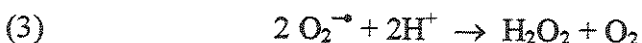
Espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO^\bullet$), consistem em produtos intermediários da redução do oxigênio molecular (1), predisposto a reduções univalentes devido à sua estrutura eletrônica (Fridovich, 1999). As espécies radicalares, ânion superóxido e hidroxila, possuem um elétron desemparelhado em sua última camada de distribuição eletrônica, sendo extremamente instáveis. Já o peróxido de hidrogênio, que não é um radical livre, é relativamente estável e livremente difusível.



EROs são geradas inevitavelmente em células que se desenvolvem em ambientes aeróbicos, como subprodutos de processos metabólicos normais que ocorrem na mitocôndria (respiração) e nos peroxissomos (β -oxidação de ácidos graxos), bem como em sistemas enzimáticos no citoplasma (lipoxigenases, NADPH oxidases, citocromo P_{450}). Além da geração intracelular, ainda existem fontes exógenas de EROs, como luz

ultravioleta, radiação ionizante, agentes quimioterápicos, citocinas inflamatórias e certas toxinas (Finkel e Hollbrook, 2000).

A mitocôndria é responsável pela maior produção endógena de EROs nas células (Boveris e Chance, 1973, Hallywell e Gutteridge, 1989), a partir de dois pontos da cadeia de transporte de elétrons - Complexos I (NADH desidrogenase) e III (ubiquinona-citocromo c óxido-redutase) – em que transferências monoeletrônicas diretas ao oxigênio molecular levam à formação do radical ânion superóxido (2). Uma vez formado, este radical pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) ou espontaneamente (3). O peróxido de hidrogênio, na presença de metais de transição (Fe^{2+} ou Cu^{1+}), pode ainda produzir radical hidroxila (4, 5 e 6), de reatividade elevada.



1.2.Efeitos em sistemas biológicos

1.2.1. Danos oxidativos

Os efeitos de EROs em sistemas biológicos têm sido amplamente estudados desde sua descoberta, há cerca de 50 anos atrás. Inicialmente foram demonstrados os efeitos deletérios, aleatórios e cumulativos sobre as biomoléculas (DNA, lipídeos, proteínas), e a relação destes com o desenvolvimento de patologias (aterosclerose, diabete, câncer, artrite, mal de Parkinson, Alzheimer) e processos degenerativos como envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Em proteínas, EROs podem levar à formação de ligações cruzadas proteína - proteína, oxidação do “esqueleto” protéico resultando em fragmentação e ainda oxidação de resíduos de aminoácidos de suas cadeias laterais (Berlett e Stadman, 1997). Os resíduos de aminoácidos cisteína e metionina são particularmente sensíveis à oxidação por EROs, sendo convertidos em dissulfetos e sulfóxidos de metionina, respectivamente (Berlett e Stadman, 1997). A formação de carbonilas pode ocorrer pela oxidação direta dos resíduos de aminoácidos lisina, arginina, prolina e treonina, ou ainda pela fragmentação da cadeia polipeptídica nos resíduos prolina, glutamato ou aspartato (Berlett e Stadman, 1997).

Peroxidação lipídica consiste em um processo degenerativo cujo alvo são fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol insaturados de membranas celulares e de outras estruturas contendo lipídeos, oxidados via radicais hidroxila, levando à produção de lipoperóxidos. Estes lipoperóxidos, sendo mais polares do que os lipídeos precursores, podem perturbar a estrutura e a função de membranas. Além disso, lipoperóxidos podem ainda sofrer posterior

redução monoelétrica mediada por Fe^{2+} , levando a (i) abstração direta de H e início da peroxidação da cadeia, (ii) cisão- β com formação de aldeídos e radicais alquil, e (iii) rearranjo e oxigenação formando radicais peroxil- epoxialílicos, alternativa mais favorecida. Uma vez formados, estes radicais disparam sucessivas reações de peroxidação lipídica mediadas por radicais livres, amplificando os efeitos deletérios da peroxidação inicial (Girotti, 1998). Além disso, como lipoperóxidos apresentam maior estabilidade do que os radicais precursores, são capazes de migrar espontaneamente ou através de proteínas transportadoras de lipídeos de seus pontos de origem até regiões de maior sensibilidade, onde a citotoxicidade mediada por ferro pode ser pronunciada (Girotti, 1998).

A oxidação de ácidos nucleicos gera danos em bases e açúcares, quebras de fita única ou dupla, formação de sítios abásicos e de ligações cruzadas DNA-proteína. 8-oxoguanina constitui uma importante lesão oxidativa a bases do DNA devido ao seu potencial mutagênico (Gilchrest e Bohr, 1997).

1.2.2. Papéis fisiológicos e de sinalização celular

Estudos posteriores demonstraram funções fisiológicas essenciais como a geração de EROs por células fagocíticas promovendo a defesa do hospedeiro no combate à infecções, bem como EROs produzidas no citoplasma em resposta ao estímulo de fatores de crescimento, regulando proliferação celular (Finkel e Holbrook, 2000). Evidências mais recentes destacam o papel de EROs como mensageiros celulares, regulando metabolismo (Nemoto e col., 2000), ciclo celular (Shackelford e col., 2000), expressão de genes, bem como participando de vias de sinalização sensíveis ao estado redox de moléculas (Allen e

Tresini, 2000, Finkel e Holbrook, 2000, Dröge, 2002). Portanto, os seres vivos não só se adaptaram para a detoxificação de EROs, impedindo seus efeitos danosos, como também desenvolveram estratégias para utilizá-las como estímulos biológicos (Allen e Tresini, 2000, Dröge, 2002). O balanço finamente regulado entre os efeitos benéficos e deletérios de EROs influencia diversos processos biológicos e a sobrevivência celular.

1.2.2.1. Sinalização celular em mamíferos

Entre as principais vias de sinalização e mediadores centrais ativados em resposta ao dano oxidativo estão as cascatas de sinalização ERK (“extracellular signal-regulated kinase”), JNK (“c-Jun amino-terminal kinase”) e MAPK (“p38 mitogen-activated kinase”), a via PI(3)K/Akt (“phosphoinositide 3-kinase”), o fator nuclear NF- κ B, p53 e a via de resposta ao choque térmico (Finkel e Holbrook, 2000, Dröge, 2002, Martindale e Holbrook, 2002). Cabe lembrar que a ativação destas vias não se deve apenas ao estresse oxidativo já que estão envolvidas na regulação do crescimento, do metabolismo e de respostas a outros tipos de estresse. Em geral, as vias de sinalização de resposta ao choque térmico, ERK, P(3)K/Akt e NF- κ B exercem uma influência pró-sobrevivência, enquanto que ativação de p53, JNK ou p38 está mais relacionada à apoptose (Finkel e Holbrook, 2000, Martindale e Holbrook, 2002). Ao nível molecular, os mecanismos da regulação redox de fatores de transcrição e vias de transdução de sinal não são completamente compreendidos, mas, em geral, são mediados por oxidação ou redução de grupos sulfidrilas de proteínas. Mudanças no estado redox destes grupos levam a alterações conformacionais que, dependendo da proteína, podem aumentar ou diminuir ligação ao DNA, liberar subunidades inibitórias ou

promover formação de complexos protéicos (Allen e Tresini, 2000 e referências citadas). Em analogia ao processo de fosforilação/defosforilação, oxidação e redução de grupos sulfidrila de proteínas promovem importante mecanismo de regulação das mesmas (Cai e col., 2000).

Existem diversas evidências de que EROs podem atuar como moléculas sinalizadoras na apoptose, fenômeno endógeno de morte celular programada, em que células indesejáveis ou severamente lesadas são removidas, e que desempenha importante função no desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares. É um processo extremamente regulado e coordenado, que origina mudanças morfológicas típicas, distintas das ocorridas por necrose, como exposição de fosfatidilserina na superfície celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (Madeo e col., 1997, Hengartner, 2000). A maior parte das alterações morfológicas ocorridas, deve-se à atuação de proteases específicas, as caspases (Hengartner, 2000). Citocromo *c*, um dos componentes da cadeia de transporte de elétrons, em adição à proteína adaptadora Apaf-1, desempenha papel fundamental na ativação da procaspase-9. Caspase-9 ativa, então, desencadeia a cascata de caspases que funcionam como efetores subsequentes do programa de morte celular (Li e col., 2000). Outras proteínas mitocondriais funcionam como reguladores deste processo, como as da família Bcl-2, induzindo-o (Bax), ou reprimindo-o (Bcl-2 e Bcl-X_L) (Madeo e col., 1997, Hengartner, 2000).

A adição de oxidantes ou depleção de antioxidantes endógenos podem promover apoptose, enquanto antioxidantes podem retardar ou inibir este processo; aumentos nos níveis intracelulares de EROs estão associados à apoptose e Bcl-2, proteína que previne apoptose tem sido descrita com capacidade antioxidante (Jiang e col., 1999, Cai e Jones,

1998, Zhang e col.,1997). Embora seja reconhecida a participação de EROs na apoptose, ainda não foi bem estabelecido em que passo ou passos esta participação é decisiva para o processo. Alterações no estado redox podem gerar sinais que levam a mitocôndria a iniciar apoptose, por outro lado, a liberação de citocromo *c* a partir desta organela eleva a formação de EROs, tornando as células ainda mais oxidadas. EROs podem ainda ativar a transição da permeabilidade mitocondrial ou a quinase sinalizadora de apoptose (ASK-1). Por fim, a acentuada oxidação celular pode estar envolvida na degradação final dos corpos apoptóticos (Cai e Jones, 1999).

*1.2.2.2.Sinalização celular em *Saccharomyces cerevisiae**

A exposição de células de *S. cerevisiae* a EROs leva a uma resposta adaptativa que consiste em mudanças na expressão de genes, afetando níveis de enzimas antioxidantes, proteínas de estresse (chaperonas e proteases) e ainda de enzimas do metabolismo celular (revisado por Costa e Moradas-Ferreira, 2001).

Os fatores de transcrição Yap1, Skn7, Hsf1 e Msn2/4 são os reguladores da resposta de leveduras a EROs. Em presença de glicose e conseqüentes níveis elevados de cAMP, estes fatores são reprimidos pela via de sinalização Ras/proteína quinase A (PKA), que promove crescimento celular. Nesta situação, as células são menos resistentes a oxidantes. De fato, muitos, senão todos os genes que codificam funções respiratórias, estão submetidos à repressão por glicose como, por exemplo, os antioxidantes *CTT1* (catalase citossólica), *CTA1* (catalase peroxissomal), *CCP1* (citocromo *c* peroxidase) e *SOD1* (superóxido dismutase citossólica) (Jamieson, 1998). Por outro lado, a exaustão da glicose e redução

dos níveis de cAMP, leva à inibição da via Ras/PKA e diferentes fatores de transcrição são ativados por vias de transdução de sinal específicas. Ocorre uma transformação no metabolismo celular que passa de fermentativo para respiratório, levando ao estímulo de biogênese de mitocôndrias e de proteínas da cadeia de transporte de elétrons, bem à indução de genes que codificam enzimas antioxidantes, para combater o aumento da produção de EROs ocasionado pela maior atividade mitocondrial.

Embora seja discutível a ocorrência de apoptose em organismos unicelulares, e não tenham sido encontradas em leveduras proteínas similares aos reguladores apoptóticos clássicos de mamíferos, vários trabalhos têm demonstrado que leveduras podem constituir importantes modelos para o estudo da apoptose. Estes estudos argumentam que tal processo corresponderia a uma vantagem evolucionária, em que células severamente danificadas interromperiam seu crescimento e consumo de nutrientes em favor de seus parentes clonais (Madeo e col., 1997). Alguns autores demonstraram que a expressão de genes humanos que codificam Bax ou p-53 induz parada de crescimento e morte celular em leveduras, com algumas alterações morfológicas clássicas da apoptose, enquanto que a co-expressão de Bcl-2 ou de Bcl-X_L, reverte esta toxicidade (Gross e col., 2000, Madeo e col., 1999, Manon e col., 1997, Longo e col., Madeo e col., 1997, Greenhalf e col., 1996). Tais trabalhos indicam a presença da maquinaria basal essencial do processo apoptótico neste organismo unicelular. Evidências experimentais revelaram a atuação de EROs como reguladores da apoptose em levedura. A expressão de *BAX*, bem como a mutação do gene *CDC48*, que codifica uma ATPase envolvida em fusão vesicular, estimulam a produção de EROs e apoptose, sendo que hipóxia e depleção de oxidantes impedem o desenvolvimento deste processo (Madeo e col., 1999). Ao contrário do que ocorre em mamíferos, o efeito letal da

expressão de *BAX* em leveduras não envolve a liberação de citocromo *c* da mitocôndria para o citoplasma celular (Gross e col., 2000, Roucou e col., 2000). Recentemente, Madeo e colaboradores (2002) descreveram uma proteína estruturalmente homóloga às caspases de mamíferos, Yor197w. Estes autores demonstraram que o processo de apoptose desencadeado pela exposição ao peróxido de hidrogênio ocorre nos padrões da atividade enzimática proteolítica das caspases, que esta resposta é eliminada completamente após disrupção e fortemente estimulada após overexpressão de Yor197w. Estas observações levaram à conclusão de que esta proteína atua realmente como uma caspase, passando a ser chamada de YCA1 (“Yeast caspase-1”).

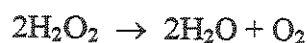
1.3. Defesas celulares

Para que pudessem se beneficiar do alto rendimento da respiração aeróbica, os seres vivos desenvolveram um sofisticado sistema de defesa contra EROs, incluindo enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px). SOD acelera a conversão de radical ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, enquanto CAT e GSH-Px transformam este último em água.

SOD



CAT



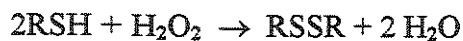


A glutathiona reduzida (GSH) é mantida em níveis fisiológicos pela sua síntese via glutathiona sintetase e pela redução da glutathiona oxidada (GSSG) através da ação da glutathiona redutase, que utiliza NADPH como redutor (Hallywell e Gutteridge, 1989).

Várias outras moléculas não enzimáticas de baixo peso molecular são importantes na remoção de EROs, como ascorbato, flavonóides, carotenóides e moléculas contendo tióis (glutathiona e tioredoxina). Metalotioneínas, proteínas que ligam íons metálicos envolvidos na geração de EROs, constituem mais uma linha de defesa.

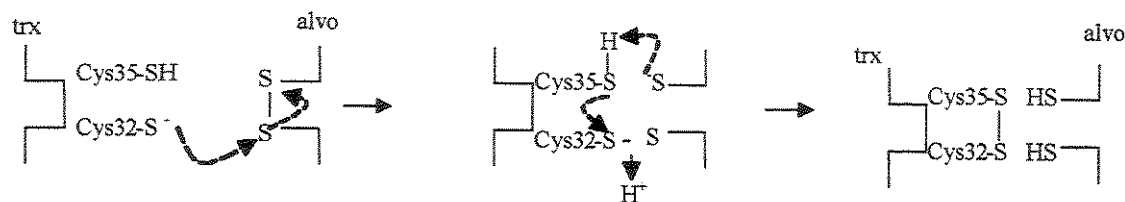
1.3.1. Peroxirredoxinas, uma nova família de peroxidases

Peroxirredoxinas (Prx) constituem uma família de enzimas antioxidantes presentes em todos os reinos biológicos, capazes de reduzir hidroperóxidos às custas de um substrato doador de elétrons contendo tiol (Netto e col., 1996). Estas enzimas não possuem nenhum grupo prostético e utilizam um ou dois resíduos de cisteína para reduzir peróxidos.



Peroxirredoxinas podem ser divididas em quatro grupos. As que possuem duas cisteínas conservadas (2-cis-prx) foram as primeiras proteínas desta família a serem descritas em bactérias e leveduras (Rhee e col., 1999). Em *S. cerevisiae*, duas 2-cis-prx estão presentes: cTPxI e cTPxII. Como em todos os membros do grupo, uma destas cisteínas é essencial para a capacidade de decompor peróxidos, ou seja, a substituição desse amino ácido por uma serina leva à perda da atividade enzimática. O resíduo de cisteína responsável pela atividade enzimática está localizado na região N-terminal e, no caso de cTPxI e cTPxII, encontra-se na posição 47, em um motivo VCP (Chae e col., 1994). A segunda cisteína conservada de 2-cis-prx está na região C-terminal, que se localiza ao redor da posição 170, também em um motivo VCP. Esta cisteína não é essencial para a atividade enzimática, mas é importante para a interação com o sistema tiorredoxina (Rhee e col., 1999). Peroxirredoxinas que utilizam tiorredoxina como substrato doador de elétrons são chamadas tiorredoxina peroxidases (Chae e col., 1994).

Tiorredoxina é uma proteína de baixo peso molecular (12-13kDa) que contém duas cisteínas vicinais. Tiorredoxina está envolvida na redução de pontes dissulfeto de várias proteínas (esquema 1).



Esquema 1 – Mecanismo de ação de tiorredoxina.

A tiorredoxina oxidada pode ser regenerada (reduzida) por NADPH, em uma reação catalizada por tiorredoxina redutase que é uma flavoenzima de acordo com a reação:



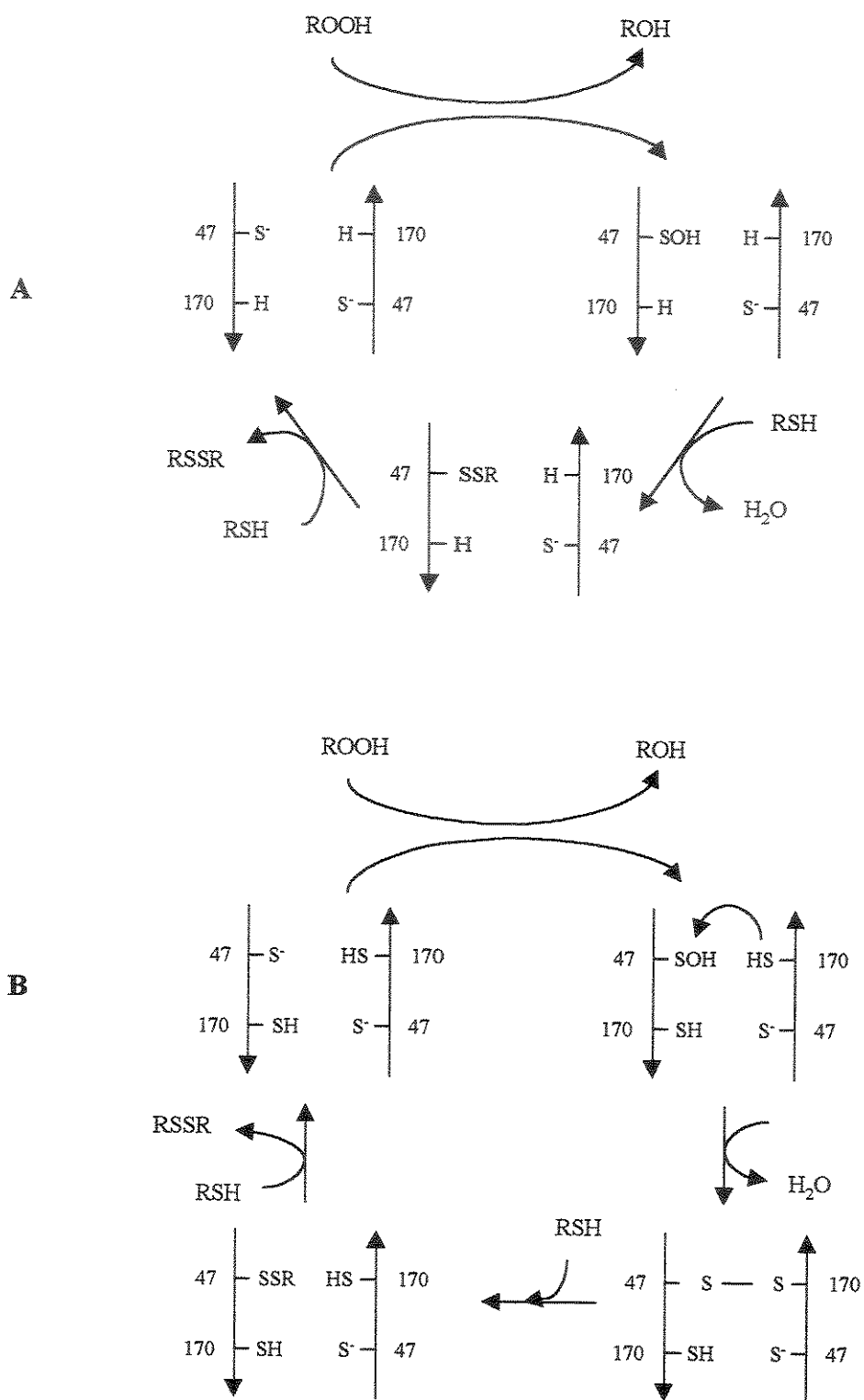
A segunda classe de peroxirredoxinas é composta por proteínas que possuem somente um resíduo de cisteína conservado (1-cis-prx), também situado na região N-terminal, em um domínio que em geral contém um motivo VCTT (Tabela I). 1-cis-prx e 2-cis-prx apresentam alta similaridade entre si. A terceira classe de proteínas também contém 2 cisteínas conservadas mas em motivos distintos como TCT e TCS (Tabela I). Também neste caso, a cisteína do sítio ativo está localizada na região N-terminal ao redor da posição 60. Proteínas desta classe são denominadas peroxirredoxinas do tipo II (tipo II prx) e têm baixa similaridade com as duas outras classes. Finalmente, a quarta classe é composta por proteínas que têm duas cisteínas conservadas na região N-terminal, ambas essenciais para atividade enzimática, e que formam um ponte dissulfeto intramolecular. A isoforma de levedura se localiza no núcleo e está envolvida com a atividade de telômeros (Park e col., 2000). Essas proteínas são conhecidas também como BCP (*bacterio comigratory protein*) ou prxQ e têm baixa similaridade com as proteínas das outras três classes (tabela I). Como pode ser observado na tabela I, apesar das proteínas de cada sub-grupo serem altamente conservadas, a localização celular difere muito entre diferentes grupos taxonômicos.

