

**Regulación por estrés oxidativo de la
actividad del factor de transcripción
Pap1 de *Schizosaccharomyces pombe*.**

Esther Castillo Andreo

Tesis Doctoral

**Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra
Barcelona, 2005**

Esther Castillo Andreo
Tesis Doctoral

**Regulación por estrés oxidativo de la
actividad del factor de transcripción
Pap1 de *Schizosaccharomyces pombe*.**

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

**Trabajo dirigido por la Dra. Elena Hidalgo Hernando
Unitat de Senyalització Cel.lular**

**Departament de Ciències Experimentals i de la Salut (CEXS)
Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida de la Universitat
Pompeu Fabra 2000-2002**

Dipòsit legal: B.46776-2005
ISBN: 84-689-5222-2

ÍNDICE

PRÓLOGO	1
INTRODUCCIÓN	5
1.- Especies reactivas del oxígeno (ROS).	7
1.1.- Principales fuentes generadoras de ROS.	7
1.2.- Efectos nocivos de las ROS.	9
2.- Actividades enzimáticas antioxidantes.	11
2.1.- Superóxido dismutasa (SOD).	12
2.2.- Catalasa, Glutaciona peroxidasa (GPx) y Peroxirredoxina (Prx).	13
2.3.- Glutaciona S-transferasa (GST).	16
2.4.- Sistema glutaciona (GSH/GSSG).	17
2.5.- Sistema glutarredoxina (Grx).	18
2.6.- Sistema tiorredoxina.	19
3.- Estrés oxidativo y respuestas celulares a estrés oxidativo.	20
3.1.- Sensores de estrés oxidativo en <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.- Sensores de estrés oxidativo en organismos eucariotas.	22
3.3.- Modificaciones inducidas por H ₂ O ₂ en proteínas sensoras.	24
4.- <i>Schizosaccharomyces pombe</i>: sistema modelo para el estudio de la respuesta a estrés oxidativo en eucariotas.	25
4.1.- El factor de transcripción Pap1 como sensor de estrés oxidativo en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	26
4.1.1.- Aislamiento y caracterización de Pap1; genes Pap1-dependientes.	27
4.1.2.- Regulación de la actividad de Pap1 por cambios en su localización subcelular. Efecto de los agentes oxidantes H ₂ O ₂ y dietilmaleato (DEM).	28
4.1.2.1.- Señales que inducen la acumulación nuclear de Pap1: H ₂ O ₂ y DEM.	29
4.1.2.2.- Maquinaria de exporte nuclear eucariota. Papel de Ran, Crm1 y proteínas asociadas.	30
4.1.2.3.- Maquinaria de exporte nuclear en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	33
4.2.- MAPK Sty1: papel en la respuesta a estrés oxidativo.	34
OBJETIVOS	37
METODOLOGÍA y RESULTADOS	41

1.- Papel de los residuos de cisteína de Pap1 en la respuesta a dos oxidantes diferentes: H₂O₂ y dietilmaleato (DEM).	43
1.1.- Metodología.....	43
1.2.- Resultados.....	47
2.- Papel de la proteína Hba1 en la regulación de la actividad de Pap1.	85
2.1.- Metodología.....	85
2.2.- Resultados.....	89
DISCUSIÓN	103
1.- La actividad transcripcional de Pap1 está regulada exclusivamente a nivel de localización celular a través de su exporte mediado por Crm1.	105
2.- El factor de transcripción Pap1 como sensor de H₂O₂: formación de un puente disulfuro intramolecular.	109
3.- Dietilmaleato (DEM) modifica los residuos de cisteína del dominio CRD de Pap1 por la formación de un tioéter.	112
4.- Caracterización del exporte nuclear dependiente de Crm1: la proteína Hba1 como cofactor de exporte.	115
5.- MAPK Sty1 y factor de transcripción Pap1: papel en la respuesta antioxidante y en la resistencia a multidrogas.	121
6. Los organismos modelo <i>Schizosaccharomyces pombe</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la respuesta a estrés.	124
6.1. Sensores específicos de estrés oxidativo en levaduras: Pap1 de <i>S. pombe</i> y Yap1 de <i>S. cerevisiae</i>	124
6.2. Rutas de la MAPK Sty1 y MAPK Hog1: respuesta global a estrés y respuesta específica a estrés osmótico.	126
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	135

PRÓLOGO

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}) son potentes oxidantes generados a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular. Debido a la elevada toxicidad de estas ROS al reaccionar con biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA e inactivar su función, las células han desarrollado actividades enzimáticas que se encargan de mantener niveles inocuos de estos oxidantes. Se llama estrés oxidativo a la situación en la cual se produce un incremento en la concentración intracelular de ROS como consecuencia de un aumento en la generación o una disminución en la degradación de las mismas. En respuesta a estrés oxidativo, la célula activa rutas de señalización y factores de transcripción específicos que activan la expresión de proteínas antioxidantes encargadas de reestablecer los niveles redox intracelulares y de reparar los desperfectos causados por estos oxidantes.

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

El factor de transcripción Pap1, de localización citoplasmática basal, se acumula en el núcleo en respuesta a estrés oxidativo debido a la inhibición del transporte nuclear mediado por el exportador Crm1. En el momento de comenzar mi Tesis Doctoral, se desconocía el mecanismo por el cual ciertos oxidantes como H_2O_2 y dietilmaleto (DEM) inhibían este transporte nuclear. Los resultados obtenidos indican que Pap1 utiliza mecanismos moleculares diferentes para la respuesta a ambos oxidantes: H_2O_2 oxida de forma reversible dos residuos de cisteína del factor de transcripción induciendo, seguramente, la formación de un puente disulfuro intramolecular, mientras que, DEM actúa como un agente

alquilante que modifica de forma irreversible los residuos de cisteína del dominio C-terminal de Pap1.

Tras su acumulación nuclear inducida por estrés oxidativo, Pap1 activa la transcripción de sus genes diana implicados en la respuesta antioxidante y en la resistencia a multidrogas. Por este motivo, *pap1* que codifica para este factor de transcripción, fue aislado como un gen que, en elevado número de copias confería a las células un fenotipo de resistencia a drogas como estaurosporina. Todos aquellos genes aislados por su implicación en la resistencia a multidrogas como *crm1*, *trr1* o *pad1*, codificaban para proteínas relacionadas con la actividad transcripcional de Pap1, excepto *hba1* que codificaba para una proteína con un dominio de unión a Ran (*Ran-binding domain*), Hba1, cuya actividad no había sido inicialmente relacionada con Pap1. Uno de los objetivos de mi trabajo experimental era el de determinar el papel de la proteína Hba1 en la regulación de la actividad de Pap1.

Nuestros resultados indican que la proteína Hba1, localizada en el nucleoplasma de la célula, participa en el transporte nuclear mediado por Crm1 de ciertas proteínas como el factor de transcripción Pap1 y la MAPK Sty1, aunque no de otras como la proteína PKI. Por ello, la pérdida de función de Hba1, por sobreexpresión o delección del gen *hba1*, induce la localización nuclear constitutiva de Pap1 y Sty1 en ausencia de estrés. Esta localización nuclear de Pap1 es suficiente para la activación transcripcional de sus genes diana. Por lo tanto, el fenotipo de resistencia aumentada a multidrogas de las cepas en las que se ha perdido la actividad de la proteína Hba1, es debido a la acumulación de Pap1 en el núcleo en condiciones de no-estrés.

INTRODUCCIÓN

1.- Especies reactivas del oxígeno (ROS).

La vida en condiciones aeróbicas tiene como consecuencia inevitable la producción de formas parcialmente reducidas del oxígeno (O_2) llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS) que, debido a su alta reactividad y poder oxidante, son nocivas para la célula (Sies, 1991). Estas ROS incluyen superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Fig. 1); este último, aunque su difusión dentro de la célula es limitada, puede reaccionar con la mayoría de las biomoléculas inactivando su función. La toxicidad de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ es menor ya que la primera es menos reactiva debido a la estabilidad de su enlace oxígeno-oxígeno, y la segunda contiene una carga negativa que le impide atravesar membranas así como oxidar moléculas ricas en electrones (Imlay, 2003). $O_2^{\cdot-}$ también puede reaccionar con radicales como el óxido nítrico (NO^{\cdot}) generando peroxinitrito ($OONO^-$), precursor de otros potentes oxidantes que reciben el nombre de especies reactivas del nitrógeno (RNS) (Beckman, 1996). Por este motivo, la generación de ROS va inevitablemente unida a la producción de RNS.

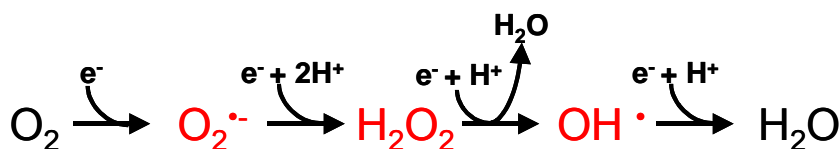


Figura 1. Las especies reactivas del oxígeno (ROS), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular (O_2).

1.1.- Principales fuentes generadoras de ROS.

El O_2 tiene poca afinidad por el primer electrón a captar por lo que sólo reacciona con aquellos transportadores de electrones en los cuales los estados de oxidación univalentes sean estables. En los sistemas biológicos, los

candidatos más probables son los centros de hierro-sulfuro, grupos hemo, quinonas y flavinas que, al transferir electrones de forma univalente, son capaces de ceder ese primer electrón al O_2 . Estos grupos se encuentran principalmente a nivel de la cadena respiratoria de procariotas y eucariotas, lo que la convierte en una de las principales fuentes intracelulares de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 .

Análisis *in vitro* e *in vivo* de la cadena respiratoria de la bacteria *Escherichia coli* indican que $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 son generados principalmente por la autooxidación de deshidrogenasas reducidas (Messner and Imlay, 2002). La NADH deshidrogenasa II es la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$, mientras que la NADH deshidrogenasa I, el homólogo bacteriano del complejo I mitocondrial, contribuye en menor medida a su producción. La enzima succinato deshidrogenasa, así como su isoforma sintetizada en condiciones anaeróbicas, fumarato reductasa, son también generadoras de $O_2^{\cdot-}$. Estas enzimas contienen flavinas que se reducen y transfieren un electrón al siguiente componente de la cadena respiratoria que puede contener un grupo hierro-sulfuro o una quinona unida. Sin embargo, y debido a que las flavinas se encuentran accesibles en la superficie de la proteína, el O_2 puede interactuar con la forma reducida de la flavina antes de que ésta transfiera los electrones al siguiente transportador y ser reducido a $O_2^{\cdot-}$. En muchos de los casos, puede transferirse un segundo electrón al $O_2^{\cdot-}$ antes de que éste abandone el sitio activo, produciéndose H_2O_2 (Messner and Imlay, 2002).

En las células eucariotas, el complejo I (NADH deshidrogenasa), el complejo II (que contiene la succinato deshidrogenasa) y el complejo III (ubiquinona-citocromo c reductasa) de la cadena respiratoria (Turrens, 2003) así como las reacciones detoxificadoras del citocromo P450 (Coon et al., 1992) parecen ser las principales fuentes de $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 2).

A partir del $O_2^{\cdot-}$ generado a nivel de la cadena de transporte de electrones, por dismutación espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), se genera H_2O_2 el cual, en presencia de iones metálicos como Fe^{2+} o Cu^+ , puede reducirse y formar el radical OH^{\cdot} , por la llamada reacción de Fenton. El $O_2^{\cdot-}$ potencia la producción de radicales OH^{\cdot} ya que puede actuar como fuente de electrones para la reducción de los iones metálicos. Sin embargo, también existen fuentes de H_2O_2 independientes de la producción de $O_2^{\cdot-}$; por ejemplo, en las células eucariotas, los peroxisomas, orgánulos que

contienen flavin oxidasas (como acil-CoA oxidasa), generan H_2O_2 como consecuencia de procesos como la β -oxidación de ácidos grasos (Chance et al., 1979) (Fig. 2).

Además de las fuentes intracelulares, existen compuestos generadores de $O_2^{\cdot -}$ como menadiona o paraquat que atraviesan la membrana celular y producen un aumento intracelular de este oxidante mediante un proceso denominado *redox-cycling*. Estos compuestos se reducen a expensas del NADPH y NADH intracelulares, y seguidamente, son oxidados por el O_2 , generandose $O_2^{\cdot -}$ (Hassan and Fridovich, 1979; Kappus and Sies, 1981) (Fig. 2).

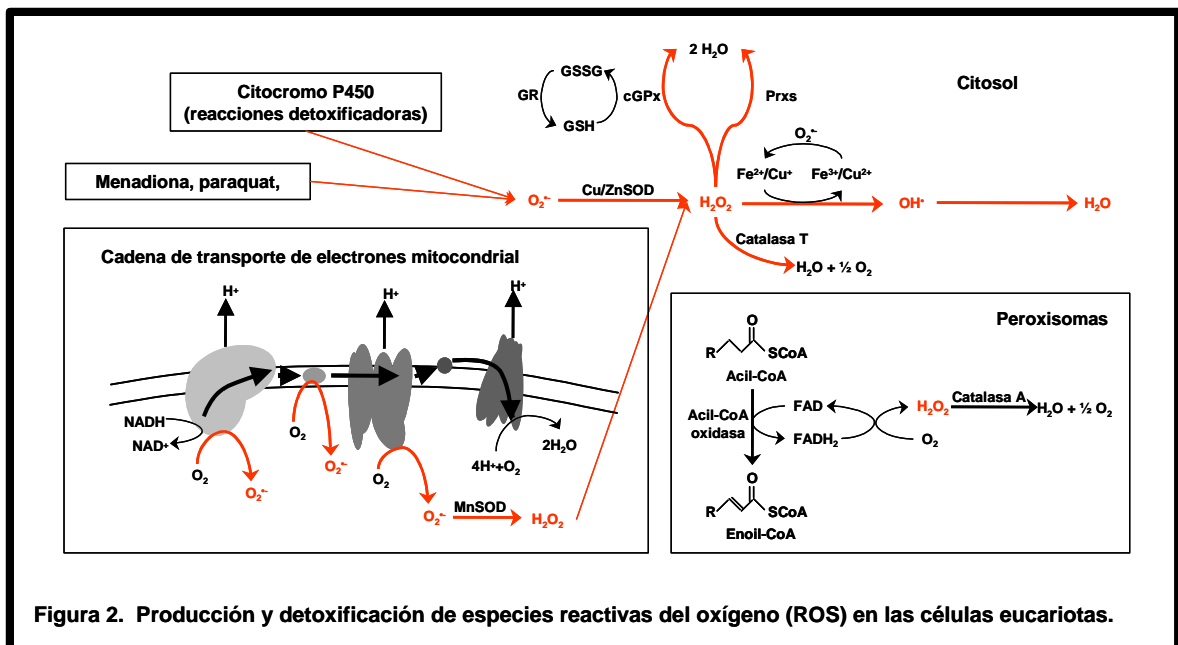


Figura 2. Producción y detoxificación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células eucariotas.

1.2.- Efectos nocivos de las ROS.

Niveles elevados de ROS son perjudiciales para la célula debido a que pueden reaccionar con biomoléculas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas e inactivar su función. La más reactiva de estas ROS es el radical OH^{\cdot} , un poderoso oxidante que, aunque de difusión celular limitada, puede dañar la mayoría de los compuestos orgánicos (Czapski, 1984). Este radical OH^{\cdot} puede atacar directamente los lípidos de membrana, e iniciar su peroxidación, proceso que tiene como consecuencia la disminución en la fluidez de la membrana y,

con ello, la alteración de sus propiedades e interacción con proteínas. Además, durante este proceso de peroxidación se generan productos de degradación (por ejemplo aldehidos), altamente reactivos que pueden dañar otras moléculas como proteínas. Sin embargo, una de las dianas más importantes del OH^\bullet es el DNA, ya que éste es capaz de unir iones metálicos como hierro que favorecen la producción de este radical libre mediante la reacción de Fenton (Rai et al., 2001). El radical OH^\bullet generado puede atacar tanto la base nitrogenada como el azúcar (deoxirribosa) de la molécula de DNA, produciendo roturas en una o ambas cadenas del ácido nucleico, aductos entre la base nitrogenada y el azúcar, y uniones covalentes con proteínas con las que está interaccionando. Todas estas modificaciones pueden resultar en mutagénesis o en un bloqueo del proceso de replicación del DNA (Sies, 1993; Sies and Menck, 1992).

El efecto más nocivo de $\text{O}_2^{\bullet-}$ es el de inactivar ciertos enzimas con centros de hierro-sulfuro (Fe-S) debido a su tendencia a ser electrostáticamente atraído al átomo de hierro de estos centros catalíticos. Tras la unión, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ oxida de forma univalente el centro Fe-S, que en su forma oxidada es inestable y se degrada (Flint et al., 1993). El hierro liberado de estos centros Fe-S dañados puede inducir mutagénesis, por lo que la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ está también relacionada con una alta tasa de mutación (Farr et al., 1986).

H_2O_2 , aunque es menos reactivo que $\text{O}_2^{\bullet-}$ y OH^\bullet , puede, debido a su elevada capacidad de difusión, reaccionar con gran cantidad de biomoléculas e inactivar su función. H_2O_2 puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos e inducir la introducción de grupos carbonilo (Stadtman and Levine, 2003) y al igual que $\text{O}_2^{\bullet-}$, puede oxidar directamente enzimas con grupos hierro-sulfuro (Flint et al., 1993). Generalmente, estas modificaciones conllevan una alteración en la estructura de la proteína que conduce a la pérdida de función o actividad; sin embargo, también se han descrito modificaciones reversibles inducidas por H_2O_2 que no suponen pérdida de función: la oxidación de metionina a metionina sulfóxido y ciertos estados de oxidación de residuos de cisteína. La oxidación de metionina a metionina sulfóxido es reversible gracias a la actividad de la enzima metionina sulfóxido reductasa, lo que ha hecho pensar que estos residuos, situados principalmente en la superficie de la proteína, podrían utilizarse para evitar el daño oxidativo a

otros residuos esenciales (Garner et al., 1998; Levine et al., 1996; Sigalov and Stern, 1998) o para regular la actividad de ciertas proteínas (Ciorba et al., 1997). H_2O_2 puede oxidar de forma irreversible el grupo tiol (R-SH) de los residuos de cisteína generándose estados altos de oxidación como sulfinicos (R-SO₂H) y sulfónicos (R-SO₃H) que producen la inactivación de la proteína; sin embargo, esta oxidación también puede ser reversible por la formación de grupos sulfénicos (R-SOH) que pueden reducirse de nuevo al grupo tiol (R-SH) o bien reaccionar con otras cisteínas cercanas y formar puentes disulfuro intra o intermoleculares. Esta reversibilidad en la oxidación permite, como veremos posteriormente, modular actividades enzimáticas o regular la actividad de proteínas que actúan como sensores de ROS (ver apartado 3.3 de esta Introducción: “Modificaciones inducidas por H_2O_2 en proteínas sensoras”).

2.- Actividades enzimáticas antioxidantes.

En condiciones normales, la concentración intracelular de ROS se encuentra por debajo de los niveles tóxicos, debido a que la célula posee actividades enzimáticas que se encargan de eliminar estas ROS. Por ejemplo, el $O_2^{\cdot-}$ generado en el interior de la célula es rápidamente eliminado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fig. 2). De forma similar, las actividades enzimáticas catalasa (Fig.2), glutatona peroxidasa (GPx) (Fig. 2, Fig. 4), y peroxirredoxina (Prx) (Fig. 2, Fig.3) son las encargadas de mantener niveles no tóxicos de H_2O_2 y otros peróxidos.

Las células también han desarrollado actividades enzimáticas y no-enzimáticas que se encargan de reparar los daños causados por estas ROS; por ejemplo, los sistemas de la glutatona (Fig. 4), la glutarredoxina (Fig. 4) y la tiorredoxina (Fig.5) se encargan de reducir los puentes disulfuro generados por la oxidación de los residuos de cisteína de ciertas proteínas. Los sistemas de la glutatona y la tiorredoxina intervienen además en la reducción de peróxidos, ya que son necesarios para la actividad catalítica de las enzimas glutatona peroxidasa (GPx) y peroxirredoxinas (Prx).

2.1.- Superóxido dismutasa (SOD).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) se encarga de mantener concentraciones no-tóxicas de $O_2^{\cdot-}$ al catalizar la reacción de dismutación de dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 (Imlay and Fridovich, 1991) (Fig. 2). Existen diferentes isoformas de esta enzima SOD dependiendo de los iones metálicos que contienen en su centro activo: Cu,ZnSOD, FeSOD, MnSOD, Fe/MnSOD y NiSOD. La reacción catalizada por estas enzimas se realiza en dos pasos, cada uno de los cuales supone la entrada en el centro activo de una molécula de $O_2^{\cdot-}$. A pesar de la carga negativa de $O_2^{\cdot-}$, la entrada está potenciada porque el propio ión metálico genera una carga neta positiva que atrae electrostáticamente a su sustrato (Miller, 2004).

En las células eucariotas existen dos isoformas de la enzima SOD: MnSOD y Cu,ZnSOD (Fig. 2). MnSOD es una enzima tetramérica de localización mitocondrial, que contiene un ión de Mn(III) por subunidad (Fridovich, 1998). Por otra parte, la Cu,ZnSOD es una enzima dimérica de localización citoplasmática que contiene en su centro activo un ión de Zn(II) cuyo papel es esencialmente estructural y uno de Cu(II) cuya oxidación/reducción es importante para la actividad catalítica de la enzima. Ambos iones metálicos se encuentran ligados a un imidazolato que es importante para la conducción de protones.

Las células procariotas también expresan, principalmente, dos isoformas de la enzima SOD: la MnSOD y la FeSOD, aunque en el espacio periplasmático de *E. coli* se ha encontrado una tercera actividad SOD con propiedades similares a la Cu,ZnSOD eucariota (Benov and Fridovich, 1994). Al igual que la enzima eucariota, la MnSOD procariota contiene un ión de Mn(III) por subunidad. Ambas enzimas MnSOD procariota y eucariota están estrechamente relacionadas. La MnSOD de *E. coli*, cuya expresión está regulada transcripcionalmente por, al menos, seis sistemas de control (Compan and Touati, 1993), no se sintetiza en condiciones de anaerobiosis mientras que es inducida en presencia de oxígeno y por compuestos que aumentan la producción de $O_2^{\cdot-}$ intracelular como quinonas (Hassan and Fridovich, 1979).

A diferencia de la MnSOD, la FeSOD de *E. coli* es constitutiva y, por lo tanto, constituye un sistema de defensa basal incluso cuando la célula pasa a vivir en condiciones anaeróbicas, en las que es imposible evitar alguna exposición a O₂ (Fridovich, 1998).

2.2.- Catalasa, Glutaciona peroxidasa (GPx) y Peroxirredoxina (Prx).

Las enzimas catalasa, glutaciona peroxidasa (GPx) y peroxirredoxina (Prx) tienen actividad peroxidasa, por lo que se encargan de disminuir los niveles de H₂O₂ en la célula (Fig. 2).

La enzima catalasa protege a la célula de los efectos tóxicos del H₂O₂ al catalizar su descomposición en O₂ y H₂O (Fig. 2). Son enzimas homotetraméricas en las que cada monómero contiene un grupo Fe(III) en su centro catalítico y NADPH o un dominio de tipo flavodoxina, cuya función es la de prevenir la acumulación de una forma inactiva Fe(IV) de la enzima (Kirkman et al., 1987). Estas enzimas se caracterizan porque tienen una baja afinidad por el sustrato pero una eficiencia catalítica muy elevada; por este motivo, estas enzimas son excelentes reductoras de H₂O₂ en ambientes en los que la concentración de este oxidante es muy elevada, como por ejemplo, los peroxisomas de las células eucariotas. Por este motivo, en ciertos organismos eucariotas como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* encontramos una forma citoplasmática, catalasa T y una forma peroxisomal, la catalasa A de esta enzima (Fig. 2).

Las glutaciona peroxidadas y las peroxirredoxinas son enzimas que utilizan un residuo de cisteína para reducir peróxidos como H₂O₂ (Fig. 2). Las glutaciona peroxidadas (GPxs) son consideradas las peroxidadas más importantes ya que tienen una amplia especificidad de sustrato y una mayor afinidad por H₂O₂ que la enzima catalasa (Fig. 2). Dos de los principales tipos de GPx caracterizados en la célula son las GPx clásicas (cGPx) y la GPx específica de peróxidos de la membrana lipídica (PHGPx). cGPx es multimérica (normalmente tetramérica) y soluble, mientras que PHGPx es monomérica y se encuentra asociada a la membrana (Ursini et al., 1995). cGPx utiliza el sistema de la glutaciona como agente reductor mientras que la

reducción de PHGPx parece estar acoplada al sistema de la tioredoxina (Brigelius-Flohe, 1999; Delaunay et al., 2002; Herbette et al., 2002). PHGPx está considerada la principal actividad enzimática implicada en reparar la peroxidación de los lípidos de membrana (Halliwell, 1999).

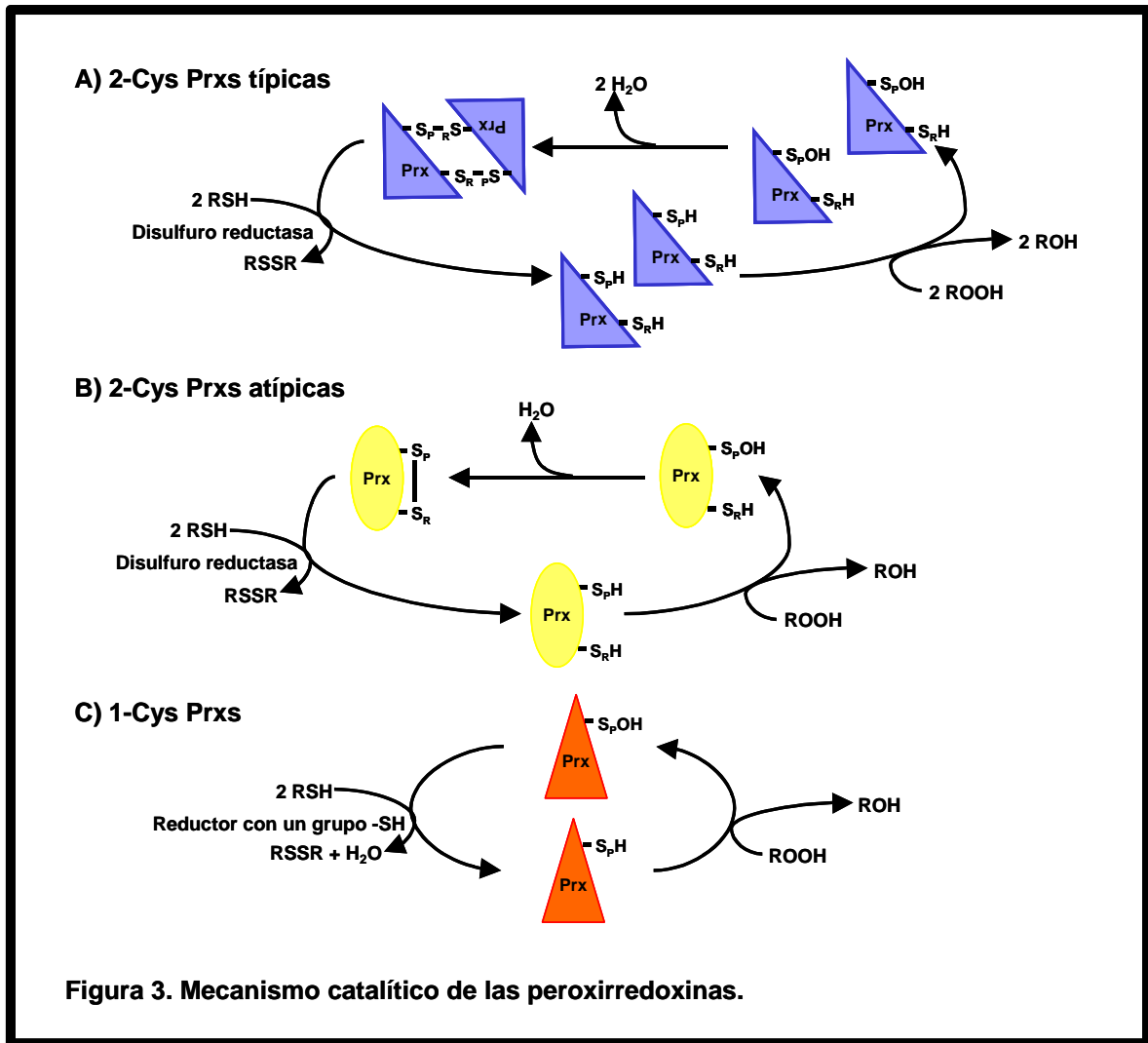


Figura 3. Mecanismo catalítico de las peroxirredoxinas.

