

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jana Mikešová

Oxidativní a jiné poškození proteinů ve stárnutí kvasinkových buněk a jeho fyziologické efekty (obrana a signalizace)
Proteins damaged by oxidative stress, their role in physiology and ageing of yeast cells

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Zdena Pálková, CSc.

Praha, 2012

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Zdeně Pálkové, CSc. za ochotu, cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Michalovi Čápovi za trpělivost a vstřícnost při vedení v laboratoři a v neposlední řadě rodičům, kteří mi byli velikou oporou během celého studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 09.05.2012

Podpis

Obsah

1	Abstrakt.....	3
2	Seznam užitých zkratk 4	4
3	Úvod.....	6
4	Fyziologicky významné reaktivní formy- ROS, RNS, RSS.....	6
4.1	ROS.....	6
4.1.1	Zdroje ROS.....	7
4.1.2	Vliv ROS na proteiny.....	8
4.2	RNS,RSS.....	8
4.2.1	RNS.....	8
4.2.2	RSS.....	9
5	ROS ve stárnutí <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
6	Ochranné mechanismy proti ROS.....	10
6.1	Neenzymatické ochranné mechanismy.....	10
6.1.1	Glutathion.....	10
6.1.2	Glutaredoxinový systém.....	11
6.1.3	Thioredoxinový systém.....	12
6.1.4	Metabolity a ionty s antioxidační funkcí.....	13
6.2	Enzymatické ochranné mechanismy.....	13
6.2.1	Superoxid dismutáza.....	14
6.2.2	Kataláza.....	15
6.2.3	Peroxidázy.....	15
7	Redoxní signalizace.....	17
7.1	Signalizační role ROS.....	17
7.2	ROS jako druzí poslové.....	18
7.2.1	Regulace transkripce oxidací Yap1p.....	20
7.2.2	Regulace ubiquitin proteasomové dráhy.....	21
7.2.3	Regulace glykolytických enzymů.....	23
7.2.4	Regulace Hog1p SAPK.....	24
8	Závěr.....	26
9	Seznam užití literatury.....	27

1 Abstrakt

Reaktivní kyslíkové formy (ROS) vznikají v buňkách jako vedlejší produkty aerobního metabolismu. Organismy si proto vyvinuly řadu ochranných mechanismů, které při fyziologických podmínkách zabraňují poškození molekul. Pokud jsou buňky vystaveny stresovým podmínkám, ochranné mechanismy nedokáží poškození zabránit. Hromadění oxidovaných molekul je považováno za jeden z důvodů stárnutí a původce některých onemocnění, jako Friedrichova ataxie, Amylotropní laterální skleróza, Alzheimerova choroba a mnoha dalších. Během oxidativního stresu jsou reaktivní kyslíkové formy vnímány zejména jako faktory vyvolávající oxidaci cysteinových zbytků v transkripčních faktorech, regulačních proteinech a reakčních centrech enzymů. Oxidací ale též dochází ke změně aktivity proteinů a spuštění specifických drah, včetně změn exprese, metabolismu, buněčného cyklu a proteolýzy. Práce ukazuje ochranné mechanismy buňky, ROS a jimi vyvolané oxidativní poškození proteinů, včetně funkce ROS jako důležitých signálních molekul nezbytných pro řadu buněčných procesů.

Klíčová slova: oxidativní poškození proteinů, antioxidační mechanismy, reaktivní kyslíkové formy, redoxní signalizace, stárnutí, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are regularly produced in cells as a by-product of aerobic metabolism. Hence, organisms developed various defence mechanisms, which are able to avoid molecular damages caused by ROS under physiological conditions. In stress conditions, however, such defence mechanisms are not sufficient to avoid molecular damages. Accumulation of oxidized proteins is supposed to be a reason for ageing and many diseases including Friedreich's ataxia, Amylotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease and many others. During oxidative stress, reactive oxygen species are reflected in oxidation of cysteine residues in transcription factors, regulation proteins and active centers of enzymes. Oxidative modifications however could lead also to changes in transcription factor activity and activation of specific pathways, including changes in gene expression, cell cycle and proteolysis. This work shows defence mechanisms, ROS and proteins altered by reactive

oxygen species that may function as important signalling molecules, which are essential for many cellular processes.

Keywords: protein oxidative damage, antioxidant mechanism, reactive oxygen species, redox signaling, ageing, *Saccharomyces cerevisiae*

2 Seznam užitých zkratk

Adh1p	alcohol dehydrogenase	alkohol dehydrogenáza
AP-1	activator protein 1 transcription factor	transkripční faktor aktivační protein 1
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
CBF	CCAAT-binding factor	komplex vázající CCAAT motif
CCS	copper chaperone for superoxide dismutase	chaperon mědi superoxid dismutázy
Cln1p	cyclik 1	cyklin 1
Cln2p	cyclin 2	cyklin 2
Crmlp	exportin	exportní protein
cTpxp	cytoplasmic thiol peroxidase	cytoplasmatická thiolová peroxidáza
Cys	Cysteine	cystein
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
E1	ubiquitin activating enzyme	enzym aktivující ubiquitin
E2	ubiquitin conjugating enzyme	enzym spojující ubiquitin
E3	ubiquitin ligase	ubiquitin ligáza
FADH	flavin adenine dinucleotide	flavinadenindinukleotid
Fre1p	ferric reductase 1	reduktáza železnatých iontů 1
Fre2p	ferric reductase 2	reduktáza železnatých iontů 2
G₁	gap 1 phase of cell cycle	fáze buněčného cyklu
G₂	gap 2 phase of cell cycle	fáze buněčného cyklu
GADPH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GDI	GDP dissociation inhibitor	inhibitor rozkladu GDP
Gpx3p (Orp1p)	glutathione peroxidase 3	glutathion peroxidáza 3
Gpxp	glutathione peroxidase	glutathion peroxidáza
Grx1p	glutaredoxine 1	glutaredoxin 1
Grx2p	glutaredoxine 2	glutaredoxin 2
Grx5p	glutaredoxine 5	glutaredoxin 5
GSH	reduced glutathione	redukovaný glutathion
GSSG	oxidized glutathione	oxidovaný glutathion
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
Hog1p	high osmolarity glycerol MAP	vyšokou osmolaritou glycerolu

	kinase	aktivovaná MAK kináza
M	mitosis phase of cell cycle	mitotická fáze buněčného cyklu
MAPK	mitogen activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MAPKK	mitogen activated protein kinase kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza kinázy
MAPKKK	mitogen activated protein kinase kinase kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza kinázy kinázy
MBF	complex binding Mlu1 cell cycle box promotor element	komplex vázající se v Mlu1 promotorové oblasti
Mbp1p	transcription factor	transkripční faktor
MFRTA	mitochondrial free radical theory of aging	teorie stárnutí v důsledku volných radikálů vznikajících v mitochondriích
mTpxp	mitochondrial thiol peroxidase	mitochondriální thiolová peroxidáza
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NES	nuclear export signal	jaderný exportní signál
Noxp	NADPH oxidase	NADPH oxidáza
nTpxp	nucleic thiol peroxidase	jaderná thiolová peroxidáza
PHGpxp	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	s membránou asociovaná glutathion peroxidáza
PKC	protein kinase c	proteinkináza c
Prxp	Peroxiredoxin	peroxiredoxin
RNS	reactive nitrogen species	reaktivní formy dusíku
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
RSS	reactive sulfur species	reaktivní formy síry
S	syntetic phase of cell cycle	syntetická fáze buněčného cyklu
SAPK	stress activated protein kinase	stresem aktivovaná protein kináza
Sod1p	superoxide dismutase 1	superoxid dismutáza 1
Sod2p	superoxide dismutase 2	superoxid dismutáza 2
Ssk1p	responce regulator protein	protein regulující odpověď
Swi4p	transcription factor	transkripční faktor
Swi6p	transcription factor	transkripční faktor
Tdh2p	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza 2
Tdh3p	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza 3
Trr1p	thioredoxin reductase 1	thioredoxin reduktáza 1
Trr2p	thioredoxin reductase 2	thioredoxin reduktáza 2
Yap1p	transcription factor	transkripční faktor

3 Úvod

Reaktivní kyslíkové formy vznikají ve všech aerobně žijících organismech jako vedlejší produkt převážně dýchacího řetězce. Mezi významné reaktivní kyslíkové formy, takzvané ROS, patří superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$, karbonátový radikál $CO_3^{\cdot-}$, hydroxylový radikál HO^{\cdot} , peroxylový radikál RO_2^{\cdot} , alkoxylový radikál RO^{\cdot} , peroxid vodíku H_2O_2 , ozon O_3 , peroxyhydrát $ONOO^-$ a singletový kyslík. V buňkách ROS způsobují narušení redoxní rovnováhy, poškození proteinů, DNA a lipidů. Hromadění oxidativně poškozených makromolekul je spojováno s mnoha lidskými nemocemi a stárnutím.

Buňky si vyvinuly řadu enzymatických (superoxid dismutáza, kataláza, peroxidáza, cytochrom c oxidáza) i neenzymatických (glutaredoxinový systém, thioredoxinový systém, metabolity a prvky) mechanismů, které snižují množství ROS, a také enzymy, které se na vzniku ROS podílejí (např. NADPH oxidáza). Tyto systémy umožňují kontrolovat redoxní stav buňky. Buňky jsou schopné změny v redoxní rovnováze vnímat a přeměňovat je na signály vyvolávající změny v důležitých buněčných procesech.