Tabela I – Características de sub-grupos de peroxirredoxinas

Sub-classe	Motivo 1 N-terminal	Motivo 2 C-terminal	Localização celular	Forma oxidada estável*	Isoformas de levedura
2-cis-prx	VCP	VCP	Citoplasma (leveduras, mamíferos) Mitocôndria (mamíferos) Cloroplasto (plantas)	-SS- (intermolecular)	cTPxI, cTPxII
1-cis-prx	VCTT	Não possui	mitocôndria (levedura) citoplasma (mamíferos) núcleo (plantas)	-SOH	mTPxI
Tipo II, AHP, pmp	TCT TCS	Não possui	peroxissomo, citoplasma (levedura) cloroplasto, secreção? (plantas) citoplasma ? (mamíferos)	-SS- (intermolecular)	cTPxIII
BCP . prxQ	<u>G</u> CTVQA <u>C</u>	Não possui	núcleo (leveduras) cloroplasto (plantas) citoplasma, mitocôndria e peroxissomos (mamíferos)	-SS- (intramolecular)	nTPxI

* A forma oxidada estável é aquela que pode ser detectada por métodos cromatográficos ou espectrométricos. (?) Apresentam indícios ainda não confirmados experimentalmente.

O mecanismo de catálise de 1-cis e 2-cis peroxirredoxinas envolve a formação de ácido sulfênico a partir da reação com hidroperóxidos. Em 1-cis-prx, o ácido sulfênico reage com uma molécula de tiol gerando um dissulfeto misto com a proteína. A regeneração do estado reduzido da enzima é realizada pela reação com um segundo tiol com a ponte dissulfeto (esquema 2). Já o mecanismo das 2-cis-prx parece ser mais complicado. A cisteína proximal oxidada (pela reação com hidroperóxido) reage com a distal, proveniente de uma segunda subunidade invertida da enzima oligomérica, formando a ponte dissulfeto inter-subunidades. Então o substrato redutor, tipicamente um ditiol, reage com esta ponte dissulfeto, regenerando o estado reduzido da enzima (Hofmann e col., 2002) (esquema 2).



Esquema 2 – Mecanismo enzimático de 1-cis-prx (A) e 2-cis-prx (B).

Tiorredoxina peroxidase citoplasmática I (cTPxI) foi a primeira peroxirredoxina isolada de uma célula eucariótica, de *S. cerevisiae* (Kim e col., 1988), corresponde a cerca de 0,7% do total de proteínas solúveis das células (Kim e col., 1989) e apresenta níveis de transcrição abundantes durante todas as fases de crescimento (Kim e col., 1989; Godon e col., 1998; Park e col., 2000). Este fato sugere uma função de peroxidase tipo “housekeeping” para cTPxI, que poderia regular níveis intracelulares de H_2O_2 . Além disso, cTPxI tem importante papel na defesa de mitocôndrias contra a permeabilização induzida por cálcio (Kowaltowski e col., 2000). Por outro lado, cTPxII (que é 96% similar a cTPxI) aparece em baixos níveis basais e é altamente induzível, podendo interferir em proliferação celular (Park e col., 2000; Wong e col., 2002). Já cTPxIII parece ter maior especificidade para alquil hidroperóxidos, sendo mais abundante na fase estacionária, em que ácidos graxos são utilizados como fonte de energia para as células (Jeong e col., 1999; Verdoucq e col., 1999; Park e col., 2000). cTPxI e cTPxIII são as isoformas de peroxirredoxinas predominantes em *S. cerevisiae* (Park e Col., 2000). Assim como cTPxII, mTPxI é altamente induzível por peróxidos e por exaustão de glicose do meio de cultura (Monteiro e col., 2002), sendo responsável pela decomposição de EROs produzidas durante o processo de respiração mitocondrial (Pedrejas e col., 2000). Finalmente, nTPx parece ter papel na proteção de telômeros (Singer e col., 1998) e poderia proteger o DNA nuclear contra danos oxidativos (Park e col., 2000). A extrema conservação destas enzimas e a quantidade de isoformas, sugerem um importante papel das mesmas para as células.

Recentes buscas em bases de dados demonstraram a existência de 320 seqüências de peroxirredoxinas de diferentes reinos biológicos submetidas (Hofmann e col., 2002). Em mamíferos, pelo menos seis isoformas de peroxirredoxinas foram descritas, tendo sido

envolvidas em diversos processos biológicos, como diferenciação e proliferação celulares (Rhee e Chae, 1994), em citotoxicidade de “Natural Killers” (Rhee e Chae, 1994), apoptose (Zhang e col., 1997) e transição da permeabilidade mitocondrial (Kowaltowski e col., 1998). Outras, encontradas em microorganismos, constituem antígenos espécie-específicos (*E. histolytica*, *H. pylori* e *M. avium*) (Rhee e Chae, 1994 e referências citadas).

Hofmann e colegas (2002) sugerem que peroxirredoxinas podem apresentar funções diferentes em três grupos de seres vivos: (1) em bactérias, leveduras e tripanossomas, que não possuem peroxidases de alta eficiência (seleno-peroxidases), peroxirredoxinas podem representar a principal linha de defesa das células contra danos oxidativos; (2) em plantas, elas estão implicadas na proteção contra subprodutos oxidantes provenientes da fotossíntese ; (3) em mamíferos, a menor eficiência enzimática de peroxirredoxinas em relação a catalases e seleno-peroxidases poderia descartá-las do cenário de defesa contra estresse oxidativo, mas sua abundância, número de isoformas e sua elevada afinidade por peróxido de hidrogênio (acima de 1000 vezes maior do que a da catalase) poderiam sugerir uma função moduladora regulatória, removendo baixas concentrações de peróxidos, produzidos como mensageiros celulares (Lee e col., 2001).

2..Estado funcional da mitocôndria e a produção de EROs

2.1. Mitocôndria funcional - Produção de energia: oxidação fosforilativa e o “vazamento” de elétrons a partir da cadeia respiratória

Na mitocôndria funcional, ocorre a fosforilação oxidativa. A cadeia respiratória é alimentada com elétrons provenientes de substratos reduzidos. Grandes complexos enzimáticos ligados à membrana, como NADH-Q óxido-redutase (Complexo I) ou succinato-Q óxido-redutase (Complexo II), transferem os elétrons através de um gradiente de potencial redox até a ubiquinona (Q), um transportador lipossolúvel. A partir da Q, os elétrons prosseguem através da Q-citocromo *c* óxido-redutase (Complexo III), citocromo *c* (um outro transportador móvel, hidrossolúvel) e citocromo *c* oxidase (Complexo IV) até o aceptor final, o oxigênio. Conforme os elétrons fluem através de seu gradiente químico, os Complexos I, III e IV efetuam o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço entre as membranas, contra seu gradiente eletro-químico. Este bombeamento gera uma força próton motriz que consiste em um gradiente elétrico (potencial de membrana), acompanhado por um pequeno gradiente químico (diferença de pH). A força próton motriz, então, impulsiona os prótons de volta à matriz através da ATP sintetase mitocondrial, resultando na síntese de ATP (esquema 3).

Em *S. cerevisiae* não existe o Complexo I que, em mamíferos, é constituído de 43 subunidades distintas, contém pelo menos cinco grupos ferro-enxofre e FMN como cofator, sendo passível de inibição por rotenona (Seo e col., 1998 e referências citadas). Substituindo este complexo, três NADH desidrogenases alternativas, duas externas (NDE1

e NDE2) e uma interna (NDI1), existem em *S. cerevisiae* (Joseph-Horne e col., 2001) (esquema 3). Todas são insensíveis a rotenona ou pericidina, são constituídas por uma única cadeia polipeptídica, sendo FAD seu cofator, e não possuem grupos ferro-enxofre. Estas NADH desidrogenases representam uma via alternativa ao complexo I na transferência de equivalentes reduzidos à cadeia de transporte de elétrons, no entanto, são incapazes de efetuar o bombeamento de prótons (Vries e Marres, 1987, Seo e col., 1998, Joseph-Horne e col., 2001). NADH desidrogenases alternativas foram também descritas em mitocôndrias de plantas, fungos, *Trypanosoma brucei*, bem como em membranas de bactérias (revisado por Fang e Beattie, 2002).

Embora a cadeia de transporte de elétrons constitua um sistema bastante eficiente, a natureza das reações de óxido-redução monoeletrônicas que catalisa predispõe cada transportador de elétrons a reações secundárias com oxigênio molecular (Cadenas e Davies, 2000). Isto é o que ocorre durante o ciclo da ubiquinona que, entre os estados quinona (totalmente oxidada), semiquinona (produto da redução monoeletrônica) e quinol (totalmente reduzida por 2 elétrons), apresenta tendência a doar um elétron diretamente ao oxigênio, gerando radical ânion superóxido, ao invés de passá-lo ao transportador de elétrons seguinte da cadeia. Neste ciclo (esquema 3B), a oxidação do quinol ocorre em uma reação bifurcada. O primeiro elétron é transferido para proteína ferro enxofre (ou proteína Rieske), citocromo c_1 e citocromo c , com a formação de uma semiquinona no centro Q_o . Esta semiquinona doa o segundo elétron através de citocromos b até a semiquinona situada no centro Q_i , em que quinona é reduzida a quinol. Para fornecer os dois elétrons necessários para a redução da quinona no centro Q_i , dois equivalentes de quinol são oxidados no centro

Q_o em sucessivos ciclos (Raha e Robinson, 2000). A semiquinona gerada no centro Q_o é a principal responsável pela formação de radicais $O_2^{\cdot-}$.

NADH desidrogenases também estão sujeitas a reações com oxigênio gerando $O_2^{\cdot-}$, através da formação de semiquinonas relacionadas às flavinas contidas nestas enzimas (Raha e Robinson, 2000) (esquema 3B). Diversos grupos ferro-enzofre presentes na cadeia respiratória também podem ser considerados sítios de geração de radicais superóxido (Cadenas e Davies, 2000). Portanto, geralmente se assume que a mitocôndria representa a maior fonte de EROs sob condições fisiológicas, com estimativas de que 1 a 2% do consumo de oxigênio diário seja desviado para a geração de radical ânion superóxido.

Recentemente, foi demonstrado que NADH desidrogenase alternativa insensível a rotenona de *T. brucei* é também uma fonte de superóxido (Fang and Beattie, 2002).

A oxidase alternativa, que atua em paralelo ao complexo *bcl* para a oxidação de ubiquinol em muitos fungos, não está presente em *S. cerevisiae* (Joseph-Horne e col., 2001) e, portanto, não pode ser considerada como fator que influencia a geração de EROs nesse microrganismo.

As taxas de produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 associadas à cadeia respiratória dependem do estado metabólico mitocondrial, refletido pelo potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ (ou força próton-motiva) (Nicholls e Budd, 2000). O estado 4, de repouso, é caracterizado por elevado $\Delta\Psi_m$, respiração lenta e nenhuma disponibilidade de ADP, sendo associado a altos níveis de produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , provavelmente em consequência ao elevado grau de redução dos componentes da cadeia respiratória. Por outro lado, o estado respiratório mitocondrial ativo, estado 3, com reduzido $\Delta\Psi_m$, alto consumo de oxigênio e ampla

disponibilidade de ADP, gera níveis relativamente baixos de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 devido ao grau de oxidação dos componentes da cadeia de transporte de elétrons (Cadenas e Davies, 2000, Nicholls e Budd, 2000).

Em adição à produção de energia (ATP), as atividades mitocondriais incluem modulação do estado redox celular, regulação osmótica, controle de pH, regulação da concentração de cálcio intracelular, termogênese (Pedersen, 1999) e síntese de compostos ferro-enxofre (Muhlenhoff e col., 2002)

2.2. Mitocôndria disfuncional e produção de EROs

2.2.1. Disfunções provocadas por agentes químicos

Como mencionado anteriormente, $\Delta\Psi_m$ é o parâmetro central na regulação da geração de EROs pela cadeia respiratória, além de regular também síntese de ATP e seqüestro de Ca^{2+} mitocondrial. $\Delta\Psi_m$, por sua vez, é controlado pela disponibilidade de substratos, demanda de ATP, estado funcional da cadeia de transporte de elétrons, condutância de prótons e seqüestro mitocondrial de Ca^{2+} (Nicholls e Budd, 2000). Interferências nestes parâmetros desencadeiam alterações na produção de EROs a partir da cadeia respiratória, podendo causar aumento ou mesmo diminuição.

Desacopladores, como FCCP e DNP, são substâncias lipofílicas capazes de dissociar o transporte de elétrons da oxidação fosforilativa através da transferência de prótons do exterior para o interior da matriz mitocondrial, promovendo colapso do $\Delta\Psi_m$. Com isto, o transporte de elétrons é acelerado e a geração de $O_2^{\cdot-}$ é inibida devido ao grau

de oxidação dos transportadores de elétrons e ao elevado consumo de O_2 , diminuindo sua disponibilidade ao redor da mitocôndria (Nicholls e Budd, 2000, Brand, 2000). A energia que seria utilizada para a síntese de ATP é dissipada na forma de calor. Além disso, a atividade reversa da ATP sintetase é estimulada, conduzindo a rápida hidrólise do ATP citoplasmático (Nicholls e Budd, 2000). Para uma célula garantir sua sobrevivência na presença de um desacoplador, sua capacidade de produzir ATP pela via glicolítica deve exceder a quantidade requerida pelo seu metabolismo mais a consumida pela atividade reversa da ATP sintetase, que parece ser possível apenas em células com limitada população de mitocôndrias (Nicholls e Budd, 2000).

Mesmo na ausência de desacopladores artificiais, uma pequena fração da energia proveniente da oxidação dos substratos é perdida na forma de calor, devido ao “vazamento” natural de prótons através da membrana interna mitocondrial (Korshunov e col., 1997, Brand e col., 2000). Este “vazamento” é aumentado em condições de elevado $\Delta\Psi_m$, sendo que vários autores sugerem que este possa ser um mecanismo de redução da formação de EROs (Korshunov e col., 1997, Brand e col., 2000). Em adição à condutância basal de prótons, mitocôndrias possuem proteínas desacopladoras induzíveis, que ocorrem no tecido adiposo marrom (UCPs), responsáveis pela termogênese necessária na proteção de recém-nascidos e na recuperação da temperatura normal de animais em hibernação (Brand, 2000).

Existe uma variedade de bloqueadores do transporte de elétrons, seletivos para cada complexo da cadeia respiratória (rotenona, antimicina A, mixotiazol, cianeto). A inibição de qualquer complexo leva ao bloqueio da transferência de elétrons ao longo de toda a cadeia, inibição do bombeamento de prótons, redução do $\Delta\Psi_m$ e bloqueio da síntese de ATP, permitindo atividade reversa da ATP sintetase. A hidrólise resultante de ATP

citoplasmático ocorre mais lentamente em relação à promovida por desacopladores, uma vez que a membrana interna mantém sua baixa permeabilidade a prótons, e é suficiente para garantir níveis de $\Delta\Psi_m$ pouco mais baixos do que na ausência de inibidores (Nicholls e Budd, 2000). Embora provoquem queda do $\Delta\Psi_m$, estes inibidores levam ao aumento da geração de radicais superóxido devido ao acúmulo das formas reduzidas de proteínas transportadoras de elétrons (flavinas relacionadas ao Complexo I e ubiquinona) localizadas anteriormente ao sítio bloqueado, o que favorece a doação de elétrons ao oxigênio (esquema 1) (Boveris e Chance, 1973, Korshunov e col., 1997, Starkov e Fiskum, 2001).

Rotenona bloqueia o transporte de elétrons no Complexo I, sendo um inibidor bastante utilizado em estudos que utilizam mitocôndrias de células de mamíferos. O tratamento de mitocôndrias de mamífero com rotenona estimula a formação de superóxido pela enzima NADH desidrogenase (Turrens, 1997).

Antimicina A e mixotiazol são inibidores do Complexo III da cadeia respiratória, sendo amplamente utilizados por realizarem seus efeitos em diferentes sítios e por apresentarem interferências contrárias na formação de radicais superóxido neste complexo (esquema 3B). Antimicina A inibe a transferência de elétrons do citocromo *b* para ubiquinona, o que favorece o acúmulo de semiquinona no centro Q_o e estimula a produção de $O_2^{\cdot-}$. Já o mixotiazol impede o transporte de elétrons do quinol para a proteína Rieske ferro-enxofre (ISP), prevenindo a formação de semiquinona no centro Q_o e, conseqüentemente, a produção de superóxido pelo Complexo III. Vários estudos demonstraram que mixotiazol diminui a formação de EROs, mas apenas quando outro inibidor do transporte de elétrons está presente, freqüentemente antimicina A (Gardner e col., 1995, Korshunov e col., 1997, Starkov e Fiskum, 2001, Young e col., 2002). Alguns

destes mesmos trabalhos revelaram que mixotiazol, quando único agente bloqueador da cadeia respiratória, estimula a produção de EROs, embora em níveis mais baixos do que os observados com antimicina A. Flavinas do complexo NADH desidrogenase são as principais geradoras de EROs em mitocôndrias inibidas por mixotiazol, sendo que e grupos ferro-enxofre da cadeia também poderiam contribuir para este efeito (Young e col., 2002).

Cianeto e azida são bloqueadores do Complexo IV da cadeia respiratória por se ligarem a grupos heme de citocromos. A adição desses inibidores provoca o aumento da geração de EROs provavelmente devido a um aumento nas formas reduzidas de flavinas e quinonas dos Complexos I e III (Bandy e Davinson, 1990).

Oligomicina é um inibidor do componente F_0 da ATP sintetase mitocondrial. Este inibidor previne tanto a síntese quanto a hidrólise de ATP e, como a mitocôndria não consome ATP citoplasmático, a capacidade glicolítica da célula deve suprir apenas ATP para a manutenção de seu metabolismo. $\Delta\Psi_m$ não só é mantido, como também aumentado (hiperpolarização) na presença de oligomicina, devido à inibição da entrada de prótons pela ATP sintetase. Conseqüentemente, a geração de $O_2^{\cdot-}$ é estimulada (Korshunov e col., 1997, Nicholls e Budd, 2000).

2.2.2. Disfunções provocadas por mutações : vulnerabilidade do genoma mitocondrial

Mitocôndrias são organelas de funcionamento semi-autônomo, que contêm um genoma residente e replicam, transcrevem e traduzem seu próprio DNA (Penta e col., 2001). O DNA mitocondrial (DNAm_t) é uma molécula circular, dupla-fita e superespiralada, contendo genes que codificam (a minoria) dos polipeptídeos que compõem a

cadeia respiratória, tRNAs e rRNAs necessários para a síntese dos polipeptídeos. Ao contrário do DNA nuclear, DNAm_t pode replicar mais de uma vez durante o ciclo celular, podendo ainda sofrer replicação em células que não estão se dividindo.

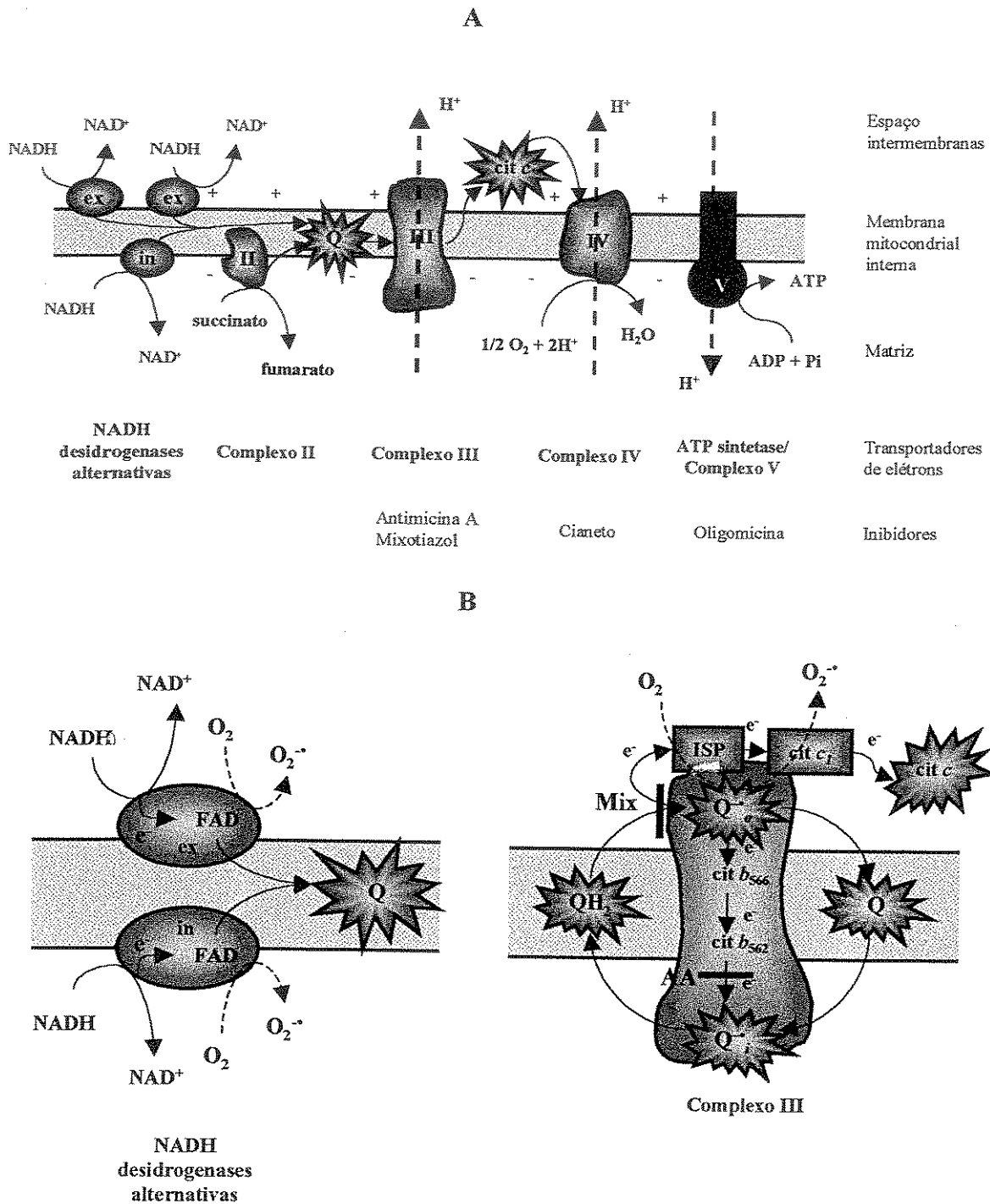
Comparado ao DNA nuclear, o DNAm_t é mais susceptível a danos oxidativos e apresenta maior taxa de mutação (Ferguson e Borstel, 1992, Penta e col., 2001). Esta maior vulnerabilidade do DNAm_t deve-se a pelo menos 4 fatores: (1) localização proximal à cadeia de transporte de elétrons, na membrana interna mitocondrial, onde EROs são continuamente geradas, (2) a mitocôndria possui mecanismos de reparo de DNA limitados, (3) ausência da proteção conferida pelas histonas e pela estrutura da cromatina e (4) ausência de introns, tornando praticamente todo DNAm_t codificador (Bandy e Davison, 1990, Penta e col., 2001).