Las peroxirredoxinas (Prx) son peroxidases que utilizan residuos de cisteína para reducir peróxidos como H₂O₂, peroxinitritos e hidroperóxidos orgánicos (Fig. 2). Estas enzimas están divididas en dos categorías, 1-Cys Prxs y 2-Cys Prxs, dependiendo del número de residuos de cisteína implicados en la catálisis (Chae and Rhee, 1994). La reacción peroxidasa se realiza en dos etapas esquematizadas en la figura 3, la primera de las cuales es común para todas las Prxs. En esta primera etapa un residuo de cisteína susceptible a oxidación/reducción, conocida como cisteína peroxidática (Cys-S_PH), ataca el

peróxido y es oxidada con la formación de un grupo sulfénico (Cys-S_POH) (Ellis and Poole, 1997). El segundo paso de la reacción peroxidasa, la resolución del grupo sulfénico de la cisteína peroxidática, permite clasificar a las Prxs en tres clases.

Las 2-Cys Prxs típicas (Fig. 3A), además de la cisteína peroxidática, contienen un segundo residuo de cisteína, la cisteína resolutoria (Cys-S_RH), implicada en el ciclo catalítico (Hofmann et al., 2002). Estas 2-Cys Prxs típicas son homodímeros obligados ya que el grupo sulfénico de la cisteína peroxidática de una subunidad es atacada por la cisteína resolutoria de la otra subunidad, generándose un puente disulfuro intermolecular. El ciclo catalítico se completa con la reducción del puente disulfuro intermolecular mediada por el sistema de la tiorredoxina o otra de las actividades disulfuro reductasa de la célula.

En la segunda clase de Prxs, las 2-Cys Prxs atípicas (Fig. 3B), el grupo sulfénico de la cisteína peroxidática es atacada por la cisteína resolutoria situada en la misma proteína, formándose un puente disulfuro intramolecular (Declercq et al., 2001; Seo et al., 2000). La forma reducida de la Prx se recupera utilizando el sistema de la tiorredoxina como actividad disulfuro reductasa (Seo et al., 2000).

El último tipo de Prxs, las 1-Cys Prxs (Fig. 3C), conserva sólo la cisteína peroxidática (Choi et al., 1998) cuyo grupo sulfénico probablemente formará un puente disulfuro transitorio con un dador de un grupo tiol, que posteriormente será reducido por un segundo dador de electrones con un grupo tiol, aunque su identidad no es conocida (Wood et al., 2003c).

Estas peroxirredoxinas pese a su baja eficiencia catalítica en comparación con catalasas y glutatióna peroxidasas (Hofmann et al., 2002), juegan un papel muy importante en la detoxificación de peróxidos debido a que son muy abundantes en la célula. Sin embargo, estudios recientes parecen indicar que la función de estas enzimas en las células eucariotas no es únicamente la de peroxidasa. Las 2-Cys Prxs típicas eucariotas, a diferencia de las procariotas, tienen una alta susceptibilidad a ser inactivadas por la sobreoxidación a grupo sulfínico (R-SO₂H) del grupo tiol de la cisteína peroxidática (Wood et al., 2003b; Yang et al., 2002). Esta inactivación es reversible ya que han sido identificadas actividades enzimáticas que son capaces de reducir este grupo sulfínico (R-

SO₂H): la enzima sulfirredoxina (Srx1) de *S. cerevisiae* (Biteau et al., 2003) y las enzimas PA26 y Hi95 de la familia de las sestrinas en las células humanas (Budanov et al., 2004). Esta inactivación temporal de las Prxs es beneficiosa para las células eucariotas, las cuales utilizan el H₂O₂ como una molécula señalizadora (Wood et al., 2003c). La inactivación de la actividad peroxidasa permite un aumento temporal de H₂O₂ y, por lo tanto, la activación de componentes redox-sensibles de las rutas de señalización (Georgiou and Masip, 2003; Wood et al., 2003c).

2.3.- Glutathione S-transferasa (GST).

Glutathione S-transferasas (GSTs) son enzimas altamente conservadas implicadas en la detoxificación de muchos compuestos xenobióticos. Estas enzimas catalizan la conjugación de la glutathione (GSH) a sustratos electrofílicos, generando compuestos menos reactivos y más solubles que son fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores de membrana específicos. El amplio rango de sustratos de la enzima GST permite proteger a la célula de una gran variedad de compuestos tóxicos (Salinas and Wong, 1999). Existen principalmente dos tipos de GST, las GSTs solubles o citosólicas y las GSTs microsomales o asociadas a la membrana del retículo endoplasmático. Las GSTs citosólicas son enzimas diméricas clasificados en diferentes familias en relación a la secuencia aminoacídica y la especificidad de sustrato (Rowe et al., 1998). Las GSTs microsomales son enzimas triméricas que parecen haber evolucionado de forma independiente a las GSTs solubles (Hayes and Strange, 2000).

Además de su función en detoxificación, varios estudios han correlacionado niveles altos de GST con resistencia aumentada a estrés oxidativo (Zimniak et al., 1997). Una de las teorías es que las GSTs pueden detoxificar algunos de los compuestos secundarios producidos por las ROS cuando éstas reaccionan con los componentes celulares; por ejemplo, las GSTs pueden conjugar GSH a compuestos reactivos como 4-hidroxinonanal generados durante la oxidación de las membranas (Danielson et al., 1987; Hubatsch et al., 1998). También se ha observado que algunas GSTs tienen

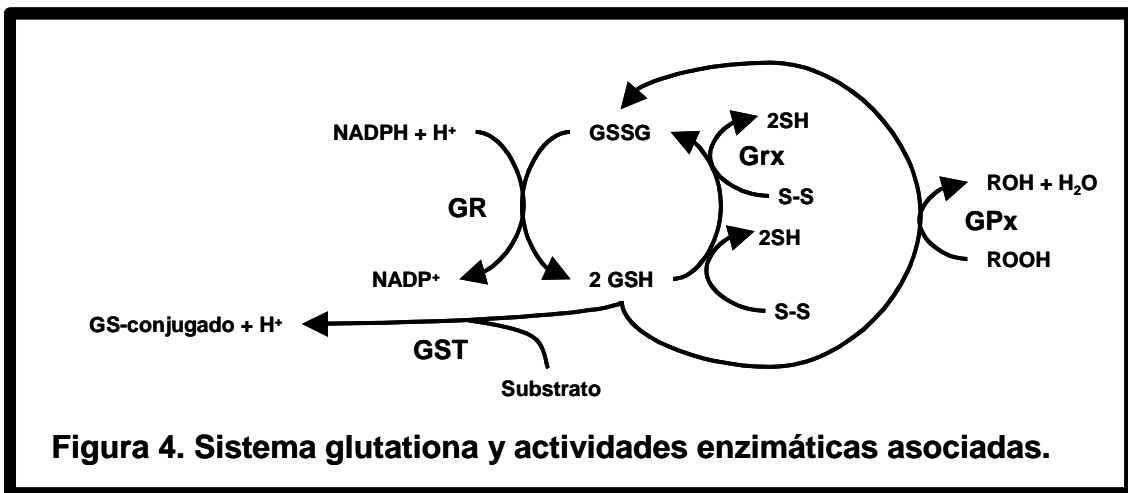
actividad glutatona peroxidasa, lo que parece indicar que han de ser importantes para la eliminación de peróxidos (Sherratt et al., 1997; Tan and Board, 1996; Zhao et al., 1999). De esta forma, en la levadura *S. pombe* se han identificado tres genes (*gst1*, *gst2* y *gst3*) que codifican para actividades GST; aunque sólo *gst3* codifica para una proteína con actividad glutatona peroxidasa, los tres genes son inducidos y requeridos para la respuesta a peróxidos como H₂O₂. La proteína codificada por el gen *gst1* interviene en la respuesta a peróxidos de forma independiente a su actividad GST (Veal et al., 2002). De igual forma, en células de mamífero se ha descrito el papel de la GST en la defensa a estrés oxidativo de forma independiente a su actividad catalítica; estas enzimas pueden actuar como inhibidores de la proteína quinasa c-Jun N-terminal, manteniéndola en su forma inactiva en ausencia de estrés (Adler et al., 1999).

2.4.- Sistema glutatona (GSH/GSSG).

La glutatona (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina), un tripéptido que contiene un grupo tiol (-SH), es la principal actividad no-enzimática implicada en la defensa celular antioxidante. Este tripéptido, muy abundante en la célula, se puede encontrar en forma reducida (GSH) o oxidada (GSSG); en condiciones normales la relación glutatona reducida/glutatona oxidada intracelular es muy elevada, lo que permite mantener el citosol en un estado reducido. La forma oxidada de la glutatona (GSSG) se genera al oxidarse el grupo tiol (R-SH) del residuo de cisteína y formar un puente disulfuro con otra molécula de GSH. La oxidación se revierte gracias a la actividad de la enzima glutatona reductasa (GR) que reduce la GSSG a GSH utilizando a NADPH como dador de electrones (Carmel-Harel and Storz, 2000) (Fig. 4).

El sistema de la glutatona es importante para la eliminación de peróxidos y para mantener reducidos los grupos tioles (R-SH) de muchas proteínas; este sistema de la glutatona participa de forma indirecta en la eliminación de peróxidos al actuar como cofactor de actividades enzimáticas como la glutatona peroxidasa (GPx) (Fig. 4). Este tripéptido también participa de forma directa en la reducción de puentes disulfuro de ciertas proteínas, así como, de

forma indirecta al actuar como agente reductor de la enzima glutarredoxina (Grx) (Fig. 4) (Carmel-Harel and Storz, 2000). La glutatona también puede conjugarse con sustratos electrofílicos, formando compuestos que generalmente son menos reactivos y más solubles. Las enzimas que catalizan esta reacción de conjugación, son las glutatona-S-transferasas (GSTs) (Fig. 4).



2.5.- Sistema glutarredoxina (Grx).

Las enzimas Grxs contienen, al igual que tiorredoxina, un sitio activo con una secuencia CXXC. A diferencia de estas últimas, que principalmente reducen puentes disulfuros de proteínas, las Grxs también reducen puentes disulfuro entre proteína y glutatona. Estas enzimas, en función de su estructura y de la actividad catalítica, se clasifican en tres categorías: clásicas como Grx1 y Grx3 de *E. coli*, las estructuralmente relacionadas con glutatona S-transferasa (GST), pero con actividad glutarredoxina oxido-reductasa como la Grx2 de *E. coli* y aquellas que tienen un sitio activo monotiol (normalmente CGFS) como las Grx3, Grx4 y Grx5 de la levadura *S. cerevisiae*. Las Grxs catalizan la reducción de puentes disulfuro a través de los residuos de cisteína de su sitio activo CXXC y utilizando el sistema glutatona como dador de electrones (Fig. 4) (Holmgren, 1989). Para la reducción de puentes disulfuro de proteínas, una de las cisteínas del sitio activo ataca a uno de los átomos de azufre implicados en el puente disulfuro, formándose un puente disulfuro entre la Grx y la proteína a reducir. La segunda cisteína de la Grx se encarga de

romper el puente disulfuro intermolecular, liberándose una Grx oxidada con un puente disulfuro intramolecular y la proteína diana reducida. Para la reducción de puentes disulfuro entre GSH y proteína, la Grx sólo utiliza un residuo de cisteína, mediante el cual forma un puente disulfuro con GSH y libera la proteína reducida. La forma Grx-SG es reducida por otra molécula de GSH generándose GSSG (Fernandes and Holmgren, 2004).

2.6.- Sistema tiorredoxina.

El sistema de la tiorredoxina está formado por tiorredoxina (Trx) y tiorredoxina reductasa (TrxR). Trx es una proteína pequeña rica en residuos de cisteína que contiene un sitio activo muy conservado (-Cys-Gly-Pro-Cys-) esencial para su función. Trx contiene 2 grupos -SH que pueden oxidarse formando un puente disulfuro, que es posteriormente reducido por la enzima TrxR que utiliza el NADPH como fuente de equivalentes reductores (Fig. 5). El sistema de la tiorredoxina reduce directamente puentes disulfuro de ciertas proteínas y, de forma indirecta, está implicado en la detoxificación de peróxidos sirviendo como dador de electrones para enzimas como peroxirredoxinas (Prx) (Fig. 5).

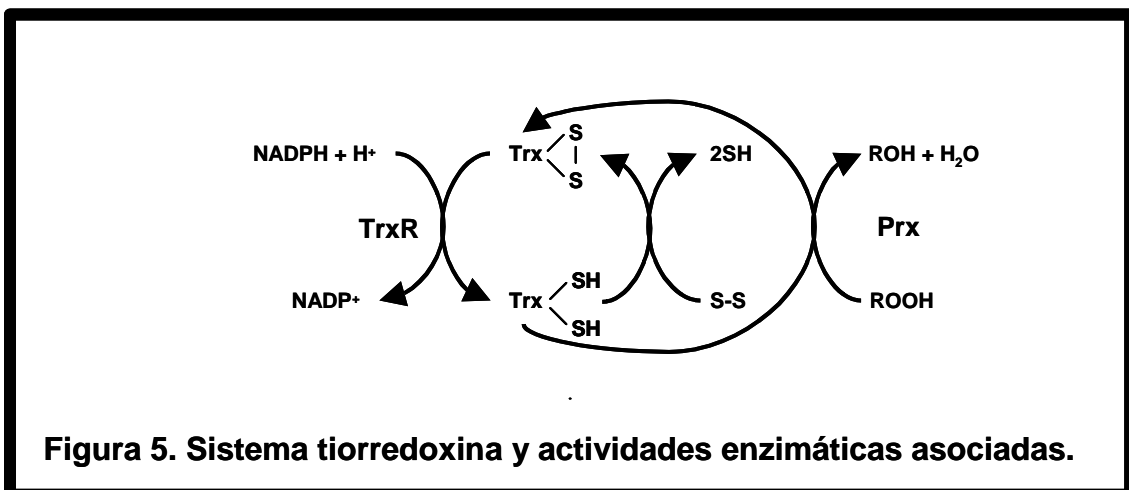


Figura 5. Sistema tiorredoxina y actividades enzimáticas asociadas.

3.- Estrés oxidativo y respuestas celulares a estrés oxidativo.

Se llama estrés oxidativo a la situación en la que, como consecuencia de un aumento en la síntesis o una disminución en la degradación de ROS, se produce un aumento en la concentración intracelular de estos oxidantes; la alteración de los niveles intracelulares de ROS es perjudicial para la célula ya que puede causar los daños descritos anteriormente (Ver “1.2.- Efectos nocivos de las ROS”).

En respuesta a estrés oxidativo, se activan en la célula rutas de transmisión de señal y factores de transcripción específicos que aumentan la expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes (Ver “2.- Actividades enzimáticas antioxidantes”). Esta respuesta específica a estrés oxidativo tiene como función disminuir los niveles de ROS así como reparar los daños producidos por estos oxidantes.

Para que la célula responda a una situación de estrés oxidativo es necesaria una proteína sensora cuya actividad esté regulada por oxidación/reducción. La identificación y caracterización de sensores específicos de estrés oxidativo en células procariotas y eucariotas, está permitiendo conocer el mecanismo por el cual las células son capaces de detectar y responder específicamente a este tipo de estrés.

3.1.- Sensores de estrés oxidativo en *Escherichia coli*.

En *E. coli* se han identificado y caracterizado dos factores de transcripción que actúan como sensores de estrés oxidativo: OxyR y SoxR que responde principalmente a H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, respectivamente.

SoxR es un activador transcripcional de la familia MerR (Amabile-Cuevas and Demple, 1991; Wu and Weiss, 1991) que se encuentra unido al DNA en forma de dímero, en el que cada subunidad contiene un grupo [2Fe-2S] (Hidalgo et al., 1995; Wu et al., 1995a). La oxidación o nitrosilación de estos centros [2Fe-2S] permite que SoxR pueda activar la transcripción de su único gen diana *soxS* que codifica para la proteína SoxS (Ding et al., 1996; Gaudu and Weiss, 1996). Niveles elevados de SoxS conducen a un incremento en la

expresión de genes antioxidantes como *sodA* que codifica para superóxido dismutasa o *fpr* que codifica para NADPH:flavodoxina oxidorreductasa. Los productos génicos del operón *rsx* y del gen *rseC* parecen ser parcialmente responsables de mantener los centros [2Fe-2S] de SoxR en un estado reducido en ausencia de estrés oxidativo (Koo et al., 2003). Estudios recientes (Chander and Dimple, 2004) han identificado residuos en el polipéptido de SoxR críticos para la activación transcripcional de su gen diana tras estrés oxidativo. Estos estudios indican que la señal redox se transmite al DNA a través del dominio de dimerización ya que mutaciones que inhiben la comunicación entre las dos subunidades de SoxR dan como resultado proteínas que son incapaces de activar la transcripción de *soxS* tras estrés oxidativo. De esta forma, SoxR funciona como una proteína de respuesta redox en la cual la interacción entre subunidades es importante para transformar una alteración en el estado de oxidación en cambios profundos en la estructura del DNA.

El factor de transcripción OxyR, en respuesta a dosis altas de H₂O₂ u otros agentes oxidantes como óxido nítrico (NO), activa la transcripción de numerosos genes antioxidantes como *gorA* que codifica para la glutatióna reductasa o *grxA* que codifica para la glutarredoxina (Hausladen et al., 1996; Zheng et al., 1998). OxyR se puede encontrar en dos formas en la célula, una forma reducida y una oxidada, aunque sólo esta última tiene actividad transcripcional. Numerosos estudios indican que la oxidación a sulfénico (R-SOH) del residuo de cisteína 199 de OxyR conduciría a la formación de un puente disulfuro intramolecular entre las cisteínas 199 y 208, activando el factor de transcripción debido a un cambio conformacional que modifica la especificidad de unión al DNA y de reclutamiento de la RNA polimerasa (Aslund et al., 1999; Choi et al., 2001; Kullik et al., 1995; Lee et al., 2004; Tao, 1999; Tao et al., 1993; Toledano et al., 1994; Zheng et al., 1998). Esta forma oxidada de OxyR sería reducida por la glutarredoxina 1 cuya expresión es dependiente de OxyR, permitiendo un sistema de autorregulación (Aslund et al., 1999; Storz et al., 1990; Zheng et al., 1998).

Sin embargo y, aunque análisis estructurales corroboran la formación de este puente disulfuro (Choi et al., 2001; Lee et al., 2004), ciertos autores cuestionan su papel en la activación de OxyR debido a que se ha descrito que la cisteína 199, además de ser la única esencial para la actividad de OxyR

(Kullik et al., 1995), sufre diferentes modificaciones como S- nitrosilación (S-NO), S- hidroxilación o formación de un grupo sulfénico (S-OH) y S- glutationilación (S-SG), que son suficientes para la activación del factor de transcripción en respuesta a agentes oxidantes y nitrosilantes (Kim et al., 2002). Además cada una de estas modificaciones resulta en una respuesta diferente del factor de transcripción, lo que implica que sean necesarios nuevos estudios para determinar si OxyR tiene diferentes mecanismos de activación específicos para distintos oxidantes.

3.2.- Sensores de estrés oxidativo en organismos eucariotas.

En las células eucariotas se han descrito homólogos funcionales de OxyR; los factores de transcripción Pap1 (*pombe AP-1 like*) y Yap1 (*yeast AP-1 like*) de las levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae*, respectivamente, activan la transcripción de genes antioxidantes en respuesta a oxidantes como H₂O₂. Como veremos posteriormente, el mecanismo molecular que utilizan estos factores de transcripción para sensor y responder a estrés oxidativo es muy similar al de OxyR: sufren modificaciones post-traduccionales inducidas por H₂O₂ y otros agentes oxidantes, que son necesarias para la transcripción de sus genes diana.

En las células de mamífero también se han descrito factores de transcripción cuya unión al DNA es dependiente del estado redox de la célula, y que, por lo tanto, pueden actuar como sensores de estrés oxidativo: el activador transcripcional AP-1 y el factor nuclear *kappa B* (NF-κB). Estos factores de transcripción contienen un residuo de cisteína sensible a oxidación/reducción localizado en el dominio de unión a DNA; la oxidación de este residuo bloquea la unión de estos factores de transcripción a DNA, mientras que condiciones reductoras potencian dicha unión (Abate et al., 1990; Matthews et al., 1992). Tiorredoxina y la proteína Ref-1 (*Redox activating factor-1*) inducen la reducción *in vivo* de las cisteínas de estos factores de transcripción; en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo estrés oxidativo, la tiorredoxina translocaría al núcleo facilitando su interacción con Ref-1 y la

reducción del residuo de cisteína de AP-1 y NF- κ B (Hirota et al., 1997; Marshall et al., 2000; Matthews et al., 1992).

Además de éste, han sido descrito distintos mecanismos de activación de AP-1 y NF- κ B en respuesta a estrés oxidativo lo que indicaría que la regulación de estos factores de transcripción es muy compleja. Por ejemplo, en condiciones basales, NF- κ B se encuentra en el citoplasma en una forma inactiva que no es capaz de unirse al DNA, asociado a una proteína inhibidora llamada *Inhibitory κ B* (I κ B) que enmascara la señal de translocación nuclear y previene su entrada en el núcleo. Tras recibir el estímulo, como estrés oxidativo, I κ B es degradado, liberando a NF- κ B que puede translocarse al núcleo donde puede activar la transcripción de genes diana (Bowie and O'Neill, 1997; Ginn-Pease and Whisler, 1996).

A diferencia de los de levadura y bacteria, estos sensores AP-1 y NF- κ B son esenciales para el crecimiento de la célula y además, no son específicos de estrés oxidativo sino que responden a diferentes señales fisiológicas. Estudios recientes han demostrado que, en células de mamífero, los oxidantes están implicados en vías de señalización relacionados con procesos como tumores o envejecimiento (Finkel, 2003).

Además de sensores de estrés oxidativo, las células de mamífero y la levadura *S. pombe* contienen también rutas de respuesta global a estrés, altamente conservadas, que responden a un amplio rango de estímulos y generan cambios transcripcionales similares. En el centro de esta ruta de respuesta global a estrés encontramos la vía de señalización de la MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), la cual transduce la señal desde la membrana o el citoplasma al núcleo para inducir cambios en la expresión génica. Las MAPKs p38 y c-JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) de mamíferos, y Sty1 de *S. pombe* están implicadas en respuestas globales a estrés. Por otra parte, la MAPK homóloga de Sty1 en *S. cerevisiae*, Hog1, fue inicialmente caracterizada como una quinasa que respondía específicamente a estrés osmótico, no siendo activada por otro tipo de estímulo. Sin embargo, estudios recientes (Bilsland et al., 2004) indican que la ruta de la MAPK Hog1 de *S. cerevisiae* puede también ser activada por estrés oxidativo.

3.3.- Modificaciones inducidas por H₂O₂ en proteínas sensoras.

Una de las modificaciones inducidas por H₂O₂ en las proteínas es la oxidación de los grupos tioles (R-SH) de los residuos de cisteína (ver apartado “1.2.- Efectos nocivos de las ROS”). La acumulación de cisteínas oxidadas conlleva, en la mayoría de los casos, la pérdida de función de la proteína por lo que la célula ha diseñado actividades enzimáticas importantes para la reparación de estas modificaciones (ver apartado “2.- Actividades enzimáticas antioxidantes”).

Sin embargo, existen casos en los que la oxidación de las cisteínas no conlleva una pérdida de función de la proteína, sino una regulación de su actividad en respuesta a estrés oxidativo; este es el caso de los sensores de H₂O₂ caracterizados en procariotas y eucariotas: OxyR de *E.coli* (ver apartado “3.1.- Sensores de estrés oxidativo en *Escherichia coli*”), RsrA de *Streptomyces coelicolor* (Kang et al., 1999), OhrR de *Bacillus subtilis* (Fuangthong and Helmann, 2002), Pap1 de *S. pombe* y Yap1 de *S. cerevisiae* (ver Discusión).

El grupo tiol (R-SH) de los residuos de cisteína puede, tras la exposición a H₂O₂, oxidarse a sulfénico (R-SOH), estado de oxidación altamente inestable que, generalmente, reacciona con otro residuo de cisteína formando un puente disulfuro. Los organismos procariotas y eucariotas contienen actividades disulfuro reductasa que están implicadas en la reducción de puente disulfuro en las proteínas, lo que permite que esta modificación pueda ser revertida rápidamente en la célula. Por este motivo, la formación de puentes disulfuro intramoleculares es el principal mecanismo molecular utilizado por los sensores de H₂O₂ como OxyR y RsrA. La formación de puentes disulfuro conlleva, en la mayoría de los casos, importantes cambios conformacionales en la proteína sensora esenciales para que active su respuesta antioxidante. Por ejemplo, el factor de transcripción OxyR pasa de un estado inactivo a un estado activo en respuesta a estrés por H₂O₂; la formación de un puente disulfuro intramolecular induce un cambio conformacional de OxyR, esencial para que active la transcripción de sus genes diana. De forma similar a OxyR, la actividad de RsrA de *S. coelicolor*, un represor del factor de transcripción σ^R , está

directamente modulada por la formación reversible de un puente disulfuro intramolecular en respuesta a H_2O_2 . La forma reducida de este represor interacciona *in vitro* con el factor de transcripción σ^R e inhibe la expresión de sus genes diana antioxidantes. La formación del puente disulfuro intramolecular impide la interacción de RsrA con el factor de transcripción y, por lo tanto, permite la transcripción de sus genes diana. La enzima tioredoxina es capaz de reducir la forma oxidada de RsrA, permitiendo que la inactivación del represor sea reversible.

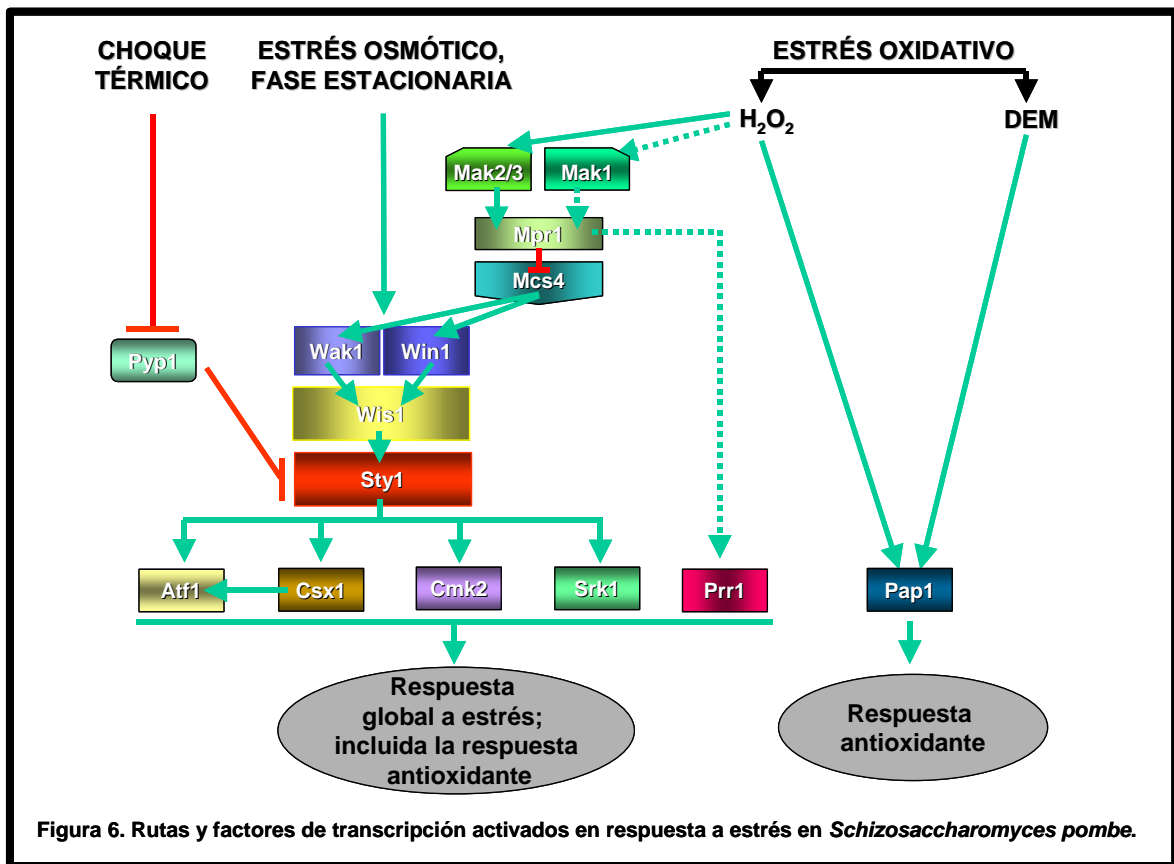
Sin embargo, existen diferentes trabajos que indican que la formación de puentes disulfuro no es el único mecanismo molecular utilizado para la respuesta a estrés por H_2O_2 ; se ha descrito la formación de grupos sulfénicos (R-SOH) estables en respuesta a este oxidante en el factor de transcripción OxyR (Kim et al., 2002) y en el represor de la transcripción OhrR de *B. Subtilis*. La forma reducida de OhrR se encuentra unida al promotor del gen antioxidante *ohrA* reprimiendo su transcripción, al inhibir seguramente la unión de la RNA polimerasa. La oxidación reversible a sulfénico (R-SOH) del único residuo de cisteína en respuesta a peróxidos rompe la interacción *in vitro* del represor con el DNA, permitiendo así que se transcriba el gen *ohrA*.