Zatímco dříve bylo pohlíženo na ROS molekuly jako na škodlivý vedlejší produkt aerobního metabolismu, v posledních letech se náhled mění. Mnoho výzkumů ukazuje, že ROS se účastní jako druzí poslové signálních drah nezbytných pro buněčný vývoj, jsou prostředkem mezibuněčné komunikace a v některých případech je jejich přítomnost vyžadována pro vytvoření mnohobuněčné formy organismu.

Cílem této práce je shrnout důležité ochranné mechanismy a změny v buněčných procesech vyvolané působením ROS molekul v kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae*. Hlavní důraz je kladen na signalizační roli ROS a mechanismus, jakým buňky vnímají jeho hladinu, jaké dráhy jsou zapojeny do změn vyvolaných jeho působením a mechanismus jejich regulace oxidativním stresem.

4 Fyziologicky významné reaktivní formy- ROS, RNS, RSS

4.1 ROS

Mezi takzvané ROS, reaktivní formy kyslíku, se řadí volné kyslíkové radikály ale i některé neradikálové formy kyslíku.

Volné radikály jsou definovány jako atomy nebo molekuly, které obsahují jeden či více nepárových elektronů a jsou schopné samostatné existence. Za fyziologických podmínek v živých organismech vznikají z neradikálových molekul přijetím či odštěpením elektronu

nebo homolytickým štěpením kovalentní vazby. Mezi významné radikálové ROS patří superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$, karbonátový radikál $CO_3^{\cdot-}$, hydroxylový radikál HO^{\cdot} , peroxylový radikál RO_2^{\cdot} a alkoxylový radikál RO^{\cdot} (Fridovich, 1998; Gutteridge, 2007)

Mezi neradikálové formy reaktivních forem kyslíku se řadí molekuly, které nemají nepárový elektron, ale jsou velice reaktivní. Fyziologicky důležitým příkladem je peroxid vodíku H_2O_2 , ozon O_3 , peroxyinitrát $ONOO^-$ a nebo singletový kyslík (Gutteridge, 2007).

4.1.1 Zdroje ROS

Reaktivní kyslíkové formy vznikají jako vedlejší produkt aerobního způsobu života (Cabiscol et al., 2000). Za nejvýznamnější zdroj reaktivních kyslíkových forem je považován dýchací řetězec mitochondrií (Guidot et al., 1993). Skládá se z řady enzymů, které přenáší elektrony odebrané z přenašečů redukčních ekvivalentů (NADH, NADPH, FADH). Elektrony jsou po přenesení enzymy dýchacího řetězce předávány na kyslík, který se přemění na vodu. Během přenosu může dojít k úniku jednoho elektronu a jeho přeskoku na kyslík za vzniku superoxidového aniontu. K úniku může dojít na komplexech 1-4.

Dalším zdrojem ROS je membrána endoplazmatického retikula, kde se nachází komplex mikrosomální monooxidasy. Komplex hraje důležitou roli v oxidaci cizorodých látek. Podobně jako u dýchacího řetězce jsou přenášeny elektrony získané z přenašečů redukčních ekvivalentů. K úniku elektronů a přeskoku na kyslík může dojít z NADPH-P450 reduktázy a cytochromu P450.

Rovněž na jaderné membráně a na plazmatické membráně se vyskytují elektronové transportní řetězce o neznámých funkcích. I z těchto systémů může dojít k úniku elektronů a vzniku ROS (Gutteridge, 2007).

ROS mohou být také produkovány buněčnými enzymy, např. NADPH oxidázou, neboli Noxp, což je s membránou asociovaný enzym (Brown and Griendling, 2009). NADPH oxidáza přenáší elektrony z NADPH na molekulární kyslík za vzniku superoxidu, který je dále dismutován na peroxid vodíku (Dikalov, 2011). Dalšími enzymy schopnými produkce ROS jsou NO syntáza a xanthin dehydrogenáza.

U hub jsou známy čtyři homologní proteiny k savcím NADPH oxidázám: NoxAp, NoxBp, NoxCp a Frep („ferric reductase“, tedy reduktáza železnatých iontů) (Takemoto et al., 2007). V *Saccharomyces cerevisiae* byly nalezeny dva geny (*FRE1* a *FRE2*) kódující Fre1p a Fre2p reduktázy železnatých iontů. Fre1p má funkci elektronového přenašeče přes membránu

a je homologní k lidské fagocytární NADPH oxidáze (Finegold et al., 1996; Lesuisse et al., 1996).

4.1.2 Vliv ROS na proteiny

Hlavním iniciátorem proteinového poškození je hydroxylový radikál. Jeho reakce s proteiny vede k rozštěpení polypeptidového řetězce, konverzi aminokyselinových zbytků postranních řetězců na hydroxylové či karbonylové deriváty a formování protein-protein propojení (Stadtman, 1995). Nejnáchylnější k oxidaci jsou methionin a cystein, tedy aminokyseliny obsahující síru. K přeměně methioninových zbytků na methioninový sulfoxid a cysteinových zbytků na disulfid dochází i při slabém narušení redoxní rovnováhy. Oxidace methioninu a cysteinu je do jisté míry reverzibilní proces. Kvasinkové buňky kódují disulfid reductázu a methionin-sulfoxid reductázu, které redukují oxidované aminokyselinové zbytky. Pro ostatní aminokyseliny kvasinky reductázy nekódují, proto by snadná oxidace výše zmíněných aminokyselin mohla sloužit jako ochranný mechanismus zabráňující nevratnému poškození jiných aminokyselin (Berlett and Stadtman, 1997).

Proteinová karbonylace je spojena buď s proteinovým štěpením, nebo s přímou oxidací aminokyselin. Při štěpení proteinové kostry dochází k napadení α -vodíku hydroxylovým radikálem, výsledkem může být kovalentní propojení proteinů nebo karbonylace. Ke karbonylaci také dochází v důsledku přímé oxidace postranních řetězců kyseliny glutamové, asparagové a prolinu (Berlett and Stadtman, 1997).

4.2 RNS,RSS

4.2.1 RNS

Mezi reaktivní dusíkové formy se řadí oxid dusnatý NO. Oxid dusnatý typicky reaguje s thiolovou skupinou (S-nitrosylace) nebo kovem. V živých systémech může NO fungovat jako ochrana proti ROS, velice ochotně s nimi reaguje a tak vytváří mnohem méně reaktivní produkt. Oxid dusnatý zastává v buňkách důležité fyziologické role, proto je vytvářen enzymy buňky (Gutteridge, 2007).

4.2.2 RSS

Většina thiolových skupin v buňce funguje jako antioxidanty, nejvýznamnější je glutathion GSH. Thioly mohou reagovat s kovovými ionty, kyslíkovými radikály nebo uhlíkovými radikály za vzniku thiolových radikálů (Gutteridge, 2007).

5 ROS ve stárnutí *Saccharomyces cerevisiae*

U *Saccharomyces cerevisiae* existují dva různé aspekty, podle kterých se posuzuje stárnutí: replikativní stárnutí a chronologické. Replikativní stárnutí je definováno počtem dělení mateřské buňky. Stárnutí chronologické jako životaschopnost kultury ve stacionární fázi. Obecně je stárnutí chápáno jako proces, při kterém dochází ke ztrátě buněčné homeostáze v důsledku kumulace poškozených makromolekul, jako jsou proteiny, lipidy a DNA (Hekimi et al., 2011).

Na základě mnoha výsledků bylo navrženo, že volné radikály způsobují stárnutí. Stárnutí je zapříčiněno oxidativním poškozením proteinů, DNA a lipidů a jejich hromaděním. Mitochondriální produkce reaktivních kyslíkových forem má za následek poškození enzymů dýchacího řetězce, které vede k narušení jejich funkce a zvýšené produkci ROS. Během stárnutí dochází k hromaděni poškození a stále větší produkci reaktivních kyslíkových forem. (Hekimi et al., 2011). Teorii MFRTA „mitochondrial free radical theory of aging“, tedy teorii stárnutí v důsledku volných radikálů vznikajících v mitochondriích, podporují experimentální data ukazující, že hladina bazálního metabolismu je nepřímo úměrná délce života, vyšší životaschopnost je spojena s nižší produkcí ROS, v mitochondriální DNA se hromadí mutace v průběhu stárnutí (Costa and Moradas-Ferreira, 2001) a v mitochondriích stárnoucích mateřských buněk se hromadí ROS (Laun et al., 2001). Tato hypotéza je také podložena výsledky prací, které ukazují na klíčovou roli antioxidantního systému v kvasinkových buňkách a jejich životaschopnosti. Buňky adaptované na respirační růstové podmínky vykazují vyšší hladinu antioxidantů, která koreluje se zvýšenou délkou života (MacLean et al., 2001).

Na zvýšenou hladinu ROS a poškození důležitých makromolekul se dá pohlížet i jako na jev vznikající v důsledku stárnutí, ne jako na jeho příčinu (Hekimi et al., 2011). Reaktivní formy jsou uvažovány jako důležité signální molekuly (Forman et al., 2010), proto může být zvyšování hladiny ROS v průběhu stárnutí způsobeno signální odpovědí buňky na nárůst množství poškozených makromolekul (Hekimi et al., 2011). Přestože většina dnes známých

výzkumů hovoří ve prospěch teorie MFRTA, objevují se i výsledky, které se s ní neshodují. Například mouchy nadprodukcující superoxid dismutázu, důležitý antioxidační enzym, nejevily zvýšenou životaschopnost, někdy dokonce naopak jevily sníženou. V některých případech u *Caenorhabditis elegans* zvýšení životaschopnosti nedoprovázela snížená hladina ROS (Chen et al., 2007). Přestože teorie MFRTA předpokládá větší poškození mitochondriální DNA než jaderné, u pokusů s krysami se tato hypotéza nepotvrdila (Lim et al., 2005).