Quando uma mutação aparece, as células contêm inicialmente uma mistura de DNAm_ts selvagens e mutados, estado conhecido como heteroplasmia. Durante a divisão de uma célula heteroplásmica, os DNAm_ts são distribuídos às células filhas ao acaso, de modo que, após muitas gerações, o genótipo do DNAm_t de uma linhagem celular pode se tornar predominantemente mutado ou selvagem (homoplasmia), um processo conhecido como segregação replicativa. Conforme a porcentagem de DNAm_ts mutados aumenta, a capacidade energética das células diminui até que atinja um limiar além do qual sintomas patológicos apareçam e se tornem progressivamente piores (Wallace, 1999).

Mutações em regiões do DNA mitocondrial ou nuclear codificadoras de polipeptídeos que participam na transferência de elétrons na cadeia respiratória podem conduzir à perda de função dos complexos respiratórios correspondentes, gerando efeitos similares aos dos bloqueadores do transporte de elétrons. Estas mutações podem então

impulsionar um ciclo de eventos levando a maior produção de EROs, seguido por posteriores mutações, amplificando cada vez mais a formação de EROs, criando uma situação de estresse oxidativo permanente.

Poyton e McEwen (1996) sugerem que EROs produzidas pela cadeia respiratória poderiam constituir mensageiros da mitocôndria para o núcleo, que então promoveria o ajuste de determinadas funções celulares para o restabelecimento da homeostase. A produção alterada de EROs refletiria mudanças no fluxo de elétrons através da cadeia respiratória ocasionadas por variações nas condições fisiológicas, como alteração da concentração de oxigênio, mutações no genoma mitocondrial acumuladas com a idade, choque térmico, ou ainda exposição a óxido nítrico.



Esquema 3. (A) Cadeia de transporte de elétrons de *S. cerevisiae*, (B) principais sítios de geração de radicais superóxido e inibidores mitocondriais, sendo mix = mixotiazol e AA = antimicina A, in = interna, ex = externa.

Células eucarióticas possuem várias vias para detoxificação de peróxidos. Nosso grupo está particularmente interessado no papel de peroxirredoxinas na defesa antioxidante de células. Tivemos como objetivo nessa tese avaliar em que condições cTPxI apresenta um papel de destaque na proteção de leveduras contra o estresse oxidativo induzido por peróxidos.

CAPÍTULO 1

Tiorredoxina peroxidase citoplasmática I é essencial para a defesa antioxidante de leveduras com disfunção mitocondrial

Artigo Publicado

Demasi, A.P.D., Pereira, G.A.G. e Netto, L.E.S. (2001) "Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essencial for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria" *FEBS letters*, **509**, 430-434.

Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria

Ana P.D. Demasi^a, Gonçalo A.G. Pereira^{b,*}, Luis E.S. Netto^c

^aDepartamento de Bioquímica, IB, UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^bDepartamento de Genética e Evolução, IB, UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^cDepartamento de Biologia, IB, USP, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

Received 4 September 2001; revised 19 November 2001; accepted 20 November 2001

First published online 29 November 2001

Edited by Gunnar von Heijne

Abstract The specific role of cytosolic thioredoxin peroxidase I (cTPx I), encoded by *TSAI* (thiol-specific antioxidant), was investigated in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. In most cases, deletion of *TSAI* has showed only a slight effect on hydrogen peroxide sensitivity. However, when the functional state of the mitochondria was compromised, the necessity of *TSAI* in cell protection against this oxidant was much more evident. All the procedures used to disrupt the mitochondrial respiratory chain promoted increases in the generation of H₂O₂ in cells, which could be related to their elevated sensitivity to oxidative stress. In fact, *TSAI* is highly expressed when cells with respiratory deficiency are exposed to H₂O₂. In conclusion, our results indicate that cTPx I is a key component of the antioxidant defense in respiratory-deficient cells. © 2001 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Thioredoxin peroxidase; Oxidative stress; Gene expression; Mitochondrion; Respiratory deficiency

1. Introduction

Living in an aerobic environment has required the development of sophisticated mechanisms to detect and detoxify reactive oxygen species (ROS), generated as by-products of normal biological reactions, specially oxidative phosphorylation [1]. The maintenance of the redox homeostasis is crucial for many biological processes such as differentiation, regulation of specific genes and signaling pathways [2,3], cell cycle regulation [4], programmed cell death [5] and aging [3]. The protective system against ROS includes enzymatic scavengers such as SOD, catalase and glutathione peroxidase, and non-enzymatic ones, like vitamins C and E, thiol-containing molecules (glutathione, thioredoxin) and transition metals chelators [1].

Peroxioredoxins constitute a group of thiol-dependent peroxidases ubiquitously distributed. In humans, these proteins have been implicated in many different processes such as proliferation [8], differentiation [9], natural killer cytotoxicity [10], apoptosis [11] and mitochondrial permeability transition [12].

*Corresponding author. Fax: (55)-19-37886235.

E-mail address: goncalo@unicamp.br (G.A.G. Pereira).

Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; cTPx I, cytosolic thioredoxin peroxidase I; TSA, thiol-specific antioxidant; HRP, horseradish peroxidase

Despite the demonstration that this protein decomposes peroxides at the expense of sulfhydryl compounds [7], the relationship between cellular processes and its enzymatic activity remains unknown.

Saccharomyces cerevisiae cytosolic thioredoxin peroxidase I (cTPx I) was the first peroxiredoxin isolated from an eukaryotic cell [6]. During the investigation about the role of cTPx I in yeast oxidative stress response, we found that its gene, *TSAI* (thiol-specific antioxidant), is transcriptionally activated in different situations where cells were exposed to high H₂O₂ concentration. The mitochondrial respiratory chain was disrupted by several means and in all cases the generation of ROS was increased. Moreover, a comparison between a *TSAI* deletion mutant and its corresponding wild-type isogenic strain indicated that this deletion renders cells more sensitive to H₂O₂, remarkably when the functional state of the mitochondria is compromised. Our results indicate that cTPx I has a fundamental importance in the oxidative stress response of cells with dysfunctional mitochondria.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and growth conditions

The *S. cerevisiae* strains used in this study were JD7-7C (MAT α ura3-52 leu2 trpA K+) [13], *tsa1* Δ (MAT α ura3-52 leu2 trpA K+ tsad::LEU2) [13], W303-1a (MAT α ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11 ura3) and *cox10* Δ (MAT α ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11 ura3 cox10::HIS3) [14]. Cells were grown at 30°C on YP medium (1% yeast extract, 2% bacto-peptone) with 2% glucose (YPD) or 2% glycerol plus 2% ethanol (YPYE) or even 2% raffinose (YPR). For most analysis, cells were harvested by centrifugation at mid-logarithmic phase, usually at an OD_{600 nm} between 0.8 and 1.4. The *rho*⁰ (p⁰) derivatives of the strains JD7-7C and *tsa1* Δ were obtained by growing cells for approximately 14 h in YPD medium containing ethidium bromide at 10 µg/ml. The respiratory deficiency of *rho*⁰ cells were verified by plating isolated colonies on YPYE medium, whereas the absence of mitochondrial DNA was visualized by epifluorescence microscopy, after staining with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) in Vectashield antifading solution (Vector Laboratory).

2.2. Plasmids and DNA manipulation

For probe preparation, a 600 bp *EcoRI/XbaI* fragment containing the *TSAI* coding sequence was isolated from plasmid pBS-C170S [15]. Plasmidial DNA preparation, gel electrophoresis and purification were all performed using standard methods as described in [16].

2.3. RNA isolation and analysis

Total yeast RNA was extracted by the method of hot acid phenol and Northern blotting was performed as previously described [16]. The *TSAI* ³²P-labeled probe was prepared by random primed synthesis [16]. Probed membranes were exposed to Kodak films

(X-OMAT). Ribosomal RNA, whose abundance is fairly constant under different growth conditions or among the strains derivatives, was used as control of the various total RNA samples loaded into the gels. In some cases, actin was also used as loading control and no significant difference was found (not shown). Quantitation of *TSAl* expression relative to rRNA bands were performed by dosimetry using Image Master VDS software. Normalized results of Northern blotting experiments are graphically represented at the bottom of the corresponding figures.

2.4. Determination of H_2O_2 tolerance

Spot test: cells were first grown in YPD media until a concentration of approximately 10^7 cells per ml, and then diluted to $OD_{600\text{ nm}} = 0.2$. Four subsequent 1/5 dilutions of these cell suspensions were realized and a 12 μ l droplet of each was plated on YPD-agar or YPR-agar medium containing 1.2 mM H_2O_2 , or 0.1 μ g/ml antimycin A or even both agents. Plates were then incubated 2 (YPD) or 4 days (YPR).

The H_2O_2 tolerance was also evaluated by the colony assay where cells were grown on YPD, 30°C until exponential phase ($OD_{600\text{ nm}} = 1.0$), treated with 0.1 μ g/ml antimycin A alone or associated to 0.5 mM H_2O_2 , during 1 h. Cells were then diluted and plated onto YPD-agar. Colonies were counted after 48 h of growth at 30°C.

2.5. Determination of H_2O_2 generation

H_2O_2 produced by *S. cerevisiae* cells was detected by the horseradish peroxidase (HRP)–scopoletin method [17]. Yeast cells from different strains were grown in YPD medium as described previously, harvested, suspended in appropriate buffer (0.1 M Tris–HCl pH 7.5, 1 mM glucose, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) containing 0.1% digitonin and incubated at room temperature for 30 min for permeabilization. Cells at the concentration of approximately 7.2×10^6 cells/ml were added to the same buffer containing 1 μ M HRP, 1 μ M scopoletin, 5 mM ATZ and, only in the positive control reaction mixture, 0.1 μ g/ml antimycin A. Fluorimetric measurement of scopoletin oxidation was assessed on a Hitachi 4500 spectrofluorimeter with excitation and emission wavelengths of 380 and 465 nm, respectively.

3. Results

3.1. ROS induces *TSAl* transcription

Studies performed in cell-free systems have demonstrated that cTPx I possesses thiol peroxidase activity [7,18]. To learn more about the physiological role of cTPx I in whole cells, the transcription of *TSAl* gene was analyzed by Northern blot. Initially, it was investigated the effect of H_2O_2 on *TSAl* transcription. When cells were grown in YPD (glucose), the maximum *TSAl* mRNA levels were observed 30 min after H_2O_2 addition, at the concentration of 1 mM, reaching around two- to five-fold the basal levels. Therefore, the time course of *TSAl* induction after H_2O_2 exposition is closely related to the periods required for the adaptation of yeast to oxidative stress [19].

Glucose represses the expression of genes in *S. cerevisiae* involved in mitochondrial biogenesis, respiratory metabolism and antioxidant defense [20]. Therefore, it was also analyzed the effect of H_2O_2 induction in cells growing in non-fermentative carbon source, glycerol/ethanol. The maximum increase in *TSAl* expression occurred faster (15 min) than in cells growing in glucose and after 60 min of treatment returned to the basal levels. These results indicate that *TSAl* is responsive to H_2O_2 treatment in all the situations analyzed.

3.2. Participation of cTPx I in the oxidative stress response of cells with dysfunctional mitochondria

It is well established that the majority of intracellular ROS production is derived from the leaking of electrons from the mitochondrial transport chain, mainly at complex I (NADH dehydrogenase) and at complex III (ubiquinone-cytochrome c

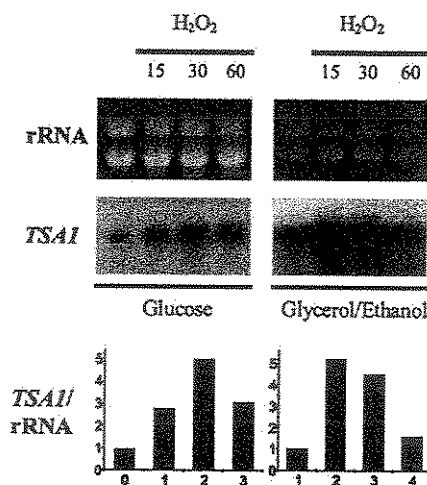


Fig. 1. Effect of H_2O_2 on *TSAl* expression. Northern blot analysis of RNA isolated from mid-logarithmic yeast strain JD7-7C exposed to 1 mM H_2O_2 during times (min) and carbon sources indicated in the figure.

reductase) [3], and several antioxidant enzymes may act in their detoxification. On the other hand, mitochondrial function has been demonstrated to improve resistance to oxidative stress in yeast [21]. Here it was evaluated the participation of cTPx I in the antioxidant response of cells with normal or impaired mitochondrial function growing under repressing (glucose) or derepressing (raffinose) conditions (Fig. 2).

In glucose-containing medium, the *rho*⁺ strain with *TSAl* deletion was only slightly more sensitive to H_2O_2 than the corresponding wild-type (Fig. 2A). Antimycin A, a drug that inhibits respiratory complex III, alone did not interfere with growth of any strain. However, association of antimycin A with H_2O_2 led to severe growth retardation of *tsalΔ* strain relative to wild-type, indicating a prominent role of cTPx I in ROS detoxification under respiratory deficiency. To confirm this trend, the same experiment was performed using *rho*⁰ cells, an alternative method to disrupt mitochondrial function. It was repeatedly observed that deletion of *TSAl* led to a faster growth of the *rho*⁰ cells in YEPD (glucose). Addition of H_2O_2 reverted the relative growth between the two strains; wild-type cells grew faster than the *tsalΔ* ones. As expected and in contrast to respiratory-competent strains, presence of antimycin A did not have any additional effect on the growth rates of the *rho*⁰ cells under any treatment.

The same experiment was performed in medium containing raffinose as the sole carbon source, a sugar that does not repress respiration. In contrast to the results obtained with cells grown in glucose, deletion of *TSAl* did not reduce resistance to H_2O_2 in respiratory-competent cells, indicating that other mitochondrial-related defenses overcome cTPx I role in this case. Treatment of antimycin A alone led to a growth retardation independent of cTPx I, however addition of H_2O_2 under this condition clearly showed the requirement of cTPx I for growth.

The importance of cTPx I on yeast defense against oxidative stress when mitochondria were not functional was confirmed by the cell colony assay (Fig. 2B). Deletion of *TSAl* provoked a remarkable sensitivity to oxidation when cells were simultaneously treated with antimycin A and H_2O_2 . In

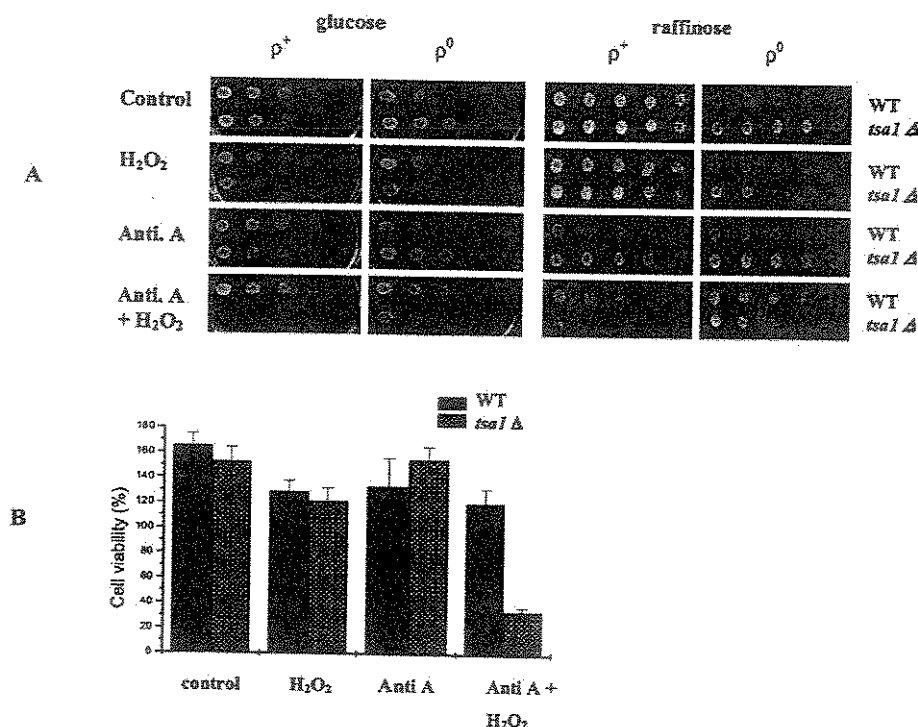


Fig. 2. H_2O_2 tolerance of respiratory-competent and respiratory-incompetent yeast cells. A: Spot test. H_2O_2 tolerance was evaluated by different growth rates of cells of the strains JD7-7C (WT) and *tsalΔ* on YP agar plates containing the agents described in the figure. B: Colony assay. H_2O_2 tolerance was reflected by the number of colonies of the strains JD7-7C (WT) and *tsalΔ*, counted after 48 h of growth on YPD-agar plates. Cells were treated before plating. Percentage survival is expressed related to the number of colonies at the beginning of the experiment (100%).

conclusion, our results showed that cTPx I has a key role in the defense of cells with dysfunctional mitochondria against H_2O_2 .

3.3. *TSAI* transcription in cells with dysfunctional mitochondria exposed to H_2O_2

Since respiratory-deficient cells presented high dependence on cTPx I for detoxification of H_2O_2 , it was evaluated whether this condition raised signals for the regulation of the *TSAI* gene. Therefore, *TSAI* transcription was analyzed under the same situations described in Fig. 2.

In glucose-containing media, addition of H_2O_2 increased *TSAI* transcription independently of the functional state of mitochondria. However, when cells were grown on raffinose, *TSAI* induction after H_2O_2 treatment was considerably higher in respiratory-incompetent cells than in those where respiratory capacity was preserved (Fig. 3). This fact indicates that absence of functional mitochondria may generate an additional signal that triggers *TSAI* induction beyond the level achieved by the presence of H_2O_2 alone. This signal could be the H_2O_2 concentration itself.

3.4. Cellular generation of H_2O_2 in cells with dysfunctional mitochondria

It is well established that the generation of ROS by normal mitochondria is significantly enhanced when terminal steps of the respiratory chain are blocked [22]. Hence it was investigated whether respiratory-deficient cells could present increased H_2O_2 internal levels, which could contribute to the lower oxidative stress resistance (Fig. 2) and additional in-

crease in *TSAI* transcription (Fig. 3) of these cells. Antimycin A treatment or *COX10* deletion led to higher H_2O_2 formation levels than their corresponding control or wild-type cells (Fig. 4) according to previous studies [22–26]. However, little is known about ROS generation in ρ^0 cells. These cells have normal levels of flavoproteins and ubiquinone ([24] and refer-

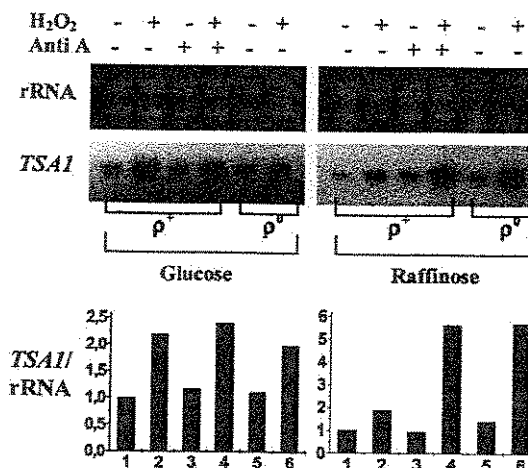


Fig. 3. Effect of H_2O_2 on *TSAI* expression in respiratory-competent and incompetent yeast cells. Northern blot analysis of RNA isolated from mid-logarithmic yeast strains JD7-7C (ρ^+) and its ρ^0 derivative, following treatment with 1 mM H_2O_2 alone or associated with 0.1 μ g/ml antimycin A. All the treatments were performed during 1 h.

ences cited herein), which can donate electrons to oxygen leading to superoxide generation, but cannot donate electrons to cytochrome oxidase, which is dysfunctional in these cells due to the lack of subunits encoded by mitochondria [27]. In fact, *rho*⁰ cells generated more H₂O₂ than their corresponding *rho*⁺ cells, although in an apparent slower rate, compared to antimycin A treatment (Fig. 4). These experiments were also performed in the *tsa1Δ* strain. Deficiency of cTPx I did not alter significantly the release of H₂O₂ (data not shown). This is in agreement with the results described in Fig. 2 showing that deletion of *TSA1* gene do not alter considerably the tolerance of cells for disruption of respiratory chain. Jiang et al. [28], have also detected more ROS generation in mammalian *rho*⁰ cells. The increased production of ROS was attributed to increased activity of enzymes such as nitric oxide synthase, xanthine oxidase and lipoxygenases [28]. Regardless where or how ROS are produced in *rho*⁰ cells, they are really elevated in comparison to *rho*⁺ cells. Therefore, cTPx I had an important protective role in cells with dysfunctional mitochondria where the levels of ROS are high.