4.- *Schizosaccharomyces pombe*: sistema modelo para el estudio de la respuesta a estrés oxidativo en eucariotas.

La levadura *S. pombe*, como ya se ha descrito anteriormente, posee sensores específicos de estrés como el factor de transcripción Pap1, así como, y, al igual que las células de mamífero, rutas de transmisión de señal que son activadas por diferentes tipos de estrés e inducen respuestas globales, como la ruta de la MAPK Sty1.

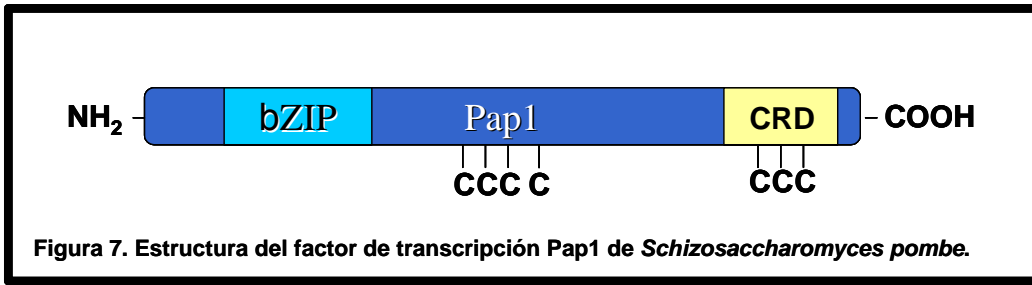
En la Figura 6 están indicados los componentes de las rutas activadas en respuesta a diferentes tipos de estrés en *S. pombe*. En respuesta a estrés oxidativo se activan la ruta de respuesta global a estrés de la MAPK Sty1, el factor de transcripción Pap1 que responde específicamente a ciertos agentes oxidantes y la proteína reguladora de la respuesta Prr1, importante para la

expresión de algunos genes antioxidantes de forma independiente a la cascada de la MAPK Sty1.



4.1.- El factor de transcripción Pap1 como sensor de estrés oxidativo en *Schizosaccharomyces pombe*.

El factor de transcripción Pap1 es uno de los componentes de la familia AP-1 de levaduras que incluye otros factores de transcripción como Yap1 de *S. cerevisiae*, Cap1 de *Candida albicans* y Kap1 de *Kluvermyces lactis* (Toone and Jones, 1999). Todos estos factores de transcripción contienen un dominio básico de cremallera de leucinas (bZIP) con homología al de c-Jun de mamíferos, componente del activador transcripcional AP-1. Este dominio bZIP contiene repeticiones de leucinas que permiten la formación de dímeros que interaccionan con las bases del DNA a través de regiones básicas cercanas al lugar de dimerización (Fujii et al., 2000).



Además del dominio bZIP, Pap1 y el resto de los factores de transcripción AP-1 de levaduras, contienen dos regiones ricas en residuos de cisteína, una localizada en el centro de la proteína y la segunda en la región C-terminal denominada dominio rico en cisteínas (CRD) (Toone and Jones, 1998; Wemmie et al., 1994).

4.1.1. Aislamiento y caracterización de Pap1; genes Pap1-dependientes.

La identificación de componentes moleculares de la respuesta a estrés oxidativo en *S. pombe* ha estado generalmente unida a la búsqueda de genes implicados en resistencia a diferentes tipos de drogas. Por ejemplo, *pap1*, que codifica para el factor de transcripción Pap1, fue inicialmente clonado como un gen que, en elevado número de copias, confería resistencia a drogas como la estaurosporina (Toda et al., 1991). El mismo fenotipo de resistencia a drogas fue observado en aquellas células que sobreexpresaban genes como *pad1*, *hba2/bfr1*, *pmd1* y *hba1*, o que presentaban mutaciones en el locus *crm1*. *hba2/bfr1* y *pmd1* son genes diana del factor de transcripción Pap1 y codifican para transportadores de tipo ABC (*ATP-binding cassette*) implicados en la resistencia a multidrogas (Nagao et al., 1995; Nishi et al., 1992). De esta forma, la sobreexpresión de Pap1 conduce a la sobreexpresión de estas proteínas, y, con ello, una mayor resistencia a drogas. El gen *pad1* codifica para una subunidad del proteasoma 26S y actúa como regulador positivo de la estabilidad de Pap1 (Arioka et al., 1998; Penney et al., 1998; Shimanuki et al., 1995; Spataro et al., 1997). El gen esencial *crm1* codifica para el factor de transporte nuclear Crm1, que actúa como regulador negativo de la actividad de Pap1 al exportarlo del núcleo al citoplasma (Stade et al., 1997; Toone et al., 1998). Por ello, su pérdida de función por mutaciones termosensibles causa

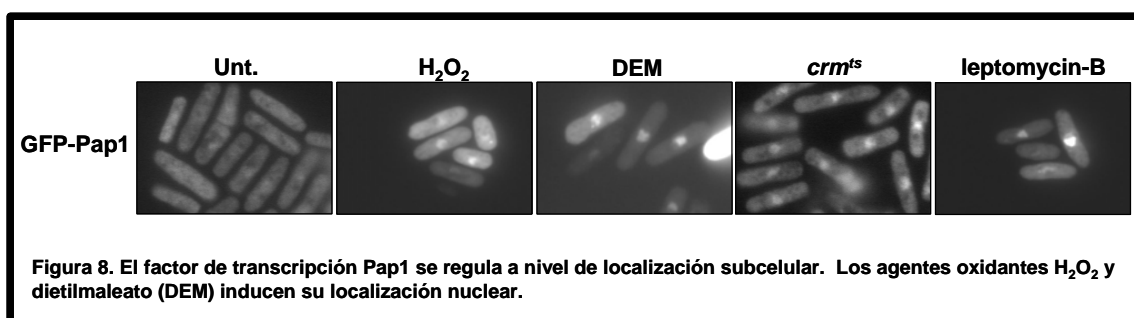
una localización nuclear constitutiva de Pap1 y, con ello, un aumento de la expresión de los genes Pap1-dependientes incluidos aquellos implicados en resistencia a multidrogas (Kudo et al., 1999b; Toda et al., 1992; Toone et al., 1998) (Ver apartado “4.1.2. Regulación de la actividad de Pap1 por cambios en su localización subcelular. Efecto de los agentes oxidantes H₂O₂ y dietilmaleato (DEM)”). Así, todos estos genes, aislados por su implicación en la resistencia a drogas, fueron relacionados con la actividad transcripcional de Pap1. Por otra parte, *hba1* fue el único gen que en elevado número de copias confería a las células un fenotipo de resistencia a la droga brefeldina A, pero cuyo producto génico, una proteína nuclear con un dominio de unión a Ran (*Ran binding domain*), no había sido relacionado con la actividad transcripcional de Pap1 (Turi et al., 1996).

De esta forma, Pap1 además de activar la transcripción de genes antioxidantes como *ctt1* (que codifica para la enzima catalasa; (Nakagawa et al., 1995), *trx2* (que codifica para la enzima tiorredoxina; (Toone et al., 1998)), *trr1* (que codifica para la enzima tiorredoxina reductasa; (Casso and Beach, 1996)) y *pgr1* (que codifica para la enzima glutatona reductasa; (Lee et al., 1997)), también aumenta la expresión de los genes de resistencia a multidrogas *hba2/bfr1* y *pmd1*. Por esta razón, las células que sobreexpresan Pap1 no sólo son más resistentes a estrés oxidativo sino también a diferentes drogas. Sin embargo, esta relación entre estrés oxidativo y resistencia a drogas no ha sido descrita únicamente en esta levadura sino que, en general, la sobreexpresión de sensores de ROS como SoxR también aumenta la resistencia a metales pesados y a diversas drogas (Fuentes and Amabile-Cuevas, 1997; Zheng et al., 1999).

4.1.2.- Regulación de la actividad de Pap1 por cambios en su localización subcelular. Efecto de los agentes oxidantes H₂O₂ y dietilmaleato (DEM).

El factor de transcripción Pap1 se regula a nivel de localización subcelular: es citoplasmático en condiciones basales y se acumula en el núcleo tras tratamientos con H₂O₂ o dietilmaleato (DEM), agentes oxidantes que alteran el estado redox intracelular (Fig. 8). El cambio de localización subcelular inducido

por estrés oxidativo es dependiente del factor de exporte nuclear Crm1 ya que su pérdida de función por mutaciones termosensibles en el gen esencial *crm1* o por tratamientos con el inhibidor leptomicina B, conduce a una localización nuclear constitutiva de Pap1 (Fig. 8) ((Toone et al., 1998); ver apartado “4.1.2.3.- Maquinaria de exporte nuclear en *Schizosaccharomyces pombe*”). De esta forma, en condiciones basales, el factor de transcripción presentaría localización citoplasmática debido al exporte nuclear dependiente de Crm1. Tras estrés oxidativo, la inhibición de este exporte nuclear induciría la acumulación nuclear de Pap1 y, con ello, la transcripción de sus genes diana antioxidantes y detoxificadores de drogas (ver apartado “4.1.1.- Aislamiento y caracterización de Pap1; genes Pap1-dependientes”).



4.1.2.1.- Señales que inducen la acumulación nuclear de Pap1: H₂O₂ y DEM.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual, en respuesta a estrés oxidativo, se inhibe el exporte nuclear dependiente de Crm1 de la proteína Pap1. Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis (ver Objetivos) es determinar el mecanismo que utiliza Pap1 para sensor y responder a dos oxidantes diferentes: H₂O₂ y DEM.

Como ya se ha descrito en el apartado 3.3 de esta Introducción (“Modificaciones inducidas por H₂O₂ en proteínas sensoras”), los sensores específicos de H₂O₂ poseen residuos de cisteína cuya oxidación reversible permite modular su actividad en respuesta a este oxidante. El factor de transcripción Pap1 también contiene residuos de cisteína, que pueden ser diana de este oxidante; la oxidación de estas cisteínas y la formación de grupos

sulfénicos estables o puentes disulfuro intramoleculares podría regular la localización subcelular y/o la actividad transcripcional de Pap1 en respuesta a concentraciones elevadas de este oxidante.

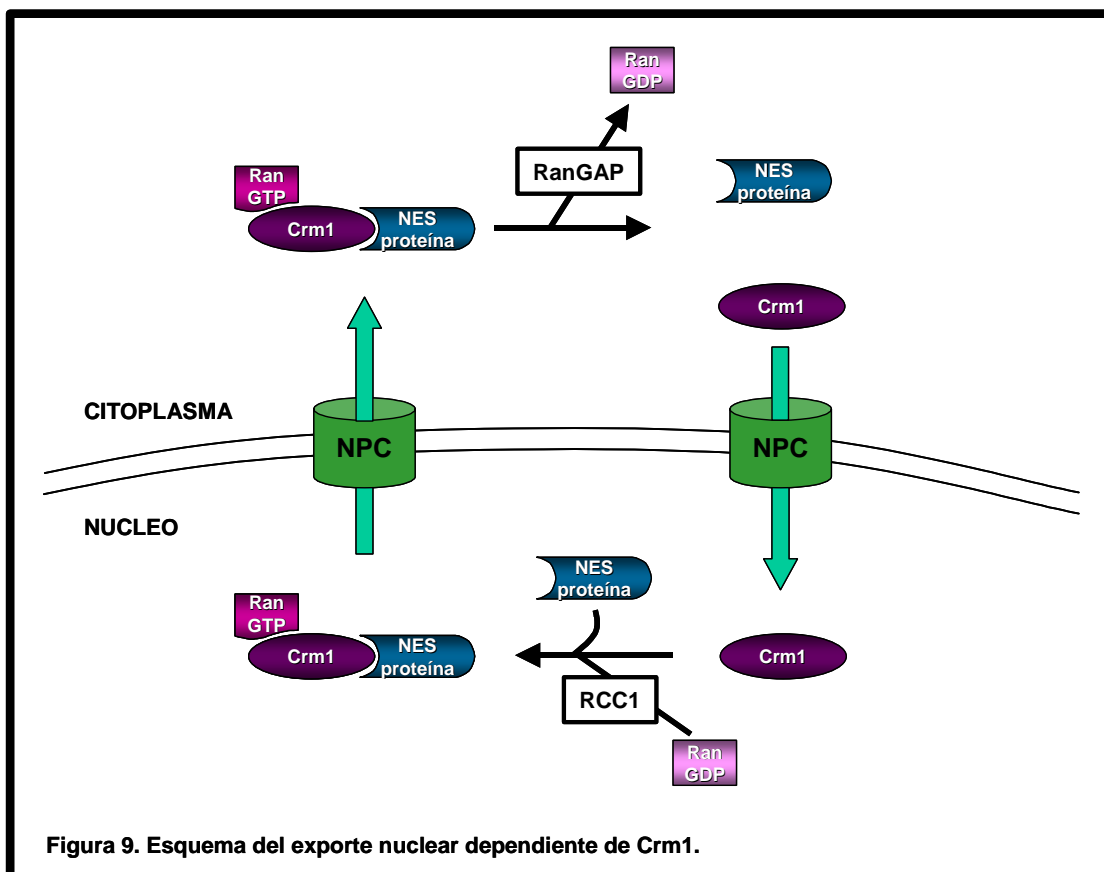
El compuesto dietilmaleato (DEM), utilizado en investigación básica y en clínica, actúa como un pro-oxidante celular al reducir los niveles de GSH intracelulares (Boylard and Chasseaud, 1968). Al igual que el oxidante H₂O₂, DEM induce la localización nuclear del factor de transcripción Pap1, aunque se desconoce si es debido a la interacción directa con el factor de transcripción o a una modulación de los niveles redox intracelulares.

4.1.2.2.- Maquinaria de exporte nuclear eucariota. Papel de Ran, Crm1 y proteínas asociadas.

La separación física entre núcleo y citoplasma exige la existencia de un transporte núcleo-citoplasmático, importe y exporte nuclear, que permita el intercambio de macromoléculas entre ambos compartimentos. Por ejemplo, los RNAs sintetizados en el núcleo serán exportados al citoplasma mediante la formación de complejos riboproteicos, mientras que las proteínas nucleares serán importadas al núcleo tras ser sintetizadas en el citoplasma. Sin embargo, esta separación entre núcleo y citoplasma y la existencia de un transporte nuclear, permite la aparición en las células eucariotas de un mecanismo de regulación que no se encuentra en las células procariotas: ciertos factores de transcripción se encuentran retenidos en el citoplasma y sólo en respuesta a una señal específica se acumulan en el núcleo donde activan la transcripción de sus genes diana. En la levadura *S. pombe*, el factor de transcripción Pap1 sufre este tipo de regulación: en respuesta a estrés oxidativo se acumula en el núcleo al inhibirse su exporte nuclear dependiente de Crm1.

El transporte de proteínas entre núcleo y citoplasma necesita de la formación de complejos de transporte que atraviesan la membrana nuclear a través del complejo del poro nuclear (NPC). Para que una proteína sea transportada a través del NPC son necesarias secuencias específicas reconocidas por los componentes de la maquinaria de transporte nuclear: la

señal de localización nuclear (NLS) rica en aminoácidos básicos, y la señal de exporte nuclear (NES) rica en residuos de leucina (Gorlich and Mattaj, 1996; Nigg, 1997). El importe de sustratos que contienen la NLS se inicia con la formación de un complejo citoplasmático formado por dos componentes: la importina- α que interacciona con el sustrato a importar y la importina- β que interacciona con el NPC permitiendo la translocación del complejo de dos componentes al interior del núcleo (Gorlich and Mattaj, 1996; Nigg, 1997; Yoneda, 1997). Por otra parte, la NES, inicialmente identificada en la proteína Rev de HIV1 y en el inhibidor de la proteína quinasa A denominado PKI (Stutz et al., 1995; Wen et al., 1995), es reconocida por el factor de exporte nuclear Crm1; Crm1 se une en el núcleo a su sustrato de exporte y, una vez atravesado el NPC, el complejo se disocia en el citoplasma liberando así la proteína a exportar (Stade et al., 1997) (Fig. 9).



Para el transporte núcleo-citoplasmático es esencial la proteína Ran debido a que es la que define una asimetría entre ambos compartimentos: la forma citoplasmática de Ran se encuentra unida principalmente a GDP debido

a la actividad de la proteína citoplasmática RanGAP1 (*Ran GTPase-activating protein 1*) que potencia la actividad GTPasa de Ran, mientras que la forma nuclear está principalmente unida a GTP por la actividad de la proteína nuclear RCC1 que se encarga de intercambiar GDP por GTP (Melchior and Gerace, 1998; Weis, 1998). El factor de exporte nuclear Crm1 se une de forma cooperativa a la proteína que contiene la NES (NES-proteína) y a RanGTP formando un complejo nuclear de tres componentes que atraviesa en NPC, y una vez en el citoplasma se disocia debido a la hidrólisis de RanGTP catalizada por la proteína RanGAP1 (Fig. 9). De esta forma, la proteína Ran juega un papel muy importante en la direccionalidad del transporte núcleo-citoplasmático y asegura que los factores de importe y exporte nuclear puedan transportar sus sustratos de forma unidireccional.

En células de mamífero y en la levadura *S. cerevisiae* se ha identificado una familia de proteínas que se caracterizan por su capacidad de unirse a Ran. Estas proteínas llamadas *Ran-binding proteins* (RanBP) tienen en común un dominio de aproximadamente 100 aminoácidos denominado *Ran-binding domain* (RanBD) necesario para la unión a la proteína Ran (Beddow et al., 1995). Entre los componentes de esta familia de proteínas encontramos RanBP1, RanBP2/Nup358 y RanBP3 de mamífero y Yrb1, Nup2 y Yrb2 de *S. cerevisiae*. RanBP1 y su homólogo Yrb1 (Ouspenski et al., 1999; Schlenstedt et al., 1995) se unen a RanGTP (Bischoff et al., 1995b; Coutavas et al., 1993; Lounsbury et al., 1994; Schlenstedt et al., 1995) y estimulan la actividad GTPasa de Ran al activar la proteína RanGAP (Bischoff et al., 1995a; Schlenstedt et al., 1995). Las proteínas RanBP2/Nup358 y Nup2 (Loeb et al., 1993; Wu et al., 1995b; Yokoyama et al., 1995) son nucleoporinas, proteínas que constituyen el NPC. Por otra parte, aunque la función de las proteínas RanBP3 y Yrb2 no se conocía, estudios recientes han demostrado el papel de estas proteínas en el exporte nuclear dependiente de Crm1 (ver apartado 4 de esta Discusión: “Caracterización del exporte nuclear dependiente de Crm1: la proteína Hba1 como cofactor de exporte”).

4.1.2.3.- Maquinaria de exporte nuclear en *Schizosaccharomyces pombe*.

El transporte núcleo-citoplasmático es un mecanismo altamente conservado entre los diferentes organismos eucariotas. Por este motivo, la proteína Ran (Spi1 en *S. pombe*) es una proteína altamente conservada y esencial para la viabilidad en todos los organismos eucariotas. Sin embargo, esta proteína no sólo es importante para el transporte a través de la membrana nuclear sino que también parece estar implicada, de forma directa o indirecta, en la replicación del DNA, la estructura y crecimiento de la membrana nuclear, la estructura de la cromatina y la progresión del ciclo celular (Sazer, 1996).

A diferencia de esta proteína Ran, los reguladores directos de Ran, como RCC1 (Pim1 en *S. pombe*), RanGAP1 (Rna1 en *S. pombe*) y RanBP1 (Sbp1 en *S. pombe*) están menos conservados en lo que respecta a la secuencia de aminoácidos, aunque tienen las mismas propiedades bioquímicas (Yoshida and Sazer, 2004). En las células de *S. pombe*, la proteína Ran y sus proteínas reguladoras interaccionan entre ellas y con otros componentes del sistema de transporte nuclear como proteínas importadoras y exportadoras, lo que indica que el transporte núcleo-citoplasmático de *S. pombe* funciona de forma muy similar al de los organismos eucariotas superiores (Yoshida and Sazer, 2004).

Al igual que Ran, el factor de exporte nuclear Crm1, identificado inicialmente en *S. pombe*, es una proteína altamente conservada entre todos los organismos eucariotas. Debido a esta elevada conservación, señales de exporte identificadas en las células de mamífero como la NES de HIV-1 y NES de PKI, pueden ser sustratos de exporte para el factor de exporte nuclear Crm1 de *S. pombe*.

La actividad exportadora de Crm1 de *S. pombe* y de su homóloga en humanos CRM1, a diferencia de la de *S. cerevisiae*, es sensible a la droga leptomicina B (LMB) (Wolff et al., 1997; Yoshida and Horinouchi, 1999), un potente antifúngico que bloquea el ciclo celular eucariota (Hamamoto et al., 1983; Yoshida et al., 1990). Esta inhibición del exporte nuclear dependiente de Crm1 tras tratamientos con LMB, se ha convertido en una de las estrategias utilizadas para la identificación de sustratos de este exporte nuclear. LMB inhibe el exporte nuclear de proteínas con NES al modificar covalentemente un residuo de cisteína (Cys-529) situado en la región central de Crm1 de *S. pombe*

(Kudo et al., 1999a). Este residuo de cisteína se encuentra conservado en la proteína CRM1 humana, aunque no en Xpol de la levadura *S. cerevisiae*, lo que explica por qué el transporte nuclear dependiente de Crm1 es sensible a LMB en *S. pombe* y en humanos, pero no en *S. cerevisiae*.

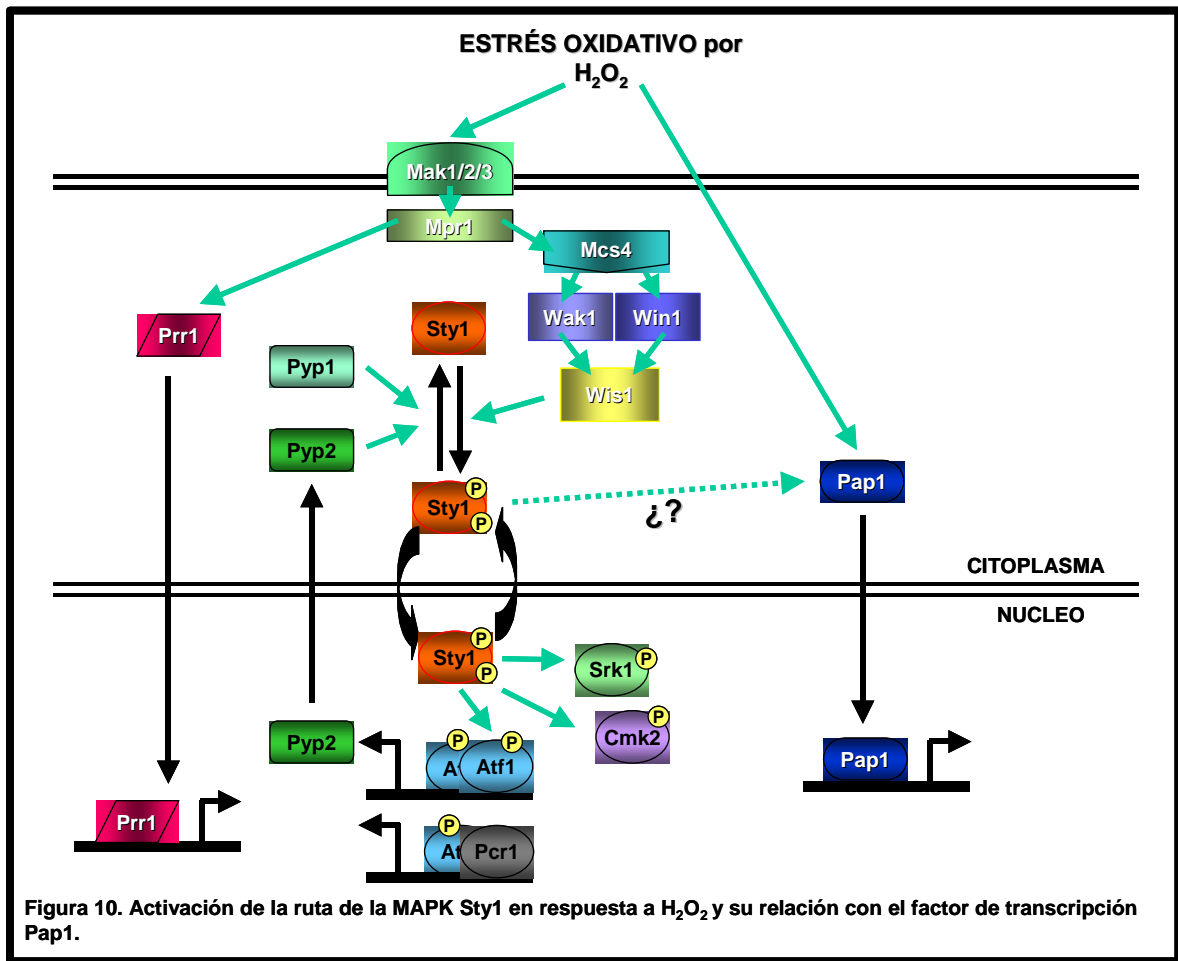
4.2.- MAPK Sty1: papel en la respuesta a estrés oxidativo.

En respuesta a diferentes tipos de estrés como estrés oxidativo, osmótico, o fase estacionaria, la MAPK Sty1 (también conocida como Phh1 y Spc1) es activada por fosforilación en residuos conservados de tirosina (Tyr-173) y treonina (Thr-171) por la MAPK quinasa (MAPKK) Wis1. A su vez, Wis1 es activada por las MAPKK quinasas (MAPKKK) Wak1 (también llamada Wis4 y Wik1) (Fuentes and Amabile-Cuevas, 1997; Samejima et al., 1997; Shieh et al., 1997; Shiozaki et al., 1997) y Win1 (Samejima et al., 1998), que la fosforilan en serina y treonina. Tras la fosforilación por Wis1, Sty1 se acumula en el núcleo debido a un proceso de transporte activo (Gaits and Russell, 1999), donde se une y fosforila a Atf1 (Gaits et al., 1998; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson et al., 1996), un factor de transcripción con un dominio bZIP que presenta homología con ATF-2 de mamíferos (Takeda et al., 1995). Atf1 forma complejos heterodiméricos con la proteína Pcr1 (Kano et al., 1996; Wahls and Smith, 1994), aunque cada una de ellas puede formar homodímeros que se unen al DNA (Wahls and Smith, 1994). Pcr1 es necesaria para la inducción transcripcional de algunos genes de estrés (Watanabe and Yamamoto, 1996) (Fig. 10).

Otros sustratos de Sty1 fosforilado son: Csx1, una proteína citoplasmática de unión a RNA que se une y estabiliza el mRNA de *atf1* y *pcr1* (Rodríguez-Gabriel et al., 2003); la proteína quinasa Cmk2, implicada en respuesta a estrés oxidativo (Sanchez-Piris et al., 2002); y la proteína quinasa Srk1 que tienen un papel en el control de la meiosis (Asp and Sunnerhagen, 2003; Smith et al., 2002) (Fig. 10).

La activación de Sty1 es transitoria gracias a la acción de la fosfotirosina fosfatasa dependiente de Atf1, Pyp2, que defosforila e inactiva la MAPK. Otra fosfotirosina fosfatasa, Pyp1, es responsable de la inactivación basal de Sty1

(Millar et al., 1995). Las fosfatasa Pyp2 y Pyp1 se encuentran localizadas en el citoplasma, por lo que, para la inactivación de Sty1 es necesario un transporte nuclear dependiente de Crm1 (Gaits and Russell, 1999). Dos serina/treonina fosfatasa de tipo 2C (PP2C), Ptc1 y Ptc3, también parecen regular la actividad de Sty1 por defosforilación de residuos de treonina (Nguyen and Shiozaki, 1999; Shiozaki et al., 1994; Shiozaki and Russell, 1995b) (Fig.10).