6 Ochranné mechanismy proti ROS

Aerobně žijící organismy jsou stabilně vystaveny ROS a jejich následkům, proto vyvinuly řadu obranných mechanismů proti jejich vzniku a účinku i systémy, které je dokáží odstraňovat. Obranné mechanismy jsou tvořeny enzymatickými i neenzymatickými systémy. Díky těmto mechanismům je v buňkách udržována redoxní rovnováha důležitá pro správné fungování proteinů. Při narušení redukčního prostředí v cytosolu vzniká oxidativní stres, tedy převážení oxidantů nad antioxidačními složkami buňky, a v jeho důsledku dochází k poškození makromolekul. Při rozsáhlém poškození může tato disbalance způsobit i smrt (Jamieson, 1998).

6.1 Neenzymatické ochranné mechanismy

Neenzymatické ochranné systémy jsou většinou tvořeny malými molekulami, které jsou oxidovány ROS a tím zabraňují oxidaci makromolekul. Díky tomuto odstraňování ROS se řadí mezi hlavní tzv. ROS „scavengers“ (Jamieson, 1998).

6.1.1 Glutathion

Glutathion je tripeptid aminokyselin kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. V buňkách je obsažený ve velkém množství, proto poměr jeho oxidované (GSSG) a redukované (2GSH) formy obvykle udává redoxní stav buňky. Tento poměr je za fyziologických podmínek 1:100 ve prospěch GSH. Glutathion je syntetizován buňkou dvěma enzymy β -glutamylcystein syntetázou, kódovanou genem *GSH1*, a glutathionsyntetázou- (gen *GSH2*). Mutanti v těchto genech vykazují rapidně sníženou hladinu glutathionu, což nasvědčuje malé schopnosti buněk přijímat ho z média (Ohtake, 1990; Schafer and Buettner, 2001).

Glutathion se v podmínkách bez zvýšeného extracelulárního ROS vyskytuje ve všech buněčných kompartmentech, největší výskyt byl pozorován v mitochondriích, perinukleárním prostoru, lumen a endoplazmatickém retikulu, nejméně ve vakuole a buněčné stěně. Místa zvýšeného výskytu odpovídají zdrojům ROS v buňce. Tato distribuce glutathionu a jeho velké množství v mitochondriích jsou nezbytné pro normální růst (Zechmann et al., 2011).

Glutathion plní v buňkách několik důležitých funkcí, od udržování redoxního stavu, funkce kofaktoru pro glutathion peroxidázu, zabraňování kovalentnímu propojení proteinů po roli signální a antioxidační (Jamieson, 1998).

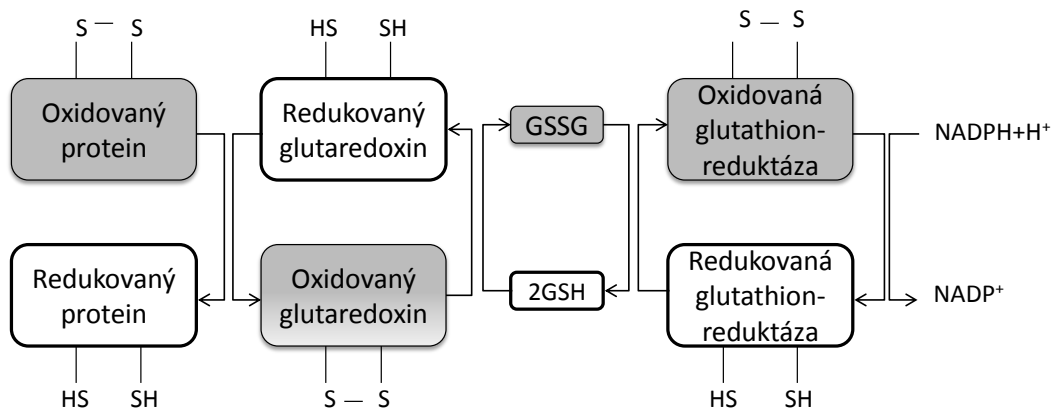
Antioxidační role spočívá v reakci s reaktivními formami, výsledkem je menší obsah ROS a tím pádem i menší poškození důležitých makromolekul. Oxidovaný GSSG je redukován glutathion reduktázou na 2GSH za spotřeby NADPH (Schafer and Buettner, 2001).

Jako velice důležitá se ukazuje role glutathionu v S-glutathiolacích, tedy vytvoření disulfidického můstku mezi sírou cysteinu na glutathionu a sírou cysteinu na proteinu (Klatt and Lamas, 2000). Tato glutathiolace může zabránit ireverzibilnímu poškození cysteinu na proteinu, ale také může sloužit jako posttranslační modifikace. Hodně je diskutovaná role thiolací v regulaci transkripčních faktorů a enzymů a její signální funkce (Shenton and Grant, 2003).

6.1.2 Glutaredoxinový systém

6.1.2.1 Glutaredoxin

Glutaredoxiny jsou malé peptidy obsahující jeden nebo dva cysteiny v aktivním centru. Monocysteinové glutaredoxiny jsou v *Saccharomyces cerevisiae* kódovány třemi geny *GRX*, tj. *GRX3-5*. Role centrálního glutaredoxinu Grx5p, vyskytujícího se v mitochondrii, je podstatná ve formování FeS klastrů, tedy aktivních center enzymů přenášejících elektrony (Alves et al., 2004; Rodriguez-Manzanique et al., 1999). Dicysteinové glutaredoxiny jsou v kvasince dva, Grx1p a Grx2p. Jsou schopné redukovat disulfidické můstky a účastní se při deglutathiolacích proteinů (Herrero et al., 2010; Luikenhuis et al., 1998). Glutaredoxin je součástí glutaredoxinového systému (obrázek 1).



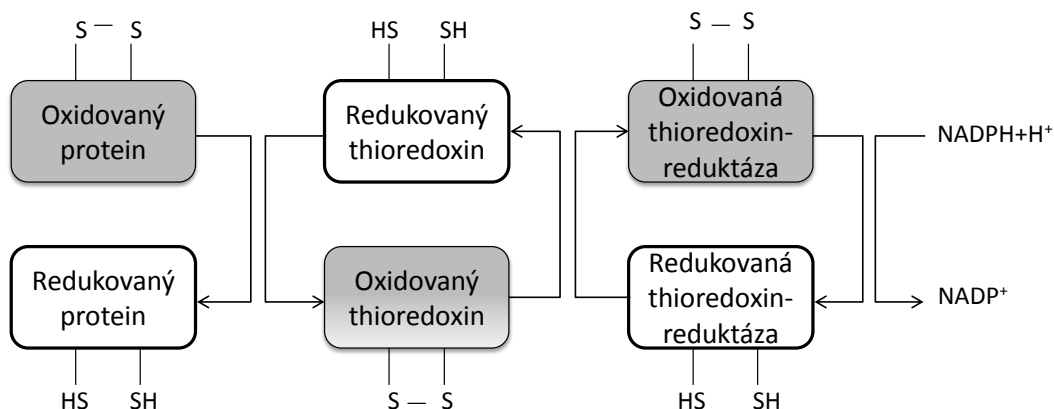
Obr.:1 Schéma glutaredoxinového systému

6.1.3 Thioredoxinový systém

6.1.3.1 Thioredoxin

Thioredoxin je polypeptid, který se stejně jako glutaredoxin vyskytuje v eukaryotech i prokaryotech. Konzervovanost těchto dvou molekul dokazuje jejich velký význam v antioxidační ochraně. Funkce glutaredoxinu a thioredoxinu se částečně překrývají, oba se účastní jako redukční činidla důležitých enzymů (Muller, 1996). Thioredoxin je v buňkách součástí thioredoxinového systému (obrázek 2).

Redukovaný thioredoxin obsahuje dvě SH skupiny. Redoxně reaguje s řadou proteinů, výsledkem je redukce původně oxidovaného proteinu a vytvoření disulfidického můstku, tedy oxidace aktivního místa thioredoxinu (Bao et al., 2009). Po oxidaci dochází k obnovení díky elektronům z NADPH, tato obnova je katalyzována enzymem thioredoxinreduktázou. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* kóduje tři thioredoxiny, dva cytosolické (geny *TRX1* a *TRX2*), jednu cytosolickou thioredoxinreduktázu Trr1p a jeden mitochondriální (*TRX3*) a mitochondriální Trr2p thioredoxinreduktázu (Gan, 1991; Pedrajas et al., 1999).



Obr.:2 Schéma thioredoxinového systému

6.1.4 Metabolity a ionty s antioxidační funkcí

Erytroaskorbová kyselina se v *Saccharomyces cerevisiae* vyskytuje hojněji než kyselina askorbová. Vlastnostmi se tyto dvě kyseliny neliší, obě jsou hydrofilní, jejich funkcí je vychytávání reaktivních forem v cytoplasmě. Obdobnou funkci plní v membránách hydrofobní karotenoidy (Gutteridge, 2007). Při odbourávání ROS jsou důležité také manganaté kationty Mn^{2+} . V buňkách, které obsahují mutaci v *SOD1*, mohou částečně kompenzovat nefunkční superoxid dismutázu (Lapinskas et al., 1995).