4. Discussion

The antioxidant defense system of yeast comprises many different antioxidant enzymes, among other components. Besides cTPx I, yeast has other enzymes that decompose peroxides such as catalase A, catalase T, cytochrome *c* peroxidase and glutathione peroxidase (reviewed in [20]). It is not known what are the specific roles for these enzymes; each one may be responsible for the decomposition of peroxide at a particular compartment or at a particular situation. In order to obtain some clues about the physiological role of cTPx I in yeast, we have measured the transcription of *TSA1* gene and evaluated the effect of the absence of cTPx I in cell survival in different conditions.

Our results indicated that cTPx I has an important antioxidant role in *S. cerevisiae*. In fact, when cells were exposed to

high H₂O₂ concentrations *TSA1* was transcriptionally activated (Fig. 1) and cells were slightly more sensitive to this oxidant (Fig. 2). All the procedures used in this study to disrupt electron transport chain led to small augments in ROS production (Fig. 4), which were not accompanied by an increase in cell mortality (Fig. 2) and were independent of the presence of cTPx I (not shown). However, when the loss of mitochondrial function was associated with H₂O₂ treatment both the sensitivity of *tsa1Δ* cells (Fig. 2) and *TSA1* expression in wild-type strain (Fig. 3) were increased considerably. It appears that the augment in ROS production by disruption of mitochondrial electron transport can be coped by any of the several antioxidant enzymes present in yeast. However, when H₂O₂ concentration is further increased by external addition of this oxidant, the survival of respiratory-incompetent cells seems to be very dependent on cTPx I.

Respiratory-deficient cells present increased sensitivity to oxidative stress [21,29], but are still able to mount an inducible adaptive response to H₂O₂ [21]. The reason for this increased sensitivity is not clear, but Grant et al. [21] proposed that it could be due to a defect in energy-requiring processes, like detoxification of ROS or repair of oxidatively damaged molecules. Alternatively, it could be related to the higher levels of H₂O₂ generated by *rho*⁰ cells or by *rho*⁺ cells treated with antimycin A (Fig. 4). Another suggestion to explain this phenomenon could involve mitochondrial functions related to the metabolism of various compounds with signaling properties, such as heme [30], Ca²⁺ [31] or even ROS [2,3,32]. The loss of function of this organelle could alter the concentrations of these species which could lead to alterations in the expression profile of antioxidant genes, electing cTPx I as a major enzyme to counteract the oxidizing environment.

Recently, two genome-wide studies of cell responses to mitochondrial dysfunction were published, one performed on glucose medium [33] and other on raffinose [34]. Alterations in the expression of genes involved in metabolic remodeling were found but no significant differences in the expression of antioxidant genes were observed. However, these studies were performed without any exposition of cells to an oxidant, hence the oxidative stress response of respiratory-deficient cells could not be evaluated appropriately. We are currently investigating this response in a genome-wide scale.

Mitochondrial defects occur in a wide variety of human degenerative diseases, aging and cancer [21–23]. Understanding how cells with these defects respond to environmental changes or stress situations should provide significant insight to improve treatment of these disorders, aiming replacement of defective functions in the case of preserving cell life (diseases), or even taking advantages of these defects to selectively destroy the cells (cancer). Our results indicate that peroxiredoxins, specially those with high similarity to yeast cTPx I, could be important targets for these studies.

Acknowledgements. This work was supported by grants from the Brazilian Agencies FAPESP and CNPq.

References

- [1] Hallywell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) Free Radicals in Biology and Medicine (Hallywell, B and Gutteridge, J.M.C., Eds.), Second Edn., Clarendon Press, Oxford.
- [2] Allen, R.G. and Tresini, M. (2000) Free Radic. Biol. Med. 28, 463–499.

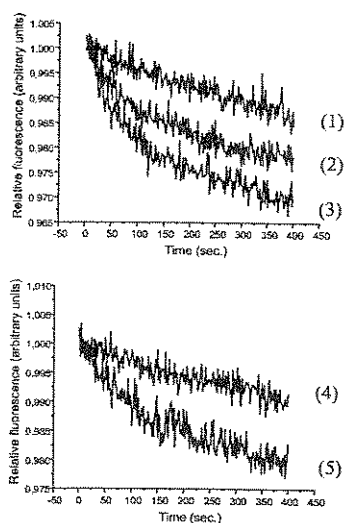


Fig. 4. H₂O₂ generated by *S. cerevisiae* cells by the HRP-scopoletin method. Fluorimetric measurement of scopoletin oxidation due to the H₂O₂ generated by cells of the strains JD7-7C (1 and 3), *rho*⁰JD7-7C (2), W303-1a (4) and *cox10Δ* (5). Antimycin A at 0.1 μg/ml was added only in (3) (Section 2.5).

- [3] Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) *Nature* 408, 239–247.
- [4] Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K. and Paules, R.S. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1387–1404.
- [5] Cai, J. and Jones, D.P. (1999) *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 327–334.
- [6] Kim, K., Kim, I.H., Lee, Ki-Y., Rhee, S.G. and Stadtman, E.R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4704–4711.
- [7] Netto, L.E.S., Chae, H.Z., Kang, S.W., Rhee, S.G. and Stadtman, E.R. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 15315–15321.
- [8] Prosperi, M.T., Ferbus, D., Karczynski, I. and Goubin, G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 11050–11056.
- [9] Yamamoto, T., Matsui, Y., Natori, S. and Obinata, M. (1989) *Gene* 80, 337–343.
- [10] Shau, H., Gupta, R.K. and Golub, S.H. (1993) *Cell. Immunol.* 147, 1–11.
- [11] Zhang, P., Liu, B., Kang, S.W., Seo, M.S., Rhee, S.G. and Obeid, L.M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 30615–30618.
- [12] Kowaltowski, A.J., Netto, L.E.S. and Vercesi, A.E. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12766–12769.
- [13] Chae, H.Z., Kim, I.H., Kim, K. and Rhee, S.G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 16815–16821.
- [14] Nobrega, M.P., Nobrega, F.G. and Tzagoloff, A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 14220–14226.
- [15] Chae, H.Z., Uhm, T.B. and Rhee, S.G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7022–7026.
- [16] Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.A., Smith, J.A. and Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapters 2, 3 and 13, John Wiley and Sons, New York.
- [17] Boveris, A., Martino, E. and Stoppani, A.O. (1977) *Anal. Biochem.* 15, 145–158.
- [18] Chae, H.Z., Chung, S.J. and Rhee, S.G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 27670–27678.
- [19] Davies, J.M.S., Lowry, C.V. and Davies, K.J.A. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 1–6.
- [20] Jamieson, D.J. (1998) *Yeast* 14, 1511–1527.
- [21] Grant, C.M., MacIver, F.H. and Dawes, I.W. (1997) *FEBS Lett.* 410, 219–222.
- [22] Boveris, A. and Chance, B. (1973) *Biochem. J.* 134, 707–716.
- [23] Bolter, C.J. and Chefurka, W. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 278, 65–72.
- [24] Bandy, B. and Davison, A.J. (1990) *Free Radic. Biol. Med.* 8, 523–539.
- [25] Wallace, K.B., Eells, J.T., Madeira, V.M.C., Cortopassi, G. and Jones, D.P. (1997) *Fund. Appl. Toxic.* 38, 23–37.
- [26] Wallace, D.C. (1999) *Science* 283, 1482–1488.
- [27] Constanzo, M.C. and Fox, T.D. (1990) *Annu. Rev. Genet.* 24, 91–113.
- [28] Jiang, S., Cai, J., Wallace, D.C. and Jones, D.P. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29905–29911.
- [29] He, C.H., Masson, J.Y. and Ramotar, D. (1996) *Curr. Genet.* 30, 279–283.
- [30] Zhang, L. and Hach, A. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 415–426.
- [31] Halachmi, D. and Eilam, Y. (1993) *FEBS Lett.* 316, 73–78.
- [32] Poyton, R.O. and McEwen, J.E. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* 65, 563–607.
- [33] Traven, A., Wong, J.M.S., Xu, D., Sopta, M. and Ingles, C.J. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 4020–4027.
- [34] Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale IV, W., Davé, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R. and Butow, R.A. (2001) *Mol. Biol. Cell* 12, 297–308.

CAPÍTULO 2

**cTPxI especificamente protege células de leveduras com
deficiência respiratória contra estresse oxidativo: participação
de EROs geradas endogenamente**

Artigo em fase de submissão

Demasi, A.P.D., Munhoz, D.C., Pereira, G.A.G. e Netto, L.E.S. "cTPxI specifically protects respiratory deficient yeast cells against oxidative stress: participation of ROS endogenously generated".

cTPx I specifically protects respiratory deficient yeast cells against oxidative stress: participation of ROS endogenously generated

Demasi, A.P.D.¹, Munhoz, D.C.³, Pereira G.A.G². and Netto, L.E.S³.

1 Departamento de Bioquímica – IB – UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP , Brazil

2 Departamento de Genética e Evolução – IB – UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP , Brazil

3 Departamento de Biologia – IB – USP, 05508-900, São Paulo, SP , Brazil

Keywords: thioredoxin peroxidase, oxidative stress, gene expression, mitochondria, respiratory deficiency.

Abbreviations: ROS = reactive oxygen species; cTPx I = cytosolic thioredoxin peroxidase I, FCCP = *p*-trifluoromethoxycarbonylcyanide phenylhydrazine

Abstract

Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I (cTPxI) is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria (Demasi *et al*, 2001). Here, the mechanism of this phenomenon was investigated. Exposure of yeast cells to different mitochondrial function inhibitors, including those that intensify (antimycin A, myxothiazol, cyanide and oligomycin) as well as those that inhibit (FCCP and anaerobic growth) ROS generation, indicated that, regardless where or how mitochondrial function is perturbed, endogenous ROS production seems to be necessary to enhance *ctpxI* mutant cells sensitivity to H₂O₂. In agreement, *CTPXI* expression was very high in conditions where the correspondent protein was essential for yeast cell protection against oxidative stress. These results indicate that cTPx I is particularly important in situations where cells are exposed simultaneously to ROS added exogenously and generated by defective mitochondria. Finally, this protective role seems to be specific for cTPxI, since deletion of genes encoding other peroxide removing enzymes did not result in elevated sensitivity. Mitochondrial defects are associated with several diseases. We suggest that peroxiredoxins could exert decisive role in the destiny of cells affected by these defects.

1. Introduction

Mitochondria electron transport chain accounts for the majority of the unavoidable ROS generation in aerobic cells (Hallywell and Guttridge, 1989). Reduced flavins associated with Complex I and reduced forms of coenzyme Q can be autoxidized to release superoxide radicals. This effect can be intensified by mutations or drugs that block the terminal steps of the respiratory chain (Boveris and Chance, 1973, Poyton and McEwen, 1996).

ROS can cause a broad spectrum of effects, from activation of redox sensitive signaling pathways and regulation of gene expression, to accumulation of oxidative damage of cellular macromolecules that can lead to development of pathologies, aging and cell death (Allen and Tresini, 2000, Finkel and Holbrook, 2000, Dröge, 2002, Barja, 2002). The occurrence and the extent of oxidative damage will depend on ROS concentration and the activation of cellular antioxidants and repair mechanisms.

Cells possess multiple enzymes to detoxify peroxides, such as catalases, glutathione peroxidases and cytochrome *c* peroxidases. Peroxiredoxins are abundant peroxidases that are independent of heme and require an N-terminal cysteine for their enzymatic activity. These ubiquitously distributed proteins reduce hydroperoxides at expense of thiol compounds, such as glutathione, dithiotreitol and thioredoxin (Chae *et al*, 1994, Netto *et al*, 1996). cTPxI was the first peroxiredoxin characterized in an eukaryotic cell (Kim *et al*, 1988). We have shown previously that cTPx I actively participates in the antioxidant defense of yeast cells with dysfunctional mitochondria (Demasi *et al*, 2001). Now, we report results indicating that increased ROS levels generated by impaired mitochondria are

necessary to enhance sensitivity of respiratory deficient cells lacking cTPx I to oxidative stress. This effect seems to be specific for cTPx I, since absence of other peroxide removing enzymes did not change significantly the sensitivity of respiratory deficient yeast cells to oxidative stress. Therefore, cTPx I is remarkably important in cell protection when there are endogenous and exogenous sources of ROS acting together.

2. Materials and methods

2.1 Yeast strains and growth conditions.

The *S. cerevisiae* strains used in this study were JD7-7C (*MAT α ura3-52 leu2 trpA K+*) and *ctpx1 Δ* (*MAT α ura3-52 leu2 trpA K+ tsa Δ ::LEU2*), obtained from Chae (1993); BY4741 (*MAT a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0*), YO4287 (*MAT a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0*; YDR453C : : Kan Mx4), YO3090 (*MAT a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0*; YBL064C : : Kan Mx4) and YO0545 (*MAT a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0*; YML028W : : Kan Mx4), obtained from EUROSCARF and YPH250 (*MATa trp- Δ 1 his3- Δ 200 lys2-801 leu2- Δ 1 ade2-101 ura3-52*), YTT7 (*MATa trp- Δ 1 his3- Δ 200 lys2-801 leu2- Δ 1 ade2-101 ctt1::URA3*), YIT2 (*MATa his3- Δ 200 lys2-801 leu2- Δ 1 ade2-101 ura3-52 ctal::TRP1*), YWT1 (*MATa his3- Δ 200 lys2-801 leu2- Δ 1 ade2-101 ctal::TRP1 ctt1::URA3*), obtained from Izawa (1996).

Cells were grown at 30°C on YPD medium (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glucose). For most analysis, cells were harvested by centrifugation at midlogarithmic

phase, usually at an OD_{600nm} between 0,8 and 1,4. Anaerobic growth was performed in an appropriated jar, with Anaerogen (Oxoyd) addition.

2.2. Plasmids and DNA manipulation.

For probe preparation, a 600 bp *EcoRI/XbaI* fragment containing the *CTPXI* coding sequence was isolated from plasmid pBS-C170S (Chae *et al*, 1993). Plasmidial DNA preparation, gel electrophoresis and purification were all performed using standard methods as described in Ausubel *et al* (1994).

2.3. RNA isolation and analysis.

Total yeast RNA was extracted by the method of hot acid phenol and Northern blotting was performed as previously described (Ausubel *et al*, 1994). The *CTPXI* ³²P - labeled probe was prepared by random primed synthesis (Ausubel *et al*, 1994). Probed membranes were exposed to Kodak films (X-OMAT). Ribosomal RNA, whose abundance is fairly constant under different growth conditions or among the strains derivatives, was used as control of the various total RNA samples loaded into the gels. In some cases, actin was also used as loading control and no significant difference was found. Bands were quantified by dosimetry using Image Master VDS software.

2.4 Determination of H₂O₂ tolerance.

Spot test: cells were first grown in YPD media until a concentration of approximately 10⁷ cells per ml, and then diluted to OD_{600nm}= 0.2. Four subsequent 1/5 dilutions of these cell suspensions were realized and a 12 µl droplet of each was plated on

YPD-agar medium containing 1,2 mM H₂O₂, or 0,1 µg/ml antimycin A, 8,0 µg/ml myxothiazol, 0,5 mM potassium cyanide, 5 µg/ml oligomycin and 1 µg/ml FCCP. Plates were then incubated 2 days (except when indicated in the figure).

2.5 Determination of sulfhydryl groups

Protein bound sulfhydryl (PB-SH) levels were measured according to the method of Sedlak and Lindsay (1968), by subtracting the nonprotein sulfhydryl (NP-SH) content from the total sulfhydryl (T-SH) content. Cells of the strains JD7-7C and *ctpx1Δ* were cultured, diluted to OD_{600nm} 0,2 and, after overnight treatments with 1,5 mM H₂O₂, 0,1 µg/ml antimycin A and 1,0 µg/ml FCCP separately or in association (as described in the figure), approximately 2×10^6 cells from each culture were collected. Protein extracts were obtained in 0,02 M EDTA pH 4,7 with glass beads addition followed by centrifugation at 13000 rpm for 15 minutes. The T-SH concentrations were determined by absorption levels at 412 nm after incubating 200 µl aliquots of protein extracts supernatants with 780 µl 0,2 M Tris pH 8,2 and 20 µl 5 mM DTNB for 30 minutes. The NP-SH contents were determined in the supernatant, after proteins precipitation with 5% TCA (final concentration) by incubating 450 µl supernatant, 900 µl 0,4 M Tris pH 8,9 and 26 µl 5 mM DTNB for 5 minutes. Absorption levels were measured at 412 nm.

3. Results

3.1 Participation of cTPx I in the oxidative stress response of cells with different defects on mitochondria function

We have shown before that cTPx I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria (Demasi *et al*, 2001). Compounds with signaling properties, such as heme (Zhang and Hach, 1999), Ca^{2+} (Halachmi and Eilam, 1993) or even ROS (Poyton and McEwen, 1996, Allen and Tresini, 2000, Finkel and Holbrook, 2000) could be associated to this phenomenon since their metabolism are closely related to mitochondria. The loss of function of this organelle could alter the concentration of these species which could lead to alterations in the expression profile of antioxidant genes, electing cTPx I as a major enzyme to counteract the oxidizing environment. Therefore, the dose response to H_2O_2 in cells with impaired mitochondrial function was analyzed. Wild-type cells could handle with elevated H_2O_2 doses, even with dysfunctional mitochondria. In contrast, sensitivity of *ctpxI* mutant cells was directly related to H_2O_2 concentration, being in all cases further increased when antimycin A was added in association to each H_2O_2 dose (figure 1).

Antimycin A promotes several effects in mitochondria, such as potential loss, lack of phosphorylation capacity and increase in ROS generation (Nicholls and Budd, 2000). To analyze which of these effects accounted for the elevated sensitivity of *ctpxI* cells to H_2O_2 , mitochondrial function was disrupted by several agents: antimycin A (blockage electron flow at Complex III, from cytochrome *b* to ubiquinone), myxothiazol (inhibition of electron

transfer from ubiquinol to Rieske iron-sulfur protein, at Complex III), cyanide (blockage electron transport at Complex IV), oligomycin (direct binding to the mitochondrial ATP synthase, inhibiting ATP production), FCCP (an uncoupler of oxidative phosphorylation that can carry protons across the mitochondrial inner membrane promoting proton gradient collapse), and anaerobic growth (absence of O₂).

Treatment with mitochondrial function inhibitory agents that were known to increase ROS generation, such as antimycin A (Boveris, 1973), myxothiazol (Starkov and Fiskum, 2001, Young *et al*, 2002, Muller *et al*, 2002) and oligomycin (Korshunov *et al*, 1997), led to slight or no interference in cell growth, independently of the presence of cTPx I (figure 2A). However, association of these compounds to H₂O₂ caused, in all cases, severe growth retardation of *ctpx1Δ* strain, relative to wild type (figure 2A). This indicate a prominent role of cTPx I in ROS detoxification under any respiratory deficiency.

In contrast, when mitochondrial function was perturbed by FCCP, an agent that decreases ROS generation (Machida e Tanaka, 1999, Brand, 2000), no alteration in growth rates of both strains was observed, even with external addition of H₂O₂ (figure 2A). Moreover, cells of wild type and *ctpx1Δ* strains, grown under O₂ absence, lost respiratory capacity and were similarly sensitive to H₂O₂ (figure 2B). In this case, ROS generation is totally blocked, since no O₂ is present to accept electrons.

These results may indicate that endogenous ROS generated by defective mitochondria could be essential to enhance sensitivity of cells to exogenous oxidative stress, specially those that are deficient in cTPx I.

3.2. *CTPXI* transcription in cells exposed to diverse mitochondrial function inhibitors and H_2O_2

Our results obtained so far indicated that when respiratory deficiency is accompanied by augmented ROS generation, cells presented high dependence on cTPxI for H_2O_2 detoxification. Next, *CTPXI* expression was analyzed.

As described before (Demasi *et al*, 2001), treatment of yeast cells with H_2O_2 increases *CTPXI* expression (figure 3A). The mitochondrial inhibitors antimycin A, oligomycin and cyanide did not alter significantly *CTPXI* mRNA levels. In contrast, FCCP treatment led to a dramatic reduction of this transcript (figure 3A).

CTPXI expression after H_2O_2 treatment was considerably higher in respiratory-deficient cells than in those where respiratory capacity was preserved, when this deficiency was generated by oligomycin or by cyanide (figure 3A). With antimycin A, this effect was slight. As described above, what is common to them is the stimulation of ROS production. In contrast, when FCCP is the agent of mitochondrial function perturbation, *CTPXI* expression after H_2O_2 addition was similar to the level achieved with H_2O_2 alone in cells with respiratory competence. Accordingly to the decrease in ROS production in cells treated with FCCP alone, *CTPXI* transcription is reduced (figure 3A). Another way to reduce or even abolish ROS generation can be achieved through anaerobic growth and, under this condition, *CTPXI* expression undergoes time-dependent decrease (figure 3B). Despite this decrease, cells under anaerobic growth were still able to induce *CTPXI* transcription after H_2O_2 treatment (figure 3B).

Finally, it is important to emphasize that in conditions where cells appear to be very dependent on cTPxI in oxidative stress defense, its gene presented high transcription levels (figure 3A, wells 8 to 10).

3.3 Oxidation of sulfhydryl groups

To determine whether cells lacking cTPx I could be more sensitive to oxidative damage than the corresponding wild-type, oxidative stress was evaluated as depletion of protein sulfhydryl content.