Diferentes estudios han identificado los mecanismos implicados en la transferencia de la señal de estrés al módulo de la MAPK (Fig. 6). Por ejemplo, la activación de Sty1 en respuesta a choque térmico está regulada a través de la inhibición de la fosfatasa Pyp1 (Nguyen and Shiozaki, 1999), mientras que la señal por estrés por H₂O₂ activa la ruta de la MAPK Sty1 a través de un sistema de transferencia de fosfatos de dos componentes similar a los ya descritos en procariontas y en la levadura *S. cerevisiae*. En este sistema, dos sensores de peróxidos con actividad histidina quinasa, Mak2 y Mak3, se

autofosforilan en un residuo de histidina situado en su dominio quinasa. Este grupo fosfato es transferido al aspártico del dominio receptor de la proteína reguladora de la respuesta, Mcs4, a través de la proteína fosfotransmisora Mpr1 (Aoyama et al., 2001; Buck et al., 2001; Nguyen et al., 2000; Shiozaki et al., 1997). Esta proteína Mcs4 transfiere la señal directamente a la ruta de la MAPK Sty1 al asociarse con la MAPKKK Wak1 (Shieh et al., 1997; Shiozaki et al., 1997). A diferencia de Mak2 y Mak3, un tercer sensor de peróxido con actividad histidina quinasa, Mak1, no es necesario para la señalización a través de la ruta de la MAPK Sty1, sino que regula una segunda proteína reguladora de la respuesta, Prr1. Esta proteína actúa como un factor de transcripción capaz de activar, de forma independiente al módulo de la MAPK Sty1, la transcripción de algunos genes como *trr1* y *ctt1* inducidos en respuesta a estrés oxidativo (Ohmiya et al., 1999), así como del gen *ste11* esencial para la entrada en meiosis (Ohmiya et al., 2000).

La ruta de la MAPK Sty1 y el factor de transcripción Pap1 parecían estar relacionadas, ya que se había descrito que la activación de Pap1 tras estrés oxidativo se perdía en cepas delecionadas para la MAPK Sty1 (Toone et al., 1998). Sin embargo, Pap1 no parece ser sustrato de Sty1 debido a que proteína Pap1, purificada a partir de células de *E. coli*, no era fosforilada *in vitro* por Sty1 (Wilkinson et al., 1996) (Fig. 10).

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

- 1.- Determinar el mecanismo molecular utilizado por el factor de transcripción Pap1 para sensar y responder a dos oxidantes diferentes, H₂O₂ y DEM.
- 2.- Determinar si la proteína Hba1, relacionada con resistencia a multidrogas, está relacionada con la actividad transcripcional de Pap1.

METODOLOGÍA y RESULTADOS

1.- Papel de los residuos de cisteína de Pap1 en la respuesta a dos oxidantes diferentes: H₂O₂ y dietilmaleato (DEM).

Este primer bloque de resultados incluye:

- A) Metodología y resultados publicados en el artículo "*Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues*". Esther A. Castillo and José Ayté, Cristina Chiva, Alberto Moldón, Montse Carrascal, Joaquín Abián, Nic Jones and Elena Hidalgo. *Molecular Microbiology* (2002) 45, 243-254".
Blackwell Publishing
- B) Resultados publicados en el capítulo del libro "*Pap1, a sensor of oxidative stress in Schizosaccharomyces pombe*". Esther A. Castillo, Ana P. Vivancos and Elena Hidalgo. *Recent Research Developments in Cell Research*".
- C) Metodología y resultados no publicados que complementan los resultados anteriores.

1.1.- Metodología.

Este apartado incluye las cepas, plásmidos y técnicas experimentales utilizadas para la obtención de los resultados adicionales presentados (apartado C).

1.1.1.- Cepas y plásmidos utilizados.

En la Tabla I se describe el genotipo de las cepas utilizadas en estos experimentos: la cepa salvaje HM123, la cepa $\Delta pap1$ EHH108, la cepa $\Delta trr1 caf4::ura4^+$ y las cepas EHH14, EHH14.C501A, EHH14.C532A, EHH14.C501,532A, EHH14.C501,523AC532T, EHH14.C523AC532T y EHH14.C532T que expresan la proteína GFP-Pap1 y los mutantes GFP-Pap1.C501A, GFP-Pap1.C532A, GFP-Pap1.C501,532A, GFP-

Pap1.C501,523AC532T, GFP-Pap1.C523AC532T y GFP-Pap1.C532T, respectivamente.

Tabla I. Cepas utilizadas.

Nombre	Genotipo	Procedencia
HM123	<i>h^r leu1</i>	
EHH108	<i>h^r leu1 his2 ura4 pap1::ura4</i>	Castillo et al., 2002
EHH14	<i>h^r leu1 his2 ura4 pap1::ura4 pnmt41x.GFP-Pap1</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C501A	<i>h^r leu1 his2 ura4 pap1::ura4 pnmt41x.GFP-Pap1.C501A</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C532A	<i>h^r leu1 his2 ura4 pap1::ura4 pnmt41x.GFP-Pap1.C532A</i>	Castillo et al., 2002
EHH14.C501,532A	<i>h^r leu1 his2 ura4 pap1::ura4 pnmt41x.GFP-Pap1.C501,532A</i>	Este trabajo
EHH14.C501,523AC532T	<i>h^r leu1 his2 ura4 pap1::ura4 pnmt41x.GFP-Pap1.C501,523AC532T</i>	Este trabajo
EHH14.C523AC532T	<i>h^r leu1 his2 ura4 pap1::ura4 pnmt41x.GFP-Pap1.C523AC532T</i>	Este trabajo
EHH14.C532T	<i>h^r leu1 his2 ura4 pap1::ura4 pnmt41x.GFP-Pap1.C532T</i>	Este trabajo
<i>caf4::ura4⁺</i>	<i>h⁺ leu1 his2 ura4 ade6 caf4::ura4⁺</i>	Benko et al., 1998

Los plásmidos utilizados se detallan en la Tabla II. Se utilizó el plásmido pRep41-*GFP-pap1* (Toone et al., 1998) para inducir la expresión de la proteína de fusión GFP-Pap1 en las células de *S. pombe*. Este plásmido contiene un promotor *nmt* (*no message with thiamine*) que se encuentra reprimido cuando hay tiamina en el medio de cultivo. El fragmento *BglII-SpeI* de pRep41-*GFP-pap1*, que contiene la mayoría de la secuencia que codifica para Pap1 excepto su región CRD, fue sustituido por un fragmento *BamHI-SpeI* de DNA que codificaba para la proteína GST, amplificado por PCR desde el plásmido pGEX-4T-1 (*Amersham Pharmacia Biotech*). De esta forma se obtuvo el plásmido p86.41x que codifica para la proteína GFP-GST-CRD. Eliminando el fragmento *SpeI-SalI* de pRep41-*GFP-pap1*, que codifica para el dominio C-terminal denominado CRD, se obtuvo el plásmido p54.41x que codifica para una proteína de fusión GFP-Pap1 en la que se ha eliminado este dominio CRD (GFP-Pap1 Δ CRD). Eliminando el fragmento *NsiI-SpeI* del plásmido pRep41-*GFP-pap1* se obtuvo el plásmido p104.41x que codifica para una proteína de

fusión GFP-Pap1 formada por la región N-terminal de Pap1 que contiene una posible señal de localización nuclear (NLS) y el dominio CRD (GFP-NLS^{Pap1}-CRD).

Tabla II. Plásmidos utilizados.

Plásmido número	Descripción	Procedencia
pRep41-GFP-pap1	pnmt41x.GFP-Pap1	Toone <i>et al.</i> , 1998
p54.41x	pnmt41x.GFP-Pap1ΔCRD	Este trabajo
p86.41x	pnmt41x.GFP-GST-CRD	Este trabajo
p104.41x	pnmt41x.GFP-NLS ^{Pap1} -CRD	Este trabajo
p66.41x	pnmt41x.GFP-Pap1ΔCRD.NES ^{PKI}	Este trabajo
p67.41x	pnmt41x.GFP-Pap1ΔCRD.NES ^{PKI(D11C)}	Este trabajo
p106.41x	pnmt41x.GFP-NLS ^{Pap1}	Este trabajo
p85.41x	pnmt41x.GFP-Pap1	Castillo <i>et al.</i> , 2002
p85.C501A.41x	pnmt41x.GFP-Pap1.C501A	Castillo <i>et al.</i> , 2002
p85.C532A.41x	pnmt41x.GFP-Pap1.C532A	Castillo <i>et al.</i> , 2002
p85.C501,532A.41x	pnmt41x.GFP-Pap1.C501,532A	Este trabajo
p85.C501,523AC532T.41x	pnmt41x.GFP-Pap1.C501,523AC532T	Este trabajo
p85.C523AC532T.41x	pnmt41x.GFP-Pap1.C523AC532T	Este trabajo
p85.C532T.41x	pnmt41x.GFP-Pap1.C532T	Este trabajo
pMBP-CRD	pMBP-CRD	Este trabajo
pMBP-CRD.C501,523,532A	pMBP-CRD.C501,523,532A	Este trabajo
pMBP-CRD.C523A	pMBP-CRD.C523A	Este trabajo
pMBP-CRD.C523,532A	pMBP-CRD.C523,532A	Este trabajo

Durante la construcción del plásmido p104.41x se recupera la diana *Spel*, por lo que este plásmido puede ser digerido *Spel-Smal* y religado tras hacer romo el extremo *Spel*, obteniéndose el plásmido p106.41x que codifica para una proteína de fusión GFP-Pap1 que únicamente contiene la región N-terminal en la que está localizada la NLS (GFP-NLS^{Pap1}). Para la construcción de los plásmidos p66.41x y p67.41x se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos complementarios que tras hibridarse daban lugar a dos fragmentos *Spel-Smal* de DNA que codificaban para la señal de exporte nuclear clásica de la proteína inhibidora de la PKA (NES^{PKI}) y para una NES^{PKI} en la que se había sustituido a cisteína el residuo de aspártico 11 (NES^{PKI(D11C)}). Se sustituyó el fragmento *Spel-Smal* de pRep41-GFP-pap1 por los fragmentos *Spel-Smal* de DNA que

codificaban para la NES^{PKI} y NES^{PKI(D11C)}, dando lugar a los plásmidos p66.41x y p67.41x que codifican para proteínas de fusión GFP-Pap1 en las que se ha sustituido el dominio CRD por estas dos señales de exporte nuclear, NES^{PKI} y NES^{PKI(D11C)}.

Con el objetivo de construir nuevos alelos mutantes de *pap1*, los plásmidos integrativos p85.41x, p85.C501,523A y p85.C523A (Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002) fueron utilizados como molde para una reacción de PCR en la que se utilizó una pareja de oligonucleótidos complementarios que contenían el cambio en el codón que codifica para el residuo de cisteína 532 y que producía la sustitución de cisteína por treonina (C532T). La mutagénesis, realizada utilizando el kit comercial *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), dio lugar a los plásmidos integrativos p85.C532T, p85.C523AC532T y p85.C501,523AC532T que codifican para proteínas GFP-Pap1.C532T, GFP-Pap1.C523AC532T y GFP-Pap1.C501,523AC532T, respectivamente. Estos plásmidos integrativos, tras ser linealizados con el enzima de restricción *NruI*, se utilizaron para transformar la cepa EHH108 (ver Tabla I) dando lugar a las cepas EHH14.C532T, EHH14.C523AC532T y EHH14.C501,523AC532T (ver Tabla I).

La región de *pap1* que codifica para su dominio CRD fue amplificada por PCR a partir de los plásmidos pRep41-*GFP-pap1*, p85.C523A, p85.C501,523,532A y p85.C523,532A, utilizando los mismos oligonucleótidos que habían sido utilizados para generar los plásmidos p76 (que codifican para GST-CRD) (Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). El fragmento CRD amplificado fue digerido *BglI-SalI* y clonado en el plásmido pMAL.c2 (*New England Biolabs*), generando los plásmidos pMBP-CRD, pMBP-CRD.C523A, pMBP-CRD.C523,532A y pMBP-CRD.C501,523,532A. Estos plásmidos fueron utilizados para transformar la cepa bacteriana FB810 (Benson *et al.*, 1994).

1.1.2.- Microscopía de fluorescencia.

La expresión de las proteínas de fusión GFP-Pap1 fue inducida tras 17-20 h de crecimiento de las células en medio de cultivo sin tiamina. 25 μ l de cultivo celular en fase exponencial tratado o no con 0.2 mM H₂O₂ o 4 mM DEM, fueron

cargados en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina. Tras eliminar por aspiración las células no fijadas en el vidrio, se añadieron 2.5 µl de glicerol 50% o 3 µl de Hoescht (1 µg/ml en 50% glicerol) y se cubrió con un cubreobjetos. Para la observación de las muestras se utiliza un microscopio Nikon Eclipse E600 a 100X aumentos y se capturaron las imágenes utilizando una cámara Orca II Dual Scan Cooled CCD Camera y el programa Hamamatsu AquaCosmos 2.0 (Hamamatsu).

1.1.3.- Purificación y electroforesis de proteínas unidas a MBP.

Cultivos de la bacteria FB810 que expresaban las proteína MBP-CRD, MBP-CRD.C523A, MBP-CRD.C523,532A y MBP-CRD.C501,523,532A fueron tratadas o no con 0.5 mM H₂O₂ y 4 mM DEM. Las células fueron centrifugadas, resuspendidas en 4 ml de tampón STET1X (50 mM Tris-HCl pH=8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH=8.0, 1% Tritón X-100) y lisadas por sonicación. Se centrifugaron las muestras para eliminar las células no lisadas y los restos celulares y se purificó la proteína unida a MBP con una resina de amilosa comercial (*New England Biolabs*). Las diferencias de tamaño entre las diferentes muestras de proteína unida a MBP fueron observadas por separación electroforética en un gel desnaturalizante al 10% de poliacrilamida y tinción de *Coomassie*.

1.2.- Resultados.

En este apartado se presentan los resultados no-publicados y su relación con aquéllos que aparecen en los artículos.

1.2.1.- El dominio CRD es imprescindible para la localización citoplasmática de Pap1 en ausencia de estrés.

Toone y colaboradores habían descrito que la localización subcelular del factor de transcripción Pap1, al igual que la de su homólogo en *S. cerevisiae*,

Yap1 (Kuge et al., 1997), estaba regulada por agentes oxidantes; en condiciones de no-estrés, la proteína de fusión GFP-Pap1 estaba localizada en el citoplasma, mientras que tras estrés oxidativo inducido por H₂O₂ o DEM, dicha proteína de fusión se acumulaba en el núcleo de la célula. Sin embargo, células que presentaban mutaciones termosensibles en el gen esencial *crm1*, que codifica para el factor de exporte nuclear, presentaban localización nuclear constitutiva (Toone et al., 1998); esto indicaba que en condiciones de no-estrés, el factor de transcripción Pap1 sufría un exporte nuclear dependiente de Crm1. De forma paralela a estos resultados, se identificó que la región C-terminal de Yap1, denominada CRD, contenía, además de los residuos de cisteína, una señal de exporte nuclear (NES) cuya secuencia era esencial para el exporte nuclear del factor de transcripción y para su interacción con el factor de exporte nuclear Xpo1 (Crm1 en *S. cerevisiae*) (Yan et al., 1998).

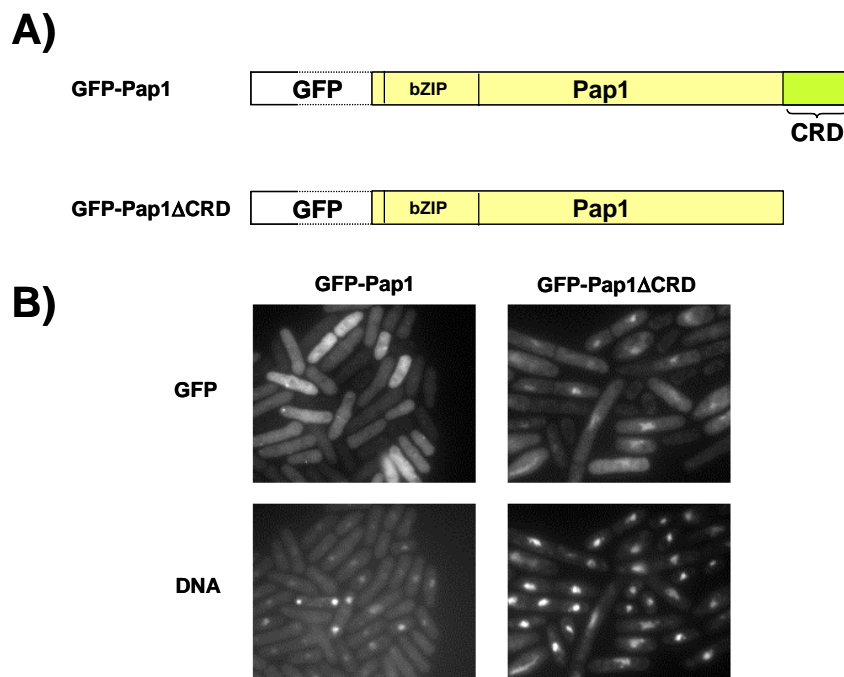


Fig. 11. El dominio rico en residuos de cisteína (CRD) es necesario para el exporte nuclear de Pap1 en ausencia de estrés.

A. Esquema de las proteínas GFP-Pap1 y GFP-Pap1ΔCRD; se encuentra indicada la posición relativa del dominio de unión a DNA (bZIP) y de la región C-terminal rica en cisteínas (CRD).

B. La localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-Pap1 y GFP-Pap1ΔCRD fue determinada por microscopía de fluorescencia (GFP) en células salvajes transformadas con los plásmidos episomales pRep41-*GFP-pap1* y p54.41x. Las células fueron también teñidas con Hoescht para visualizar los núcleos (DNA).

Pap1 también tiene una región C-terminal rica en residuos de cisteína (CRD) que presenta homología con el dominio CRD de Yap1; para determinar

el papel del dominio CRD de Pap1 en su localización subcelular, utilizamos un mutante de la proteína de fusión GFP-Pap1 en el que se había deletado el dominio CRD (GFP-Pap1 Δ CRD) (Fig. 11A). Cepas salvajes (HM123) fueron transformadas con los plásmidos episomales pRep41-GFP-pap1 y p54.41x que codifican para las proteínas GFP-Pap1 y GFP-Pap1 Δ CRD, respectivamente, y se determinó la localización subcelular de estas proteínas de fusión mediante microscopía de fluorescencia. La proteína GFP-Pap1 se encuentra localizada en el citoplasma en condiciones basales, mientras que la proteína GFP-Pap1 Δ CRD presenta localización nuclear en ausencia de estrés (Fig. 11B), lo que indica que el dominio CRD es imprescindible para el transporte nuclear de Pap1. Estos mismos resultados fueron posteriormente publicados por Kudo y colaboradores (Kudo et al., 1999b) los cuales no sólo demostraron que CRD era suficiente para el transporte nuclear de Pap1 y otras proteínas, sino que también identificaron una región de aproximadamente 19 aminoácidos que contenía una señal de transporte nuclear (NES) reconocida por el factor de transporte nuclear Crm1.

1.2.2.- El dominio CRD es esencial para la respuesta a los oxidantes H₂O₂ y DEM.

Los resultados anteriores indicaban que el dominio CRD de Pap1 estaba implicado en la regulación de la localización subcelular de Pap1 debido a que contenía una señal de transporte nuclear (NES^{Pap1}). Para determinar el papel del dominio CRD de Pap1 en la respuesta a dos oxidantes diferentes, H₂O₂ y DEM, sustituimos este dominio por la señal de transporte nuclear clásica de la proteína inhibidora de la PKA (NES^{PKI}) generando la proteína de fusión GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} (Fig. 12A). Esta proteína, al igual que la proteína GFP-Pap1, está localizada en el citoplasma en condiciones basales debido al transporte nuclear dependiente de la NES^{PKI} (Fig. 12B). Sin embargo, así como la proteína GFP-Pap1 se acumula en el núcleo tras tratamientos con H₂O₂ o DEM, la proteína GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} no se acumula en el núcleo en respuesta a estos oxidantes (Fig. 12B). Sustituimos un residuo de aspártico de

la NES^{PKI} por una cisteína, generando la proteína de fusión GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI(D11C)} (Fig. 12A). Esta proteína tampoco es capaz de acumularse en el núcleo tras tratamientos con H₂O₂ y DEM (Fig. 12B), lo que indica que la secuencia de aminoácidos del dominio CRD (y la disposición de sus residuos de cisteína) es importante para la respuesta a estos oxidantes.

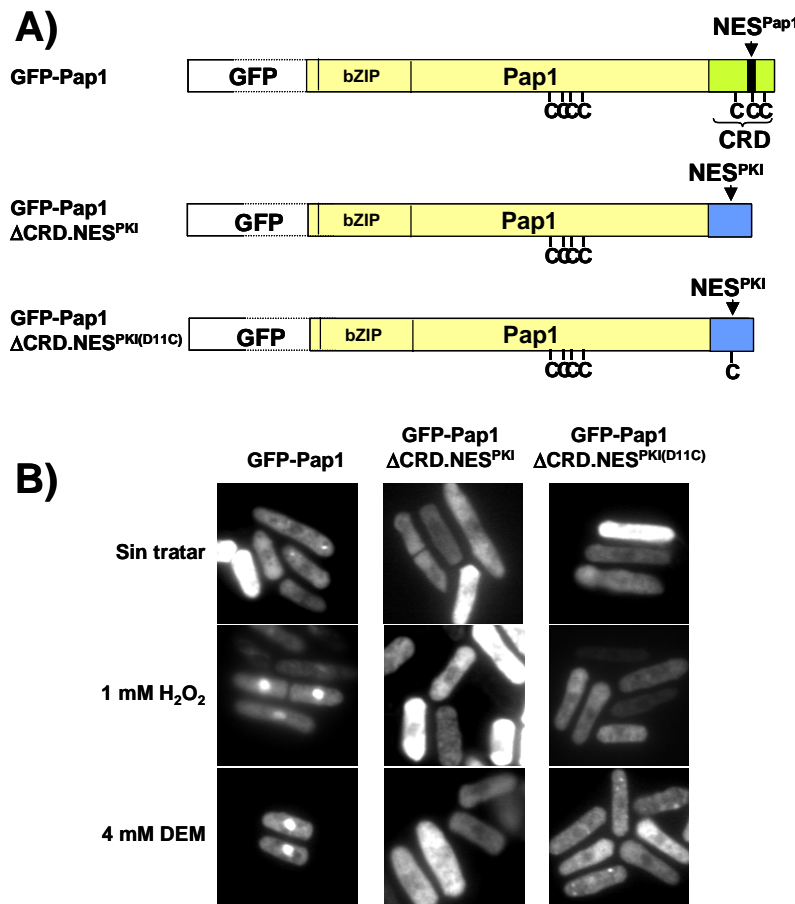


Fig. 12. El dominio CRD de Pap1 es imprescindible para la respuesta a H₂O₂ y DEM.

A. Esquema de las proteínas GFP-Pap1, GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI(D11C)}. En el esquema se indica el dominio de unión a DNA (bZIP), la región C-terminal rica en cisteínas (CRD), la señal de exporte nuclear de Pap1 (NES^{Pap1}) y de la proteína PKI (NES^{PKI}) y la posición relativa de los residuos de cisteína.

B. Localización subcelular de las proteínas GFP-Pap1, GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI(D11C)} en células tratadas o no con las concentraciones indicadas de H₂O₂ y DEM. La distribución celular de estas proteínas de fusión fue determinada por microscopía de fluorescencia en células salvajes (HM123) transformadas con los plásmidos episomales pRep41-GFP-pap1, p66.41x y p67.41x, respectivamente.

1.2.3.- El dominio CRD de Pap1 es suficiente para la respuesta a dietilmaleato (DEM), pero no para la respuesta a H₂O₂.

Quisimos determinar si, además de imprescindible, este dominio CRD de Pap1 era suficiente para la respuesta a los dos oxidantes utilizados, H₂O₂ y DEM. Para ello, comparamos la cinética de acumulación nuclear en respuesta a cada uno de los oxidantes de la proteína GFP-GST-CRD, que sólo contiene el dominio CRD de Pap1, con la de la proteína completa, GFP-Pap1 (Fig. 3, Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). La proteína GFP-GST-CRD presenta una

exclusión nuclear en condiciones de no-estrés debido al transporte nuclear dependiente del dominio CRD (Fig. 13B). Tras tratamientos con DEM, la inhibición de este transporte hace que esta proteína GFP-GST-CRD, que difunde libremente a través del complejo del poro nuclear (NPC), se localice por toda la célula (Fig. 13B); sin embargo, no se consigue una localización exclusivamente nuclear debido a que la fusión no contiene ninguna señal de localización nuclear (NLS) (Fig. 13B). Por otra parte, el tratamiento con H₂O₂ no modifica la localización subcelular de GFP-GST-CRD, lo que parece indicar que el dominio CRD no es suficiente para la respuesta a este oxidante (Fig. 3, Castillo et al., Mol. Microbiol., 2002; Fig. 13B). De esta forma, utilizando la proteína GFP-GST-CRD, determinamos que el dominio CRD de Pap1 es suficiente para la respuesta a DEM, aunque no para la respuesta a H₂O₂, lo que indica que se tratan de respuestas diferentes.

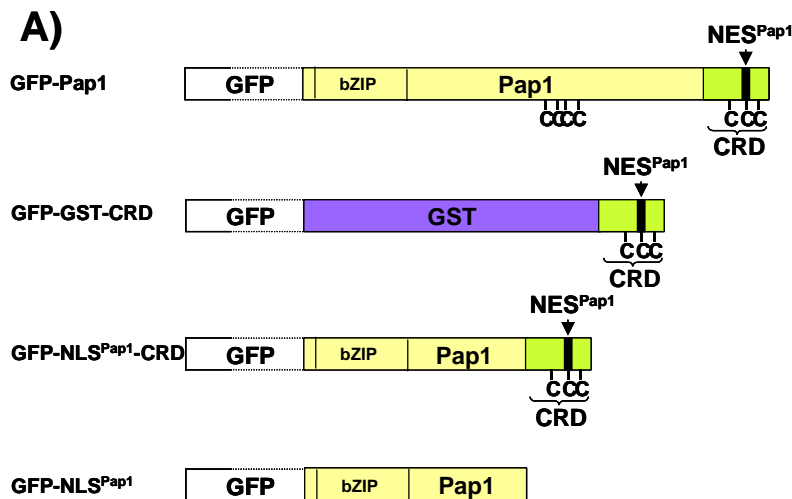
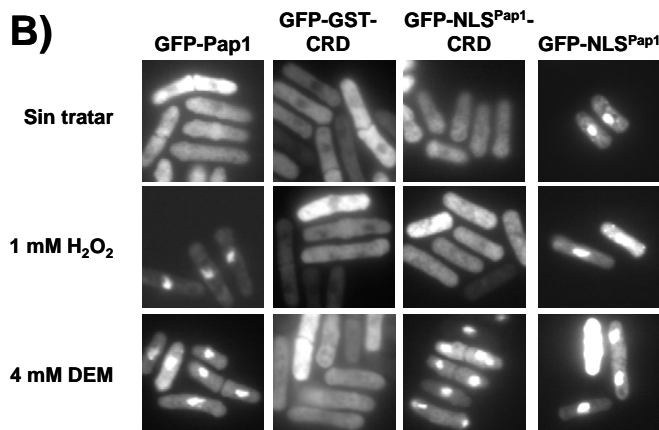


Fig. 13. El dominio CRD de Pap1 es suficiente para la respuesta a dietilmaleato (DEM), pero no para la respuesta a H₂O₂.



- A.** Esquema de las proteínas GFP-Pap1, GFP-GST-CRD, GFP-NLS^{Pap1}-CRD y GFP-NLS^{Pap1}; se encuentra indicada la posición relativa del dominio de unión a DNA (bZIP), la región C-terminal rica en cisteínas (CRD), la señal de transporte nuclear de Pap1 (NES^{Pap1}) y la posición relativa de los residuos de cisteína.
- B.** Localización subcelular de las proteínas GFP-Pap1, GFP-GST-CRD, GFP-NLS^{Pap1}-CRD y GFP-NLS^{Pap1} en células tratadas o no con las concentraciones indicadas de H₂O₂ y DEM. La distribución celular de estas proteínas de fusión fue determinada por microscopía de fluorescencia en células salvajes (HM123) transformadas con los plásmidos episomales pRep41-GFP-pap1, p86.41x, p104.41x y p106.41x, respectivamente.