Trehalóza je neredukující disacharid dvou molekul glukózy spojených $\alpha 1-1\alpha$ vazbou. Je prokázána její akumulace během teplotního šoku, zmražení, přítomnosti vysokých koncentrací solí a alkoholu, která má za následek zvýšenou toleranci a redukci agregace denaturovaných proteinů (Lewis et al., 1997). Výsledky ukazují, že vysoká hladina trehalózy vyvolaná mírným teplotním šokem zvyšuje odolnost buněk proti peroxidu vodíku. Vracením buněk do nestresující teploty dochází ke snížení hladiny trehalózy a s ní i rezistence na peroxid vodíku. Důležitost trehalózy v odolnosti proti reaktivním formám podtrhuje fakt, že množství karbonylovaných proteinů v buňkách se zvýšenou hladinou trehalózy je menší, než v buňkách s hladinou nízkou (Benaroudj et al., 2001).

6.2 Enzymatické ochranné mechanismy

Ochrana buněk proti ROS zahrnuje také řadu enzymů schopných odstranit radikály samotné i jejich produkty, nebo opravit poškození jimi způsobené. Mezi významné enzymatické antioxidanty patří především superoxid dismutáza, na ní navazující kataláza a řada peroxidáz.

6.2.1 Superoxid dismutáza

Superoxid dismutáza (Sodp) hraje v buňkách důležitou roli při odstraňování superoxidů za vzniku peroxidu vodíku (1).



Podle kofaktoru vyžadovaného superoxid dismutázou se rozlišuje několik typů SOD, CuZnSOD, MnSOD, FeSOD a NiSOD (Fridovich, 1998). V kvasince *Saccharomyces cerevisiae* se vyskytují dvě superoxid dismutázy, gen *SOD1* kóduje cytoplazmatickou dismutázu a gen *SOD2* kóduje mitochondriální dismutázu (Sturtz et al., 2001).

Ve větším počtu jsou superoxid dismutázy zastoupeny u patogenních kvasinek. Např. *Candida albicans* kóduje šest Sodp (Hwang et al., 1999). Tato větší rozmanitost umožňuje přežívání v hostiteli, poskytuje ochranu proti jeho imunitní odpovědi a zvyšuje patogenitu (Missall et al., 2004).

6.2.1.1 CuZnSOD

CuZnSOD, neboli Sod1p, je lokalizována v cytoplazmě a v mitochondriálním intermembránovém prostoru. Většinou se vyskytuje ve formě dimeru, jedna proteinová jednotka obsahuje Zn^{2+} , druhá Cu^{2+} . Zinečnatý kation je důležitý pro stabilizaci enzymu, zatímco měďnatý kation se účastní katalytického cyklu. Pro vytvoření katalytického centra enzymu je důležitý chaperon mědi (CCS), který přináší Cu^{2+} a zajišťuje vytvoření disulfidických můstků v Sod1p. CCS je v buňce lokalizován stejně jako Sod1p a jeho aktivita ovlivňuje množství superoxid dismutázy (Birmingham-McDonogh et al., 1988; Sturtz et al., 2001).

Mutanti *sod1Δ* vykazují zvýšené množství karbonylace cytosolických i mitochondriálních proteinů a zvýšené umírání buněk během stacionární fáze. Naopak větší množství Sod1p v intermembránovém prostoru zvyšuje životaschopnost buněk ve stacionární fázi. Toto pozorování ukazuje důležitost Sod1p v obraně proti reaktivním formám kyslíku a jejich odstraňování (Sturtz et al., 2001).

6.2.1.2 MnSOD

MnSOD, neboli Sod2p, je lokalizovaná v mitochondriích. V *Saccharomyces cerevisiae* se vyskytuje ve formě dimeru. V aktivním centru obsahuje ion Mn^{3+} , který se účastní katalytického cyklu. Dismutace superoxidu je umožněna přechodem mezi Mn^{3+} a Mn^{2+} . Na rozdíl od CuZnSOD, která je velice odolná, je náchylná k vyšší teplotě, organickým rozpouštědlům a detergentům. I sekvencí aminokyselin jsou tyto dvě superoxid dismutázy odlišné. Hlavní funkcí Sod2p je obrana proti superoxidům, které vznikají v elektronovém transportním řetězci (Gutteridge, 2007; Herrero et al., 2008). Peroxid vodíku, který vzniká činností Sod1p a Sod2p, může být v buňkách odstraňován katalázami nebo peroxidázami.

6.2.2 Kataláza

Kataláza je enzym zajišťující disproportionaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík. (2)



Katalázy jsou většinou homotetramerní proteiny. V aktivním místě mají hemový železitý kationt Fe^{3+} . Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* kóduje dvě katalázy. Peroxisomální katalázu A (gen *CTA1*) a cytosolickou katalázu T (gen *CTT1*) (Herrero et al., 2008; Izawa et al., 1996).

6.2.3 Peroxidázy

Jako peroxidázy jsou souhrnně označovány enzymy schopné odstraňovat anorganické i organické peroxidy. Na rozdíl od superoxiddismutázy a katalázy není jejich funkce závislá na redoxních vlastnostech kovů v jejich aktivním místě (Herrero et al., 2008). Pro správné fungování vyžadují jako zdroj elektronů různé organické molekuly. Podle těchto zdrojů se rozlišuje mnoho typů peroxidáz, například glutathionperoxidázy, thioredoxinperoxidázy, cytochrom *c* peroxidázy, NADH peroxidázy, křenová peroxidáza a další (Fridovich, 1998).

6.2.3.1 Glutathion peroxidázy

Glutathion peroxidázy odstraňují peroxid vodíku za oxidace dvou redukovaných glutathionů (3).



Peroxidázy využívající jako donor elektronů glutathion je možné rozdělit na dvě skupiny: klasické Gpxp a s membránou asociované fosfolipid-hydroxiperoxid Gpxp (PHGpxp). Gpxp jsou většinou solubilní multimery, PHGpxp se většinou vyskytují ve formě monomerů (Herrero et al., 2008).

V kvasince *Saccharomyces cerevisiae* byly nalezeny tři geny kódující glutathion peroxidázu, *GPX1*, *GPX2* a *GPX3* (Inoue et al., 1999). Po provedení srovnávací analýzy a dalších ověření bylo zjištěno, že tyto geny kódují PHGpx1-3p (Avery and Avery, 2001). Všechny tři enzymy jsou selenoproteiny, v aktivním místě obsahují selenocystein (Fridovich, 1998).

6.2.3.2 Peroxiredoxiny

Peroxiredoxiny (Prxp) je skupina peroxidáz, které redukují peroxid vodíku i organické peroxidy. V aktivním místě obsahují cysteiny, na nichž je založena katalytická aktivita enzymu. Podle počtu a umístění cysteinů se Prxp rozdělují do tří skupin. Nejčastěji vyskytující se peroxiredoxiny jsou typické dvoucysteinové Prxp. Jsou to homodimery obsahující jeden cystein na každé podjednotce. Atypické dvoucysteinové také obsahují dva cysteiny, ale oba jsou na stejné podjednotce. Monomerní jednocysteinové peroxiredoxiny obsahují pouze jeden cystein v aktivním místě (Herrero et al., 2008; Trujillo et al., 2007).

Během reakce s peroxidem vodíku dochází u všech typů k oxidaci cys-SH skupiny na cys-SOH. V případě dvoucysteinových reaguje tato kyselina sulfonová s druhou cys-SH skupinou za vzniku disulfidického můstku. Na redukci je vyžadován thioredoxin, proto se dvoucysteinové peroxiredoxiny označují také jako thioredoxinperoxidázy. V případě jednocysteinových je mechanismus reakce nejasný (Trujillo et al., 2007).

Saccharomyces cerevisiae kóduje pět thiolových peroxidáz s rozdílnou lokalizací, cytoplazmatické cTpx1p, cTpx2p, cTpx3p, mitochondriální mTpxp a jadernou nTpxp (Park et al., 2000).

6.2.3.3 Cytochrom *c* peroxidáza

Cytochrom *c* peroxidáza je v *Saccharomyces cerevisiae* lokalizována v mitochondriálním mezimembránovém prostoru. V aktivním místě obsahuje hemový železitý kation, který je během reakce oxidován a umožňuje tak dismutaci peroxidu vodíku. Při reakci s H₂O₂ se tvoří stabilní komplex enzym-substrát (Gutteridge, 2007).

7 Redoxní signalizace

Dříve bylo na ROS pohlíženo jen jako na škodlivé molekuly způsobující fyziologické defekty. V posledních letech se náhled na reaktivní kyslíkové formy změnil díky řadě důkazů, které ukazují, že ROS se zřejmě účastní některých signálních drah.