Exposition to H_2O_2 promoted only a slight loss in sulfhydryl groups, both NP-SH and PB-SH, and *ctpxI* mutant cells were barely more sensitive than wild-type to this loss (figure 4). Antimycin A treatment alone caused little or no effect on sulfhydryl groups content in both strains, however, its association to H_2O_2 led to a huge depletion in NP-SH as well as PB-SH levels only in cells lacking cTPx I (figure 4). Despite the partial loss of sulfhydryl groups content in both strains followed by FCCP treatment alone, what should be pointed out is that there was no additional decrease in these groups concentration after association with H_2O_2 , even in cells lacking cTPx I (figure 4).

These results indicate that *ctpxI* mutant cells with dysfunctional mitochondria are more sensitive to protein oxidative damage when this dysfunction is accompanied to increased endogenous ROS production (antimycin A treatment).

3.4. Specificity of *cTPxI* for antioxidant defense in yeast cells with dysfunctional mitochondria

In order to evaluate whether other enzymes that decompose H_2O_2 , such as cytosolic thioredoxin peroxidase II (*cTPx II*), mitochondrial thioredoxin peroxidase (*mTPx*), catalase A and catalase T, would be also able to protect respiratory deficient cells against oxidative stress, we performed viability tests using yeast strains with deletions in these enzymes corresponding genes. Lack of any other peroxidase mentioned above did not lead to alterations in cell growth rates of mutant cells neither after isolate treatment with H_2O_2 or antimycin A (data not shown), nor after the association of both, contrary to the severe retardation observed in *cTPxI* deficient cells (figure 5).

These results remarkably demonstrate the exclusive participation of *cTPx I*, among many other antioxidant enzymes, in the defense of respiratory deficient cells to oxidative stress.

4. Discussion

Wild type and *ctpxI* Δ cells exposure to different mitochondrial function inhibitors indicated that, regardless where or how mitochondrial respiratory chain is perturbed, endogenous ROS production seems to be necessary to enhance sensitivity of cells lacking *cTPx I* to H_2O_2 . Treatment with mitochondrial inhibitors known to intensify ROS generation (antimycin A, myxothiazol, cyanide and oligomycin) led to retardation on

growth rate (figure 2) as well as increased oxidative damage (figure 4) in *ctpXI* mutant cells exposed to H_2O_2 , when compared with their wild-type counterparts.

Although it would be expected a decrease of mitochondrial ROS generation by myxothiazol treatment, since this compound inhibits quinol oxidation to semiquinone radical, this effect does not occur. In fact, several reports showed that myxothiazol leads to increase in superoxide generation by mitochondrial complex I (Gardner *et al*, 1995, Raha *et al*, 2000, Starkov and Fiskum, 2001, Young *et al*, 2002, Muller *et al*, 2002). These same studies demonstrated that myxothiazol only provokes decrease in superoxide generation when antimycin A is added together. As *S. cerevisiae*, *Trypanosoma brucei* also possess a rotenone-insensitive NADH dehydrogenase which consists in a single polypeptide with a flavin cofactor, providing an alternative pathway to complex I in transferring reducing equivalents to respiratory chain (Fang and Beattie, 2002). Recently, Fang and Beattie (2002) have shown that rotenone-insensitive NADH dehydrogenase accounts for the majority of superoxide radicals produced by trypanosome mitochondria. Considering the similarities, it could be inferred that any of the three *S. cerevisiae* NADH dehydrogenases could also be potent $O_2^{\cdot-}$ generators in cells treated with myxothiazol. This effect correlates to the higher sensitivity to H_2O_2 of cells deficient in cTPxI exposed to this inhibitor (figure 2).

In contrast, when mitochondrial dysfunction was accompanied by diminished ROS levels (treatment with FCCP or growth under anaerobiosis), absence of cTPx I did not alter neither cell growth rate (figure 2), nor protein sulfhydryl content after H_2O_2 exposition (figure 4). Therefore, cTPx I is remarkably essential in cell protection when there are endogenous and exogenous sources of ROS acting together.

In agreement, *CTPX1* mRNA levels determined in our Northern blot analysis (figure 3) were closely related to the requirement of cTPxI in cell antioxidant defense. High expression levels of this gene were obtained when cells were exposed to antimycin A/H₂O₂, or oligomycin/H₂O₂, or even cyanide/H₂O₂, conditions where cells demonstrated extreme dependence on cTPxI to protect themselves against oxidative stress (figure 2).

The importance of this protective role of cTPxI also emerges when it is considered that cells with dysfunctional mitochondria are more sensitive to oxidative stress (Grant *et al.*, 1997). This increased sensitivity to oxidants is probably not related to decrease in antioxidant content, because microarray studies did not show a markedly change in the expression of enzymes required for ROS detoxification (Epstein *et al.*, 2001; Traven *et al.*, 2001), although without any exposition to oxidants. Grant *et al.* (1997) suggested that the oxidant sensitivity could be due to a defect in an energy-requiring process. Josse and colleagues (1998) reported in their study with Jukart cells a tremendous drop in ATP level when both oligomycin and H₂O₂ were added together, below 10% of the normal value. These appears not to be the case in this study, because when glucose is present, most of the ATP synthesis does not come from mitochondrial respiration, but from glycolysis (Lagunas, 1986). Moreover, altered ATP levels appear not to influence respiratory deficient yeast antioxidant defense because wild-type cells, subjected to the associated treatment oligomycin plus H₂O₂, could protect themselves competently from oxidative stress (figure 2A). In addition, it would be expected a higher cytoplasmic ATP hydrolysis rate after FCCP than following antimycin A exposition (Nicholls and Budd, 2000), leading to a pronounced energy failure in cells treated with this uncoupler. However, cells exposed to

the associated treatment FCCP + H₂O₂, did not present alteration in H₂O₂ sensitivity, even *ctpxI* mutants, contrary to the effect observed after antimycin A plus H₂O₂ exposition.

Among other peroxidases, only cTPxI assures protection against oxidative stress to respiratory deficient cells (figure 5). Although inducibilities of cTPxII and mTPx were shown to be greater than that of cTPxI, the levels of these former enzymes after H₂O₂ exposition were found to be still much lower than that of cTPxI (Park *et al*, 2000). These observations could explain why only cTPxI exerts influence in cell protection and other peroxiredoxins can not replace cTPxI in this role. Finally, we could suggest an involvement of the glucose repressor effect. Msn2p/Msn4p regulate cTPxII (Hong *et al*, 2002) and mTPx (Monteiro *et al*, 2002). These factors are repressed in the presence of glucose through Ras/PKA pathway. It is still unknown whether these factors also regulates cTPxI. Our results could imply that cTPxI could undergo a smaller glucose repressor effect than the other peroxidases tested, being the main enzyme in ROS detoxification under this condition.

Taken together, augment in endogenous ROS production by dysfunctional mitochondria, repression of alternative antioxidant genes by glucose, external addition of H₂O₂ and lack of cTPxI could not give other choice to cells but die.

The possibility of the involvement of mitochondrial functions related to the metabolism of compounds with signaling properties, such as heme (Zhang and Hach, 1999), or Ca²⁺ (Halachmi and Eilam, 1993) in this phenomenon still remains. Further investigations would be necessary to clarify whether there could be alterations in these compounds levels.

Many of the ROS-mediated responses actually protect cells against oxidative stress and reestablish redox homeostasis (Dröge, 2002). Since thiol containing molecules, such as thioredoxin and glutathione, greatly influence the regulation of this redox homeostasis (Arrigo, 1999), cTPx I presence could be really essential in signaling pathways.

Respiratory deficiencies are frequently associated with cancer, neurodegenerative diseases and aging in human cells (Wallace *et al*, 1997, Wallace, 1999, Cassarino *et al*, 1999, Wickens, 2001 Penta *et al*, 2001, Salvioli *et al*, 2001, Barja, 2002). Our results suggest that peroxiredoxins, specially those with high similarity to yeast cTPxI, could exert decisive role in the destiny, survival or death, of cells affected by these disorders. In fact, some recent reports have shown that peroxiredoxins are overexpressed in different types of tumor cells and participate in their antioxidant defense (Shen and Natan, 2002, Kinnula *et al*, 2002, Noh *et al*, 2001).

Acknowledgements: This work was supported by grants from the Brazilian Agencies FAPESP and CNPq.

References

- Allen, R.G. e Tresini, M. (2000) "Oxidative Stress and gene regulation" *Free Rad. Biol. Med.*, **28**, 463-499.
- Arrigo, A.P. (1999) "Gene expression and the thiol redox state" *Free Rad. Biol. Med.*, **27**, 936-944.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.A., Smith, J.A., Struhl, K. (1994) em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Caps. 2, 3 e 13
- Barja, G. (2002) "Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction" *Ageing Research Reviews*, **1**, 397-411.
- Boveris, A., Chance, B. (1973) "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide" *Biochem. J.*, **134**, 707-716.
- Brand, M.D. (2000) "Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing" *Experimental Gerontology*, **35**, 811-820.
- Cassarino, D.S. e Bennett Jr., J.P. (1999) "An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses and cell death in neurodegeneration" *Brain Res. Rev.*, **29**, 1-25.
- Chae, H.Z., Kim, I. H., Kim, K. e Rhee, S.G. (1993), "Cloning, sequencing, and Mutation of Thiol Specific Antioxidant gene of TSA" *J. Biol. Chem.*, **268**, 16815-16821.
- Chae, H.Z., Uhm, T.B. e Rhee, S.G. (1994) "Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 7022-7026.
- Demasi, A.P.D., Pereira, G.A.G. e Netto, L.E.S. (2001) "Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essencial for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria" *FEBS letters*, **509**, 430-434.
- Dröge, W. (2002) "Free radicals in the physiological control of cell function" *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95.
- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale 4th, Dave, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R. and Butow, R.A. (2001) "Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction" *Mol. Biol. Cell*, **12**, 297-308.
- Fang, J. and Beattie, D.S. (2002) "Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria" *Mol. Biochem. Parasitology*, **123**, 135-142.
- Finkel, T. e Holbrook, N.J. (2000) "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing" *Nature*, **408**, 239-247.
- Gardner, P.R., Raineri, I., Epstein, L.B. e White, C. (1995) "Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells" *J. Biol. Chem.*, **270**, 13399-13405.
- Grant, C.M., MacIver, F.H. e Dawes, I.W. (1997) "Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *FEBS Letters*, **410**, 219-222.
- Halachmi, D e Eilam, Y. (1993) "Calcium homeostasis in yeast cells exposed to high concentrations of calcium. Roles of vacuolar H⁺-ATPase and cellular ATP" *FEBS*, **316**, 73-78.

- Hallywell, B e Gutteridge, J.M.C. (1989) em *Free Radicals in biology and Medicine* (Hallywell, B e Gutteridge, J.M.C., eds.), Second edition, Claredon Press, Oxford.
- Hong, S., Cha, M., Choi, Y., Kim, W. and Kim, I. (2002) "Msn2p/Msn4p as a key transcriptional activator on yeast cytoplasmic thiol peroxidase II" *J. Biol. Chem.*, **277**, 12109-12117.
- Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A (1996) "Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*" *Biochem. J.*, **320**, 61-67.
- Josse, C., Legrand-Poels, S., Piret, B., Sluse, F. and Piette, J. (1998) "Impairment of the mitochondrial electron chain transport prevents NF-kB activation by hydrogen peroxide" *Free Rad. Biol. Med.*, **25**, 104-112.
- Kim, K., Kim, I.H., Lee, Ki-Y., Rhee, S.G. e Stadtman, E.R. (1988) "The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system" *J. Biol. Chem.*, **263**, 4704-4711.
- Kinnula, V.L., Lehtonen, S., Sormunen, R., Kaarteenaho-Wiik, R., Kang, S.W., Rhee, S.G. and Soini, Y. (2002) "Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V and VI in malignant mesothelioma" *J. Pathol.*, **196**, 316-323.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. and Starkov A.A. (1997) "High protonic potential actuates a mechanism of reactive oxygen species in mitochondria" *FEBS Letters*, **416**, 15-18.
- Lagunas, R. (1986) "Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast*, **2**, 221-228.
- Machida, K. e Tanaka, T. (1999) "Farnesol-induced generation of reactive oxygen species deperdent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F₀F₁-ATPase in yeast" *FEBS Letters*, **462**, 108-112.
- Monteiro, G., Pereira, G.A and 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 Radical Biol. Med.*, **32**, 278-288.
- Muller, F., Crofts, AR. and Kramer, D.M. (2002) "Multiple Q-cycle bypass reaction at the Q_o site of the cytochrome *bcl* complex" *Biochemistry*, **41**, 7866-7874.
- Netto, L. E.S., Chae, H.Z., Kang, S.W., Rhee, S.G. e Stadtman, E.R. (1996) "Removal of hydrogen peroxide is involved with the antioxidant properties of Thiol Specific Antioxidant (TSA). TSA possesses thiol peroxidase activity" *J. Biol. Chem.*, **271**15315-15321.
- Nicholls, D.G. and Budd, S.L. (2000) "Mitochondria and neuronal survival" *Physiological Reviews*, **80**, 315-360.
- Noh, D.Y., Ahn, S.J., Lee, R.A, Kim, S.W., Park, I.A and Chae, H.Z. (2001) "Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer" *Anticancer Res.*, **21**, 2085-2090.
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W. e Kim, I.H. (2000) "Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.*, **275**, 5723-5732.
- Penta, J.S., Johnson, F.M., Wachsman, J.T. and Copeland, W.C. (2001) "Mitochondrial DNA in human malignancy" *Mutation Research*, **488**, 119-133.
- Poyton, R.O. e McEwen, J.E. (1996) "Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes" *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 563-607.

- Raha, S., McEachern, G.E., Myint, A. and Robinson, B.H. (2000) "Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase" *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 170-180.
- Salvioli, S., Bonafè, M., Capri, M., Monti, D. e Franceschi, C. (2001) "Mitochondria, aging and longevity- a new perspective" *FEBS Letters*, **492**, 9-13.
- Sedlak, J. and Lindsay, R.H. (1968) "Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent" *Anal. Biochem.*, **25**, 192-205.
- Shen, C. and Nathan, C. (2002) "Nonredundant antioxidant defense by multiple two cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells" *Mol. Med.*, **8**, 95-102.
- Starkov, A.A. e Fiskum, G. (2001) "Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain" *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **281**, 645-650.
- Traven, A., Wong, J.M., Xu, D., Sopta, M. and Ingles, C.J. (2001) "Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial DNA mutant" *J. Biol. Chem.*, **276**, 4020-4027.
- Wallace, D.C (1999) "Mitochondrial diseases in man and mouse" *Science*, **283**, 1482-1488.
- Wallace, K.B., Eells, J.T., Madeira, V.M.C., Cortopassi, G., Jones, D.P. (1997) "Mitochondria-mediated cell injury" *Fund. Appl. Toxic.*, **38**, 23-37.
- Wickens, A.P. (2001) "Ageing and the free radical theory" *Respiration Physiology*, **128**, 379-391.
- Young, T.A, Cunningham, C.C. and Bailey, S.M. (2002) "Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol" *Arch. Biochem. Biophys.*, **405**, 65-72.
- Zhang, L. and Hach, A (1999) "Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator" *Cell Mol. Life Sci.*, **56**, 415-426.

Figure legends

Figure 1. Dose-dependent H_2O_2 tolerance of yeast cells. Growth rates of the strains JD7-7C (WT) and *ctpX* Δ exposed to crescent doses of H_2O_2 alone or associated with 0,1 μ g/ml antimycin , as indicated, after 5 days incubation at 30°C

Figure 2. H_2O_2 tolerance of respiratory-competent and respiratory-inhibited yeast cells. Growth rates of the strains JD7-7C (WT) and *ctpX* Δ exposed to 1,2 mM H_2O_2 , 0,1 μ g/ml antimycin A (anti A), 8,0 μ g/ml myxothiazol (myxo), 5,0 μ g/ml oligomycin (oligo), 1,0 μ g/ml FCCP and 0,5 mM potassium cyanide . (A) aerobic growth and (B) anaerobic growth. Incubation of 2 days at 30°C.

Figure 3. Effect of H_2O_2 on *CTPX* expression in yeast cells exposed to different mitochondrial function inhibitors . Northern blot analysis of RNA isolated from yeast cells of strain JD7-7C (WT) exposed to 1,2 mM H_2O_2 , 0,1 μ g/ml antimycin A (anti A), 5,0 μ g/ml oligomycin (oligo), 1,0 μ g/ml FCCP and 0,5 mM potassium cyanide, during 1 h. (A) Aerobic growth and exposition. (B) Crescent periods of anaerobic growth except lane 1 (aerobic). Bottom panels: proportions of *CTPX* transcripts relative to corresponding rRNA levels.

Figure 4. Determination of sulfhydryl groups of respiratory-competent and respiratory-inhibited cells exposed to H_2O_2 . Cell protein extracts of strains JD7-7C (WT) and *ctpX* Δ were assayed as previously described for thiol groups after exposition to 1,2

mM H_2O_2 isolately or in association with 0,1 $\mu\text{g/ml}$ antimycin A or 1,0 $\mu\text{g/ml}$ FCCP . Results are represented relative to the concentration of these groups in control cells (100%), that were not exposed to any agent.

Figure 5. H_2O_2 tolerance of respiratory-competent and respiratory-inhibited yeast cells deficient in peroxidases. Growth rates of cells deficient in mitochondrial thioredoxin peroxidase (*mtpx Δ*), cytosolic thioredoxin peroxidase II (*ctpxII Δ*), cytosolic thioredoxin peroxidase I (*ctpxI Δ*), peroxisomal catalase (*ctaI Δ*), cytosolic catalase (*cttI Δ*) and in both catalases (*cttI Δ ctaI Δ*), relative to their corresponding wild-type cells, exposed to 1,5 mM H_2O_2 and 0,1 $\mu\text{g/ml}$ antimycin A.

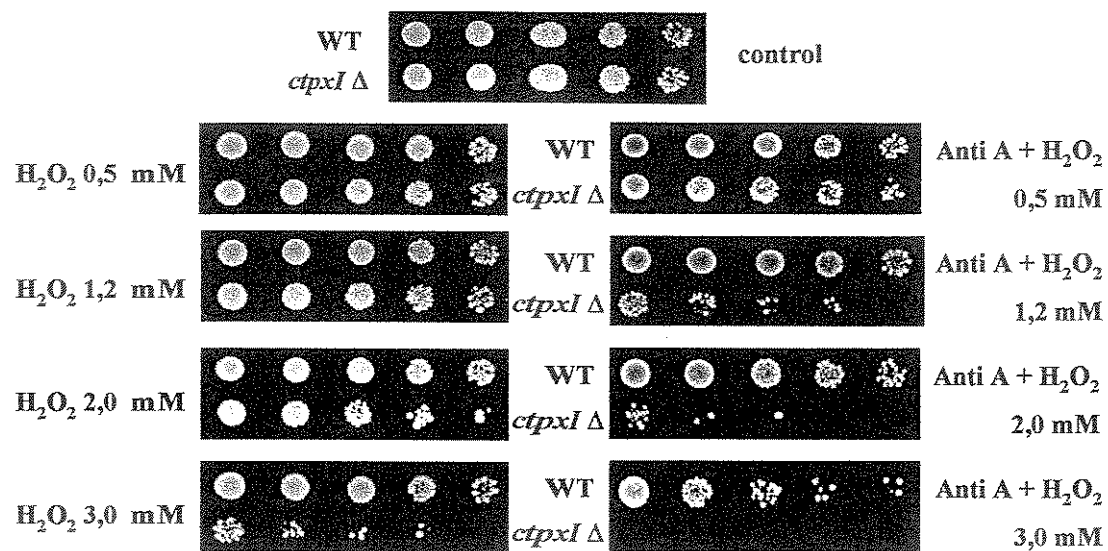


Figure 1.

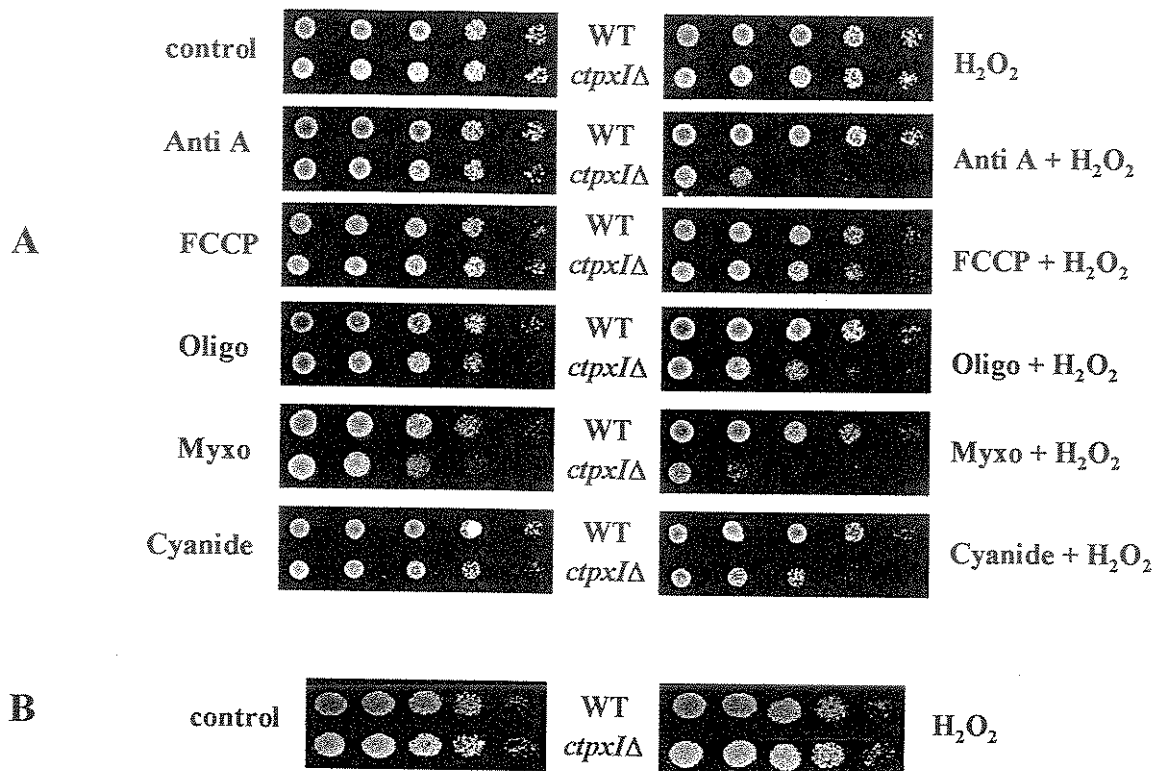


Figure 2.