Previamente habíamos intentado utilizar proteínas de fusión como GFP-NLS^{SV40}-CRD o GFP-Cdc10-CRD, en las que se había fusionado el dominio CRD a diferentes NLS. El objetivo era conseguir una proteína de fusión que se acumulara en el núcleo al inhibir el exporte nuclear dependiente del dominio CRD; sin embargo, estas proteínas de fusión presentaban una localización nuclear constitutiva seguramente debido a que el importe dependiente de la NLS tenía un efecto dominante sobre el exporte nuclear mediado por la NES del CRD (Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). Posteriormente, analizamos la localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-NLS^{Pap1}, que contiene sólo la región N-terminal de Pap1, y GFP-NLS^{Pap1}-CRD, que contiene la región N-terminal y el dominio CRD de Pap1 (Fig. 13A). La proteína GFP-NLS^{Pap1}, a diferencia de lo que se esperaría por su reducido tamaño, presenta una localización nuclear constitutiva (Fig. 13B), lo que indica que esta región de Pap1 contiene la información necesaria para la entrada en el núcleo del factor de transcripción, es decir, seguramente contiene una señal de localización nuclear (NLS). La proteína GFP-NLS^{Pap1}-CRD presenta exclusión nuclear en condiciones basales, es decir, el exporte nuclear mediado por CRD tiene un efecto dominante sobre el importe dependiente del dominio N-terminal (Fig. 13B); tratamientos con DEM inhiben el exporte nuclear de esta proteína de fusión con lo que se induce su acumulación nuclear (Fig. 13B). Por otra parte, GFP-NLS^{Pap1}-CRD no se acumula en el núcleo en respuesta a H₂O₂ (Fig. 13B), indicando que, como ya habíamos comprobado anteriormente, el dominio CRD es suficiente para la respuesta a DEM, pero no para la respuesta a H₂O₂.

1.2.4.- Los residuos de cisteína 501 y 532 del dominio CRD son necesarios para la acumulación nuclear de Pap1 tras tratamientos con H₂O₂.

Mediante el análisis de la localización subcelular de mutantes por sustitución de la proteína GFP-Pap1, pudimos determinar el papel de ciertos residuos de cisteína de Pap1 en la respuesta a los oxidantes H₂O₂ y DEM. La sustitución a alanina del residuo de cisteína 278 generaba una proteína mutante que era incapaz de acumularse en el núcleo en respuesta a H₂O₂ y de activar la transcripción de sus genes diana como *trr1* (Fig. 1 y 2, Castillo *et al.*,

Mol. Microbiol., 2002), lo que indicaba que esta cisteína era esencial para la respuesta a este oxidante. La misma sustitución en el residuo de cisteína 501 inhibía la entrada de GFP-Pap1 en el núcleo en respuesta a H₂O₂, aunque no de forma completa, permitiendo que se activara parcialmente la transcripción del gen diana de Pap1, *trr1* (Fig. 1 y 2, Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002; Fig. 14B). Esto significaba que esta cisteína era necesaria aunque no esencial para la respuesta a H₂O₂. Aunque presenta una cierta localización nuclear constitutiva, el mutante GFP-Pap1.C532A se acumula más en el núcleo en respuesta a H₂O₂ (Fig. 1 y 2, Castillo *et al.*, 2002; Fig. 14B). Sin embargo, la localización nuclear constitutiva del mutante GFP-Pap1.C501,532A no se ve alterada en respuesta a este oxidante, indicando que las dos cisteínas 501 y 532 son necesarias para la respuesta a H₂O₂ (Fig. 14B).

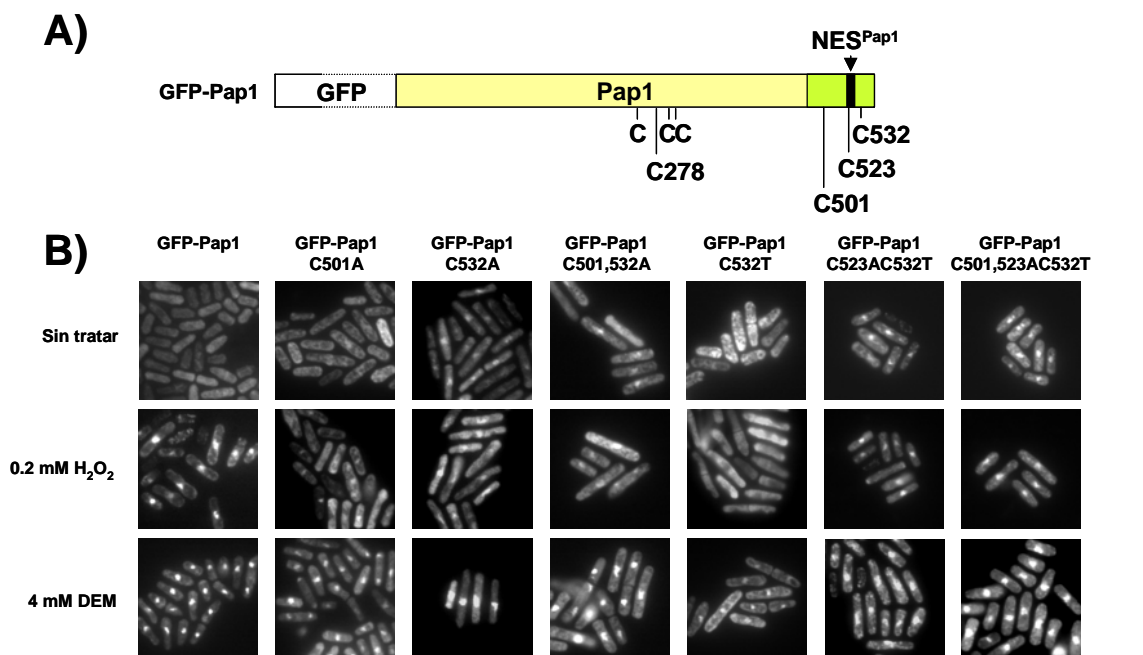


Fig. 14. Identificación de los residuos de cisteína implicados en la respuesta a H₂O₂ y DEM.

- A. Representación esquemática de GFP-Pap1. Aparecen indicados los dos dominios ricos en cisteínas y la posición relativa de los residuos de cisteína importantes para este experimento.
- B. Localización subcelular de la proteína de fusión GFP-Pap1 y los mutantes GFP-Pap1.C501A, GFP-Pap1.C532A, GFP-Pap1.C501,532A, GFP-Pap1.C532T, GFP-Pap1.C523A C532T y GFP-Pap1.C501,523AC532T. Estas proteínas de fusión se expresan en células delecionadas para *pap1* (EHH108) a partir de plásmidos integrativos y bajo el control de un promotor *nmt* reprimible por tiamina. Mediante microscopía de fluorescencia se analiza la distribución celular de estas proteínas de fusión en condiciones de no-estrés o tras tratamientos con 0.2 mM H₂O₂ o 4 mM DEM.

Por otra parte, estas mismas cisteínas no son esenciales para la respuesta al agente pro-oxidante DEM ya que, los mutantes GFP-Pap1.C278A, GFP-Pap1.C501A y GFP-Pap1.C532A continuaban acumulándose en el núcleo

en respuesta a este oxidante (Fig. 1 y 2, Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002; Fig. 14B). La sustitución de dos (GFP-Pap1.C523,532A) o tres de las cisteínas (GFP-Pap1.C501,523,532A) daba lugar a una proteína de localización nuclear constitutiva (Fig. 1 y 2, Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), por lo que fue imposible encontrar un mutante de localización basal citoplasmática que no respondiera a DEM. Por otra parte, en *S. cerevisiae*, la sustitución a treonina del último residuo de cisteína genera una proteína mutante de Yap1 que presenta una localización citoplasmática basal y una acumulación nuclear tras estrés oxidativo; la sustitución a alanina de las dos cisteínas restantes, da lugar a una proteína de localización citoplasmática constitutiva que no responde a DEM (Kuge *et al.*, 1997). Quisimos determinar si estas mismas sustituciones en Pap1, o similares, generaban un mutante citoplasmático incapaz de responder a DEM. Para ello construimos las proteínas mutantes GFP-Pap1.C532T, GFP-Pap1.C523AC532T y GFP-Pap1.C501,523AC532T. El mutante GFP-Pap1.C532T, a diferencia de GFP-Pap1.C532A, no presenta localización nuclear constitutiva sino una localización por toda la célula, citoplasma y núcleo (Fig. 14B); además, esta sustitución parece afectar a la respuesta de Pap1 a ambos oxidantes, ya que el mutante GFP-Pap1.C532T no altera su localización subcelular tras tratamientos con H₂O₂ y sólo se acumula débilmente en el núcleo en respuesta a DEM (Fig. 14B). Los mutantes GFP-Pap1.C523AC532T y GFP-Pap1.C501,523AC532T presentan cierta localización nuclear incluso en ausencia de estrés, aunque, sorprendentemente, son capaces de responder a DEM, incrementando su acumulación nuclear tras este oxidante (Fig. 14B).

1.2.5.- La pérdida de función de la proteína Trr1 conduce a una acumulación nuclear constitutiva de Pap1.

Aunque era necesaria una confirmación bioquímica, los resultados anteriores indicaban que la acumulación nuclear de Pap1 en respuesta a H₂O₂ era debida a la oxidación de los residuos de cisteína 278 y 501 (o 532, en el mutante GFP-Pap1.C501A) de Pap1, induciendo seguramente la formación de un puente disulfuro intramolecular. El homólogo funcional de Pap1 en *E. coli*,

el factor de transcripción OxyR, contiene un residuo de cisteína que se oxida en respuesta a estrés por H_2O_2 y reacciona con otra cisteína formando un puente disulfuro intramolecular. La formación de este puente disulfuro conduce a un cambio conformacional que regula la actividad del factor de transcripción (Zheng et al., 1998). La actividad disulfuro reductasa de la glutarredoxina 1 revierte la oxidación de OxyR tras estrés oxidativo, permitiendo su inactivación

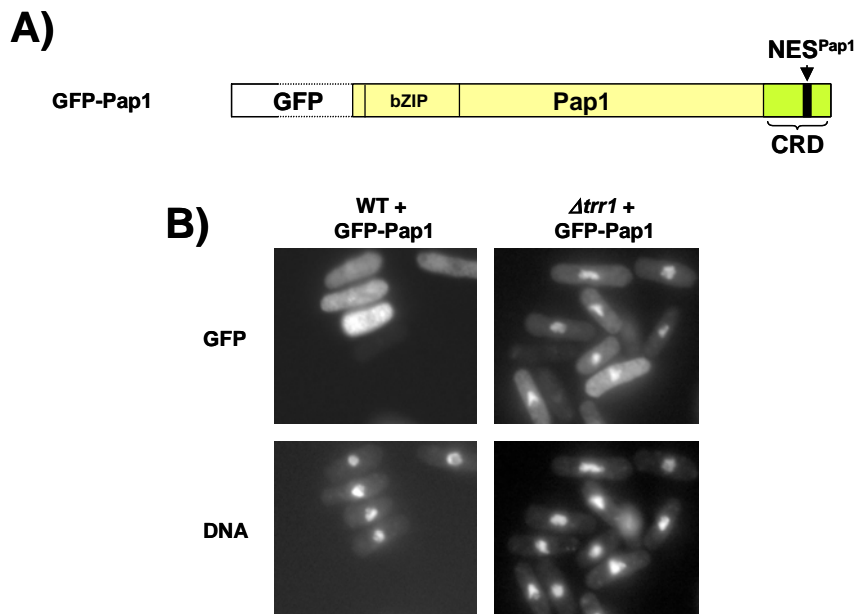


Fig. 15. El sistema de la tiorredoxina es necesario para mantener al factor de transcripción Pap1 en una forma inactivada/citoplasmática incluso en ausencia de estrés.

- Esquema de la proteína GFP-Pap1 en el que se indica la posición del dominio de unión a DNA (bZIP), el dominio CRD y la señal de exporte nuclear (NES^{Pap1}).
- Localización subcelular de la proteína GFP-Pap1 (GFP) expresada en cepas salvajes (WT+pGFP-Pap1) y en cepas delecionadas para el gen *trr1* ($\Delta trr1$ +pGFP-Pap1). Las células fueron también teñidas con Hoescht para visualizar los núcleos (DNA).

(Zheng et al., 1998). Al igual que la activación de OxyR, la localización nuclear de Pap1 en respuesta a H_2O_2 es temporal (Fig. 3 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), lo que hace pensar que una actividad reductora de puentes disulfuro está inactivando a Pap1 tras su entrada en el núcleo. Para determinar si el sistema reductor de puentes disulfuro de la tiorredoxina estaba implicado en la regulación de la actividad de Pap1, se analizó la localización celular de la proteína de fusión GFP-Pap1 (Fig. 15A) en cepas delecionadas en el gen que codifica para la enzima tiorredoxina reductasa, *trr1*. En estas cepas, incluso en ausencia de estrés, la proteína GFP-Pap1 presenta localización nuclear (Fig. 15B), lo que indica que esta actividad enzimática es necesaria para mantener

reducido y, por lo tanto, citoplasmático el factor de transcripción Pap1 incluso en condiciones basales.

1.2.6.- DEM modifica de forma irreversible la región CRD de Pap1.

La proteína GFP-GST-CRD presentaba la misma cinética de acumulación nuclear tras tratamientos con DEM que la proteína GFP-Pap1 (Fig. 3 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), lo que nos indicó que para la respuesta a este oxidante sólo era necesario el dominio CRD de Pap1 (Fig. 3 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002; Fig. 13). Quisimos determinar si DEM modificaba el dominio CRD de Pap1, y si dicha modificación conllevaba un aumento de peso molecular detectable en un gel de poliacrilamida. Los resultados publicados para GST-CRD muestran que DEM está modificando los residuos de cisteína 523 y 532 de CRD, lo que provoca que esta proteína modificada migre menos que la forma no-tratada con DEM (Fig. 4 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). La proteína GST contiene algunos residuos de cisteína susceptibles a ser modificados por DEM (Fig. 4 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), por lo que decidimos utilizar otra proteína de fusión cuya purificación fuera sencilla y efectiva y que los únicos residuos de cisteína que tuviera fueran los del dominio CRD de Pap1. Para ello construimos la proteína MBP-CRD. La figura 16 muestra que la proteína MBP-CRD, al igual que GST-CRD (Fig. 4 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), está siendo modificada en respuesta a DEM; la proteína purificada a partir del cultivo tratado con DEM migra como una banda más pesada al compararla con aquella purificada desde células sin tratar o tratadas con H₂O₂ (Fig. 16 carriles 1,2 y 3). Las proteínas mutantes MBP-CRD.C501,523,532A y MBP-CRD.C523,532A, purificadas a partir de células de *E. coli* tratadas con DEM, migran como la forma no modificada de MBP-CRD, lo que parece indicar que las cisteínas 523 y 532 del dominio CRD son las que sufren dicha modificación (Fig. 16 carriles 5 y 7). Tal como se esperaba, la proteína MBP-CRD.C523A expresada en células tratadas con DEM muestra una movilidad intermedia entre la forma no modificada y la modificada en dos cisteínas (Fig. 16 carril 6).

Para determinar qué tipo de modificación estaba induciendo DEM en las cisteínas de Pap1, se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight*) las formas no tratadas y tratadas con DEM de la proteína MBP-CRD (Fig. 5 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). Inicialmente, el análisis por MALDI-TOF nos indicó que cada una de las cisteínas 523 y 532 del CRD estaba siendo modificada por DEM. La modificación inducida por DEM conlleva un aumento de peso molecular de 172 Da por residuo de cisteína (Fig. 5 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), que parece corresponder a la conjugación del grupo tiol de la cisteína al doble enlace de DEM, y la formación de aductos irreversibles con una estructura tioéter (Fig. 3 Castillo *et al.*, Recent Research Developments...). Posteriormente vimos por espectrometría de masas MALDI-TOF que la cisteína 501 de CRD sufría la misma modificación que las cisteínas 523 y 532 (datos no publicados).

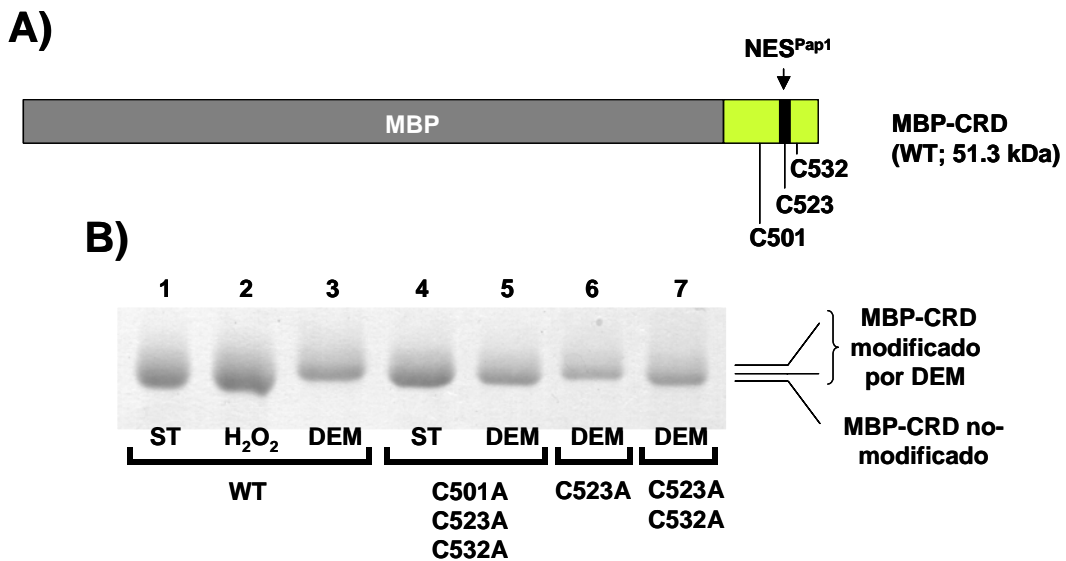


Fig. 16. DEM induce la modificación *in vivo* del dominio CRD de Pap1.

- A. Representación esquemática de la proteína de fusión MBP-CRD; se encuentran indicadas la señal de exporte nuclear (NES^{Pap1}) y la posición relativa de los residuos de cisteína del dominio CRD.
- B. Análisis de la movilidad en gel desnaturalizante de la proteína MBP-CRD y sus mutantes por sustitución en cisteína. Se expresan y purifican las proteínas MBP-CRD (WT), MBP-CRD.C501,523,532A (C501A,C523A,C532A), MBP-CRD.C523A (C523A) y MBP-CRD.C523,532A (C523A,C532A) a partir de células de *E.coli* que han crecido sin tratamiento (ST) o en presencia de 0.5 mM H₂O₂ (H₂O₂) o de 4 mM DEM (DEM). Las muestras son analizadas por electroforesis en un gel de SDS y tinción de Coomassie. Se distingue una forma no-modificada y de mayor movilidad (carriles 1 y 2) y una forma modificada por DEM (carril 3) de la proteína MBP-CRD. El triple mutante MBP-CRD.C501,523,532A y el doble mutante MBP-CRD.C523,532A no se modifican tras DEM (carriles 5 y 7), mientras que el mutante MBP-CRD.C523A se modifica parcialmente y se separa en el gel de poliacrilamida con una movilidad intermedia entre la forma no-modificada y la completamente modificada (carril 6).

Esta modificación covalente también se observó en la proteína GST-CRD expresada en células de *S. pombe* (Fig. 6 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002);

además, la forma modificada por DEM de la proteína GST-CRD expresada en *S. pombe* no interacciona con el factor de exporte nuclear Crm1 (Fig. 6 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), lo que indica que DEM está modificando de forma covalente los tres residuos de cisteína del dominio CRD de Pap1, impidiendo así la interacción entre la NES de Pap1 y Crm1 (Fig. 7 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002).

Posteriormente comprobamos que el agente alquilante iodoacetamida (IA) también es capaz de inducir la acumulación nuclear irreversible de Pap1, lo que nos indicaba que DEM actuaba como agente alquilante de cisteínas al igual que IA (Fig. 4 Castillo *et al.*, Recent Research Developments...).

El factor de exporte nuclear Crm1 contiene un residuo de cisteína, la cisteína 529, que puede ser modificado por la droga leptomicina B, causando la pérdida de función de este exportador y la localización nuclear de sus sustratos de exporte. Sin embargo, el tratamiento con DEM no induce la entrada en el núcleo de otras proteínas cuyo exporte nuclear es dependiente de Crm1, como la MAPK Sty1 o la proteína quimérica que contiene la NES de la proteína PKI (GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI}) (Fig. 5 Castillo *et al.*, Recent Research Developments...), lo que parece indicar que DEM no es capaz de modificar este residuo de cisteína de Crm1 o que, si lo hace, dicha modificación no es capaz de inhibir la interacción del exportador con la proteína sustrato.

Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues

Esther A. Castillo^{1†}, José Ayté^{1†}, Cristina Chiva⁴, Alberto Moldón¹, Montse Carrascal³, Joaquín Abián³, Nic Jones² and Elena Hidalgo^{1*}

¹Cell Signaling Unit, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain.

²Paterson Institute for Cancer Research, Christie Hospital NHS Trust, Wilmslow Road, M20 4BX Manchester, United Kingdom.

³Department of Medical Bioanalysis, IIBB-CSIC, IDBAPS, C/Rosellon 161, 08036 Barcelona, Spain.

⁴Laboratory of Protein Chemistry and Proteomics, Universitat Pompeu Fabra, C/Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain.

Summary

During the last decade, much has been learnt about the mechanisms by which oxidative stress is perceived by aerobic organisms. The *Schizosaccharomyces pombe* Pap1 protein is a transcription factor localized at the cytoplasm, which accumulates in the nucleus in response to different inducers, such as the pro-oxidant hydrogen peroxide (H₂O₂) or the glutathione-depleting agent diethylmaleate (DEM). As described for other H₂O₂ sensors, our genetic data indicates that H₂O₂ reversibly oxidizes two cysteine residues in Pap1 (Cys278 and Cys501). Surprisingly, our studies demonstrate that DEM generates a non-reversible modification of at least two cysteine residues located in or close to the nuclear export signal of Pap1 (Cys523 and Cys532). This modification impedes the interaction of the nuclear exporter Crm1 with the nuclear export signal located at the carboxy-terminal domain of Pap1. Mass spectrometry data suggest that DEM binds to the thiol groups of the target cysteine residues through the formation of a thioether. Here we show that DEM triggers Pap1 nuclear accumulation by a novel molecular mechanism.

Introduction

In living cells, reactive oxygen species (ROS) are mainly

generated by means of the univalent reduction of oxygen during respiration. This side-effect from the otherwise advantageous utilization of oxygen as the final electron acceptor, leads to damage of most biomolecules. Under normal aerobic growth, cells cope with the toxicity of ROS using enzymatic and non-enzymatic defences, which keep the levels of ROS under toxic levels (Sies, 1991). Imbalances in the production/disposal of ROS, however, can increase their steady-state concentration and lead to oxidative stress. Cells can counteract oxidative damage by inducing the expression of a large number of genes many of which encode proteins that decrease the levels of ROS and repair the accumulated damage. Such changes of gene expression in response to oxygen derivatives have been observed in prokaryotic cells (Storz and Imlay, 1999), as well as in yeast and mammalian cells (Banuett, 1998; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996; Dalton *et al.*, 1999). However, the underlying molecular basis of the sensing mechanisms are less well understood in eukaryotic cells than in bacterial systems.

Oxidation of cysteine residues by elevated intracellular H₂O₂ can lead to irreversible loss of protein function when high oxidation states (e.g. sulphonic acid) are reached (Coan *et al.*, 1992). However, thiol groups can also be reversibly oxidized to form disulphides. Intramolecular disulphides between two cysteine residues of target proteins have been proposed to have a role during oxidative stress signalling. So far, the reversible formation of a disulphide bond has been described for the regulation of the transcriptional factor OxyR (Zheng *et al.*, 1998), the *Escherichia coli* Hsp33 chaperone (Jakob *et al.*, 1999), the RsrA antisigma factor from *Streptomyces coelicolor* (Kang *et al.*, 1999) and the *Saccharomyces cerevisiae* YAP1 protein (Delaunay *et al.*, 2000).

In *Schizosaccharomyces pombe*, the *pap1* gene, encoding the transcription factor Pap1, has been consistently isolated in screens for oxidative stress survival. Pap1 and its *S. cerevisiae* homologue YAP1 belong to the AP-1 family of transcriptional regulators, showing homology in their bZIP DNA binding domain to the mammalian c-Jun protein (Moye-Rowley *et al.*, 1989; Toda *et al.*, 1991). Pap1 and YAP1 contain two clusters of three and four cysteine residues each, one located at the centre of the protein, and the second at the carboxy-terminal region (Wemmie *et al.*, 1994; Toone and Jones, 1998). Conditions suspected to alter the intracellular redox state, such as H₂O₂, diamide, diethylmaleate (DEM), heavy

Accepted 9 April, 2002. *For correspondence. E-mail elena.hidalgo@cexs.upf.es; Tel. 34-93-542-2891; Fax 00-34-93-542-2802. †The first two authors contributed equally to this work.

metals and a variety of toxic drugs, induce the expression of Pap1-dependent genes (Toone *et al.*, 1998). Pap1 activity is modulated at the level of cellular localization; pre-existing Pap1 accumulates in the nucleus upon oxidative treatments, as a consequence of inhibition of Crm1-dependent Pap1 export (Toone *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 1999). Similar relocalization upon stress has been described for its homologue YAP1 (Kuge *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1998; Kuge *et al.*, 1998). The nuclear export signals (NES) for both YAP1 and Pap1 have been identified (Yan *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 1999). These Crm1-interacting motifs are located within the second cysteine-rich domain (CRD) in the carboxy terminus of each protein. Thus, deletion of the CRD results in constitutive nuclear localization of both YAP1 and Pap1 (Kuge *et al.*, 1997; Kudo *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 1999).

During the last years, many groups have been trying to understand how Crm1-mediated Pap1/YAP1 export can be disrupted upon oxidative stress, although little is known at the molecular level. A recent study reported the participation of both cysteine domains of YAP1 in oxidative stress sensing: two cysteine residues of YAP1, each one belonging to a different cysteine cluster, are necessary for the H₂O₂-dependent formation of a disulphide bond and subsequent Crm1-mediated export inhibition (Delaunay *et al.*, 2000). Nevertheless, several reports suggested that the carboxy-terminal CRD of either YAP1 or Pap1 is sufficient to confer regulated cellular localization to an heterologous cargo upon oxidative stress signalling (Kuge *et al.*, 1997; Kudo *et al.*, 1999). The possible participation of the individual cysteine residues of the CRD in oxidative stress sensing has been extensively analysed (Kuge *et al.*, 1997; Wemmie *et al.*, 1997) and some groups concluded that the carboxy-terminal CRD is the only domain required for oxidative stress sensing in both Pap1 and YAP1 (Kudo *et al.*, 1999). More recently, Kuge and coworkers described that diamide also triggers the formation of reversible disulphide bonds between cysteine residues different from the ones oxidized by H₂O₂ (Kuge *et al.*, 2001).

The α,β -unsaturated carbonyl compound DEM was first reported to conjugate with glutathione by Boyland and Chasseaud (Boyland and Chasseaud, 1968), which led to widespread use of DEM as a glutathione-depleting agent and, therefore, as a cellular pro-oxidant. Using NMR spectroscopy, Kubal and coworkers described the formation of diastereomers of S-(α,β -diethoxycarbonyl)glutathione as the product of DEM-glutathione conjugation (Kubal *et al.*, 1995). DEM can trigger Pap1 and YAP1 nuclear accumulation (Kudo *et al.*, 1999; Kuge *et al.*, 1997), but it is not known whether it does so directly or as a consequence of glutathione depletion.

We report here the molecular modifications of Pap1 upon DEM stress. We demonstrate that Pap1 nuclear

localization and Pap1-dependent transcription, are dependent on the redox state of critical cysteine residues, as expected for an oxidant sensor. The carboxy-terminal CRD is necessary and sufficient for DEM sensing, but not for sensing H₂O₂ stress. We provide genetic and biochemical evidence that DEM induces irreversible modifications of cysteines 523 or cysteine 532. These modifications are sufficient to impede interaction between Pap1 and the export machinery upon DEM treatment; we propose that DEM binds to the thiol group of the target cysteine residues to form a stable thioether. A model for the irreversible post-translational modification of Pap1 induced by DEM is presented.