7.1 Signalizační role ROS

Především výzkumy na savčích buňkách potvrzují funkci ROS jako důležitých signálních molekul. Například při hypoxii vyvolané vystavením buněk nízké hladině kyslíku paradoxně dochází ke zvýšené produkci reaktivních kyslíkových forem v mitochondriích. Zvýšení hladiny ROS se ukazuje jako velice důležité při regulaci odpovědi buňky (Chandel et al., 1998; Waypa et al., 2006). ROS produkované NADPH oxidázami jsou důležité při diferenciaci buněk hladkých svalů, jejich růstu a vazodilataci (Cai et al., 2003; Clempus et al., 2007; Ushio-Fukai et al., 2001). NADPH oxidázy (Nox), a tak i produkce ROS, je v buňkách regulována (Finkel, 2003). Bylo zjištěno, že při aktivaci NADPH oxidázy hraje roli GTP, což naznačuje roli GTP-vazebného proteinu v regulaci (Gabig et al., 1987). Později byly tyto GTP vazebné proteiny určeny jako Rac rodina GTPáz (Knaus et al., 1991). Neaktivovaná forma Rac proteinů je lokalizována v cytosolu, kde se nachází v komplexu s GDI proteinem (Chuang et al., 1993). Během aktivace NADPH oxidázy dochází k rozbití komplexu, GDI protein zůstává lokalizován v cytosolu a Rac protein je lokalizován v plazmatické membráně (Quinn et al., 1993). Mezi další významné regulátory NADPH oxidáz patří proteiny $p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ a $p40^{\text{phox}}$ (Bedard and Krause, 2007). Regulace funkce Rac proteinů, a tak i NADPH oxidázy, je vysvětlitelná na signalizaci vyvolané angiotensinem II v savčích buňkách (Dikalov, 2011). Angiotensin II (ang II) je důležitým mediátorem v hladkých svalech, jehož efekty jsou zprostředkovány reaktivními kyslíkovými formami (Griendling et al., 2000). Po navázání ang II na receptor dochází k aktivaci PKC (protein kinázy C), fosforylaci $p47^{\text{phox}}$ a výměně nukleotidů na Rac ze stavu Rac-GDP na Rac-GTP. Aktivace NADPH oxidázy má za následek generaci ROS. Takto vzniklý peroxid vodíku aktivuje tyrosin kinázu a dochází k transaktivaci receptoru pro epidermální růstový faktor. Dále dochází k produkci fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu, který aktivuje další Rac. Takto dochází k zesílení NADPH oxidázové aktivity (Seshiah et al., 2002).

U rostliny *Arabidopsis thaliana* je produkce reaktivních kyslíkových forem nezbytná pro správný průběh růstu, morfogeneze a vytváření symbiotických interakcí (Foreman et al., 2003; Takemoto et al., 2006). Diferenciace buněk modelového organismu *Drosophila melanogaster* je závislá na ROS signalizaci (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). Také eukaryotické mikroorganismy využívají ROS jako důležité signální molekuly, jsou důležité během sexuální reprodukce, tvorby mnohobuněčného stádia a intracelulární komunikace (Bloomfield and Pears, 2003; Gessler et al., 2007; Malagnac et al., 2004).

ROS aktivují během své signalizace mnoho signálních kaskád, včetně protein tyrosinových kináz, serin/threoninových kináz, fosofolipáz, MAP kináz a Ca^{2+} závislých drah (Griendling et al., 2000). Signalizace molekulami ROS byla objevena u živočichů, rostlin i mikroorganismů, což podtrhuje její důležitost.

Role signalizace ROS molekulami je také hodně diskutovaná ve vývoji mnohobuněčnosti. NADPH oxidázy se vyskytují u všech zkoumaných organismů, které mají v životním cyklu mnohobuněčné stádium. U organismů jednobuněčných se homologové Nox proteinů vyskytují pouze vzácně (Bedard et al., 2007). NADPH oxidázy se účastní regulace diferenciace buněk (viz výše); jako substrát používají NADPH, takže jejich aktivita odráží metabolický stav buňky; jsou schopné produkovat ROS z buňky, reaktivní formy mohou difundovat do okolních buněk a fungovat tak jako signální molekuly (H_2O_2 splňuje požadavky druhého posla) (Lalucque and Silar, 2003).

7.2 ROS jako druzí poslové

Superoxidy oxidují thiolové skupiny za vzniku radikálů. Reakce probíhá při fyziologickém pH velice pomalu (Winterbourn and Metodiewa, 1995). Množství thiolových skupin takto vzniklých oxidací je nevýznamné a superoxid není vhodným druhým poslem.

Hydroxylový radikál je velice silné oxidační činidlo, které v buňkách reaguje s řadou různých molekul (Forman et al., 2010). Tento radikál proto nemůže hrát specifickou roli v signalizacích.

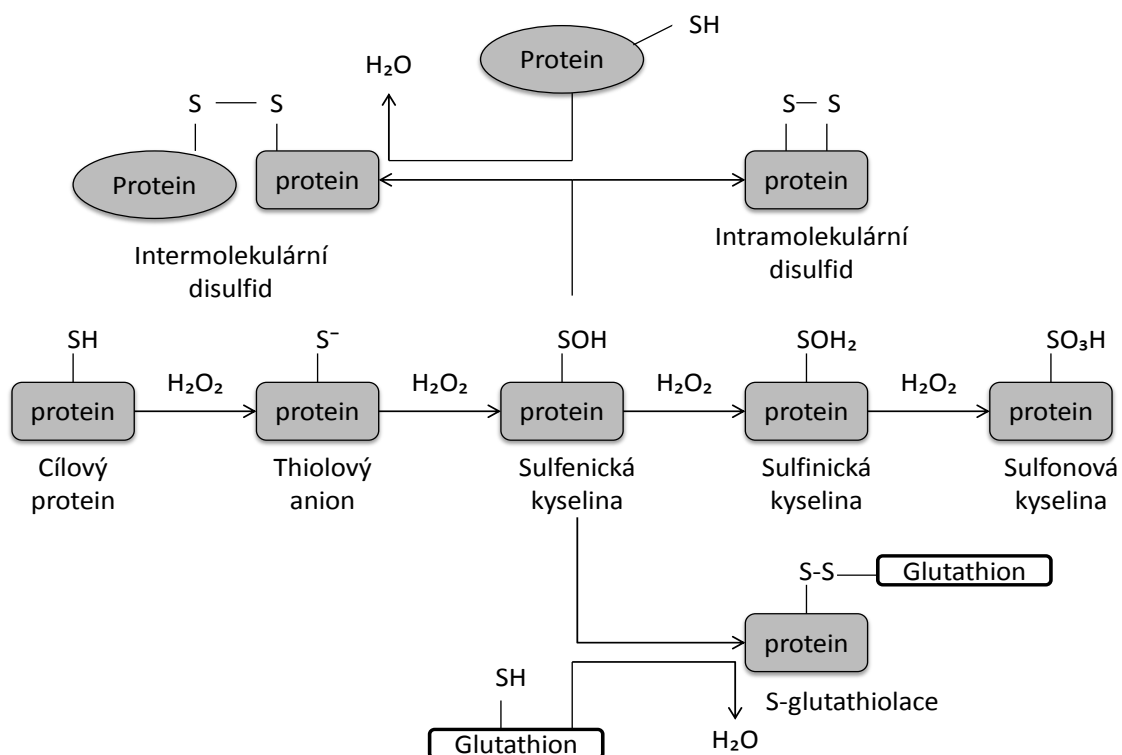
Znaky druhého posla nejlépe splňuje peroxid vodíku H_2O_2 (Forman et al., 2010). Jeho odbourávání i syntézu v buňkách zajišťují enzymatické systémy, takže jeho hladina může být velice přesně kontrolována (viz. Kapitola 2 a 4). Také chemismus souhlasí s požadavky signální molekuly, peroxid vodíku je neutrální molekula, takže difunduje přes membrány, snadno opouští mitochondrii a má vysokou specifitu pro thioly, jejichž oxidace se ukazuje

jako důležitá v regulacích metabolických drah, funkci proteasomu, změně genové exprese a dalších. (Cyrne et al., 2010; Delaunay et al., 2002; Klatt and Lamas, 2000; Silva et al., 2008).

5.3. Oxidace thiolových skupin

Oxidace thiolových skupin cysteinů je důležitým mechanismem umožňujícím buňkám monitorovat změny v redoxní rovnováze. Thiolové skupiny se v závislosti na okolních aminokyselinách a jejich strukturním uspořádání liší v hodnotách pK_a . Thiolové skupiny s nižší hodnotou ochotněji reagují s ROS a patří mezi tzv. cílové („target“) proteiny pro H_2O_2 (Salsbury et al., 2008; Winterbourn and Metodiewa, 1999). Během redoxního stresu jsou cílové proteiny oxidovány snadněji než proteiny s vysokými hodnotami thiolového pK_a a mohou být též glutathiolovány. Díky tomuto mechanismu není oxidace proteinů náhodná a umožňuje buňkám specifickou reakci na změněné redoxní podmínky.

S-glutathiolace, tedy vazba glutathionu pomocí disulfidického můstku na protein, vzniká v případě narušení redoxní homeostáze buňky. Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.1.1, S-glutathiolace plní velmi důležitou funkci během redoxní signalizace, je důležitým regulátorem a chrání proteiny proti ireverzibilnímu poškození.



Obr.3: Překresleno podle (Finkel, 2011), cílový protein se v buňce může i za běžných redoxních podmínek vyskytovat ve formě thiolového aniontu, vznik kyseliny sulfinické a kyseliny sulfonové je ireverzibilní

7.2.1 Regulace transkripce oxidací Yap1p

Yap1p je transkripční faktor AP-1 rodiny typu „leucinový zip“ (Moye-Rowley et al., 1989). V pučících kvasinkách zvyšuje transkripci řady genů antioxidačních systémů. Po přidání menadionu který způsobuje tvorbu superoxidu a peroxidu vodíku, dochází ke zvýšené expresi genů pro superoxid dismutázu, glutation peroxidázu, thioredoxin, thioredoxin reduktázu, glutaredoxin, glutation reduktázu a řadu dalších (Gasch et al., 2000; Lee et al., 1999).

Yap1p je za běžných redoxních podmínek lokalizovaný v cytosolu, v případě oxidativního stresu je lokalizován v jádře (Kuge et al., 1997). Yap1p obsahuje v C-terminální doméně jaderný exportní signál, který je rozeznáván Crm1p jaderným přenašečem. Crm1p zajišťuje cytosolickou lokalizaci Yap1p za nestresových redoxních podmínek. Redoxní stres vyvolá oxidaci thiolových skupin v oblasti NES sekvence („nuclear export signal“, jaderný

exportní signál), v důsledku vytvoření disulfidického můstku dojde ke sbalení a NES není rozeznávána Crm1p, zůstává lokalizován v jádře, kde ovlivňuje transkripci výše zmíněných genů (Kuge et al., 2001; Yan et al., 1998).