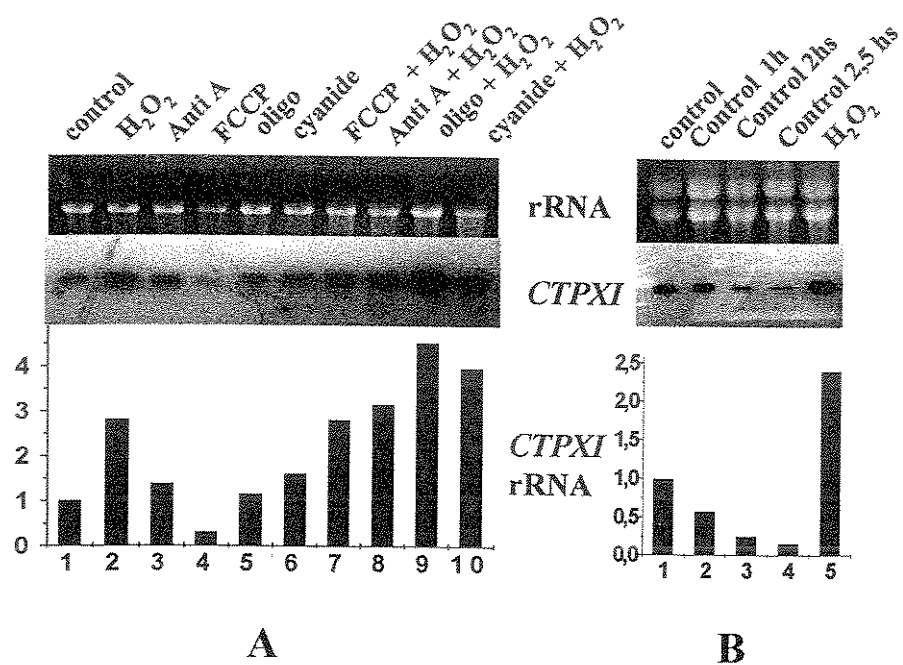


Figure 3.

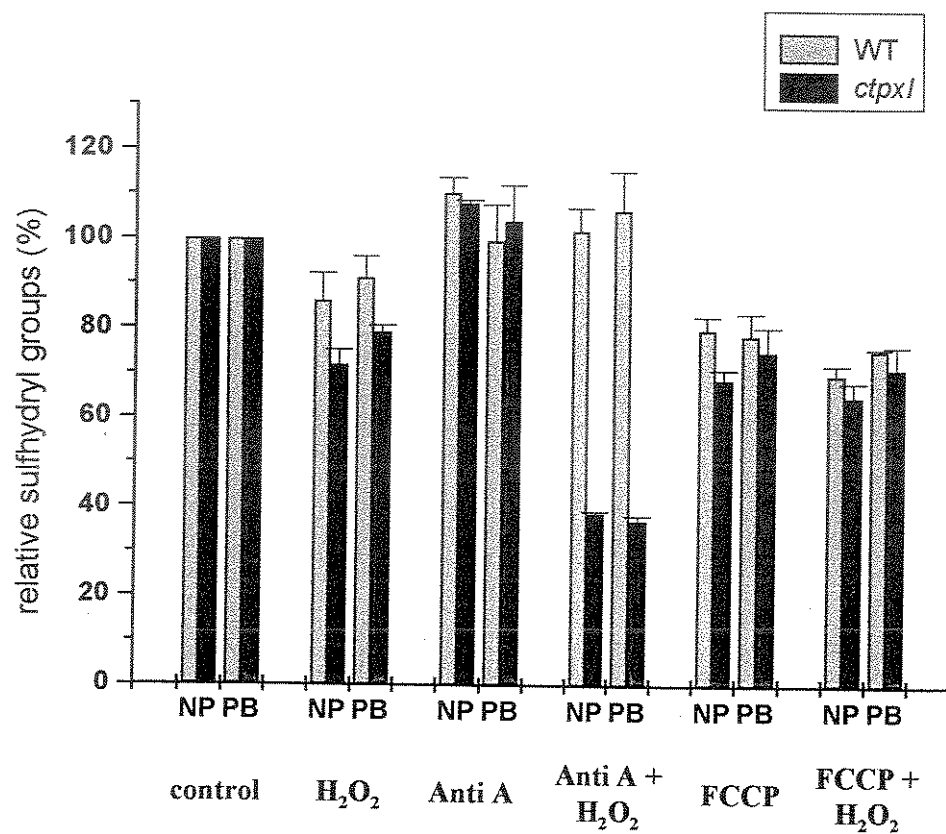


Figure 4.

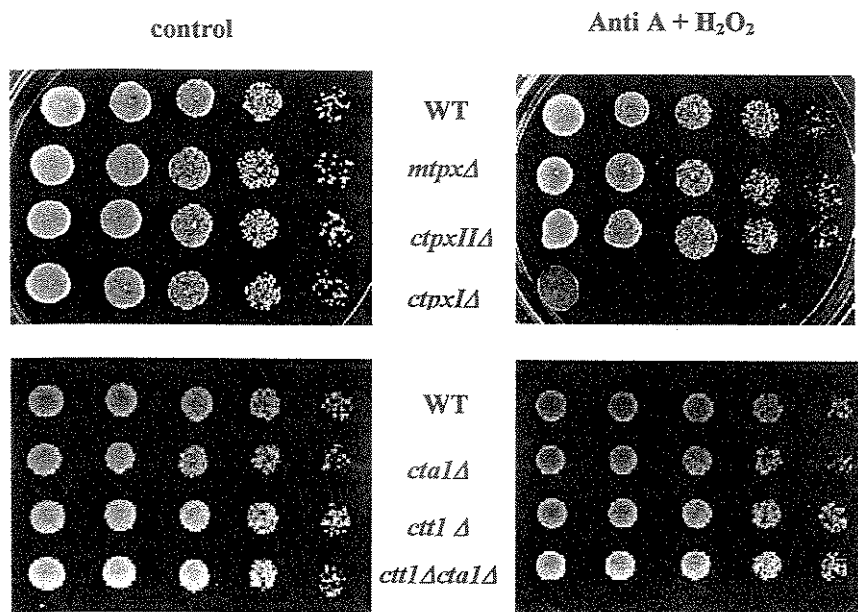


Figure 5.

CAPÍTULO 3

Resultados suplementares

3.1. Efeito da fase de crescimento na expressão de *CTPXI*

A fase de crescimento de células de leveduras afeta a expressão de muitos genes antioxidantes, que geralmente são induzidos quando as células atingem a fase estacionária (Jamieson, 1998). *CTPXI* é altamente expresso durante todas as fases de crescimento das células, apresentando leve aumento em fases mais tardias (figura 1), resultados também obtidos por Park e colegas (2000), sugerindo possível papel “housekeeping” para *cTPxI*.

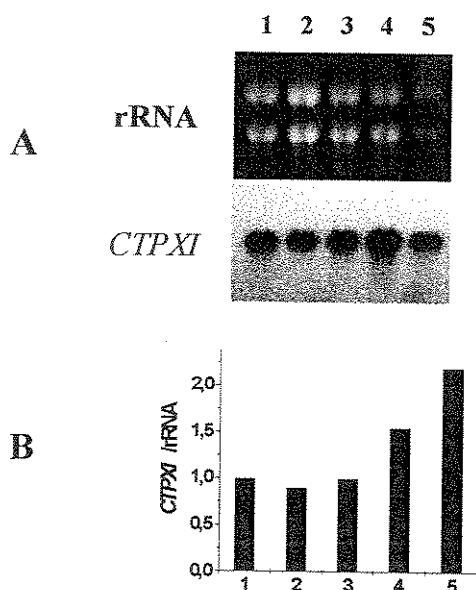


Figura 1. Efeito da fase de crescimento na expressão de *CTPXI*. (A) Análise via “Northern blot” de RNA isolado de células da linhagem JD7-7C, cultivadas em YEPD, nas seguintes densidades óticas (OD_{600}) : 0,6 (coluna 1), 1,0 (coluna 2), 2,3 (coluna 3), 5,5 (coluna 4) e 9,1 (coluna 5). (B) Quantificação dos transcritos de *CTPXI* em relação aos níveis de rRNA, obtida por densitometria. As colunas correspondem às descritas em (A).

3.2. Efeito da fonte de carbono na expressão de *CTPXI*

Muitos, senão todos os genes que codificam funções respiratórias, estão submetidos à repressão por glicose. Além disso, a maioria das enzimas antioxidantes, como catalase citossólica (*CTT1*), catalase peroxissomal (*CTA1*), citocromo c peroxidase (*CCP1*) e superóxido dismutase citossólica (*SOD1*) também são reprimidas por glicose (Jamieson, 1998). Para verificar possível efeito de repressão do gene *CTPXI* por glicose, células foram cultivadas em meio de cultura contendo esta fonte de carbono (YEPD) ou contendo glicerol (2%) mais etanol (2%) (YPYE). Além disso, algumas células foram tratadas com H_2O_2 para a avaliação da indução deste gene nas diferentes fontes de carbono.

Os níveis basais de transcritos correspondentes a *CTPXI* apresentam-se levemente aumentados quando as células utilizam glicerol como fonte de carbono, em relação aos obtidos com glicose (figura 2). No entanto, os níveis de mRNA de *CTPXI* apresentados após indução com H_2O_2 foram superiores em meio de cultura contendo glicerol (figura 2), indicando que este gene também sofre repressão por glicose, embora menos pronunciada do que outros genes antioxidantes. Além disso as cinéticas de indução de *CTPXI* em resposta ao H_2O_2 são distintas em meios de cultura contendo glicose (máxima ao redor de 30 a 60 minutos de tratamento) ou glicerol (máxima ao redor de 15 e 30 minutos, voltando a níveis basais após 1 hora) (figura 1, capítulo 1).

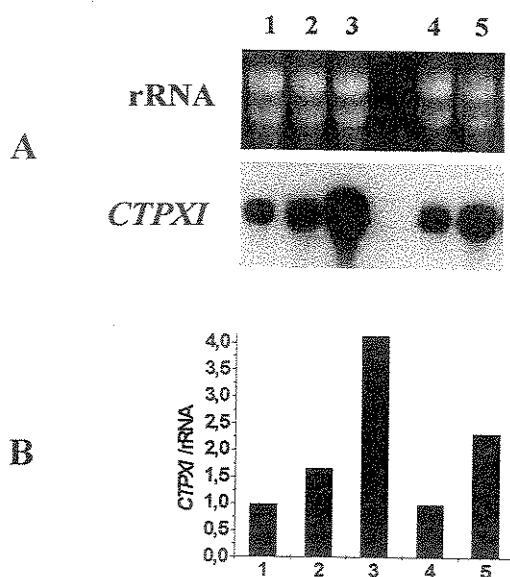


Figura 2. Efeito da fonte de carbono na expressão de *CTPXI*. (A) Análise via “Northern blot” de RNA isolado de células da linhagem JD7-7C, cultivadas em YEPD, fase exponencial (colunas 1, 4 e 5) ou YPYE (colunas 2 e 3), sendo que colunas 3 e 5 correspondem às células tratadas com H_2O_2 1,0 mM durante 15 (3) ou 50 min. (5). (B) Quantificação dos transcritos de *CTPXI* em relação aos níveis de rRNA, obtida por densitometria. As colunas correspondem às descritas em (A).

3.3. Efeito da exposição a concentrações crescentes de H_2O_2 na expressão de *CTPXI*

Como demonstrado através da figura 3, níveis máximos de indução de *CTPXI* são obtidos a baixas concentrações de H_2O_2 e se mantêm com aumentos de dose significativos. Godon e colaboradores (1998), através de análise comparativa de proteínas em géis bidimensionais, também descreveram uma curva dose-resposta similar para cTPxI, embora tenham utilizado apenas as concentrações 0,2, 0,4 e 0,8 mM de H_2O_2 . Tiorredoxina redutase, tiorredoxinas 1 e 2, e SOD citoplasmática apresentaram o mesmo perfil de curva dose-resposta ao H_2O_2 que cTPxI. (Godon e col., 1998). Já concentrações muito elevadas de H_2O_2 levam à diminuição da expressão de *CTPXI*, provavelmente por serem concentrações muito tóxicas (figura 3).

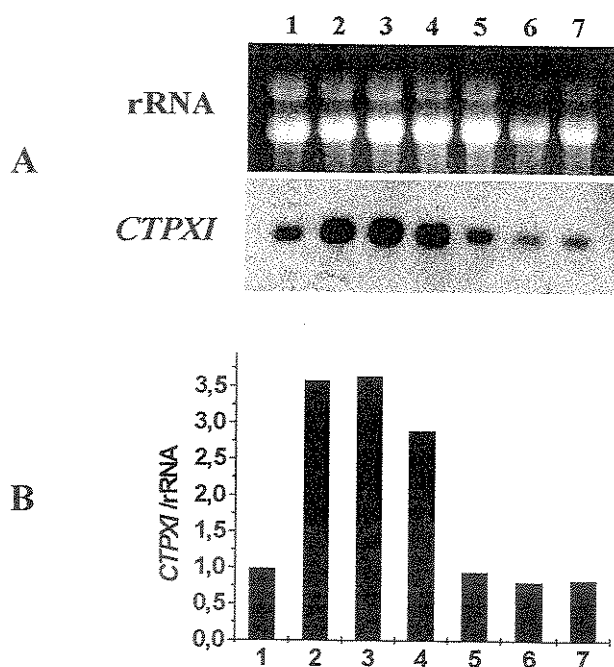


Figura 3. Efeito de concentrações crescentes de H_2O_2 na expressão de *CTPXI*. (A) Análise via “Northern blot” de RNA isolado de células da linhagem JD7-7C, cultivadas em YEPD, fase exponencial, tratadas durante 50 min. com H_2O_2 , 0,5 mM (2) 1,0 mM (3), 2,0mM (4), 4,0 mM (5), 6,0 mM (6) e 8,0 mM (7), ou sem nenhum tratamento (1). (B) Quantificação dos transcritos de *CTPXI* em relação aos níveis de rRNA, obtida por densitometria. As colunas correspondem às descritas em (A).

3.4. Curvas de crescimento de células de leveduras expostas a diferentes condições

Observando as curvas de crescimento (figura 4 A e B) podemos verificar que células deficientes em *ctpXI* crescem similarmente às selvagens, com ligeira diminuição da proliferação em fases tardias. O tratamento com H_2O_2 provocou um intenso retardo do crescimento de células mutantes *ctpXI*, que não foi observado nas selvagens. Entretanto, após 30 horas de crescimento, as densidades óticas alcançadas por estas células se aproximaram bastante, revelando uma recuperação das mutantes *ctpXI*. Já o tratamento com antimicina A não provocou alterações significativas de crescimento das células selvagens nem mesmo das mutantes em *CTPXI* nas fases iniciais, sendo notadas ligeiramente após 20 horas de desenvolvimento. No entanto, quando antimicina A foi associada ao H_2O_2 , células

selvagens sofreram intenso retardo do crescimento, com posterior recuperação, já as *ctpxI* não apresentaram crescimento nenhum. A exposição ao FCCP não provocou alterações nas taxas de crescimento das células das duas linhagens, mas a sua associação ao H_2O_2 sim, sendo muito mais proeminente o retardo de crescimento observado nas células deficientes em cTPxI. Analisando todas as curvas, os períodos de retardo de crescimento foram, tanto para células mutantes *ctpxI* como para as selvagens, maior quando antimicina A foi o agente da disfunção mitocondrial, sendo que as mutantes *ctpxI* foram capazes de responder ao duplo tratamento FCCP + H_2O_2 , mas não a antimicina A + H_2O_2 . Estas observações reforçam o papel de EROs produzidas endogenamente na toxicidade das células mutantes *ctpxI*.

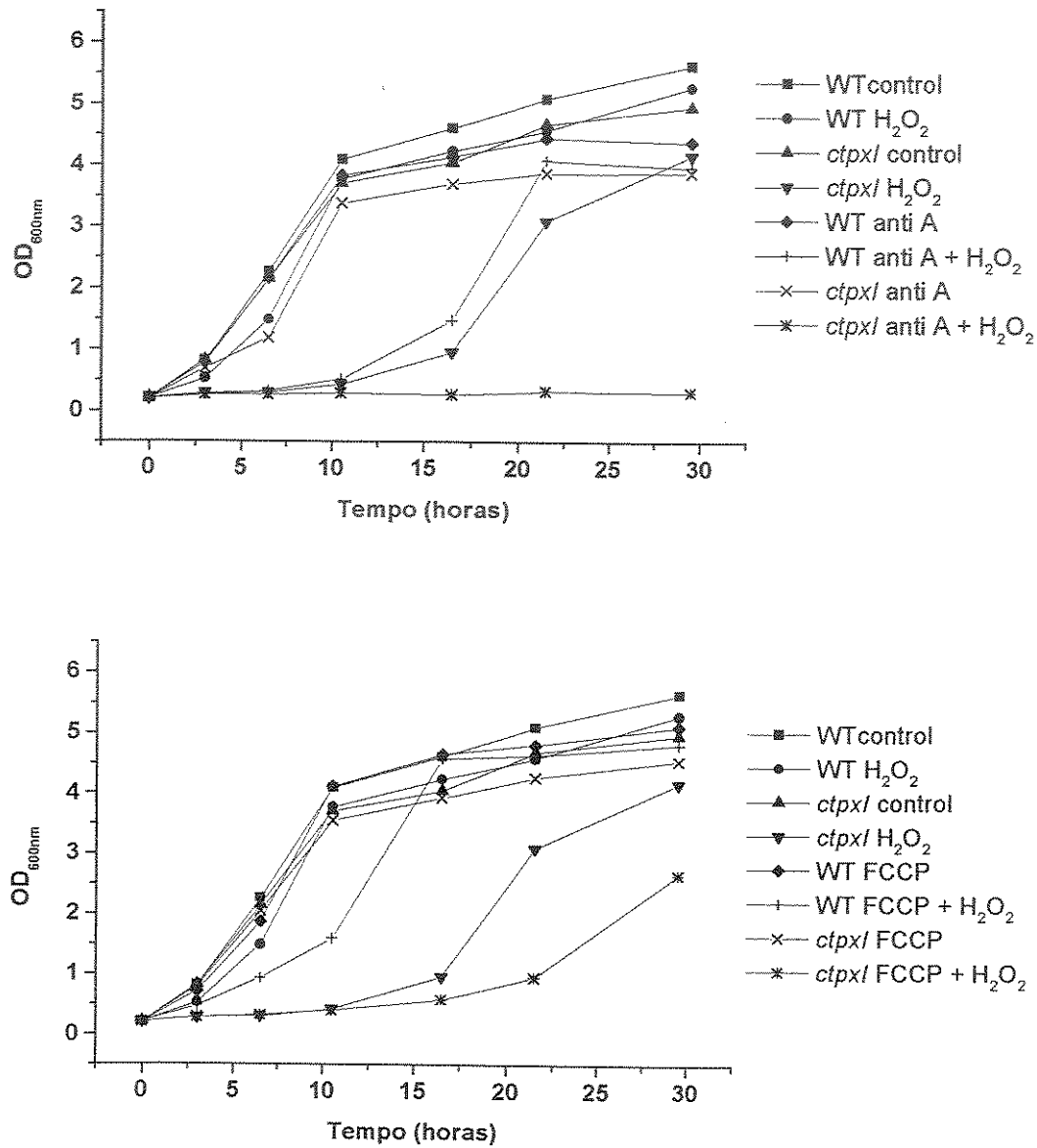


Figura 4. Curvas de crescimento de células de levedura. Células das linhagens JD7-7C (WT) e *ctpx*Δ foram expostas a H_2O_2 1,2 mM, antimicina A 0,1 μ g/ml, FCCP 1,0 μ g/ml ou a nenhum agente (controle) e o crescimento foi monitorado através de sucessivas leituras de densidades óticas a 600 nm em espectrofotômetro, iniciando em OD_{600nm} 0,2.

DISCUSSÃO GERAL

Células que se desenvolvem em ambientes aeróbicos enfrentam um desafio permanente, a manutenção da homeostase redox, ameaçada constantemente por EROs geradas como subprodutos de seu metabolismo normal. A complexidade dos efeitos provenientes da atuação de EROs é refletida no intrincado e sofisticado sistema de modulação e detoxificação destas espécies desenvolvido pelos seres vivos, que possibilitou sua adaptação não só para que pudessem se defender contra e reparar danos oxidativos, mas também para utilização de EROs como mensageiros celulares.

O sistema antioxidante de leveduras compreende diferentes enzimas, entre outros componentes. Além de cinco isoformas de peroxirredoxinas, incluindo cTPxI, a levedura possui outras enzimas que decompõem peróxidos, como catalases A e T, citocromo *c* peroxidase e glutathione peroxidase (Jamieson, 1998, Park e col, 2000). Ainda não estão totalmente estabelecidos os papéis destas enzimas que, embora possam parecer até mesmo redundantes, podem atuar em compartimentos celulares específicos ou em uma situação particular.