Results

Cysteine residues in Pap1 are essential for oxidative stress sensing

The localization of a GFP.Pap1 fusion has been described to be cytoplasmic in wild-type *S. pombe* cells, whereas oxidative treatments like H₂O₂ or DEM triggered the accumulation of the fusion protein to the nucleus (Toone *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 1999). It has been demonstrated that, in non-stressed cells, the GFP.Pap1 fusion is exported out of the nucleus by Crm1, the nuclear export signal (NES) being located at the carboxy-terminal CRD of Pap1 (Toda *et al.*, 1992; Benko *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 1999). We studied the role of some cysteine residues of Pap1 in oxidative stress sensing and export inhibition by analysing *in vivo* the cellular localization of cysteine substitution mutants. Wild-type and mutant *GFP.pap1* alleles were integrated into the chromosome of a $\Delta pap1$ strain, and the localization of the fusion proteins determined by fluorescence microscopy. As others and we have shown before, a GFP.Pap1 fusion protein translocated to the nucleus upon both, H₂O₂ and DEM stresses (Fig. 1B). The cytoplasmic localization of Pap1 under non-stressed conditions was unaffected in some cysteine-to-alanine substitutions (i.e. C501A, C523A and C278A). On the contrary, the C523D (cysteine-to-aspartic residue) and C532A mutants showed strong and weak nuclear staining, respectively, indicative of defective nuclear export. These data are in agreement with the work of Yoshida and coworkers (Kudo *et al.*, 1999), who showed that those substitutions affected the access of Crm1 to the NES in Pap1. Interestingly, the cysteine residue at position 523, which is embedded within the NES, when substituted to alanine results in wild-type behaviour, whereas substitution to an acidic residue leads to complete lack of export. We conclude that cysteine 523 is not directly required for Crm1 binding, but that the addition of a negatively charged aspartic acid residue can impede access to the NES. As expected, triple cysteine-to-alanine substitutions within the CRD (C501/523/532A) had a strong export

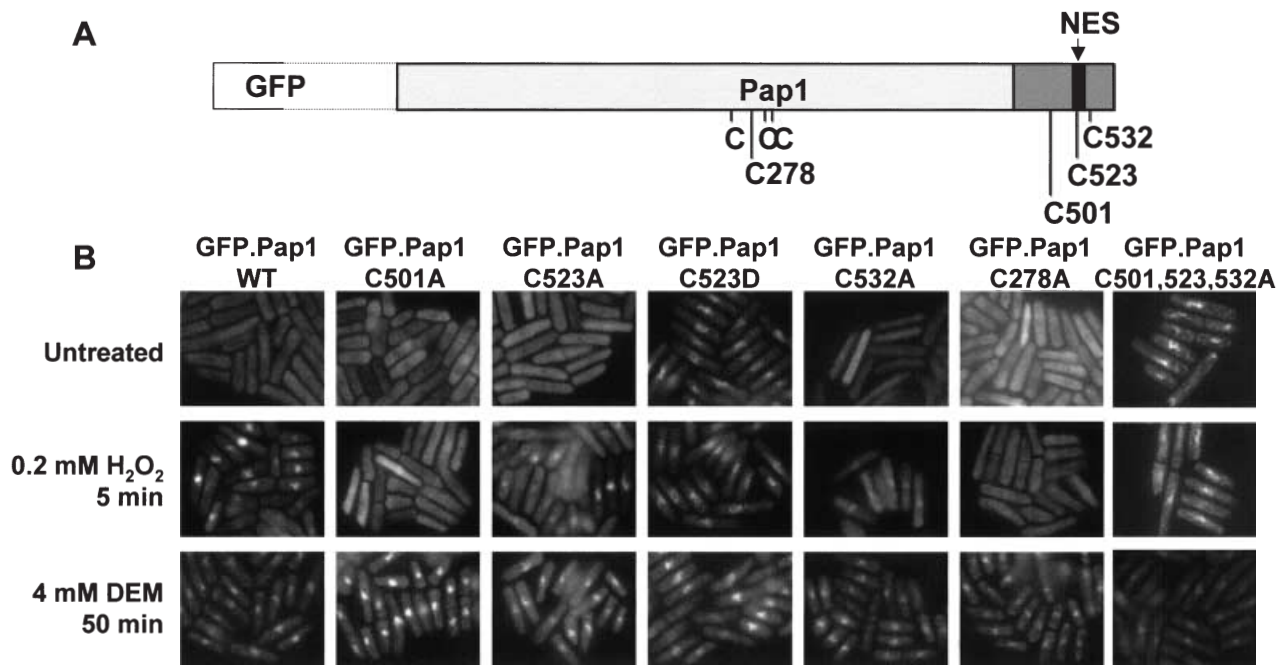


Fig. 1. Identification of redox-sensitive cysteine residues in Pap1.

A. Schematic representation of GFP.Pap1. The two cysteine clusters and the relative positions of some cysteines residues are indicated. GFP is not drawn at scale.

B. Localization of wild-type and mutant GFP.Pap1 proteins. A $\Delta pap1$ mutant, EHH108, was transformed with linearized p85.41x and derivative plasmids, containing the wild-type and mutant *GFP.pap1* genes under the control of the *nmf* promoter. Integrants were selected as described in *Experimental procedures*. The cellular distribution of the fusion proteins was determined by fluorescence microscopy in cells that had been left untreated, after a 5 min exposure to 0.2 mM H₂O₂, or after 50 min treatment with 4 mM DEM.

defect; the already weak nuclear export of the C532A mutation is further impaired by additional changes at the CRD (Fig. 1B). Identical constitutive nuclear staining was observed for a double C523/532A substitution (data not shown).

Two of the mutant fusion proteins with basal cytoplasmic localization, GFP.Pap1.C501A and GFP.Pap1.C278A, remained cytoplasmic upon H₂O₂ stress (Fig. 1B). The same residues have been described to be responsible for H₂O₂ sensing in the *S. cerevisiae* homologue YAP1, where those two cysteines have been suggested to form a disulphide bond upon H₂O₂ stress (Delaunay *et al.*, 2000). As indicated in Fig. 1A, those two cysteine residues belong to different cysteine clusters in Pap1, and the formation of a disulphide bond between them could strongly affect the structure of Pap1 concealing the NES.

Unexpectedly, all the mutant proteins we assayed, including those insensitive to H₂O₂ stress, were able to translocate to the nucleus upon DEM treatment (Fig. 1B). This result strongly suggests different modes of Pap1 activation upon either H₂O₂ or DEM stress.

To assay the *in vivo* relevance of these changes, we measured the transcriptional activity of the fusion proteins, using the target gene *trr1* as a reporter (Toone *et al.*, 1998). We compared the basal (lanes 1 in Fig. 2B),

H₂O₂- (lanes 2) and DEM-induced (lanes 3) levels of *trr1* transcript. As expected, the fusion proteins with strong defects in nuclear export (GFP.Pap1.C523D and C501/523/532A proteins, Fig. 2B) showed increased levels of *trr1* expression when compared to the wild type. The weak export defect of the mutant GFP.Pap1.C532A was only partially reflected by a moderate increase in the basal level of *trr1*. The single mutants GFP.Pap1.C501A and C278A, as well as the double mutant C278/501A, presented a very defective response to H₂O₂ (lanes 2 of Fig. 2B), in concordance with the absence of nuclear localization of these proteins in response to this oxidant. The levels of *trr1* transcript in response to DEM were as high for all the mutant Pap1 proteins as it was for wild-type cells (Fig. 2B, lanes 3). The different transcriptional activity of the mutant GFP.Pap1 proteins was not due to differences of protein levels in the different strains, as determined by Western blot analysis (data not shown).

Kinetics of Pap1 nuclear accumulation in response to DEM vs. H₂O₂

The results described above established that Pap1 contains two cysteine residues, C278 and C501, involved in

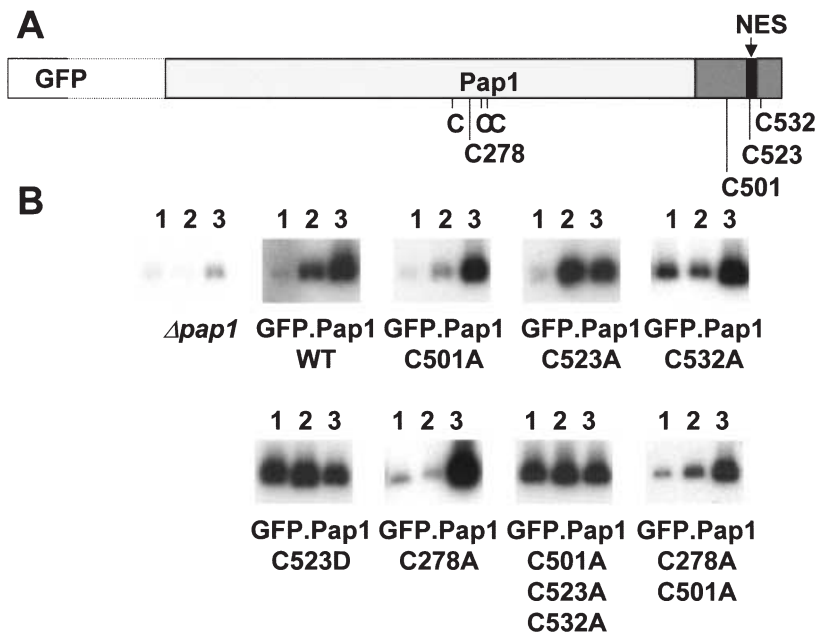


Fig. 2. *trr1* expression is dependent on Pap1 localization.

A. Scheme of GFP.Pap1; the relative positions of some cysteine residues are indicated.

B. Northern blot analysis of Pap1-dependent *trr1* expression. Total RNA from the $\Delta pap1$ strain EHH108 alone ($\Delta pap1$) or from EHH108-derivatives containing integrated versions of either wild-type or mutant GFP.*pap1* genes was obtained. Cultures had been left untreated (lanes 1), were treated for 20 min with 0.5 mM H_2O_2 (lanes 2), or were treated for 60 min with 4 mM DEM (lanes 3). Equal loading was confirmed with methylene blue staining of the nylon membranes prior to hybridization (data not shown). Similar results were obtained in three independent experiments.

H_2O_2 but not in DEM sensing. To further analyse the differences in induction and reversibility for both stress responses, *S. pombe* cells overexpressing wild-type GFP.Pap1 were challenged with H_2O_2 or DEM and the subcellular localization of the protein was determined by fluorescence microscopy at different times following stress imposition (Fig. 3A). GFP.Pap1 responded very rapidly to H_2O_2 , with 100% of the cells showing nuclear staining only 5 min after the challenge (Fig. 3A, white bars). However, this response was transient and the GFP.Pap1 fusion was efficiently exported from the nucleus 50 min after the H_2O_2 stress. On the contrary, the nuclear accumulation of GFP.Pap1 following DEM treatment was slower (Fig. 3A, grey bars), reaching its maximum at 50 min. Furthermore, the response appeared to be irreversible at least for the time indicated in this experiment (Fig. 3A).

The carboxy-terminal cysteine-rich domain (CRD) of Pap1 is sufficient for DEM, but not for H_2O_2 , sensing

We then analysed whether DEM-sensing could be restricted to the last carboxy-terminal 73 amino acids of Pap1, that is, the CRD, by fusing this domain to a heterologous cargo. We generated chimeras containing the CRD fused to an NLS or NLS-containing proteins, namely GFP.NLS^{SV40}.CRD, and a GFP.Cdc10.CRD fusion protein. However, the fluorescent proteins showed constitutive nuclear localization probably due to a dominant effect of NLS-mediated import vs. CRD-mediated export (data not shown). We then decided to use a protein lacking nuclear transport signals, a GFP.GST chimera, which has been

described to be localized throughout the cell due to passive diffusion across the nuclear pore complex, as a reporter of CRD-mediated export (Kudo *et al.*, 1997). As expected, the GFP.GST.CRD fusion protein showed cytoplasmic localization due to the presence of an NES at the CRD of Pap1 (Fig. 3B). Upon DEM treatment, the nuclear exclusion was abolished, and the fusion protein redistributed between the cytoplasm and the nucleus (Fig. 3B, grey bars), following very similar kinetics to those observed for full-length GFP.Pap1 (Fig. 3A, grey bars). On the contrary, export of the chimera was not inhibited upon H_2O_2 stress since this fusion contains only one of the two cysteine residues required for H_2O_2 sensing.

DEM irreversibly modifies the CRD of Pap1

We have shown that the CRD region of Pap1 contains all the information required for DEM sensing. We decided to analyse whether we could identify a DEM-mediated modification of the CRD region through a mobility shift. GST.CRD protein was purified from *E. coli* cells grown in normal medium or following 1 h of growth in H_2O_2 - or DEM-containing media. As shown in Fig. 4, a significant decrease in the mobility of the fusion protein isolated from DEM-treated cultures (lane 3) was observed when compared with proteins isolated from untreated cultures or from cells exposed to H_2O_2 (lanes 1 and 2, Fig. 4). When we purified a DEM-treated fusion protein in which the three cysteine residues of the CRD had been substituted to alanines, the chimera migrated at an intermediate position between the fastest and the slowest forms described for the wild-type GST.CRD (compare lane 5 with lanes 1

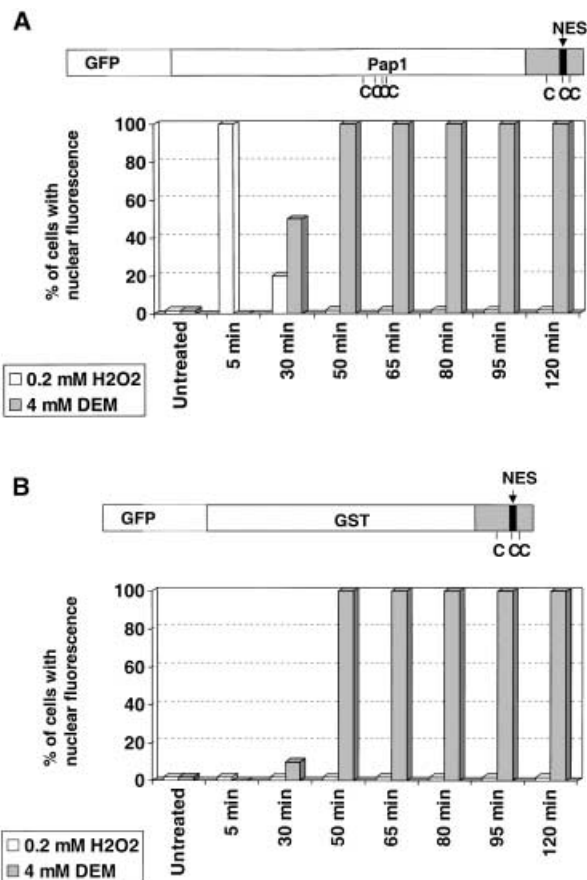


Fig. 3. Kinetics of nuclear export inhibition of Pap1 by H₂O₂ and DEM.

A. Scheme of GFP.Pap1 and percentage of cells with nuclear staining at different time points after H₂O₂ or DEM treatments. Strain EHH108 ($\Delta pap1$) transformed with pRep41-GFP. *pap1* was grown in minimal media for 15–17 h in the absence of thiamine to trigger the expression of the fusion protein GFP.Pap1. The percentage of cells with nuclear staining before and after oxidative treatments (to reach final concentrations of 0.2 mM for H₂O₂ and 4 mM for DEM) was estimated by fluorescence microscopy. The results are the average of three independent experiments.

B. Scheme of GFP.GST.CRD and percentage of cells with nuclear staining at different time points after H₂O₂ or DEM treatments. Strain EHH108 transformed with p86.41x was grown in minimal media for 15–17 h in the absence of thiamine to trigger the expression of the fusion protein GFP.GST.CRD. Cellular redistribution of the fusion protein, from its initial cytoplasmic to a nuclear/cytoplasmic localization upon stress, was monitored by fluorescence microscopy in cell cultures upon addition of 0.2 mM for H₂O₂ or 4 mM for DEM at the times indicated in the figure. The results are the average of three independent experiments.

and 3, Fig. 4). The intermediate mobility is probably due to the use of GST as a tag, since it contains some cysteine residues which could react with DEM. In fact, thiol-group modifiers have been described to react with cysteine residues from GST and induce steric hindrance of the substrates pockets, inhibiting GST catalytic function (Tamai *et al.*, 1990; Nishihira *et al.*, 1992; van Iersel *et al.*, 1997). A GST.CRD.C501A mutant protein isolated from DEM-treated cultures showed similar mobility as the

treated wild-type form (compare lanes 6 and 3, Fig. 4), indicating that residue C501 may not be involved in DEM sensing. This was confirmed by using the double mutant GST.CRD.C523/532 A, which presented similar mobility as the triple mutant (compare lanes 7 and 5, Fig. 4) following DEM treatment. Similar results were obtained when we analysed the change in mobility of a series of MBP.CRD fusion proteins (data not shown). MBP lacks cysteine residues, ensuring that there was no interference in the assay, however, its larger size impaired the electrophoretic separation of the modified forms (data not shown).

In order to determine the nature of the DEM-induced modification of the CRD, we examined the untreated and DEM-treated forms of MBP.CRD by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Fig. 5). The spectrum was recorded in the 750- to 3500 Da region and the mass of each observed fragment differed from its theoretical value by <70 p.p.m. The peptide containing the cysteine residue 523 showed a mass of 1418.59 Da in the untreated MBP.CRD, but not in the DEM-treated form. Instead, we observed a 1590.71 Da peak for the DEM-treated MBP.CRD sample, with a mass shift of 172.12 Da (Fig. 5A). The difference between these values corresponds closely to the expected mass of a DEM adduct in a thioether linkage with the thiol group of the cysteine residue (172.07 Da). Such conjugation reaction had been previously described between DEM with either glutathione or L-cysteine (Kubal *et al.*, 1995). To confirm that the modification was linked to the cysteine residue at position 523, the amino acid sequence of the 1590 Da peptide was determined by tandem mass spectrometry using the Q-Star in the product ion mode (see *Experimental procedures*). This analysis confirmed the expected sequence (H-FESFDIDDLCSK-OH) with a modification of 172 Da in the cysteine residue. A partially digested peptide containing the cysteine residue 532 also showed a shift upon DEM treatment of 172 Da (Fig. 5B). In this case, another peak with a mass gain of only 126 Da also appeared for the spectra of the DEM-modified form; this mass difference could be due to the formation of a thioester, with the loss on an ethoxy group of DEM.

Modification of the CRD of Pap1 by DEM inhibits Crm1 access to the NES

In order to test whether the DEM-induced modifications at the CRD could sterically impede the access of the exporter Crm1 to the NES located at this domain, we developed an assay to study the *in vivo* interaction of CRD and Crm1. We transformed *S. pombe* cells with a plasmid containing a GST.CRD chimeric gene under the control of the inducible *nmt* promoter. After thiamine

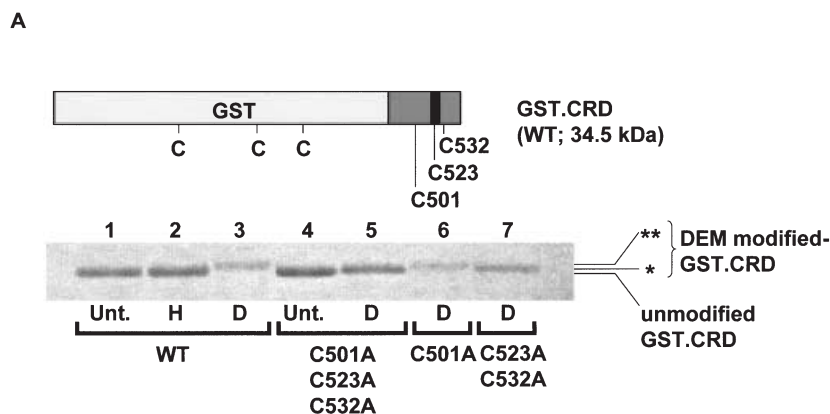


Fig. 4. DEM-mediated *in vivo* modification of the CRD. Denaturing electrophoretic analysis of wild-type and mutant GST.CRD. A schematic representation of the fusion protein GST.CRD is shown. *E. coli* cells overexpressing either wild-type GST.CRD (WT) or mutant forms with cysteine-to-alanine substitutions at the CRD (C501/523/532 A, C501A and C523/532 A) were grown in the absence of oxidants (Unt.) or in the presence of 0.5 mM H₂O₂ (H) or 4 mM DEM (D). Purification of the fusion proteins was performed as described in *Experimental procedures*. Samples were analysed by electrophoresis on an SDS-12.5% acrylamide-bisacrylamide (120 : 1) gel followed by Coomassie staining. The unmodified, faster-mobility forms (lanes 1, 2 and 4) are indicated. DEM induced a mobility change in cysteine residues from both the GST tag and the CRD (indicated as **, lanes 3 and 6) when C523 and C532 of the CRD were present in the fusion protein. When the mutated forms lacked those residues at the CRD, DEM modified cysteine residues of the GST tag only, inducing an intermediate change in electrophoretic mobility (indicated as *, lanes 5 and 7).

removal, we prepared protein extracts from untreated, DEM-treated or H₂O₂-treated cells, and used GSH-Sepharose beads to pull down GST.CRD and GST.CRD-associated proteins. We analysed the samples by Western blot (Fig. 6). DEM-modified GST.CRD showed a shift in electrophoretic mobility when compared with the untreated or H₂O₂-treated forms, as described for the *E. coli*-expressed proteins (Fig. 4). As seen in Fig. 6, GST.CRD from either untreated or H₂O₂-treated cells was able to interact with Crm1, whereas the DEM-modified GST.CRD form could not coprecipitate with Crm1. No Crm1 was detected by Western blot analysis when GST alone was expressed at comparable levels to the GST.CRD fusion and pulled down with GSH-beads (data not shown). The inhibition of Pap1 export is a direct consequence of the DEM-induced modification at the CRD of Pap1, and it is not due to a modification of the exporter Crm1, since heterologous cargos containing different nuclear export signals do not accumulate at the nucleus upon DEM stress (data not shown).

Discussion

Identification and characterization of redox stress cellular sensors is starting to unravel the mechanisms by which cells trigger oxidative defence responses. In most cases, the inducer of the pathway reacts with the sensor and reversibly activates it instead of causing protein loss of function (Storz and Imlay, 1999; Jakob *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 1999). This seems to be the case for the *S. pombe* H₂O₂-sensor Pap1: as a consequence of a temporary oxidation of two cysteine residues, the transcription factor

translocates from the cytoplasm to the nucleus upon H₂O₂ stress. Nevertheless, Pap1-dependent stress response can be triggered by other stimuli, such as DEM. We demonstrate here that DEM can also induce Pap1 nuclear relocalization, however, it does so by covalent modification of different cysteine residues in the protein.

Although biochemical confirmation is still required, H₂O₂ seems to trigger the oxidation in Pap1 of cysteine residues 278 and 501, each located within a different cluster of cysteines on the polypeptide, maybe leading to an intramolecular disulphide bond. Residues located at equivalent positions in the *S. cerevisiae* homologue YAP1 have been postulated to exert the same role in H₂O₂ sensing (Delaunay *et al.*, 2000). According to this model, a substantial conformational change as a result of this oxidation could result in sequestration of the NES and subsequent loss of export and nuclear accumulation (Fig. 7). As in YAP1 (Izawa *et al.*, 1999; Delaunay *et al.*, 2000), the oxidation of Pap1 cysteine residues 278 and 501 is rapidly reversed by the Pap1-induced thioredoxin pathway, which is also involved in keeping the cysteine thiol groups reduced prior to H₂O₂ stress (our unpublished data). The equilibrium between these forces, reduction of cytoplasmic disulphide bonds by thioredoxins and reversible oxidation of free thiols by H₂O₂ stress, directs Pap1 cellular distribution.

Cysteine residues are also mediating DEM sensing. Nevertheless, they are not the same as the residues required for H₂O₂ sensing. The *in vivo* fusion experiments shown here demonstrate that the CRD domain alone is sufficient for sensing DEM, but not H₂O₂, stress (Fig. 3B). Furthermore, the kinetics of Pap1 cellular redistribution

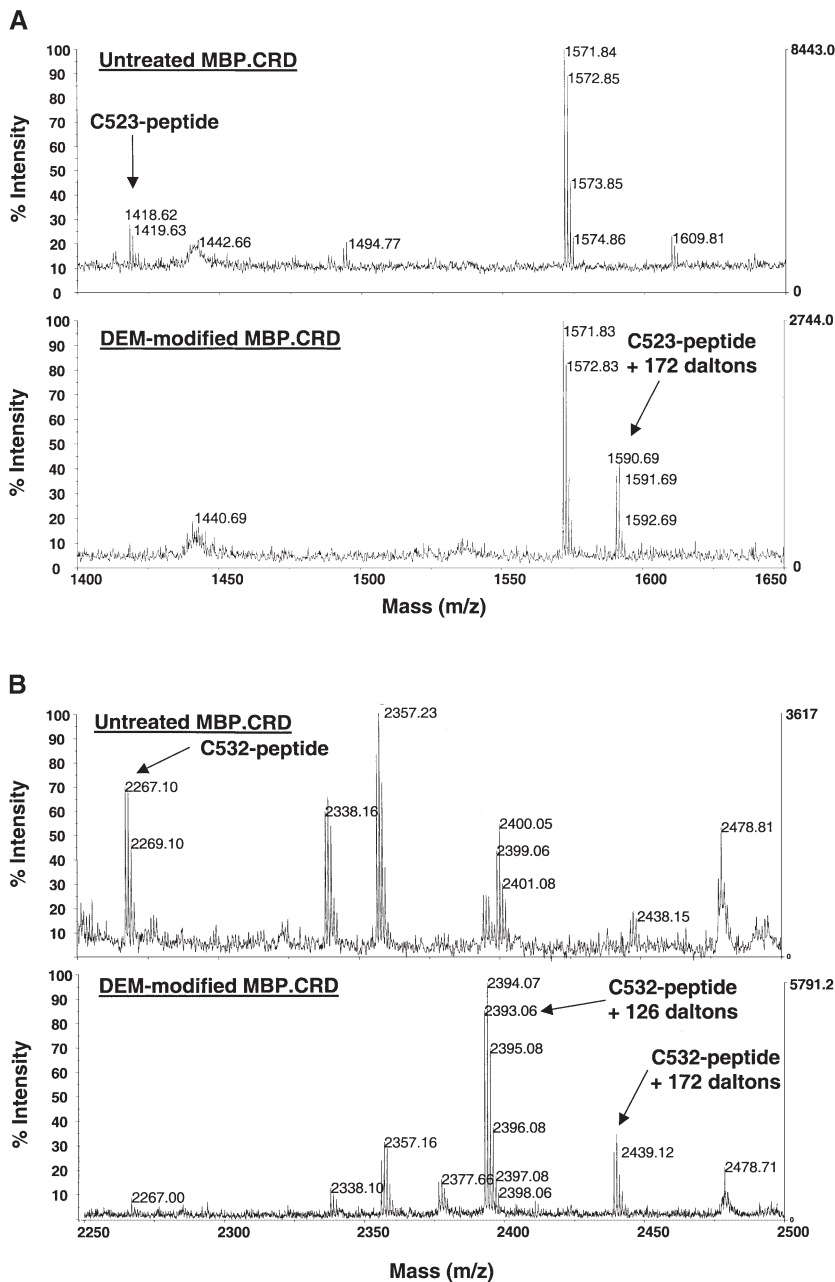


Fig. 5. Masses of tryptic MBP.CRD and DEM-modified MBP.CRD. Samples of wild-type MBP.CRD (untreated or DEM-modified) were purified and tryptic as described in *Experimental procedures*. Masses of the peptides were determined by MALDI-TOF spectrometry.

A. Masses of C523-containing peptides.

The mass determined for the C523-containing peptide was 1418.59 Da for the untreated MBP.CRD sample (the theoretical mass for that peptide was 1418.54), and 1590.71 Da for the DEM-treated MBP.CRD sample, with a mass gain of 172.12 Da.