Vytvoření disulfidického můstku není způsobeno přímou interakcí cysteinů v NES oblasti s H_2O_2 , ale interakcí s Gpx3p enzymem. Gpx3p, neboli Orp1p, je glutathion peroxidáze příbuzný enzym, který má funkci senzoru peroxidů vodíku. Při oxidaci dochází k vytvoření disulfidického můstku mezi Cys36 na Gpx3p a Cys598 na Yap1p. Dále dochází k vytvoření vazby mezi cysteiny Yap1p a uvolnění Gpx3p (Delaunay et al., 2002). V Yap1p je obsaženo šest signálně důležitých můstků. Jejich oxidací můžou vzniknout čtyři různé oxidační formy Yap1p, které se liší svojí aktivitou a udržují tak buněčnou redoxní homeostázi (Okazaki et al., 2007).

7.2.2 Regulace ubiquitin proteasomové dráhy

Proteasom je velký proteinový komplex. Proteasom 26S je složen z katalytického 20S centra a dvou regulačních 19S částí. Proteiny určené k proteasomální degradaci jsou polyubiquitinylovány za účasti ATP (adenosintrifosfát) a tří enzymů E1 (ubiquitin aktivační enzym), E2 (ubiquitin konjugační enzym) a E3 (ubiquitin ligáza). Pěhem polyubiquitylace je nejprve ubiquitin aktivován vytvořením disulfidického můstku s E1 enzymem, dále je přenesen na enzym E2, s kterým také tvoří disulfidický můstek. V posledním kroku je pomocí E3 enzymu ubiquitin navázán na protein. Proteasomální degradace chrání buňku proti hromadění nefunkčních, poškozených proteinů, hraje klíčovou roli během buněčného cyklu a je důležitá při buněčné diferenciaci (Kornitzer and Ciechanover, 2000).

Během oxidativního stresu dochází ke snížení množství ubiquitinylovaných proteinů. Pokles buněčných ROS na nestresovou úroveň je doprovázen zvýšením ubiquitylace na množství, které se objevuje v nestresovaných buňkách. Během několika hodin dochází k dalšímu zvýšení ubiquitylace nad nestresovou úroveň. Výkyvy v ubiquitylaci souhlasí s aktivitou enzymů E1 a E2, která je za podmínek oxidativního stresu snižena, po jeho odstranění se zvyšuje. V souladu s tímto pozorováním jsou i změny ubiquitin dependentního odstraňování proteinů v proteasomu (Shang et al., 1997). Změny v aktivitě ubiquitin aktivačního enzymu a ubiquitin konjugačního enzymu jsou závislé na buněčném GSSG:GSH poměru. Během inaktivace těchto enzymů dochází k navázání glutathionu, tedy S-glutathiolaci (Jahngen-Hodge et al., 1997; Obin et al., 1998). S-glutathiolace a následná inaktivace ubiquitinilacních enzymů by mohla mít význam v jejich ochraně proti

ireverzibilnímu oxidativnímu poškození aktivního místa (vznik sulfinické nebo sulfonové kyseliny), také by mohla sloužit jako mechanismus bránící odbourávání proteinů, které nejsou ireverzibilně oxidované. Tomu by odpovídala skutečnost, že po odstranění reaktivních kyslíkových forem se aktivita E1 a E2 enzymů zvýší, takže mohou být odstraněny oxidované proteiny, které nedokázaly být opraveny (redukovány) ochrannými a reparačními systémy buňky.

Proteolýza proteinů může také probíhat v samotném 20S katalytickém centru bez navázaných 19S regulačních částí. Degradace proteinů 20S=proteasomem je nezávislá na ATP a ubiquitinilaci. Během oxidativního stresu, při kterém dochází k inhibici 26S dráhy, jsou v 20S odbourávány oxidované proteiny (Inai and Nishikimi, 2002; Shringarpure et al., 2003). Katalytické 20S centrum je složeno z α a β podjednotek. Podjednotky α nemají katalytickou aktivitu a slouží jako vstupní části do katalytických β podjednotek. Kvasinky kódují sedm různých podjednotek β s různými katalytickými vlastnostmi. Podjednotka $\beta 1$ vykazuje kaspázovou aktivitu (štěpení za acidickými aminokyselinami), $\beta 2$ trypsinovou aktivitu (štěpení za bazickými aminokyselinami) a $\beta 5$ chymotrypsinovou aktivitu (štěpení proteinů za hydrofobními aminokyselinami) (Groll et al., 1999).

Chymotrypsinová aktivita kvasinkového proteasomu není ovlivněna GSSG díky struktuře, která brání interakci oxidovaného glutathionu a cysteinového zbytku. Redukovaný glutathion GSH snižuje aktivitu 20S proteasomu během zvýšeného výskytu ROS v buňce. Katalytické jádro 20S obsahuje cysteiny, které jsou během oxidativního stresu oxidovány a následně S-glutathiolovány (Demasi et al., 2003). Na deglutathiolaci a znovunabytí funkce se podílí především glutaredoxin 2 a thioredoxiny 1 a 2. Během odbourávání glutathionu musí glutaredoxin 2 vstoupit do katalytického jádra, což potvrzuje lokalizaci glutathiolovaných cysteinů (Silva et al., 2008).

Nejnovější výsledky ukazují, že S-glutathiolace je důležitá při regulaci vstupu proteinů do 20S proteasomu. Jak již bylo zmíněno výše, sedm α podjednotek slouží jako vstupní část do katalytického centra. Pro vstup proteinů je nutné otevření α částí. To je částečně zajištěno S-glutathiolací dvou cysteinů v $\alpha 5$ podjednotce. Tímto způsobem je regulován vstup oxidovaných proteinů do 20S proteasomu za podmínek oxidativního stresu (Silva et al., 2012).

7.2.3 Regulace glykolytických enzymů

Glykolýza je metabolická dráha, během které dochází ke vzniku dvou pyruvátů, dvou molekul ATP a dvou NADH (nikotinamid adenin dinukleotid). Enzymy inhibované během oxidativního stresu, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GADPH) a enoláza, se účastní přeměny glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát za vzniku 2NADH v případě GAPDH (šestá reakce glykolýzy) a přeměny 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát v případě enolázy (devátá reakce glykolýzy). Dalším enzymem inhibovaným přítomností ROS je alkoholdehydrogenáza (ADH), enzym katalyzující přeměnu alkoholů na ketony nebo aldehydy za vzniku NADH.

Saccharomyces cerevisiae obsahuje tři geny kódující GADPH: *TDH1*, *TDH2* a *TDH3*. Všechny tři izoformy glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy obsahují dva cysteiny v aktivním místě, během buněčné stresové odpovědi je S-glutathiolována pouze Tdh3p izoforma. K dethiolaci dochází glutaredoxinem 5. Působením oxidativního stresu může dojít ke snížení NADPH aktivity až o 90%, při úbytku množství ROS se aktivita Tdh3p zvyšuje rychleji než aktivita Tdh2p, což by mohlo poukazovat na ireverzibilní poškození izoformy 2, která není chráněna glutathiolací. Aktivita enolázy a alkoholdehydrogenázy může být snižena až o 70% a zvyšuje se po odeznění oxidativního stresu, což naznačuje reverzibilní S-glutathiolaci. Aktivita aldolázy, trióza fosfát izomerázy a aldehyd dehydrogenázy není ovlivněna. (Bucciarelli et al., 2009; Grant et al., 1999; Mohr et al., 1998; Shenton and Grant, 2003; Shenton et al., 2002).

Enzymy pentózofosfátového cyklu nejsou inhibovány účinky ROS. Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza a 6-fosfoglukonátdehydrogenáza vykazují zvýšenou aktivitu v *gsh1Δ* mutantech (mutanti v gamma-glutamylcystein syntetáze, klíčovém enzymu pro tvorbu GSH (Ohtake, 1990)), která by mohla sloužit jako kompenzace nízké hladiny GSH pomocí NADPH vzniklého v pentózovém cyklu (Shenton and Grant, 2003). Inhibice glykolýzy při odpovědi na oxidativní stres znamená větší přísun glukózy do pentózového cyklu, který poskytuje množství NADPH a tak se podílí na redukci oxidativního prostředí v buňce.