Na tentativa de obtenção de evidências a respeito do papel fisiológico de cTPxI em leveduras, resultados iniciais obtidos durante meu programa de doutorado demonstraram que *CTPXI* é altamente expresso durante todas as fases de crescimento das células, apresentando leve aumento em fases mais tardias (figura 1, resultados suplementares), resultados também obtidos por Park e colegas (2000), sugerindo possível papel “housekeeping” para cTPxI. Embora apresente elevados níveis de transcrição, *CTPXI* pode ainda ser induzido, como demonstrado através da exposição ao H₂O₂ (figura 1, capítulo 1).

De acordo com os padrões de regulação de outros genes antioxidantes de *S. cerevisiae*, *CTPX1* é levemente mais expresso e apresenta maior indução em resposta ao H_2O_2 quando as células se desenvolvem em meio de cultura contendo fonte de carbono não fermentável do que com glicose (figura 2, capítulo 3). De fato, muitos, senão todos os genes que codificam funções respiratórias, estão submetidos à repressão por glicose. Além disso, a maioria das enzimas antioxidantes, como catalase citossólica (*CTT1*), catalase peroxissomal (*CTA1*), citocromo c peroxidase (*CCP1*) e superóxido dismutase citoplasmática (*SOD1*) também são reprimidas por glicose (Jamieson, 1998). Estes resultados forneceram evidências de que cTPxI participa da resposta adaptativa ao estresse oxidativo em células de levedura. Estas evidências foram confirmadas por Godon e colaboradores (1998), que demonstraram através de eletroforese comparativa de proteínas em gel bidimensional que cTPx I é uma das proteínas cuja síntese é estimulada após tratamento com H_2O_2 em *S. cerevisiae*.

Em nossos estudos de viabilidade, observamos que células mutantes *ctpx1* apresentam sensibilidade ao H_2O_2 levemente aumentada em relação às selvagens (figura 2, capítulo 1) no entanto, outros autores demonstraram efeitos mais intensos (Park e col., 2000), o que poderia ser explicado pela utilização de diferentes linhagens ou por diferentes condições experimentais.

Como a mitocôndria é reconhecidamente a maior fonte de EROs em células que vivem em ambientes aeróbicos, também verificamos o efeito de perturbações na função desta organela, sendo demonstrado que células deficientes em cTPxI não apresentam alteração de sensibilidade em relação às selvagens nestas circunstâncias (figura 2, capítulo 1). Entretanto, quando a perda da função mitocondrial foi associada ao tratamento com H_2O_2 , a

sensibilidade das células mutantes *ctpxI* foi extremamente aumentada (figura 2, capítulo 1), revelando que a presença de cTPxI é essencial para a defesa de células com defeitos respiratórios a agentes oxidantes (Demasi e col., 2001). A inibição da cadeia de transporte de elétrons leva ao acúmulo de metabólitos reduzidos, como $Q^{\bullet-}$ associadas aos Complexos I e III que, através da oxidação não catalítica a partir de O_2 , aumenta a produção de EROs bem como os danos oxidativos às biomoléculas. Além disso, $O_2^{\bullet-}$ promove a oxidação de grupamentos [4Fe-4S] de proteínas como aconitase, causando sua inativação e liberação de Fe^{2+} que, por sua vez, leva à redução de H_2O_2 , gerando radicais $OH^{\bullet}$, o que provoca a exacerbação dos efeitos tóxicos. A inativação da aconitase causa o bloqueio do ciclo de Krebs, impedindo a síntese de aminoácidos de cadeia ramificada (Gardner e col., 1995). O aumento de $O_2^{\bullet-}$ decorrente das disfunções mitocondriais parece poder ser controlado por outras enzimas antioxidantes em células mutantes *ctpxI*. No entanto, quando estes efeitos deletérios são associados aos promovidos pela adição extracelular de H_2O_2 , as defesas antioxidantes de células deficientes em cTPxI provavelmente são ultrapassadas e estas células não são capazes de adaptar-se a condições oxidantes extremas, levando a danos irreversíveis e morte celular. Entretanto, quando cTPxI está presente, a proteção antioxidante é enormemente intensificada, permitindo a sobrevivência das células. Por outro lado, mitocôndria funcionalmente ativa mantém baixos níveis de produção de EROs e as células, mesmo na ausência de cTPxI, podem combater oxidantes exógenos (Demasi e col., 2001).

A exposição de células selvagens e mutantes em *CTPXI* a diferentes inibidores da função mitocondrial indicou que, independentemente de onde ou como a cadeia respiratória é afetada, produção endógena de EROs parece ser necessária para promover aumento de

sensibilidade de células deficientes em cTPx I ao H_2O_2 . Tratamentos de células com agentes que perturbam a função mitocondrial e intensificam a geração de EROs (antimicina A, mixotiazol, cianeto, oligomicina e deleção do DNA mitocondrial) levaram ao retardamento da taxa de crescimento (figura 2, capítulo 1 e figura 2, capítulo 2), bem como níveis aumentados de danos oxidativos (figura 4, capítulo 2) em células deficientes em cTPxI, quando comparadas às suas selvagens correspondentes.

Mixotiazol impede a formação de semiquinona no centro Q_o do Complexo III da cadeia respiratória, diminuindo a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a partir deste Complexo, especialmente quando antimicina A está presente (Gardner e col., 1995, Korshunov e col., 1997, Starkov e Fiskum, 2001, Raha e col., 2000, Young e col., 2002). No entanto, mixotiazol estimula a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a partir de flavinas do Complexo NADH desidrogenase (Complexo I) (Young e col., 2002), efeito nitidamente demonstrado por vários autores na ausência de antimicina A (Gardner e col., 1995, Korshunov e col., 1997, Starkov e Fiskum, 2001, Raha e col., 2000, Young e col., 2002).

Como *S. cerevisiae*, *T. brucei* também possui NADH desidrogenase alternativa, insensível à rotenona, que consiste em uma única cadeia polipeptídica contendo flavina como cofator, e que representa um caminho alternativo ao Complexo I na transferência de equivalentes reduzidos à cadeia respiratória (Fang e Beattie, 2002). Recentemente, foi demonstrado que esta NADH desidrogenase é a maior responsável pela geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em mitocôndrias de *T. brucei* (Fang e Beattie, 2002). Considerando as similaridades, poderíamos inferir que NADH desidrogenases alternativas de *S. cerevisiae* também poderiam ser potentes geradores de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em células tratadas com mixotiazol. Este efeito

explicaria a sensibilidade aumentada ao H_2O_2 em células deficientes em cTPxI expostas a este inibidor (figura 2, capítulo 2).

Demonstramos que mutantes *rho*⁰ de leveduras, com perda total do genoma mitocondrial, produzem níveis mais elevados de H_2O_2 do que as células selvagens *rho*⁺ correspondentes (figura 4, capítulo 1). Nestes mutantes, parte da cadeia de transporte de elétrons dependente do DNA nuclear ainda é funcional, mantendo níveis praticamente normais de flavoproteína-desidrogenases e ubiquinona (Bandy e Davison, 1990). No entanto, em função da ausência do DNA mitocondrial, que codifica as subunidades I, II e III da citocromo c oxidase, apo-citocromo b e as subunidades 6, 8 e 9 do componente F_0 da ATPase (Constanzo e col., 1990), passos finais desta cadeia estão bloqueados, favorecendo a formação de EROs.

Jiang e colaboradores (1999) também observaram maior geração de EROs em células ρ^0 de mamíferos, no entanto, estes autores não atribuíram o aumento de EROs à cadeia de transporte de elétrons, mas sim à atividade elevada de outras enzimas também envolvidas na produção destas espécies, tais como sistema citocromo P_{450} , xantina oxidase, lipoxigenases, ciclooxigenases, NADPH oxidase, óxido nítrico sintase. Já Miranda e colegas (1999) relacionaram os elevados níveis de EROs obtidos em células HeLa *rho*⁰ ao “vazamento” de elétrons a partir do Complexo II e da ubiquinona, codificados pelo DNA nuclear. De acordo com o efeito obtido em células tratadas com inibidores mitocondriais que intensificam a geração de EROs, mutantes *rho*⁰ $\Delta ctpxI$ apresentaram sensibilidade superior ao H_2O_2 em relação às células *rho*⁰ derivadas das selvagens (figura 2, capítulo 1).

Por outro lado, quando a disfunção mitocondrial foi acompanhada por redução dos níveis de geração de EROs (FCCP e crescimento anaeróbico), ausência de cTPxI não

acarretou alterações significativas do crescimento celular, nem mesmo do conteúdo de grupos sulfidrila após exposição ao H_2O_2 (figuras 2 e 4, capítulo 2). Portanto, cTPxI é essencial para a proteção das células quando existem fontes endógenas e exógenas de EROs agindo simultaneamente.

Análises de experimentos de “Northern blot” revelaram que os níveis de transcrição do gene *CTPXI* se mostraram intimamente relacionados às necessidades das células de defesa antioxidante. Altos níveis de expressão deste gene foram obtidos em resposta aos tratamentos antimicina A/ H_2O_2 , oligomicina/ H_2O_2 ou cianeto/ H_2O_2 (figura 3, capítulo 2), situações em que as células demonstraram extrema dependência de cTPxI para sua proteção contra o estresse oxidativo (figura 2, capítulo 2). Além disso, estes resultados mostraram evidências de que EROs ou outros metabólitos ainda não identificados gerados pelas mitocôndrias defeituosas poderiam produzir um sinal adicional que dispararia indução de *CTPXI* em níveis acima dos atingidos em resposta ao H_2O_2 isoladamente.

Células com deficiência respiratória apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo, no entanto são ainda capazes de desenvolver resposta adaptativa ao H_2O_2 (Grant e col., 1997). A razão desta sensibilidade aumentada não está estabelecida, porém Grant e colegas (1997) sugeriram que poderia ser decorrente de defeitos em processos que requerem energia, como detoxificação de EROs e reparo de moléculas oxidadas. Recentemente, análises de *microarray* não mostraram nenhuma alteração drástica no perfil de expressão de enzimas antioxidantes em células com disfunções mitocondriais (Epstein e col., 2001; Traven e col., 2001), o que poderia indicar que este não é o fator responsável pelo aumento de sensibilidade de células *rho*⁰ ou de células tratadas com antimicina A ao estresse oxidativo. No entanto, o efeito de indução de genes antioxidantes em resposta ao

H₂O₂ em células com deficiência respiratória não foi avaliado nestes experimentos, uma vez que não houve exposição destas células ao oxidante mencionado.

No caso de células de leveduras deficientes em respiração, alterações na concentração de ATP devido a perturbações mitocondriais podem retardar o crescimento quando células são expostas ao H₂O₂, mas parecem não ser drásticas o suficiente para impedir uma resposta antioxidante eficiente. Isto porque quando existe glicose no meio de cultura, a maior parte do ATP sintetizado (cerca de 67%) não se origina a partir da oxidação fosforilativa, mas sim da glicólise (Lagunas, 1986). Além disso, quando a produção de ATP foi inibida por oligomicina, células selvagens apresentaram capacidade de proteger-se eficientemente contra estresse oxidativo (figura 2, capítulo 2). Ainda deve ser ressaltado que células tratadas com FCCP apresentam uma carência energética maior do que as expostas à antimicina A, já que FCCP, além de impedir a síntese de ATP mitocondrial como antimicina A, ainda promove hidrólise do ATP citoplasmático mais acentuada do que antimicina A (Nicholls e Budd, 2000). No entanto, células mutantes em *CTPX1* tratadas com FCCP não apresentaram alterações de sensibilidade ao H₂O₂ em relação às selvagens nas mesmas condições (figura 2, capítulo 2), nem mesmo níveis de danos oxidativos superiores (figura 4, capítulo 2). Já o tratamento com antimicina A levou a efeitos opostos.

Observando as curvas de crescimento das células expostas aos conjuntos de tratamentos (antimicina A e H₂O₂) e (FCCP e H₂O₂), poderíamos sugerir que a queda na produção de energia decorrente da perda da função mitocondrial poderia acarretar um intervalo para que as células pudessem se adaptar ao H₂O₂ ou mesmo para que pudessem decompor este oxidante e, então, o crescimento fosse retomado (figura 4, capítulo 3). Godon e colaboradores (1998) demonstraram que o metabolismo de carboidratos é

redirecionado após exposição ao H_2O_2 , com inibição da glicólise e ativação da via das pentoses fosfato para a regeneração de NADPH, cofator de glutathione redutase e de tiorredoxina redutase. Estas alterações do metabolismo vão de encontro às necessidades das células, que inibem sua proliferação em função do aumento de sua capacidade de defesa antioxidante. Este período de retardo de crescimento foi, tanto para células mutantes *ctpXI* como para as selvagens, maior quando antimicina A era o agente da disfunção mitocondrial, sendo que as mutantes *ctpXI* foram capazes de responder ao duplo tratamento FCCP + H_2O_2 , mas não a antimicina A + H_2O_2 (figura 4, capítulo 3). Estas observações reforçam o papel de EROs produzidas endogenamente na toxicidade das células e ainda vão totalmente de encontro aos resultados obtidos nas análises de grupos sulfidríla realizadas em células deficientes em cTPxI e selvagens correspondentes (figura 4, capítulo 2).

Entre as enzimas antioxidantes estudadas, somente cTPxI pode assegurar proteção às células com deficiência respiratória ao estresse oxidativo (figura 5, capítulo 2). Embora cTPxII e mTPx possam ser mais induzidas em resposta ao H_2O_2 do que cTPxI, os níveis atingidos pelas mesmas parecem ser muito inferiores aos de cTPxI (Park e col., 2000). Estas observações poderiam explicar as razões pelas quais apenas cTPxI apresenta capacidade de proteger as células e outras peroxirredoxinas não podem substituí-la neste papel. Poderíamos ainda sugerir o envolvimento do efeito repressor da glicose. cTPxII (Hong e col., 2002) e mTPx (Monteiro e col., 2002) estão sob a regulação de Msn2/Msn4, fatores reprimidos pela via Ras/PKA na presença de glicose. Ainda não está descrita a influência destes fatores na transcrição de *CTPXI*, que poderia sofrer um efeito repressor menor do que as outras peroxidases testadas, tornando-se a principal enzima para a detoxificação de EROs nestas condições.

Mecanismos regulatórios distintos entre cTPxI e outras enzimas antioxidantes também foram sugeridos por Godon e colaboradores (1998) que dividiram as proteínas em três classes, de acordo com os perfis dose-resposta ao H_2O_2 apresentados. cTPxI, assim como tiorredoxina redutase, tiorredoxinas 1 e 2 e SOD citoplasmática, apresentaram o perfil de máxima indução a baixas doses de H_2O_2 e manutenção desta indução com doses crescentes (até 0,8 mM). Embora citocromo *c* peroxidase e SOD mitocondrial também tenham apresentado máxima indução a baixas doses, seus níveis demonstraram quedas sucessivas com doses crescentes, sendo classificadas em outro grupo. Dentro do terceiro e último grupo, demonstrando perfil de resposta ao H_2O_2 diferente dos dois anteriores, catalase citoplasmática e diversas proteínas “heat shock” apresentaram níveis de indução baixos nas concentrações iniciais, porém crescentes de acordo com os aumentos das doses deste oxidante. Estes resultados reforçam a importância de cTPxI na defesa das células contra o estresse oxidativo, sendo altamente induzida em resposta a diversos graus de intensidade deste estresse.

Ainda permanece a possibilidade do envolvimento de funções mitocondriais relacionadas ao metabolismo de compostos com propriedades sinalizadoras, como heme e Ca^{2+} , neste fenômeno. Mais investigações são necessárias para esclarecer o papel de cTPxI nesses processos que envolvem a mitocôndria. Cabe ressaltar que nosso grupo mostrou que cTPxI, em conjunto com catalase A (peroxissomal) e catalase T (citoplasmática) protege mitocôndrias contra permeabilização induzida por Ca^{2+} (Kowaltowski e col., 2000). Além disso, mostramos que cTPxII e mTPxI, mas não cTPxIII, também são importantes na proteção de mitocôndrias de levedura contra permeabilização induzida por Ca^{2+} (dados de Monteiro e col., ainda não publicados). Por outro lado, a proteção de leveduras com

mitocôndrias não funcionais contra estresse oxidativo parece ser bastante dependente de cTPxI e não de outras peroxirredoxinas. Analisando esses dados em conjunto, parece que esses dois fenômenos (permeabilização da membrana interna por Ca^{2+} e proteção antioxidante em células com disfunção respiratória) não estão totalmente relacionados entre si.

Muitas das respostas mediadas por EROs protegem as células contra o estresse oxidativo e restabelecem a homeostase redox (Dröge, 2002). Moléculas contendo tióis, como tioredoxina e glutathiona, influenciam enormemente a regulação desta homeostase. O sistema tioredoxina compreende tioredoxina e tioredoxina redutase. A expressão dos genes correspondentes é induzida em resposta ao H_2O_2 , levando ao aumento da defesa antioxidante (Kuge e Jones, 1994, Morgan e col., 1997, Godon e col., 1998). Ross e colaboradores (2000) demonstraram que a indução de *TRX2* (tioredoxina) e de *TRR1* (tioredoxina redutase) após tratamento com H_2O_2 é mediada por cTPxI numa via dependente de Yap1 e Skn7. Eles sugeriram que esta regulação poderia envolver a influência direta de cTPxI no estado redox ou de fosforilação de Yap1 e/ou Skn7 ou ainda no estado redox de uma possível proteína de interação na via da tioredoxina. A ausência de cTPxI implicaria num colapso do sistema tioredoxina, tornando as células muito mais susceptíveis aos danos oxidativos. Portanto, em adição às suas propriedades antioxidantes, cTPxI pode ainda apresentar papel regulatório sobre processos celulares (revisado por Hofmann e col., 2002).

Juntos, aumento da produção de EROs pela mitocôndria disfuncional, adição externa de H_2O_2 , ausência de cTPxI e repressão de genes antioxidantes alternativos, não podem gerar outra “escolha” para as células senão morrer.

Danos oxidativos ao DNA mitocondrial podem causar mutações, levando ao bloqueio da cadeia de transporte de elétrons, aumento da produção de EROs e deficiência respiratória. Estas alterações são freqüentemente associadas ao processo de envelhecimento, doenças neurodegenerativas e câncer em células humanas e podem estar relacionadas à sua maior sensibilidade ao estresse oxidativo.

Mutações no DNAm_t foram identificadas em câncer de bexiga, mama, cólon, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, estômago e nas patologias hematológicas malignas, leucemia e linfoma (Penta e col., 2001 e referências citadas).

Como descrito anteriormente, mutações no DNAm_t levam freqüentemente à perda de função de proteínas transportadoras de elétrons na cadeia respiratória e ao estabelecimento do ciclo de aumento na produção de EROs e posteriores mutações, perpetuando e amplificando uma condição de estresse oxidativo. Em acordo, células tumorais estão sob estresse oxidativo constante e geram níveis mais elevados de EROs do que as normais correspondentes (Penta e col., 2001 e referências citadas). Células tumorais apresentam maior capacidade de realizar glicólise aeróbica, consistente com o modelo de desequilíbrio no transporte de elétrons mitocondrial, produção aumentada de EROs e diminuição da geração de ATP. Em adição ao DNAm_t, o DNA nuclear também pode constituir um alvo de EROs derivadas a partir da mitocôndria, que poderiam ativar oncogenes ou ainda desativar genes supressores de tumor, desencadeando o processo de carcinogênese.

Além da influência na produção de EROs, o genoma mitocondrial pode ainda participar do processo de desenvolvimento de tumores a partir da transferência e integração de fragmentos de DNAm_t ao genoma nuclear, mecanismo sugerido para a ativação de

oncogenes (Bandy e Davison, 1990, Penta e col., 2001).

Trabalhos publicados recentemente demonstraram que peroxirredoxinas apresentam níveis de expressão aumentados em diferentes tipos de células tumorais e que participam de sua defesa antioxidante (Noh e col, 2001, Shen and Natan, 2002, Kinnula e col., 2002). Portanto, peroxirredoxinas poderiam ser consideradas alvos para o desenvolvimento de novas terapias, sendo que a associação de um inibidor de cTPxI a um agente gerador de EROs poderia representar uma abordagem promissora para matar seletivamente células tumorais. Uma abordagem semelhante realizada por Huang e colaboradores (2000) demonstrou que a inibição de SOD por um derivado de estrógeno, 2-metoxiestradiol, provocou a morte de células leucêmicas humanas, mas não de linfócitos normais.

Mutações no DNA mitocondrial também têm sido implicadas em uma grande variedade de doenças neurodegenerativas. Estas mutações, herdadas ou adquiridas, causam perda da capacidade de transporte de elétrons pela cadeia respiratória e, conseqüentemente, diminuição da produção de ATP, aumento na geração de EROs e perda da regulação de cálcio. Estas disfunções, então, levam a posteriores danos em lipídeos, proteínas e DNA mitocondriais e ainda a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, evento ligado à morte celular. Embora respostas protetoras nucleares, como enzimas antioxidantes e Bcl-2, possam ser induzidas, o aumento cumulativo de danos oxidativos pode lesar neurônios por períodos prolongados de tempo, levando à morte celular neuronal (Cassarino e Bennett Jr., 1999, Wallace, 1999). Entre as doenças neurodegenerativas associadas a mutações no DNAm_t estão: síndrome de Kearns-Sayre (KSS), neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON), miopatia mitocondrial com fibras vermelhas ásperas

(MERRF), MELAS, síndrome de Leigh, mal de Parkinson, Huntington, Alzheimer (Schapira e Cooper, 1992, Wallace, 1999)

O processo de envelhecimento causa múltiplas mudanças prejudiciais nos seres vivos em todos os níveis de organização biológica, limitando sua capacidade funcional, diminuindo a homeostase e aumentando a probabilidade de desenvolvimento de doenças degenerativas e, finalmente, morte.