B. Masses of C532-containing peptides.

The mass determined for the C532-containing peptide was 2267.10 Da for the untreated MBP.CRD sample (the theoretical mass for that peptide was 2267.06), and 2393.06 and 2439.12 Da for the DEM-treated MBP.CRD sample, with mass gains of 125.96 and 172.02 Da respectively.

upon stress is clearly different for H₂O₂ vs. DEM, both in time and in reversibility (Fig. 3A). DEM has been described as a weak electrophile that decreases the intracellular concentration of glutathione in the presence of glutathione transferases (Boylard and Chasseaud, 1967). Even though it has been widely used as a thiol depletor in experimental animal models, its use as a therapeutic agent has also been proposed to overcome resistance to radiation in tumours (Mirkovic *et al.*, 1997) or to prevent organ damage in inflammatory conditions (Nathens *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 1999). DEM toxicity could be a consequence of its reactivity with protein

cysteine residues and concomitant loss of function. In the case of Pap1, covalent modification of C523 and/or C532 by DEM could impede Crm1 access to the NES without a major change in Pap1 conformation (Fig. 7), possibly by steric hindrance or charge repulsion. This is similar to the effect caused by a cysteine-to-aspartic acid substitution at residue 523 (Fig. 1B). What is the nature of the thiol modification induced by DEM? The experiments we describe here using MALDI-TOF and tandem mass spectrometry have revealed a mass difference between unmodified and DEM-modified MBP.CRD of 172 Da per target cysteine residue (at positions 523 and 532), which

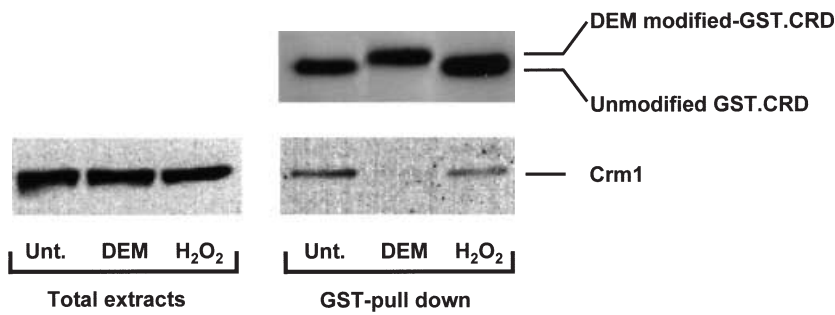


Fig. 6. Association of GST.CRD to Crm1 is altered upon *in vivo* treatment with DEM. Plasmid p89.3x, expressing GST.CRD, was introduced into the wild-type strain TP114-2 A. Cells were stressed or not with 4 mM DEM for 50 min or with 0.2 mM H₂O₂ for 5 min, and harvested. Total lysates were incubated in native conditions with GSH-Sepharose beads to purify GST.CRD and associated proteins. The purified proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by immunoblotting, using antibodies against Crm1 or against GST (GST-pull down). The total amount of Crm1 in the total lysates was also detected by Western blot (Total extracts).

matches the molecular weight of DEM. According to these data, the most likely chemical reaction would be the conjugation addition of the cysteine thiol group to the unsaturated bond of DEM, which would generate an irreversible adduct with a thioether structure. Such a modification would impede the access of Crm1 to its nuclear export signal. Therefore, the glutathione-depletor DEM could be considered not only an oxidant, but also an alkylating agent of exposed cysteine residues. In fact, the cysteine-alkylating agent iodoacetamide is also able to trigger nuclear localization of Pap1 (data not shown). Nevertheless, DEM treatment does not inhibit export of other Crm1 cargos such as the MAP kinase Sty1 or the protein kinase inhibitor NES (data not shown), suggesting that DEM does not impair Crm1 activity.

Through mutagenesis of the CRD, we were expecting to isolate cysteine mutants of Pap1 insensitive to DEM stress, and thus having constitutive cytoplasmic localization. In fact, the biochemical analysis of MBP and GST tags fused to different versions of the CRD indicate that cysteine residues 523 and 532 seem to be the DEM targets. The individual cysteine-to-alanine mutants (GFP.Pap1.C523A and GFP.Pap1.C532A) do respond to DEM, although one of them (C532A) shows a partial

defect in export. Unfortunately, the double C523/532 A mutant showed a constitutive nuclear localization (data not shown), and we speculate that this is due to these modifications perturbing the Crm1-interacting domain. In the case of YAP1, a cysteine-to-threonine substitution at that last cysteine yields a protein with wild type phenotype; further substitution of the other two cysteine residues of the CRD to alanine yields a constitutively cytoplasmic YAP1 protein insensitive to DEM (Kuge *et al.*, 1997). Unfortunately, and unlike YAP1, a GFP.Pap1.C532T mutant (and the double and triple cysteine-to-alanine derivatives on residues 501 and 523) still demonstrated export defects as shown by clear nuclear staining under unstressed conditions (data not shown).

The results shown here indicate that different signals can interact with the same sensor and activate it to trigger identical defence responses, but that the molecular basis of such activation may differ widely for each one of the inducers. Similar activation patterns have been described for the prokaryotic redox sensors OxyR and SoxR, where two types of signals trigger the formation of distinct active forms. Thus, superoxide and nitric oxide stress can lead to active forms of SoxR which are clearly different at the

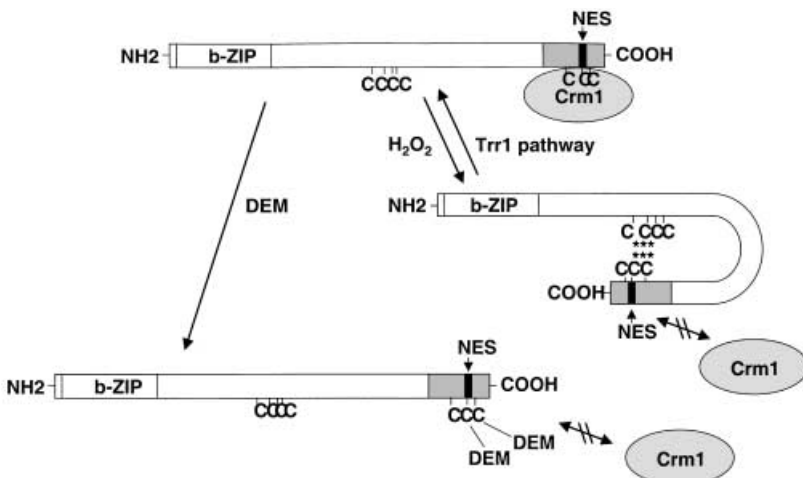


Fig. 7. A model for Pap1 nuclear accumulation upon H₂O₂ vs. DEM stress. Schematic representation of Pap1 binding to Crm1 through its NES located at the carboxy-terminal region. The two cysteine clusters of Pap1 are indicated. DEM irreversibly modifies C523 and C532 by direct covalent modification of their thiol groups (DEM; see *Discussion*), impeding access of Crm1 to the NES. H₂O₂ seems to promote the oxidation of C278 and C501 (represented by asterisks between the two cysteine residues), which may induce a conformational change leading to Pap1 nuclear accumulation. The thioredoxin reductase (Trr1) pathway can revert H₂O₂-induced cysteine oxidation (see *Discussion*).

molecular level (Hidalgo *et al.*, 1997; Ding and Demple, 2000). Also, H₂O₂ stress (Zheng *et al.*, 1998) and S-nitrosothiols (Hausladen *et al.*, 1996) can activate the transcription factor OxyR, although it has not yet been described whether they lead to the same active form or not. It will be interesting to know whether other inducers of Pap1 do so through the production of modified forms similar to those described for H₂O₂ or DEM.

Experimental procedures

Yeast strains and growth conditions

Most of the experiments were performed with the wild-type strains HM123 (*h⁻ leu1*) and TP114 (*h⁹⁰ leu1 ura4*), and the Δ *pap1* strain TP108-3C (*h⁻ leu1 his2 ura4 pap1::ura4⁺*) (Toda *et al.*, 1991). Strain EHH108 was constructed by transforming strain TP108-3C with a PCR-amplified fragment of a non-functional allele of *ura4* [*ura4-D18*; (Grimm *et al.*, 1988)], and selection of *ura* minus integrants on 5-fluoro-orotic acid-containing plates, as previously described (Boeke *et al.*, 1984). Cells were grown in rich medium (YE5S) or in synthetic minimal medium (EMM2) as described (Moreno *et al.*, 1991; Alfa *et al.*, 1993).

Plasmids

We used plasmid pRep41-*GFP.pap1* (Toone *et al.*, 1998) to trigger the expression of a GFP.Pap1 fusion protein in *S. pombe* cells. In order to construct the plasmid p86.41x, encoding the fusion protein GFP.GST.CRD, a *Bgl*II-*Spe*I fragment from plasmid pRep41-*GFP.pap1*, containing most of the *pap1* open reading frame except for the CRD, was eliminated and the remaining was ligated to a *Bam*HI-*Spe*I DNA fragment encoding GST, which had been PCR-amplified from pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech) with primers 5'-CGGGATCCATGTCCCCTACTAGGTT-3' (including a *Bam*HI site and the *GST* initiation codon) and 5'-GGACTAGTACGCGGAACCAGATCCGA-3' (containing an *Spe*I site). A 4.5-kb *Pst*I-*Sac*I fragment from plasmid pRep41-*GFP.pap1*, including the *GFP.pap1* coding and regulatory sequences, was subcloned into plasmid pJK148, a Bluescript derivative containing the *S. pombe leu1* gene (Keeney and Boeke, 1994). The new plasmid was called p85.41x. In order to construct *pap1* mutant alleles, p85.41x was used as a template for PCR reactions using pairs of mutagenic and complementary primers containing the codon change of interest. The mutagenesis, performed using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) following manufacturer's instructions, yielded plasmids p85.C278A (using primers 5'-CGGTAACAATTTGCCCAAAGCTATCTAC-3' and 5'-GTAGATAGCTTTTGGGCAAATTGTTTACCG-3'), p85.C501A (primers 5'-CATACCTCAGCGCCCCCAAGG-3' and 5'-CCTTGGGGGCGCTGAGGTATG-3'), p85.C523A (primers 5'-GATGATTTGGCTAGCAAGTTG-3' and 5'-CAACTTGCTAGCCAAATCATC-3'), p85.C532A (primers 5'-GAATAAAGCTAAAGCTTCTTCTTCGGGTG-3' and 5'-CACCCGAAGAAGAAGCTTTAGCTTTATTC-3') and plasmid p85.C523D (primers 5'-GATGATTTGGATAGCAAGTTG-3' and 5'-CAACTTGCTATCCAAATCATC-3'). Double and triple

cysteine substitutions were generated using the single-codon mutants as templates of second or third mutagenesis reactions. All the mutations were confirmed by sequencing. The p85.41x plasmid and its mutation derivatives were used to generate chromosomal insertions of *GFP*-tagged *pap1* genes into the *leu1* locus of strain EHH108 (see below). The CRD-coding region of *pap1* was PCR-amplified using plasmid pRep41-*GFP.pap1* as a template with primers 5'-GAAGATCTACTAGTTCTCAAATGCCTTCAG-3' (containing a *Bgl*II artificial site and the *Spe*I site of *pap1*) and 5'-GCA GCTTGAATGGGCTTCCATAG-3' (which hybridizes downstream of the multiple-cloning site of the pRep series of *S. pombe* vectors). This fragment, digested with *Bgl*II and *Sac*I, was subcloned into the GST-tagging fusion vector pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech), yielding plasmid p76.GST. Mutant CRDs were subcloned into pGEX-4T-1 using the same strategy as described for the wild-type form but using as templates in the PCR reactions the following plasmids: p85.C501/523/532 A, p85.C523/532A and p85.C523A. The wild-type CRD-coding region of *pap1* was also PCR-amplified and digested as described above for the GST fusions, and subcloned into pMAL.c2 (New England Biolabs) to yield pMBP.CRD (WT). In order to generate a GST.CRD-encoding gene to be induced in *S. pombe* cells, the GST-coding region was PCR-amplified using plasmid pGEX-4T-1 and primers 5'-CCGGGTGACATGTCCCCTACTAGGTTATTG-3' (containing a *Sac*I artificial site) and 5'-CGGGGATCCACGCGGAACCAG-3' (which contains a *Bam*HI site). This fragment, digested with *Sac*I and *Bam*HI, was subcloned into the *S. pombe* vector pRep3x (Maundrell, 1993). The CRD was then PCR-amplified as described above, digested with *Bgl*II and *Sma*I, and subcloned into the pRep3x-GST vector, previously digested with *Bam*HI-*Sma*I. The resulting plasmid was named p89.3x.

Construction of yeast strains with integrated versions of modified *pap1* genes

The plasmid p85.41x or its mutant derivatives, containing the *GFP.pap1* coding region and the *leu1* gene, were linearized with *Nru*I, which yielded single DNA fragments by digestion at the *leu1* locus. EHH108 *S. pombe* cells were transformed using the lithium acetate method (Moreno *et al.*, 1991) with *Nru*I-linearized plasmids; cells where integration occurred were selected by their ability to grow in media without leucine. Yielding strains were named EHH14 (WT *pap1*), EHH14.C278A, EHH14.C501A, EHH14.C523A, EHH14.C532A, EHH14.C278, 501 A, EHH14.C523D, EHH14.C523, 532 A and EHH14.C501, 523, 532 A.

RNA analysis

Cells, grown in minimal media to a final OD₆₀₀ of 0.5, were left either untreated or treated for the indicated times with 0.5 mM H₂O₂ or 4 mM DEM. Yeast cultures (25–50 ml) were then centrifuged at 500 *g* for 3 min, washed with H₂O and cell pellets were immediately frozen in dry ice. Each sample was then resuspended in 0.4 ml of AE buffer (50 mM sodium acetate pH 5.3, 10 mM EDTA pH 8.0). Sodium dodecyl sulphate was then added to a final concentration of

1%, and proteins and DNA extracted by adding 0.3 ml of acidic phenol, and incubation at 65°C for 5 min. Samples were cooled down in dry ice, 0.3 ml of chloroform was added, and the aqueous phase was separated by centrifugation at 10 000 *g* for 2 min at 4°C. After chloroform extraction, RNA was precipitated with ethanol. RNA concentration was determined by OD260 and equal amounts (10 µg) were loaded in formaldehyde agarose gels (Sambrook *et al.*, 1989) and transferred to GeneScreen Plus membranes (NEN Life Science Products). Equal loading was confirmed by staining ribosomal RNA in the nylon membranes with methylene blue, following manufacturer's instructions. Hybridization and washes were performed as recommended by the manufacturer. The blots were hybridized with a *trr1*-specific probe, which contained the complete ORF of the thioredoxin reductase-encoding gene. Probe was labelled with α -³²P-dCTP using a random primer system from Roche.

Purification and electrophoresis of GST- and MBP-tagged proteins

Bacteria strain FB810 (Benson *et al.*, 1994) transformed with the pGEX.4T-1 or pMAL.c2 derivatives were inoculated into LB broth (Miller, 1992) with 100 µg ml⁻¹ of ampicillin and incubated at 37°C for ~16 h with vigorous shaking. The overnight cultures were diluted 25-fold into 100 ml of fresh medium in duplicate or triplicate flasks and incubated at 37°C until the culture reached an optical density of 1 at 600 nm. Isopropyl- β -thio-D-galactoside (IPTG) was then added to a final concentration of 0.5 mM and shaking continued at 25°C for 4 h. When indicated, H₂O₂ (0.5 mM) or diethylmaleate (4 mM) were added to the cultures and incubation continued at 25°C for 20 min (H₂O₂ treatments) or 1 h (DEM treatments). The cells were then harvested and the cell pellets frozen. Cells were then resuspended in 4 ml of STET extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100), and broken by sonication. Debris and unbroken cells were removed by centrifugation. GST- and MBP-tagged proteins were purified with GSH-Sepharose (Amersham-Pharmacia) and amylose resin (New England Biolabs) beads, following manufacturer's instructions. Size differences among GST-tagged protein samples were observed by electrophoretic separation on 12.5% denaturing polyacrylamide (120 acrylamide:1 bisacrylamide) gels, and Coomassie staining.

Mass spectrometry

Wild-type MBP.CRD, previously treated *in vivo* or not with DEM, was bound to amylose beads as described above. The purified proteins were run on denaturing polyacrylamide, and stained by Coomassie. Protein bands were in-gel digested with trypsin (sequencing grade modified trypsin, Promega) as described before (Rosenfeld *et al.*, 1992; Hellman *et al.*, 1995), and the peptide pattern was analysed by MALDI-TOF spectrometry on a MALDI-TOF instrument (Voyager-STR, Applied Biosystems) using a matrix solution containing 5 mg ml⁻¹ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in a solution water:acetonitrile (1:1), 0.1% trifluoroacetic acid. The sequence of the DEM-modified peptide was determined

using a nano-ESI-Q-Star (Applied Biosystems). Prior to analysis the sample was desalted and fractionated using ZipTip C18 (Millipore). The doubly charged peptide ion with *m/z* 796.24 was selected in the first quadrupole and transported to the collision cell. The product ions detected in the TOF section were analysed to obtain the sequence. Due to the tryptic nature of the peptide with a positive charge in the C-terminal amino acid, the *y* ions series signals were completely detected in the spectrum, and the peptide sequence was obtained.

Crm1-CRD interaction assay

Exponentially growing cells were harvested by centrifugation, washed once with distilled water, resuspended in lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 120 mM KCl, 5 mM EDTA, 0.1% NonidetP-40, 10% glycerol, 10 mM NaF, 0.1 mM sodium vanadate, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 5 mg each of leupeptin, chymostatin, pepstatin, and aprotinin per ml] and disrupted by vortexing with glass beads for 30 s at setting 5.5 on a FastPrep FP120 (Bio101). Lysates were cleared by centrifugation at 14 000 *g* for 15 min at 4°C. Protein concentration was determined by the Bradford method. Pull-down experiments were performed with 1 mg of whole cell lysate and glutathione-Sepharose in NET-N [20 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 5 mg each of leupeptin and aprotinin per ml] and incubated at 4°C for 30 min. After five washes with 1 ml of NET-N, the proteins were separated in an SDS-10% polyacrylamide gel, transferred to PVDF membranes, and blotted with polyclonal antibodies against Crm1 or monoclonal antibodies against the GST tag (gift from Dr James DeCaprio).

Fluorescence microscopy

Exponentially growing yeast cultures (25 µl) were loaded onto poly L-lysine-coated, multiwell slides, and the remaining suspension was immediately withdrawn by aspiration. Three microlitres of Hoescht (1 µg ml⁻¹ in 50% glycerol) was added, and a cover slip was placed over the microscope slide. Fluorescence microscopy was carried out on a Nikon Eclipse E600 microscope at 100× magnification. Images were captures by use of a Digital Black-and-White CF 8/4 DXC KAPPA camera, using CD KAPPA ImageBase software.

Acknowledgements

We thank Dr Hiromi Maekawa (Paterson Institute for Cancer Research, UK) for providing plasmid and primers required for *ura4-D18* amplification, and Dr James A. DeCaprio for the monoclonal α -GST antibodies, DG122. We want to thank Dr Rodolfo Lavilla (Laboratory of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Universidad de Barcelona, Spain) and Dr David Andreu (Laboratory of Protein Chemistry and Proteomics, Universitat Pompeu Fabra) for helpful discussions regarding DEM reactivity and mass spectrometry. We are also thankful to Francesc Posas for his careful and critical reading of the manuscript. E.A.C. is the recipient of a predoctoral fellowship

from the Ministerio de Ciencia y Tecnologia (Spain). This work was supported by Dirección General de Investigación, Spain Grant PM99-0029 to E.H. We would like to thank the Imperial Cancer Research Fund (London), where some of this work was performed. During that period, E.H. was supported by an EMBO long-term fellowship.

References

- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., and Warbrick, E. (1993) *Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Banuett, F. (1998) Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 249–274.
- Benko, Z., Sipiczki, M., and Carr, A.M. (1998) Cloning of *caf1+*, *caf2+* and *caf4+* from *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in multidrug resistance, UV and pH sensitivity. *Mol Gen Genet* **260**: 434–443.
- Benson, F.E., Stasiak, A., and West, S.C. (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J* **13**: 5764–5771.
- Boeke, J.D., LaCroute, F., and Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**: 345–346.
- Boyland, E., and Chasseaud, L.F. (1967) Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. *Biochem J* **104**: 95–102.
- Boyland, E., and Chasseaud, L.F. (1968) Enzymes catalysing conjugations of glutathione with alpha-beta-unsaturated carbonyl compounds. *Biochem J* **109**: 651–661.
- Coan, C., Ji, J.Y., Hideg, K., and Mehlhorn, R.J. (1992) Protein sulfhydryls are protected from irreversible oxidation by conversion to mixed disulphides. *Arch Biochem Biophys* **295**: 369–378.
- Coleman, S.T., Epping, E.A., Steggerda, S.M., and Moye-Rowley, W.S. (1999) Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol Cell Biol* **19**: 8302–8313.
- Dalton, T.P., Shertzer, H.G., and Puga, A. (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 67–101.
- Delaunay, A., Isnard, A.D., and Toledano, M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**: 5157–5166.
- Ding, H., and Demple, B. (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 5146–5150.
- Grimm, C., Kohli, J., Murray, J., and Maundrell, K. (1988) Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. *Mol General Genet* **215**: 81–86.
- Hausladen, A., Privalle, C.T., Keng, T., DeAngelo, J., and Stamler, J.S. (1996) Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**: 719–729.
- Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J., and Heldin, C.H. (1995) Improvement of an 'In-Gel' digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* **224**: 451–455.
- Hidalgo, E., Ding, H., and Demple, B. (1997) Redox signal transduction: mutations shifting [2Fe-2S] centers of the SoxR sensor-regulator to the oxidized form. *Cell* **88**: 121–129.
- van Iersel, M.L., Ploemen, J.P., Lo, B.M., Federici, G., and van Bladeren, P.J. (1997) Interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1–1. *Chem Biol Interact* **108**: 67–78.
- Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y., and Kimura, A. (1999) Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 28459–28465.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., and Bardwell, J.C. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341–352.
- Jones, J.J., Fan, J., Nathens, A.B., Kapus, A., Shekhman, M., Marshall, et al. (1999) Redox manipulation using the thiol-oxidizing agent diethyl maleate prevents hepatocellular necrosis and apoptosis in a rodent endotoxemia model. *Hepatology* **30**: 714–724.
- Kang, J.G., Paget, M.S., Seok, Y.J., Hahn, M.Y., Bae, J.B., Hahn, J.S., et al. (1999) RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J* **18**: 4292–4298.
- Keeney, J.B., and Boeke, J.D. (1994) Efficient targeted integration at *leu1–32* and *ura4–294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**: 849–856.
- Kubal, G., Meyer, D.J., Norman, R.E., and Sadler, P.J. (1995) Investigations of glutathione conjugation in vitro by 1H NMR spectroscopy. Uncatalyzed and glutathione transferase-catalyzed reactions. *Chem Res Toxicol* **8**: 780–791.
- Kudo, N., Khochbin, S., Nishi, K., Kitano, K., Yanagida, M., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1997) Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem* **272**: 29742–29751.
- Kudo, N., Taoka, H., Toda, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999) A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J Biol Chem* **274**: 15151–15158.
- 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 disulphide bond formation. *Mol Cell Biol* **21**: 6139–6150.
- Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* **16**: 1710–1720.
- Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N., and Nomoto, A. (1998) Crm1 (Xpol) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* **3**: 521–532.
- Maundrell, K. (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**: 127–130.
- Miller, J.H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Mirkovic, N., Voehringer, D.W., Story, M.D., McConkey, D.J., McDonnell, T.J., and Meyn, R.E. (1997) Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols. *Oncogene* **15**: 1461–1470.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., and Mager, W. (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* **19**: 651–658.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth Enzymol* **194**: 795–823.
- 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 Dev* **3**: 283–292.
- Nathens, A.B., Marshall, J.C., Watson, R.W., Dackiw, A.P., and Rotstein, O.D. (1996) Diethylmaleate attenuates endotoxin-induced lung injury. *Surgery* **120**: 360–366.
- Nishihira, J., Ishibashi, T., Sakai, M., Nishi, S., Kumazaki, T., Hatanaka, et al. (1992) Characterization of cysteine residues of glutathione S-transferase P: evidence for steric hindrance of substrate binding by a bulky adduct to cysteine 47. *Biochem Biophys Res Commun* **188**: 424–432.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C., and Ferrara, P. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* **203**: 173–179.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press,.
- Sies, H. (1991) Oxidative stress: introduction. In: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Sies, H. (ed.). London, UK: Academic Press, pp. xv–xxii.
- Storz, G., and Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**: 188–194.
- Tamai, K., Satoh, K., Tsuchida, S., Hatayama, I., Maki, T., and Sato, K. (1990) Specific inactivation of glutathione S-transferases in class Pi by SH-modifiers *Biochem. Biophys Res Commun* **167**: 331–338.
- Toda, T., Shimanuki, M., Saka, Y., Yamano, H., Adachi, Y., Shirakawa, M., et al. (1992) Fission yeast pap1-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, crm1. *Mol Cell Biol* **12**: 5474–5484.
- Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M. (1991) Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* **5**: 60–73.
- Toone, W.M., and Jones, N. (1998) Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes Cells* **3**: 485–498.
- Toone, W.M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B.A., Toda, T., and Jones, N. (1998) Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev* **12**: 1453–1463.
- Wei, A.C., Fan, J., Jones, J.J., Hamilton, J.E., Li, Y.H., Marshall, J.C., and Rotstein, O.D. (1999) Delayed treatment with diethyl maleate prevents E-selectin expression in human endothelial cells. *Surgery* **126**: 286–292.
- Wemmie, J.A., Steggerda, S.M., and Moye-Rowley, W.S. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *J Biol Chem* **272**: 7908–7914.
- Wemmie, J.A., Wu, A.L., Harshman, K.D., Parker, C.S., and Moye-Rowley, W.S. (1994) Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem* **269**: 14690–14697.
- Yan, C., Lee, L.H., and Davis, L.I. (1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J* **17**: 7416–7429.
- Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulphide bond formation. *Science* **279**: 1718–1721.

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Recent Devel. Cell Res., 1(2003): 217-230 ISBN: 81-271-0006-4

12

Pap1, a sensor of oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*

Esther A. Castillo, Ana P. Vivancos and Elena Hidalgo
Cell Signalling Unit, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Universitat Pompeu Fabra, C/ Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

Abstract

Schizosaccharomyces pombe is an excellent model system to study stress responses: it has specific sensors to environmental changes (such as Pap1, an oxidative stress sensor), but it also has general signal transduction pathways which are activated by different types of stress signals and induce global responses, as described for mammalian cells; this is the case for the MAP kinase Sty1 pathway. The transcription factor Pap1 (*pombe* AP-1-like), an intracellular sensor of hydrogen peroxide (H_2O_2) and diethylmaleate (DEM), suffers post-translational modifications in response to these types of stress. Those modifications are specific for each type of signal. As a result, modified Pap1 is not recognized by the nuclear export protein Crm1 and accumulates at the nucleus, where it activates transcription of antioxidant genes. We will describe at the molecular level the modifications of Pap1 by both H_2O_2 and

DEM, the participation of Sty1 in Pap1 activation and the consequences of such signalling interactions.

Introduction

An inevitable consequence of aerobic life is the production of reactive oxygen species (ROS) derived from reduction of molecular oxygen during metabolic events such as respiration, or due to environmental processes. These ROS that include superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^{\bullet}), can modify lipids, proteins, and nucleic acids with concomitant loss of function (1). Aerobic cells contain both enzymatic (i.e. catalase or superoxide dismutase) and non-enzymatic (i.e. glutathione) activities to maintain the levels of ROS under toxic concentrations (2). Oxidative stress occurs when the rate of generation of ROS exceeds the detoxification capacity of the cell. In response to oxidative stress, cells trigger signalling pathways and specific transcription factors that ultimately increase the expression of antioxidant proteins which will repair the injuries caused by and reduce the harmful levels of these oxidants (3;4).

To sense and combat oxidative stress, some organisms have developed specific sensors that respond to increased levels of ROS. For example, OxyR and SoxR in *Escherichia coli* are specifically activated by H_2O_2 and $O_2^{\bullet-}$, respectively (5;6). OxyR functional homologues have been described in eukaryotic cells: *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* respond to H_2O_2 stress through two transcription factors, Pap1 (*pombe* AP-1-like; 7) and Yap1 (*yeast* AP-1-like; 8;9), respectively; upon H_2O_2 stress, they suffer post-translational modifications which lead to transcriptionally active conformations (10;11). All the sensors/transcription factors described for prokaryotic and eukaryotic microbes are not essential for the cells, but deletion of their genes renders cells sensitive to oxidative stress (12;13). The homologue of Pap1 and Yap1 in mammalian cells is c-Jun, that can form homodimers as well as heterodimers with Fos to form the transcriptional activator AP-1. The nuclear factor kappa B (NF-KB) is a transcription factor that regulates a variety of genes in response to extracellular stimuli. DNA-binding activity of AP-1 and NF-KB is dependent on the redox status of conserved oxidant-sensitive cysteines in their structure; nevertheless, these sensors are not specific for oxidative stress since they respond to physiological signals as well, and are essential for growth. Recent studies have demonstrated that, in mammalian cells, oxidants are involved in signalling pathways related to processes such as tumor generation and ageing (14).