5.3.4. Regulace buněčného cyklu oxidativním stresem

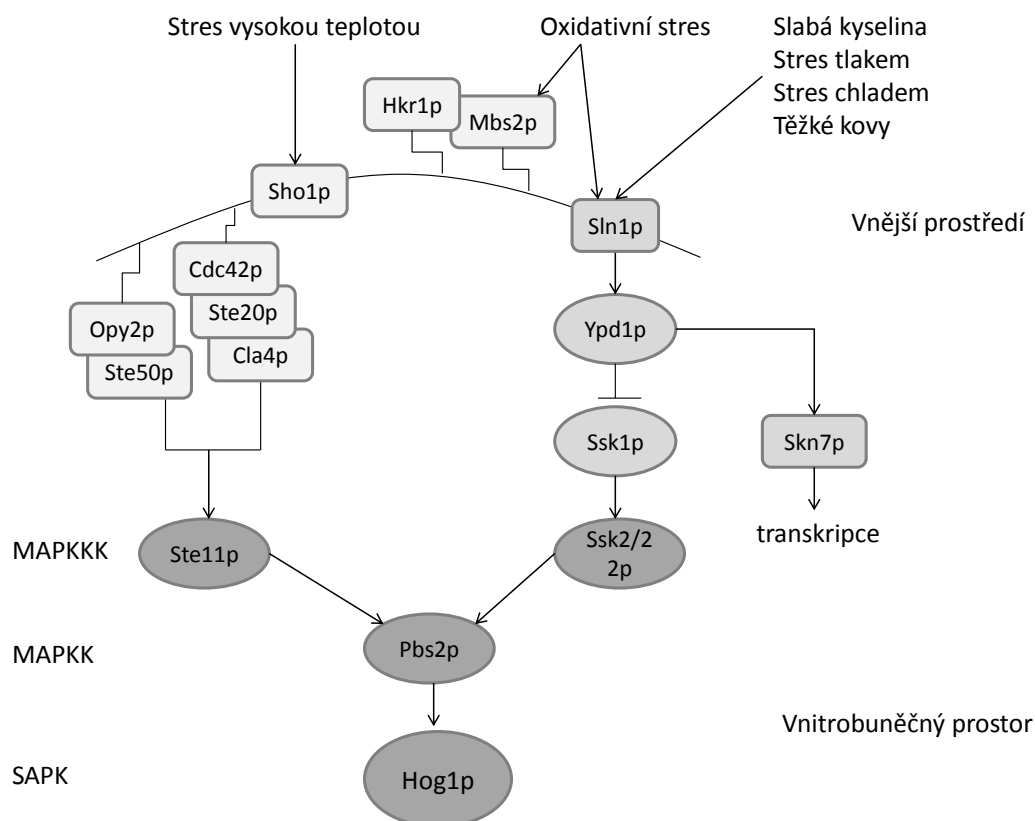
Buněčný cyklus kvasinkových buněk lze rozdělit na čtyři fáze: G₁, S (fáze syntézy DNA), G₂ a M (mitóza). Přejít do následující fáze ovlivňují cyklin dependentní kináza a cykliny specifické pro každou fázi. Kontrolním bodem vstupu buněk *Saccharomyces*

cerevisiae do buněčného cyklu je tzv. „start“, který reguluje vstup z G₁ do S fáze (Sveiczet et al., 2004). V podmínkách velkého oxidativního stresu je buněčný cyklus narušen, zastaví se před vstupem do S fáze, což naznačuje redoxní regulaci v kontrolním bodě (Chiu et al., 2011)

Expresí cyklinů je v buňkách regulována. Klíčovým regulátorem exprese cyklinů pozdní G₁ fáze (Cln1p a Cln2p) jsou komplexy SBF a MBF. SBF komplex je složen z Swi6p/Swi4p transkripčních faktorů, MBF komplex z Swi6p/Mbp1p transkripčních faktorů (Simon et al., 2001). Na rozdíl od Swi4p a Mbp1p je Swi6p zapojen do odpovědi na oxidativní stres. Swi6p obsahuje cystein Cys-404, jehož postranní řetězec je během stresu oxidován na sulfenickou kyselinu. Oxidace zabraňuje expresi genů kódujících cykliny důležité pro vstup do S fáze a buněčný cyklus je zastaven v G₁ fázi. Díky tomuto mechanismu mají obranné systémy možnost redukce poškozených proteinů, DNA a lipidů a nedochází k jejich pučení během nefyziologických redoxních podmínek (Fong et al., 2008; Chiu et al., 2011).

7.2.4 Regulace Hog1p SAPK

Stresem aktivované protein kinázy SAPK („stress-activated protein kinases“) jsou velice důležitou součástí stresové odpovědi buněk. Patří do MAP („mitogen activated protein“) kinázové rodiny. Signální kaskáda začíná aktivací MAPKK kinázy (MAPKKK), která fosforylací aktivuje MAPK kinázu (MAPKK). Fosforylovaná MAPK kináza aktivuje SAPK. Fosforylovaná SAKP dále fosforyluje mnoho substrátů včetně transkripčních faktorů a regulátorů buněčného cyklu, a tak zajišťuje velice komplexní odpověď buňky (Smith et al., 2010).



Obr.:4 Překresleno podle (Smith et al., 2010). Signální dráhy spouštějící odpověď na různé stresové podmínky. Znak \perp znamená defosforylaci, znak \downarrow fosforylaci. Ssk1p je aktivní v defosforylované formě, ostatní proteiny dráhy jsou aktivní ve fosforylované formě.

Role Hog1p signální dráhy během působení oxidativního stresu není jasná. Výsledky ukazující že mutanti *sln1p*, *ssk1p*, *hog1p* a *pbs2p* jsou hypersenzitivní k oxidativnímu stresu vyvolanému H_2O_2 (jinými oxidanty ne) naznačují, že Hog1p dráha se účastní odpovědi na stres. Mutanti *sho1Δ* hypersenzitivní nejsou, odpovědi na stres vyvolaný peroxidem vodíku se dráha aktivovaná Sho1p receptorem neúčastní. V souladu s pozorovanou účastí Hog1p je i aktivace Skn7p transkripčního faktoru, který spouští transkripci genů důležitých při buněčné stresové odpovědi. Na druhou stranu existují výsledky, které ukazují, že se Hog1p dráha odpovědi na redoxní stres neúčastní. Oxidativní stres vyvolaný peroxidem vodíku nezvýší množství fosforylovaných Hog1p kináz, takže nejsou aktivovány a nemohou dále fosforylovat substráty. Práce o čtyři roky novější naopak ukazuje, že se během oxidativního stresu množství fosforylovaných Hog1p rapidně zvýší a proto se tato dráha stresové odpovědi účastní (Bilsland et al., 2004; Schuller et al., 1994; Singh, 2000).

8 Závěr

Práce stručně shrnuje současné znalosti o ROS molekulách a jimi vyvolaném poškození. Důraz klade na signalizační roli ROS a ochranné mechanismy modelového kvasinkového organismu *Saccharomyces cerevisiae*.

Největší pozornost z hlediska role oxidativního stresu vždy samozřejmě byla věnována lidskému organismu. Nicméně řada důležitých poznatků byla získána i na modelových organizmech včetně kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, jejíž manipulace jsou relativně jednoduché a umožňují snadnou přípravu mutovaných kmenů různě reagujících na stresové podmínky. Výsledky mnoha studií ukazují na důležitost cysteinových zbytků jako „cíle“ oxidativního stresu a v posledních letech se zájem obrací především na specifické změny vyvolané ROS, které následně vedou k změnám aktivit konkrétních enzymů, transkripčních faktorů a proteinů, a fungují tedy v buněčné signalizaci.

V minulosti většina studií bohužel pracovala s koncentracemi oxidantů, které jsou pro buňky letální. Proto není nyní úplně jasné, které buněčné procesy a signální dráhy jsou během fyziologického oxidativního stresu zapojeny do buněčné odpovědi a jsou významné během nemocí a stárnutí. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že zájem a budoucí výzkum se budou stále více orientovat na studium signalizačních rolí neletálních množství ROS.

9 Seznam užité literatury

Alves, R., Herrero, E., and Sorribas, A. (2004). Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism. II. Role of glutaredoxin Grx5. *Proteins* 57, 481-492.

Avery, A.M., and Avery, S.V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *The Journal of biological chemistry* 276, 33730-33735.

Bao, R., Zhang, Y., Lou, X., Zhou, C.Z., and Chen, Y. (2009). Structural and kinetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* thioredoxin Trx1: implications for the catalytic mechanism of GSSG reduced by the thioredoxin system. *Biochimica et biophysica acta* 1794, 1218-1223.

Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87, 245-313.

Bedard, K., Lardy, B., and Krause, K.H. (2007). NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* 89, 1107-1112.

Benaroudj, N., Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *The Journal of biological chemistry* 276, 24261-24267.

Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 272, 20313-20316.

Birmingham-McDonogh, O., Gralla, E.B., and Valentine, J.S. (1988). The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 4789-4793.

Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., and Sunnerhagen, P. (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Molecular microbiology* 53, 1743-1756.

Bloomfield, G., and Pears, C. (2003). Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*. *Journal of cell science* 116, 3387-3397.

Brown, D.I., and Griendling, K.K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free radical biology & medicine* 47, 1239-1253.

Bucciarelli, T., Saliola, M., Brisdelli, F., Bozzi, A., Falcone, C., Di Ilio, C., and Martini, F. (2009). Oxidation of Cys278 of ADH I isozyme from *Kluyveromyces lactis* by naturally occurring disulfides causes its reversible inactivation. *Biochimica et biophysica acta* 1794, 563-568.

Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 275, 27393-27398.

- Cai, H., Li, Z., Davis, M.E., Kanner, W., Harrison, D.G., and Dudley, S.C., Jr. (2003). Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Molecular pharmacology* 63, 325-331.
- Clempus, R.E., Sorescu, D., Dikalova, A.E., Pounkova, L., Jo, P., Sorescu, G.P., Schmidt, H.H., Lassegue, B., and Griendling, K.K. (2007). Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 42-48.
- Costa, V., and Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular aspects of medicine* 22, 217-246.
- Cyrne, L., Antunes, F., Sousa-Lopes, A., Diaz-Berrio, J., and Marinho, H.S. (2010). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is largely unresponsive to low regulatory levels of hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC biochemistry* 11, 49.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., and Toledano, M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471-481.
- Demasi, M., Silva, G.M., and Netto, L.E. (2003). 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *The Journal of biological chemistry* 278, 679-685.
- Dikalov, S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free radical biology & medicine* 51, 1289-1301.
- Finegold, A.A., Shatwell, K.P., Segal, A.W., Klausner, R.D., and Dancis, A. (1996). Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry* 271, 31021-31024.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology* 15, 247-254.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology* 194, 7-15.
- Fong, C.S., Temple, M.D., Alic, N., Chiu, J., Durchdewald, M., Thorpe, G.W., Higgins, V.J., and Dawes, I.W. (2008). Oxidant-induced cell-cycle delay in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the SWI6 transcription factor. *FEMS yeast research* 8, 386-399.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., *et al.* (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442-446.
- Forman, H.J., Maiorino, M., and Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49, 835-842.

Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of experimental biology* 201, 1203-1209.

Gabig, T.G., English, D., Akard, L.P., and Schell, M.J. (1987). Regulation of neutrophil NADPH oxidase activation in a cell-free system by guanine nucleotides and fluoride. Evidence for participation of a pertussis and cholera toxin-insensitive G protein. *The Journal of biological chemistry* 262, 1685-1690.

Gan, Z.R. (1991). Yeast thioredoxin genes. *The Journal of biological chemistry* 266, 1692-1696.

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

Gessler, N.N., Aver'yanov, A.A., and Belozerskaya, T.A. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry Biokhimiia* 72, 1091-1109.

Grant, C.M., Quinn, K.A., and Dawes, I.W. (1999). Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Molecular and cellular biology* 19, 2650-2656.

Griendling, K.K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research* 86, 494-501.

Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D.H., and Huber, R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10976-10983.

Guidot, D.M., McCord, J.M., Wright, R.M., and Repine, J.E. (1993). Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. *The Journal of biological chemistry* 268, 26699-26703.

Gutteridge, B.H.a.J.M.C. (2007). Free radicals in biology and medicine.

Hekimi, S., Lapointe, J., and Wen, Y. (2011). Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in cell biology* 21, 569-576.

Herrero, E., Belli, G., and Casa, C. (2010). Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Current protein & peptide science* 11, 659-668.

Herrero, E., Ros, J., Belli, G., and Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 1217-1235.

Hwang, C.S., Rhie, G., Kim, S.T., Kim, Y.R., Huh, W.K., Baek, Y.U., and Kang, S.O. (1999). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochimica et biophysica acta* 1427, 245-255.

- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., and Schumacker, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11715-11720.
- Chen, J.H., Hales, C.N., and Ozanne, S.E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic acids research* 35, 7417-7428.
- Chiu, J., Tactacan, C.M., Tan, S.X., Lin, R.C., Wouters, M.A., and Dawes, I.W. (2011). Cell cycle sensing of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidation of a specific cysteine residue in the transcription factor Swi6p. *The Journal of biological chemistry* 286, 5204-5214.
- Chuang, T.H., Bohl, B.P., and Bokoch, G.M. (1993). Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation. *The Journal of biological chemistry* 268, 26206-26211.
- Inai, Y., and Nishikimi, M. (2002). Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26 S proteasome assembly. *Archives of biochemistry and biophysics* 404, 279-284.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., and Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 274, 27002-27009.
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal* 320 (Pt 1), 61-67.
- Jahngen-Hodge, J., Obin, M.S., Gong, X., Shang, F., Nowell, T.R., Jr., Gong, J., Abasi, H., Blumberg, J., and Taylor, A. (1997). Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 272, 28218-28226.
- Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.
- Klatt, P., and Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 4928-4944.
- Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, T., Curnutte, J.T., and Bokoch, G.M. (1991). Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254, 1512-1515.
- Kornitzer, D., and Ciechanover, A. (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *Journal of cellular physiology* 182, 1-11.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., and Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Molecular and cellular biology* 21, 6139-6150.

- Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO journal* *16*, 1710-1720.
- Lalucque, H., and Silar, P. (2003). NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends in microbiology* *11*, 9-12.
- Lapinskas, P.J., Cunningham, K.W., Liu, X.F., Fink, G.R., and Culotta, V.C. (1995). Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Molecular and cellular biology* *15*, 1382-1388.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K.U., and Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Molecular microbiology* *39*, 1166-1173.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M.B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of biological chemistry* *274*, 16040-16046.
- Lesuisse, E., Casteras-Simon, M., and Labbe, P. (1996). Evidence for the *Saccharomyces cerevisiae* ferrireductase system being a multicomponent electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* *271*, 13578-13583.
- Lewis, J.G., Learmonth, R.P., Attfield, P.V., and Watson, K. (1997). Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* *18*, 30-36.
- Lim, K.S., Jeyaseelan, K., Whiteman, M., Jenner, A., and Halliwell, B. (2005). Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1042*, 210-220.
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular biology of the cell* *9*, 1081-1091.
- MacLean, M., Harris, N., and Piper, P.W. (2001). Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast* *18*, 499-509.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G., and Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal genetics and biology : FG & B* *41*, 982-997.
- Missall, T.A., Lodge, J.K., and McEwen, J.E. (2004). Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryotic cell* *3*, 835-846.
- Mohr, S., McCormick, T.S., and Lapetina, E.G. (1998). Macrophages resistant to endogenously generated nitric oxide-mediated apoptosis are hypersensitive to exogenously added nitric oxide donors: dichotomous apoptotic response independent of caspase 3 and reversal by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD 098059.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 5045-5050.

Moye-Rowley, W.S., Harshman, K.D., and Parker, C.S. (1989). Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes & development* 3, 283-292.

Muller, E.G. (1996). A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Molecular biology of the cell* 7, 1805-1813.

Obin, M., Shang, F., Gong, X., Handelman, G., Blumberg, J., and Taylor, A. (1998). Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12, 561-569.

Ohtake, Y., A. Satou, S. Yabuuchi (1990). Isolation and characterization of glutathione biosynthesis-deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and biological chemistry* 54, 3145-3150.

Okazaki, S., Tachibana, T., Naganuma, A., Mano, N., and Kuge, S. (2007). Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal. *Molecular cell* 27, 675-688.

Owusu-Ansah, E., and Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537-541.

Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W., and Kim, I.H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 275, 5723-5732.

Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.A., Wright, A.P., and Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 274, 6366-6373.

Quinn, M.T., Evans, T., Loetterle, L.R., Jesaitis, A.J., and Bokoch, G.M. (1993). Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *The Journal of biological chemistry* 268, 20983-20987.

Rodriguez-Manzanegue, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 19, 8180-8190.

Salsbury, F.R., Jr., Knutson, S.T., Poole, L.B., and Fetrow, J.S. (2008). Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Protein science : a publication of the Protein Society* 17, 299-312.

Seshiah, P.N., Weber, D.S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., and Griendling, K.K. (2002). Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circulation research* 91, 406-413.

- Shang, F., Gong, X., and Taylor, A. (1997). Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated. *The Journal of biological chemistry* 272, 23086-23093.
- Shenton, D., and Grant, C.M. (2003). Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal* 374, 513-519.
- Shenton, D., Perrone, G., Quinn, K.A., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (2002). Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 277, 16853-16859.
- Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., and Davies, K.J. (2003). Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278, 311-318.
- Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine* 30, 1191-1212.
- Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C., and Ruis, H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *The EMBO journal* 13, 4382-4389.
- Silva, G.M., Netto, L.E., Discola, K.F., Piassa-Filho, G.M., Pimenta, D.C., Barcena, J.A., and Demasi, M. (2008). Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. *The FEBS journal* 275, 2942-2955.
- Silva, G.M., Netto, L.E., Simoes, V., Santos, L.F., Gozzo, F.C., Demasi, M.A., Oliveira, C.L., Bicev, R.N., Klitzke, C.F., Sogayar, M.C., *et al.* (2012). Redox Control of 20S Proteasome Gating. *Antioxidants & redox signaling* 16, 1183-1194.
- Simon, I., Barnett, J., Hannett, N., Harbison, C.T., Rinaldi, N.J., Volkert, T.L., Wyrick, J.J., Zeitlinger, J., Gifford, D.K., Jaakkola, T.S., *et al.* (2001). Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell* 106, 697-708.
- Singh, K.K. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free radical biology & medicine* 29, 1043-1050.
- Smith, D.A., Morgan, B.A., and Quinn, J. (2010). Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways. *FEMS microbiology letters* 306, 1-8.
- Stadtman, E.R. (1995). Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. *Methods in enzymology* 258, 379-393.
- Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R., and Culotta, V.C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *The Journal of biological chemistry* 276, 38084-38089.

- Sveiczzer, A., Tyson, J.J., and Novak, B. (2004). Modelling the fission yeast cell cycle. *Briefings in functional genomics & proteomics* 2, 298-307.
- Takemoto, D., Tanaka, A., and Scott, B. (2006). A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis. *The Plant cell* 18, 2807-2821.
- Takemoto, D., Tanaka, A., and Scott, B. (2007). NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal genetics and biology : FG & B* 44, 1065-1076.
- Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohe, L., and Radi, R. (2007). Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. *Sub-cellular biochemistry* 44, 83-113.
- Ushio-Fukai, M., Griending, K.K., Becker, P.L., Hilenski, L., Halleran, S., and Alexander, R.W. (2001). Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21, 489-495.
- Waypa, G.B., Guzy, R., Mungai, P.T., Mack, M.M., Marks, J.D., Roe, M.W., and Schumacker, P.T. (2006). Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation research* 99, 970-978.
- Winterbourn, C.C., and Metodiewa, D. (1995). Reaction of superoxide with glutathione and other thiols. *Methods in enzymology* 251, 81-86.
- Winterbourn, C.C., and Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free radical biology & medicine* 27, 322-328.
- Yan, C., Lee, L.H., and Davis, L.I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *The EMBO journal* 17, 7416-7429.
- Zechmann, B., Liou, L.C., Koffler, B.E., Horvat, L., Tomasic, A., Fulgosi, H., and Zhang, Z. (2011). Subcellular distribution of glutathione and its dynamic changes under oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 11, 631-642.