A teoria dos radicais livres de envelhecimento foi introduzida por Denham Harman em 1956 e propõe que o envelhecimento resulta dos danos aleatórios e cumulativos às biomoléculas causados pelos radicais livres, produzidos endógeno e constantemente (Hallywell e Gutteridge, 1989, Wickens, 2001). Como EROs são principalmente geradas na mitocôndria, a partir da cadeia respiratória, a teoria mitocondrial de envelhecimento, bem como a hipótese “rate-of-living”, em que quanto maior a taxa metabólica (maior a produção de EROs), menor o tempo de vida, podem ser consideradas sinônimos da teoria de Harman (Finkel e Holbrook, 2000).

Várias evidências experimentais dão suporte à teoria de Harman, tais como: (1) elevada expectativa de vida está relacionada a taxa metabólica reduzida e baixo nível de produção de EROs, (2) danos oxidativos a proteínas, lipídeos e DNA, apresentam níveis aumentados em indivíduos com idade avançada, (3) expressão aumentada de enzimas antioxidantes em organismos modelo podem levar a aumentos significativos na longevidade, (4) indivíduos com elevada expectativa de vida apresentam maior resistência a diferentes tipos de estresse, incluindo oxidativo e (5) diminuição do consumo calórico leva à redução da produção de EROs e aumento da expectativa de vida (Salvioli e col., 2001, Wickens, 2001, Barja, 2002, Tissenbaum e Guarente, 2002).

A mitocôndria, maior “vilã” na produção de EROs na célula, é também quem mais sofre as consequências, passando por profundas alterações durante o envelhecimento, tais como: acúmulo de grandes deleções e mutações pontuais em seu DNA, diminuição da atividade das enzimas da cadeia de transporte de elétrons com conseqüente aumento da geração de EROs e amplificação dos danos oxidativos, redução do potencial de membrana, diminuição da produção de ATP (Salvioli e col., 2001, Barja, 2002). A mitocôndria poderia ainda participar do controle do processo de envelhecimento através de sua influência na expressão de genes nucleares, mediada por concentrações alteradas de produtos dela derivados, como ATP, EROs ou algum outro fator não estabelecido. Consistente com esta possibilidade, células de ratos jovens sofrem degeneração acelerada e senescência (inibição irreversível da proliferação associada à idade) quando submetidas à microinjeção com mitocôndrias extraídas de ratos velhos (Salvioli e col., 2001 e referências citadas).

A relação entre prolongamento do tempo de vida e aumento da resistência ao estresse oxidativo tem se mostrado bastante estreita, em todos os modelos experimentais utilizados, validando a teoria dos radicais livres de envelhecimento. Alguns exemplos são descritos a seguir. Em leveduras, deleções de qualquer *SOD*, citoplasmática ou mitocondrial, levam à redução do tempo de sobrevivência de células em fase estacionária (Longo e col., 1996). Zandycke e col (2002) demonstraram em *S. cerevisiae* que a deleção de *CTT1*, que codifica catalase citoplasmática, diminui a longevidade dos organismos, bem como aumenta sua sensibilidade ao H_2O_2 . Em *C. elegans*, a deleção de *mev-1*, que codifica uma subunidade da enzima succinato desidrogenase (Complexo II) da cadeia respiratória, promove redução do tempo de vida (Melov e col., 2000), provavelmente devido ao aumento dos níveis de produção de $O_2^{\bullet-}$ (Senoo-Matsuda e col., 2001). Quando tratados com compostos sintéticos

miméticos de SOD/catalase, estes mutantes *mev-1* recuperaram sua expectativa de vida (Melov e col., 2000). Ainda em *C. elegans*, a deleção de *daf-2*, que confere maior longevidade, leva a aumento da expressão de *SOD3* (Honda e Honda, 1999). Em *Drosophila*, mutação no gene *methuselah* eleva a resistência a paraquat, um gerador de EROs, e prolonga o tempo de vida das moscas (Lin e col., 1998). Em camundongos, deleção do gene que codifica p66^{shc} estende a longevidade e os animais apresentam inibição da apoptose induzida por estresse oxidativo (Migliaccio e col., 1999).

Evidências obtidas em nosso trabalho sugerem que cTPxI poderia influenciar amplamente a longevidade de células. Em contraste à terapia contra o câncer, em que um inibidor desta enzima seria sugerido, em relação ao envelhecimento poderíamos propor que a superexpressão ou a geração de um mimético de cTPxI poderiam atenuar os danos oxidativos relacionados à idade avançada e até mesmo prolongar o tempo de vida do organismo.

Portanto, nossos resultados indicam que peroxirredoxinas, especialmente as do tipo 2-cis que apresentam elevada similaridade a cTPxI de levedura, poderiam exercer papel decisivo no destino, sobrevivência ou morte, de células afetadas por desordens humanas de origem mitocondrial. Estamos realmente interessados na verificação desta possibilidade em células de mamíferos, possível alvo de nossas investigações futuras.

ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

ATP: adenosina trifosfato

cTPxI: tioredoxina peroxidase citoplasmática I

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNP: 2,4-dinitrofenol

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FCCP: *p*-trifluorometoxicarbonilcianeto de fenilhidrazona

FMN: flavina mononucleotídeo

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO•: radical hidroxila

mRNA: RNA mensageiro

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

O₂^{-•}: radical ânion superóxido

prx: peroxirredoxina

Q^{-•}: (ubi)semiquinona

Q: ubiquinona

QH₂: (ubi)quinol

RNA: ácido ribonucleico

SOD: superóxido dismutase

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS RELACIONADAS À TESE

Demasi, AP, Pereira, GA e Netto, LE "Investigation of the regulation of the Thiol Specific Antioxidant gene in yeast" XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 23 a 26 de maio de 1998, Caxambu-MG, Brasil.

Demasi AP, Pereira, GA e Netto, LE "Regulation of the thioredoxin peroxidase gene in yeast" IX Biennial Meeting International Society for Free Radical Research", 7 a 11 de setembro de 1998, São Paulo-SP, Brasil.

Demasi, AP, Pereira, GA e Netto, LE "Mitochondrial respiratory chain disruption increases the expression of thioredoxin peroxidase gene in yeast" XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 22 a 25 de maio de 1999, Caxambu-MG, Brasil.

Demasi, AP, Oresco, C, Pereira, GA e Netto, LE "Regulation of the thioredoxin peroxidase gene in yeast" XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 23 a 26 de maio de 2000, Caxambu-MG, Brasil.

Demasi, AP, Pereira, GA e Netto, LE "Thioredoxin peroxidase prevents mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to hydrogen peroxide" XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 19 a 22 de maio de 2001, Caxambu-MG, Brasil.

Demasi, AP, Pereira, GA e Netto, LE "Cytosolic thioredoxin peroxidase is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria" "XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International", 16 a 20 de julho de 2002, Paris, França.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, R.G. e Tresini, M. (2000) "Oxidative Stress and gene regulation" *Free Rad. Biol. Med.*, **28**, 463-499.
- Bandy, B. e Davison, A.J. (1990) "Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: imolications for carcinogenesis and aging?" *Free Radic. Biol. Med.*, **8**, 523-539.
- Barja, G. (2002) "Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction" *Ageing Research Reviews*, **1**, 397-411.
- Berlett, B.S. e Stadtman, E.R. (1997) "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress" *J. Biol. Chem.*, **272**, 20313-20316.
- Boveris, A., Chance, B. (1973) "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide" *Biochem. J.*, **134**, 707-716.
- Brand, M.D. (2000) "Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing" *Experimental Gerontology*, **35**, 811-820.
- Cadenas, E. e Davies, K.J. (2000) "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging" *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 222-230.
- Cai, J. e Jones, D.P. (1998) "Superoxide in apoptosis" *J. Biol. Chem.*, **273**, 11401-11404.
- Cai, J., Wallace, D.C., Zhivotovsky, B e Jones, D.P. (2000) "Separation of cytochrome c-dependent caspase activation from thiol-disulfide redox changes in cells lacking mitochondrial DNA" *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 334-342.
- Cassarino, D.S. e Bennett Jr., J.P. (1999) "An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses and cell death in neurodegeneration" *Brain Res. Rev.*, **29**, 1-25.
- Chae, H.Z., Chung, S.J. e Rhee, S.G. (1994) "Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast" *J. Biol. Chem.*, **269**, 27670-27678.
- Chae, H.Z., Kim, I. H., Kim, K. e Rhee, S.G. (1993), "Cloning, sequencing, and Mutation of Thiol Specific Antioxidant gene of TSA" *J. Biol. Chem.*, **268**, 16815-16821.
- Chae, H.Z., Uhm. T.B. e Rhee, S.G. (1994) "Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 7022-7026.
- Costa, V. e Moradas-Ferreira, P. (2001) "Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases" *Molecular Aspects Medicine*, **22**, 217-246.
- Costanzo, M.C., Fox, T.D. (1990) "Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*" *Annu. Rev. Genet.*, **24**, 91-113.
- Demasi, A.P.D., Pereira, G.A.G. e Netto, L.E.S. (2001) "Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essencial for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria" *FEBS letters*, **509**, 430-434.
- Dröge, W. (2002) "Free radicals in the physiological control of cell function" *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95.
- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale 4th, Dave, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R. and Butow, R.A. (2001) "Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction" *Mol. Biol. Cell*, **12**, 297-308.

- Fang, J. and Beattie, D.S. (2002) "Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria" *Mol. Biochem. Parasitology*, **123**, 135-142.
- Ferguson, L.R. e Borstel, R.C. (1992) "Induction of the cytoplasmic petite mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae*" *Mutation. Research*, **265**, 103-148.
- Finkel, T. e Holbrook, N.J. (2000) "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing" *Nature*, **408**, 239-247.
- Fridovich, I. (1999) "Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?" *Annals New York Acad. Sci.*, **48**, 157-161.
- Gardner, P.R., Raineri, I., Epstein, L.B. e White, C. (1995) "Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells" *J. Biol. Chem.*, **270**, 13399-13405.
- Gilchrest, B.A. e Bohr, V. (1997) "Aging processes, DNA damage, and repair" *FASEB J.*, **11**, 322-330.
- Girotti, A.W. (1998) "Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems" *J. Lipid Res.*, **39**, 1529-1542.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B. e Labarre, J. (1998) "The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.*, **273**, 22480-22489.
- Grant, C.M., MacIver, F.H. e Dawes, I.W. (1997) "Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *FEBS Letters*, **410**, 219-222.
- Greenhalf, W., Stephan, C., Chaudhuri, B. (1996) "Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and motality in *Saccharomyces cerevisiae*" *FEBS letters*, **380**, 160-175.
- Gross, A., Pilcher, K., Blachly-Dyson, E., Basso, E., Jockel, J., Bassik, M.C., Korsmeyer, S.J. e Forte, M. (2000) "Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X_L" *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3125-3136.
- Halachmi, D e Eilam, Y. (1993) "Calcium homeostasis in yeast cells exposed to high concentrations of calcium. Roles of vacuolar H⁺-ATPase and cellular ATP" *FEBS*, **316**, 73-78.
- Hallywell, B e Gutteridge, J.M.C. (1989) em *Free Radicals in biology and Medicine* (Hallywell, B e Gutteridge, J.M.C., eds.), Second edition, Claredon Press, Oxford.
- Hengartner, M.O. (2000) "The biochemistry of apoptosis" *Nature*, **407**, 770-776.
- Hofmann, B., Hecht H. e Flohé, L. (2002) "Peroxiredoxins" *Biol. Chem.*, **383**, 347-364.
- Honda, Y. e Honda, S. (1999) "The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*" *FASEB J.*, **13**, 1385-1393.
- Hong, S., Cha, M., Choi, Y., Kim, W. and Kim, I. (2002) "Msn2p/Msn4p as a key transcriptional activator on yeast cytoplasmic thiol peroxidase II" *J. Biol. Chem.*, **277**, 12109-12117.
- Huang, P.H., Feng, L., Oldham, E.A., Keating, M.J. e Plunkett, W. (2000) "Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells" *Nature*, **407**, 390-395.
- Jamieson, D.J., (1998) "Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast*, **14**, 1511-1527

- 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.
- Jiang, S., Cai, J., Wallace, D.C. e Jones, D.P. (1999) "Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA" *J. Biol. Chem.*, **274**, 29905-29911.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W. e Wood, P.M. (2001) "Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components" *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 179-195.
- Josse, C., Legrand-Poels, S., Piret, B., Sluse, F. and Piette, J. (1998) "Impairment of the mitochondrial electron chain transport prevents NF- κ B activation by hydrogen peroxide" *Free Rad. Biol. Med.*, **25**, 104-112.
- Kim, I.H., Kim, K. e Rhee, S.G. (1989) "Induction of antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O₂, Fe³⁺, or 2-mercaptoethanol" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 6018-6022.
- Kim, K., Kim, I.H., Lee, Ki-Y., Rhee, S.G. e Stadtman, E.R. (1988) "The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system" *J. Biol. Chem.*, **263**, 4704-4711.
- Kinnula, V.L., Lehtonen, S., Sormunen, R., Kaarteenaho-Wiik, R., Kang, S.W., Rhee, S.G. and Soini, Y. (2002) "Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V and VI in malignant mesothelioma" *J. Pathol.*, **196**, 316-323.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. and Starkov A.A. (1997) "High protonic potential actuates a mechanism of reactive oxygen species in mitochondria" *FEBS Letters*, **416**, 15-18.
- Kowaltowski, A.J., Netto, L.E.S. e Vercesi, A.E. (1998) "The Thiol-specific Antioxidant Enzyme prevents mitochondrial permeability transition" *J. Biol. Chem.*, **273**, 12766-12769.
- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., Rhee, S.G. e Netto, L.E. (2000) "Catalases and thioredoxin peroxidase protect *Saccharomyces cerevisiae* against Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization and cell death" *FEBS Letters*, **473**, 177-182.
- Kuge S. e Jones, N. (1994) "YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides" *The EMBO Journal*, **13**, 655-664.
- Lagunas, R. (1986) "Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast*, **2**, 221-228.
- Lee, S.P., Hwang, Y.S., Kim, Y.J., Kwon, K., Kim, H.J., Kim, K. e Chae, H.Z. (2001) "Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity" *J. Biol. Chem.*, **276**, 29826-29832.
- Li, K., Li, Y., Shelto, J.M., Richardson, J.A., Spencer, E., Chen, Z.J., Wang, X. e Williams R.S. (2000) "Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis" *Cell*, **101**, 389-399.
- Lin, Y.J., Seroude, L. e Benzer, S. (1998) "Extended life span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*" *Science*, **282**, 943-946.
- Longo, V.D., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Valentine, J.S. e Gralla, E.B. (1997) "Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast" *J. Cell Biol.*, **137**, 1581-1588.

- Longo, V.D., Gralla, E.B. e Valentine, J.S. (1996) "Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.*, **271**, 12275-12280.
- Madeo, F., Fröhlich, E. e Fröhlich, K.U. (1997) "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis" *J. Cell Biol.*, **139**, 729-734.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Stephan, J.S., Wolf, D.H. e Fröhlich, K. (1999) "Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast" *J. Cell Biol.*, **145**, 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächet, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wasselborg, S. e Fröhlich, K. (2002) "A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast" *Mol. Cell*, **9**, 911-917.
- Manon, S., Chaudhuri, B. e Guérin, M. (1997) "Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of this effects by coexpression of Bcl-x_L" *FEBS letters*, **415**, 29-32.
- Martindale, J.L. e Holbrook, N.J. (2002) "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival" *J. Cell. Physiol.*, **192**, 1-15.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R. e Lithgow, G.J. (2000) "Extension of life-span with superoxide/catalase mimetics" *Science*, **289**, 1567-1569.
- Migliaccio, E. *et al.* (1999) "The p66^{shc} adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals" *Nature*, **402**, 309-313.
- Miranda, S., Foncea, R., Guerrero, J. e Leighton, F. (1999) "Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 44-49.
- Monteiro, G., Pereira, G.A and 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 Radical Biol. Med.*, **32**, 278-288.
- 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**(5), 1035-1044.
- Muhlenhoff, U., Ricchardt, N., Gerber, J. e 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.
- Muller, F., Crofts, A.R. and Kramer, D.M. (2002) "Multiple Q-cycle bypass reaction at the Q_o site of the cytochrome *bcl* complex" *Biochemistry*, **41**, 7866-7874.
- Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J. e Finkel, T. (2000) "A role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism" *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7311-7318.
- Netto, L. E.S. e Stadtman, E.R. (1996) "The iron catalyzed oxidation of dithiothritol, a disulfide reducing agent, is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of free radical chains of reactions." *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 233-242.
- Netto, L. E.S., Chae, H.Z., Kang, S.W., Rhee, S.G. e Stadtman, E.R. (1996) "Removal of hydrogen peroxide is involved with the antioxidant properties of Thiol Specific Antioxidant (TSA). TSA possesses thiol peroxidase activity" *J. Biol. Chem.*, **271**, 15315-15321.
- Nicholls, D.G. and Budd, S.L. (2000) "Mitochondria and neuronal survival" *Physiological Reviews*, **80**, 315-360.

- Noh, D.Y., Ahn, S.J., Lee, R.A., Kim, S.W., Park, I.A and Chae, H.Z. (2001) "Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer" *Anticancer Res.*, **21**, 2085-2090.
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W. e Kim, I.H. (2000) "Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.*, **275**, 5723-5732.
- Pedersen, L.P. (1999) "Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview" *J. Bioenergetics Biomembranes*, **31**, 291-304.
- Pedrajas, J. R.; Miranda-Vizuet, 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.*, **26**, 16296-16301.
- Penta, J.S., Johnson, F.M., Wachsmann, J.T. and Copeland, W.C. (2001) "Mitochondrial DNA in human malignancy" *Mutation Research*, **488**, 119-133.
- Poyton, R.O. e McEwen, J.E. (1996) "Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes" *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 563-607.
- Raha, S., McEachern, G.E., Myint, A and Robinson, B.H. (2000) "Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase" *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 170-180.
- Rhee, S.G. e Chae, H.Z. (1994) "Thioredoxin peroxidase and peroxiredoxin family" *Mol. Cells*, **4**, 137-142.
- Ross, S.J., Findlay, V.J., Malakasi, P. e Morgan, B.A. (2000) "Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast" *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2631-2642.
- Roucous, X., Prescott, M., Devenish, R.J. e Nagley, P. (2000) "A cytochrome c-GFP fusion is not released from the mitochondria into the cytoplasm upon expression of Bax in yeast cells" *FEBS Letters*, **471**, 236-239.
- Salvioli, S., Bonafè, M., Capri, M., Monti, D. e Franceschi, C. (2001) "Mitochondria, aging and longevity- a new perspective" *FEBS Letters*, **492**, 9-13.
- Schapira, A.H.V. e Cooper, J.M. (1992) "Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing" *Mutation Research*, **275**, 133-143.
- Sedlak, J. and Lindsay, R.H. (1968) "Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent" *Anal. Biochem.*, **25**, 192-205.
- Senoo-Matsuda, N., Yasuda, K., Tsuda, M., Ohkubo, T., Yoshimura, S., Nakasawa, H., Hartman, P.S. e Ishi, N. (2001) "A defect in cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*" *J. Biol. Chem.*, **276**, 41553-41558.
- Seo, B.B., Kitajima-Ihara, T., Chan, E.K., Scheffler, I.E., Matsuno-Yagi, A. e Yagi, T. (1998) "Molecular remedy of Complex I defects: rotenone insensitive NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of Complex I-deficient mammalian cells" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9167-9171.
- Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K. e Paules, R.S. (2000) "Oxidative stress and cell cycle checkpoint function" *Free Rad. Biol. Med.*, **28**, 1387-1404.
- Shen, C. and Nathan, C. (2002) "Nonredundant antioxidant defense by multiple two cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells" *Mol. Med.*, **8**, 95-102.

- Singer, M.S., Kahana, A., Wolf, A.J., Meisinger, L.L., Peterson, S.E., Goggin, C., Mahowald, M. e Gottschling, D.E. (1998) "Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*" *Genetics*, **150**, 613-632.
- Starkov, A.A. e Fiskum, G. (2001) "Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain" *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **281**, 645-650.
- Tissenbaum, H.A. e Guarente, L. (2002) "Model organisms as a guide to mammalian aging" *Developmental Cell*, **1**, 9-19.
- Traven, A., Wong, J.M., Xu, D., Sopta, M. and Ingles, C.J. (2001) "Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial DNA mutant" *J. Biol. Chem.*, **276**, 4020-4027.
- Turrens, J.F. (1997) "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain" *Biosci. Repots*, **17**, 3-7.
- Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J.P., Chartier, Y. e Meyer Y. (1999) "In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family" *J. Biol. Chem.*, **274**, 19714-19722.
- Vries, S. e Marres, C.A.M. (1987) "The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism" *Biochem. Bioph. Acta*, **895**, 205-239.
- Wallace, D.C. (1999) "Mitochondrial diseases in man and mouse" *Science*, **283**, 1482-1488.
- Wickens, A.P. (2001) "Ageing and the free radical theory" *Respiration Physiology*, **128**, 379-391.
- Wong, C., Zhou, Y., Ng, R.W., Kung, H. e Jin, D. (2002) "Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress" *J. Biol. Chem.*, **277**, 5385-5394.
- Young, T.A., Cunningham, C.C. and Bailey, S.M. (2002) "Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol" *Arch. Biochem. Biophys.*, **405**, 65-72.
- Zandycke, S.M., Sohler, P.J. e Smart, K.A. (2002) "The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*" *Mechanisms of Ageing and Development*, **123**, 365-373.
- Zhang, L. and Hach, A (1999) "Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator" *Cell Mol. Life Sci.*, **56**, 415-426.
- Zhang, P., Liu, B, Kang, S.W., Seo, M.S., Rhee,S.G. e Obeid, L.M. (1997) "Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2" *J. Biol. Chem.*, **272**, 30615-30618.