Mammalian cells and *S. pombe*, but not *S. cerevisiae*, have highly conserved global stress responses that respond to a wide range of stimuli and lead to similar transcriptional changes. Central to these global stress responses are the stress-activated MAPK signalling pathways, which signal from the membrane or the cytoplasm to the nucleus to activate necessary changes in gene expression (15-17). Mammalian p38 and JNK (18), and the *S. pombe* Sty1/Spc1 MAPK (19) are the kinases implicated in these global responses to stress. Nevertheless, the *S. cerevisiae* homolog of Sty1, Hog1, specifically responds to osmotic stress, and it is not activated by other stimuli (20).

So, the fission yeast *S. pombe* has specific sensors that respond to oxidative stress and global responses that are activated by several types of stress (reviewed in Fig. 1), and therefore it seems to be the ideal model system to study eukaryotic stress responses. The *S. pombe* genome has been recently sequenced, setting the stage for the post-genomic

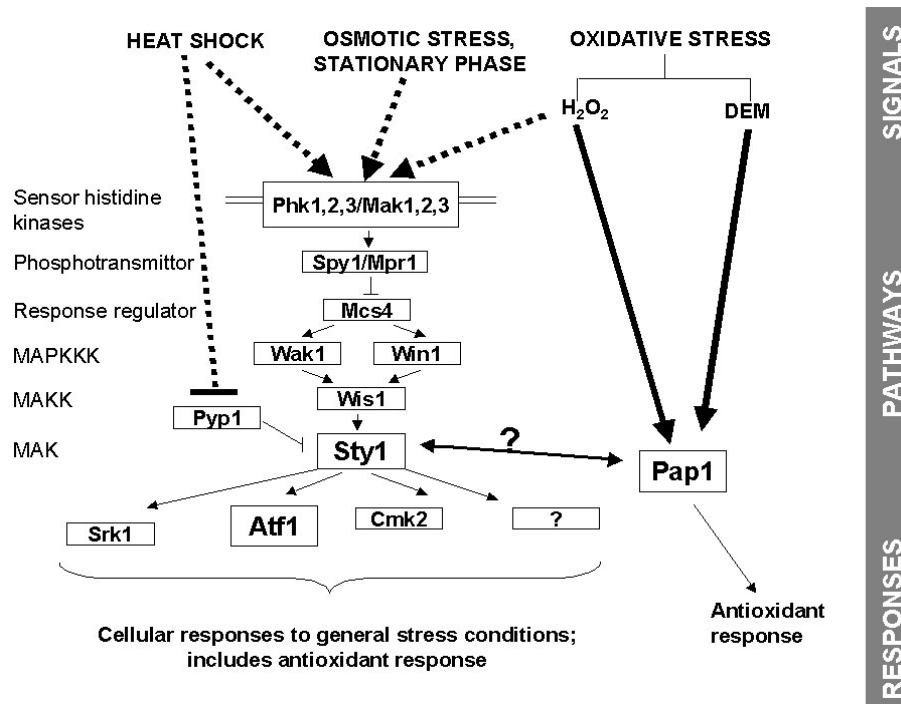


Figure 1. Scheme of the pathways and transcription factors activated by different types of stress in *S. pombe*. The stress-activated MAPK Sty1 signalling pathway respond to heat shock, stationary phase, osmotic and oxidative stress. Upon stress, Sty1 activates the transcription factor Atf1, and the kinases Cmk2 and Srk1; they initiate the general response to stress. H₂O₂ or DEM-stress activate the transcription factor Pap1, leading to a specific antioxidant response.

era of this model organism (21). *S. pombe* DNA is the sixth eukaryotic genome to be sequenced. It is worthnoting that *S. pombe* genome sequence has high quality, with a sequencing error rate less than 1 in 180,000 base pairs (21). The knowledge of the sequence has allowed to set up global expression studies through microarrays analysis at the Sanger Center by the group of Dr. Jürg Bähler (22). The group has already published studies of global gene expression, including responses to stress (23;24).

In this article, we will review the role of Pap1 in stress sensing and its relationship with the MAPK Sty1. We will show that Pap1 transcriptional activity can be directly activated by oxidant agents such as H₂O₂ and cysteine alkylating agent such as diethylmaleate. Each type of signal elicits a distinct modification in Pap1, in both cases leading to Pap1 activation.

Pap1: Role in multidrug resistance and gene targets

The identification of molecular components of antioxidant pathways has often been accomplished through genetic screenings of mutant clones with increased resistance to different drugs (shown in Table 1).

Table 1. *S. pombe* genes isolated in multidrug screenings

Screening	Gene	Gene product
Staurosporine resistance	<i>pap1</i>	AP-1-like transcription factor required for oxidative stress response
	<i>pad1</i>	Positive regulator of Pap1 stability; subunit of the 26S proteasome
Brefeldin A resistance	<i>hba2/bfr1</i>	ABC transporter; downstream target of Pap1
Leptomycin B	<i>pmd1</i>	ABC transporter; downstream target of Pap1
Maintenance of higher order chromosome structure and caffeine resistance	<i>crm1</i>	Nuclear export factor, negative regulator of Pap1
Brefeldin A and caffeine resistance	<i>hba1</i>	Protein containing a Ran binding-protein

For example, *pap1* was first cloned as a gene that, when in multiple copies, conferred resistance to staurosporine (7). Pap1 was thereafter isolated in a number of screenings for multidrug resistance (25;26). Pap1 was described as a transcriptional activator with homology to c-Jun at their bZIP DNA binding domain; Pap1 also showed DNA binding specificity similar to c-Jun (7). This multidrug resistant phenotype was also observed in cells overexpressing genes such as *pad1*, *hba2/bfr1*, *pmd1*, and *hba1*, or bearing mutations at *crm1*. All these genes, known to regulate multidrug sensitivity, are connected to Pap1 activation. Thus, Pad1 is a positive regulator of Pap1 stability as it is a subunit of the 26S proteasome in fission yeast (27-30). *hba2/bfr1* and *pmd1* genes are downstream targets of the Pap1 transcription factor: overexpression or constitutive activation of Pap1 result in the overexpression of Bfr1 and Pmd1 (31). These genes codify for proteins with ATP binding domains and with transmembrane sequences characteristic of ABC transporters (32;33). Mutations in the essential *crm1* gene rendered a *pap1*-dependent multidrug resistant phenotype as well as increased expression of Pap1-dependent genes, including those encoding ABC transporters (34). Thus, Crm1 was first isolated as a negative regulator of Pap1 activity since a temperature-sensitive mutation called *crm1-809* caused constitutive nuclear localization of Pap1 even at permissive temperature. Crm1 was later characterized as an essential nuclear export factor not only in *S. pombe* (31), but also in *S. cerevisiae* (35), *Xenopus* (36) and mammalian cells (37). Crm1 negatively regulates Pap1 activity by exporting it from the nucleus to the cytoplasm (31;38). *hba1* is one of the genes whose overexpression was associated with increased multidrug resistance although it had not been connected to *pap1* (39). Our recent studies show that overexpression and deletion of *hba1* produces nuclear accumulation of Pap1, and consequently transcriptional activation of those Pap1-dependent genes that confer multidrug resistance; Hba1 participates in the Crm1-dependent Pap1 nuclear export (Castillo, E.A., Vivancos, A.P., Ayté, J., Jones, N., and Hidalgo, E., manuscript in preparation; see below).

When stress-activated, Pap1 controls the expression of the following oxidative stress-induced genes: *ctl1* (encoding catalase; 40), *trx2* (encoding thioredoxin; 31), *trr1* (encoding thioredoxin reductase; 41), *pgr1* (encoding glutathione reductase; 42) and the above mentioned ABC transporters *hba2/bfr1* and *pmd1*. Therefore, activation of Pap1 seems to induce genes required to combat oxidative stress as well as multidrug toxicity. That may explain why deletion of Pap1 renders cells sensitive to many different drugs. Nevertheless, it is not known whether drugs can trigger Pap1 activation, either directly or through H₂O₂ generation. Our last studies indicate that Pap1 activation does not occur upon caffeine exposure, at least at the times and concentrations assayed (data not shown). That would indicate that multiple drugs would take benefit of the genes regulated by Pap1, and an increase (through Pap1 overexpression) or a decrease (in a Δ *pap1* strain) of Pap1 levels would modify their expression and the sensitivity to the drugs; nevertheless, they would not induce the pathway. In general, over-expression of ROS sensors has been described to increase cell resistance not only to oxidative stress, but also to metals and to multiple drugs (43-45).

Pap1 is regulated by changes in sub-cellular localization

Specific sequences within a protein contain the information necessary for its nucleocytoplasmic transport: most nuclear proteins have nuclear localization sequences (NLS) rich in basic amino acids, and others have short nuclear export sequences (NES) rich in leucine, firstly identified in the HIV-1 Rev protein and in the protein kinase A inhibitor PKI (46;47). These NES sequences are recognized by a highly conserved export receptor, termed Crm1 (for a review on nuclear export, see 48). This export factor recognizes NES-containing proteins at the nucleus and deliver them to the cytoplasm through the nuclear pore complex (NPC). Once in the cytoplasm, the export factor releases the exported protein and shuttles back to the nucleus (35).

Crm1 binds cooperatively to both the NES-containing substrate and RanGTP generating a nuclear ternary complex. Ran is a protein that switches between GTP- and GDP-bound states. The major guanine-nucleotide exchange factor of Ran is the nuclear protein RCC1, whereas its main GTPase-activating protein, RanGAP1, is almost exclusively found in the cytoplasm (49). This asymmetric distribution makes that any cytoplasmic Ran is immediately converted into the GDP-state. Nuclear Ran is thought to be predominantly loaded with GTP because of the action of RCC1 (50). Crm1 would interact with RanGTP and the NES-containing cargoes at the nucleus and the ternary complex would be dissociated by cytoplasmic RanGTP hydrolysis.

Regulation of Pap1 occurs at the level of sub-cellular localization. The protein shows cytoplasmic localization in unstressed cells, but is nuclear in cells that have been exposed to H₂O₂ or diethylmaleate (31; Fig. 2). Pap1 contains two clusters of cysteine residues, one located at the center of the protein, and the second at the carboxy-terminal region (31;51). Deletion of the carboxy-terminal cysteine-rich domain (CRD) results in constitutive nuclear localization of Pap1 (38). This fact suggested that the NES of Pap1, where interaction with Crm1 occurs, is embedded within the CRD as it has been demonstrated by Yoshida and co-workers (38). Pap1 is constitutively imported into the nucleus and exported in a Crm1-dependent manner. During oxidative stress, the redox state of the conserved cysteines at the CRD may be altered such that the interaction with Crm1 is impaired and the transcription factor accumulates at the nucleus. For this reason,

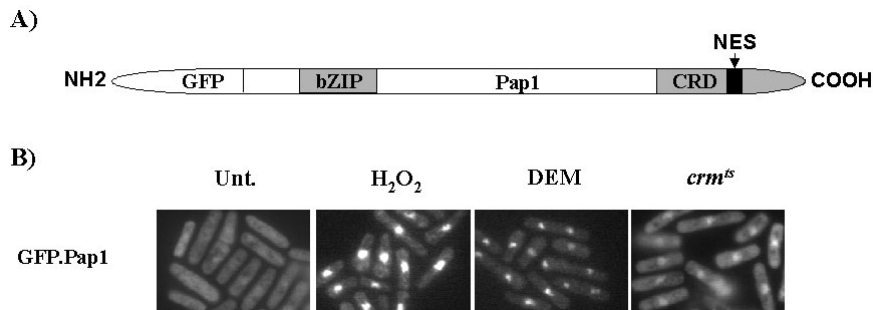


Figure 2. Hydrogen peroxide (H₂O₂), diethylmaleate (DEM) and impairment of the Crm1-dependent export, trigger Pap1 nuclear accumulation. A) Schematic representation of GFP.Pap1. The localization of the b-ZIP DNA-binding domain, carboxy-terminal cysteine-rich domain (CRD) and the nuclear export signal (NES) are indicated. B) Localization of GFP.Pap1 protein after H₂O₂ or DEM-stress and impairment of the Crm1-dependent export. The cellular distribution of the fusion protein was determined by fluorescence microscopy in wild-type cells that had been left untreated (Unt.), after a 5 min exposure to 0.2 mM H₂O₂ (H₂O₂), and after 50 min treatment with 4 mM DEM (DEM), or in a strain carrying a temperature-sensitive mutation of *crm1* (*crm1^{ts}*) at permissive temperature.

mutations at the *crm1* locus leading to defective Crm1, or treatment with the Crm1 inhibitor leptomycin B triggers Pap1 nuclear accumulation (Fig. 2). Leptomycin B irreversibly inhibits Crm1 by covalent binding to a cysteine residue at the central-conserved region (52).

hba1 codes for a nuclear protein that contains a Ran-binding domain (39;53). The closest homolog to Hba1 in *S. cerevisiae*, the Yrb2 protein, interacts with Ran (54) and Crm1 (55), and deletion of the *yrb2* gene retards nuclear protein export (55;56). The role of the human orthologue of Hba1 and Yrb2, RanBP3, in Crm1-mediated export of NES-containing substrates has been recently characterized. RanBP3 has been described to stabilize the interaction between Crm1 and its substrates, and influence substrate choice *in vitro* and *in vivo* (57;58). It has been shown not only to enhance the affinity of Crm1 for RanGTP and cargo, but also for the Ran-guanine nucleotide exchange factor RCC1 (59). Our recent studies have shown that Hba1 is necessary for nuclear export of Pap1 and other NES-containing proteins, such as the MAPK Sty1. Deletion of *hba1* triggered Pap1 and Sty1 basal nuclear accumulation, although other NES-containing proteins such as protein kinase A inhibitor (PKI) remained cytosolic (Castillo, E.A., Vivancos, A.P., Ayté, J., Jones, N., and Hidalgo, E., manuscript in preparation). Hba1 may be assisting Crm1 to export some, but not all, NES-containing proteins.

Pap1 is activated upon treatment with H₂O₂

Recent studies greatly expand the idea of cysteine post-translational modifications being relevant to redox signal transduction. This seems to be the case for the *S. pombe* H₂O₂-sensor Pap1: *in vivo* studies have revealed that, as a consequence of a temporary oxidation of two cysteine residues, the transcription factor translocates from the cytoplasm to the nucleus upon H₂O₂ stress (11). Although biochemical confirmation is

still required, H₂O₂ seems to trigger the oxidation of Pap1 at cysteine residues 278 and 501, each located within different cysteine clusters on the polypeptide, maybe leading to an intramolecular disulfide bond. Residues located at equivalent positions in the *S. cerevisiae* homologue Yap1 (Cys303 and Cys598) have been postulated to exert the same role in H₂O₂ sensing (10). According to this model, formation of the disulfide bridge would contribute to a substantial conformational change and could result in the loss of the Crm1 access to Pap1 NES, with the subsequent nuclear accumulation of the transcription factor (Fig. 3). The oxidation of Pap1 cysteine residues 278 and 501 is rapidly reversed by the Pap1-induced thioredoxin pathway, which is also involved in keeping the cysteine thiol groups reduced prior to H₂O₂ stress (Castillo, E.A., Vivancos, A.P., Ayté, J., Jones, N., and Hidalgo, E., manuscript in preparation).

Recently, it has been described in *S. cerevisiae* that the glutathione peroxidase Gpx3/Orp1 mediates the activation of the transcription factor Yap1 by H₂O₂ (60). According to this model, the formation of the Cys303-Cys598 disulfide bond in Yap1 is mediated by Gpx3/Orp1, that acts as the initial hydroperoxide sensor of the Yap1 pathway. Thus, in cells exposed to H₂O₂ the Cys36 of Gpx3 forms a sulfenic acid

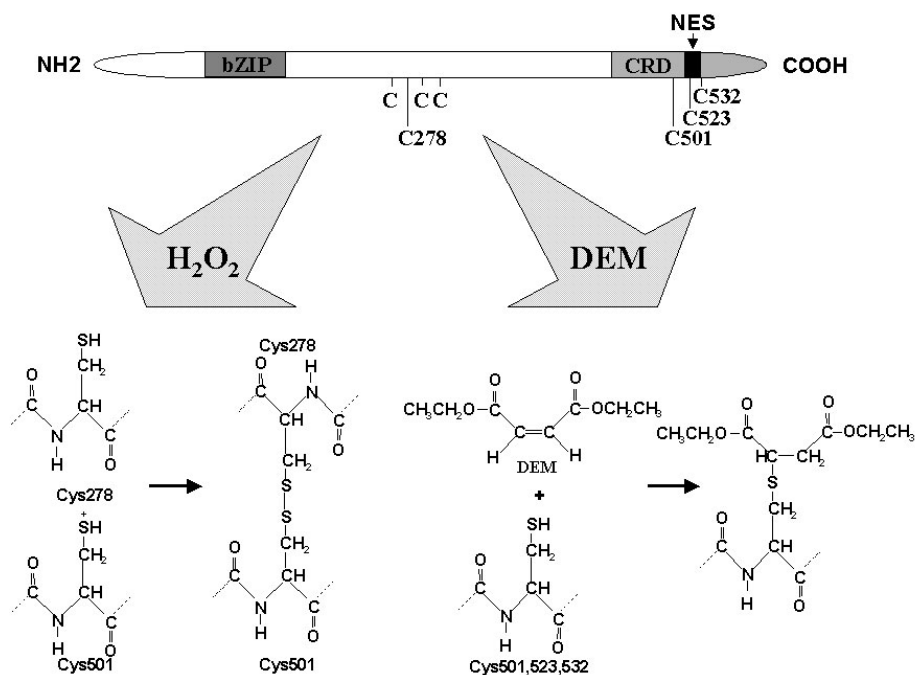


Figure 3. A model for Pap1 modifications upon H₂O₂ and DEM treatments. Schematic representation of Pap1 with the b-ZIP DNA-binding domain, the two cysteine clusters and the nuclear export signal (NES) embedded in the carboxy-terminal cysteine-rich domain (CRD). DEM irreversibly modifies C501, C523 and C532 by direct covalent modification of their thiol groups, impeding access of Crm1 to the NES. H₂O₂ probably promotes the oxidation of C278 and C501 thiol groups to a disulfide bond; that could lead to a conformational change in Pap1 that might impaired recognition of the NES by Crm1.

intermediate that reacts with Cys598 in Yap1, leading to a disulfide-linked intermolecular complex. The subsequent rearrangement of the disulfide bond leads to the resolution of the complex to yield Yap1 with a disulfide bond between Cys303-Cys598, and regenerated, reduced Gpx3. The glutathione peroxidase Gpx3 would, therefore, present a H₂O₂ sensor role in addition to its reported H₂O₂ scavenger one. The only glutathione peroxidase of *S. pombe*, Gpx1, does not seem to exert such a sensor role in the H₂O₂-dependent Pap1 pathway (our unpublished data).

Relationship between Pap1 and the MAPK Sty1

Pap1 is not the only regulator of antioxidant responses in *S. pombe*: Sty1 responds to high concentrations of H₂O₂ and activates global defence responses which include antioxidant genes (61;62).

Upon signalling, the MAPK Sty1/Spc1 is activated through phosphorylation of conserved tyrosine (Tyr-173) and threonine (Thr-171) residues by the MAPK kinase (MAPKK) Wis1, which in turn is activated through phosphorylation by two MAPKK kinases Wak1 (also known as Wis4 and Wik1; 63-65) and Win1 (66) (Fig. 1). After phosphorylation by Wis1, Sty1 translocates to the nucleus where it binds to and phosphorylates Atf1, a transcription factor that is structurally similar to mammalian ATF-2 (67-69). Recently, two new substrates of active Sty1 have been reported: the Cmk2 kinase involved in the response to oxidative stress (70), and the Srk1 protein kinase, which has a role in the control of meiosis (71). Downstream targets of both kinases remain to be determined.

Activation of Sty1 is transient because of the action of the Pyp2 phosphotyrosine phosphatase that dephosphorylates and inactivates the MAPK. Another tyrosine phosphatase, Pyp1, is responsible of the basal inactivation of Sty1 (72). Pyp1 and Pyp2 phosphatases are located in the cytoplasm, so Crm1-dependent nuclear export is required to inactivate Sty1 (73). Two type 2C serine/threonine phosphatases (PP2C), Ptc1 and Ptc3, also seem to regulate Sty1 activity by dephosphorylation of a threonine residue (74-76).

The sensor proteins involved in triggering Sty1 activation upon oxidative stress have been recently described (77), whereas the mechanism of Sty1 activation by other stresses such as osmotic stress or nutrient limitation are yet to be discovered. Oxidative stress activates the Sty1 pathway through a “two-component” phosphorelay system, which comprises the peroxide-sensing histidine kinases Mak2 and Mak3 (also called Phk2 and Phk3; 77-79), the phosphorelay protein Mpr1/Spy1 (61;80), and the response regulator protein Mcs4 (61;65;77). Mcs4 associates with Wak1/Wis4 kinase, which transmit the stress signal to the Wis1 MAPKK, that activates Sty1 (Fig. 1). Activation of Sty1 by heat shock seems to be partially mediated by inactivation of Pyp1, the major tyrosine phosphatase that inactivates the MAPK (76).

Individual gene targets of the Sty1-Atf1 pathway have been isolated by biochemical and/or genetic approaches, such as *ctt1* (coding for catalase; 69), *fbp1* (encoding fructose-1,6-bisphosphatase; 81), *tps1* (encoding trehalose-6-phosphate synthase; 82), *gpx1* (glutathione peroxidase; 31;77), *gpd1* (glycerol-3-phosphate dehydrogenase; 69), *pyp2* (protein-tyrosine phosphatase 2; 72), or *ste11* (required for entry into meiosis; 83). Nevertheless, and as mentioned in the introduction, microarrays of the *S. pombe* genome are now available and studies about global responses to stress and the role of Sty1 on

such responses are now available (23), and in progress (Nic Jones and Jürg Bähler, personal communication).

Thus, different treatments such as oxidative (hydrogen peroxide), metal (cadmium) and osmotic (sorbitol) stress, heat shock and DNA damaging agents (MMS), have been reported to alter the expression of 10-14% of all *S. pombe* genes by microarrays (23). There is a set of genes which are induced or repressed in most stress situations (four out of five), constituting the core environmental stress response (CESR), and including up to 4% of the *S. pombe* genes. The main CESR induced genes encode proteins involved in a variety of functions, such as carbohydrate metabolism, signalling and transcriptional regulation, lipid or fatty acid metabolism, antioxidants, DNA repair, and protein folding and degradation. The CESR repressed genes are associated with protein synthesis, transport, transcription, cellular signalling and cytoskeletal organization. As many as 85% of the CESR genes are Sty1 dependent, and 85% of them are also Atf1 dependent (23).

Besides de CESR response, each kind of stress triggers a set of genes induced or repressed specifically, so-called the SESR (specific environmental stress response) genes. Oxidative stress SESR genes were found to be involved in antioxidant pathways (*trr1*, *obr1*, both encoding thioredoxin reductases), in trans-membrane transport (*hba2*) and vitamin B use or synthesis; many of them seem to be Pap1-dependent. In oxidative stress, 65% of the SESR genes are Sty1 dependent (one of the studied stresses with a highest dependency on Sty1), being Atf1 dependent 38% of the total (23).

Pap1 was initially thought to be a substrate of Sty1 because a mutant strain lacking the MAPK was unable to accumulate Pap1 in response to oxidative stress (31). Recent studies found that *S. pombe* mounts two separate responses upon H₂O₂ stress: an adaptive response to low levels of H₂O₂, which protects the cell from subsequent exposures to higher concentrations of H₂O₂, and an acute or survival response, which allows the cell to survive a sudden and potentially lethal exposure to H₂O₂ (62). Pap1 is required for the response to low-level H₂O₂ stress, whereas Sty1/Atf1 regulates the response to high levels of the oxidant. The kinetic of Pap1 nuclear accumulation depends on the severity of the H₂O₂ stress imposed; Pap1 quickly accumulates at the nucleus in response to low levels of H₂O₂, but as the dose of H₂O₂ increases, the time for Pap1 nuclear accumulation increases too. Furthermore, Pap1 accumulation in response to low levels of H₂O₂ is Sty1 independent, whereas high concentrations of H₂O₂ produce a delayed Pap1 accumulation only if Sty1 is present (62). We believe that only a narrow window of H₂O₂ concentrations will be able to accomplish Pap1 activation through generation on an intramolecular disulfide bond. Concentrations over those activating ones will induce other redox modifications on Pap1's cysteine residues which will not lead to an active conformation. Therefore, high concentrations of the oxidant will have to be decomposed in order to reach the activating low levels. As stated above, the expression of the main H₂O₂ scavenging activities, catalase and glutathione peroxidase, are Sty1/Atf1-dependent, and that would explain why the delayed entrance of Pap1 in response to high H₂O₂ doses is compromised in a Δ *sty1* strain. Indeed, overexpression of the glutathione peroxidase- and catalase-encoding genes *gpx1* or *ctl1*, or pre-activation of the Sty1 pathway accelerates Pap1 nuclear accumulation at high concentrations of H₂O₂, providing evidence supporting this theory (Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Ayté, J. and Hidalgo, E., manuscript in preparation).

Pap1 is activated by treatment with diethylmaleate

The compound diethylmaleate (DEM) was described as a glutathione-depleting agent (84) and, for this reason, it had been used as a cellular pro-oxidant in basic and clinical research. It had been shown that DEM was able to trigger Pap1 accumulation (38;85), although it was not clear whether it was due to a direct interaction with the transcription factor or to an indirect modulation of the intracellular redox levels.

Several facts seemed to indicate that activation of Pap1 by DEM is different that activation of the transcription factor by H_2O_2 . Firstly, cells treated with DEM show irreversible nuclear accumulation of Pap1, even after washing DEM from the media (Fig. 4), whereas Pap1 nuclear accumulation by H_2O_2 is transient. Second, whereas H_2O_2 is able to activate both Sty1 and Pap1, Sty1 activation did not occur upon DEM treatment (Fig. 5).

Our results indicate that DEM modifies some cysteine residues in Pap1 and induce its nuclear accumulation and subsequent transcriptional activation (11). Pap1 cysteine residues involved in DEM sensing are not the same as the residues required for H_2O_2 sensing. The CRD alone (Fig. 3) is sufficient for the response to DEM, but not for H_2O_2 stress. We initially found that the residues modified by DEM were cysteines 523 and 532 (11), but our last results indicate that cysteine 501 is also covalently modified by DEM (data not shown). These results indicate that all the cysteine residues at the CRD are

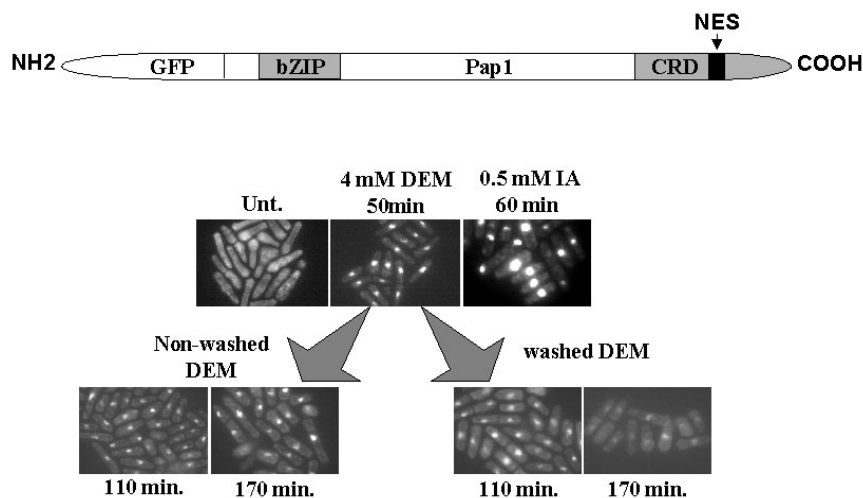


Figure 4. Cysteine alkylating agents induce the irreversible translocation of Pap1 to the nucleus. Scheme of GFP.Pap1 and its localization in cells treated with DEM (washed or not from the media) or iodoacetamide (IA). The cellular distribution of the fusion protein was determined by fluorescence microscopy in cells that had been left untreated (Unt.), after a 50 min exposure to 4 mM DEM (4mM DEM 50 min) or after 1 h. exposure to 0.5 mM IA (0.5 mM IA 60 min). After 50 min of DEM treatment, cells were centrifuged and 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}^{**}$ cycloheximide was added. Cells were resuspended either in their own DEM-rich medium (non-washed DEM), or in DEM-free medium (washed DEM). The cellular distribution of the fusion protein was determined after 60 and 120 min (110 and 170 min, respectively).

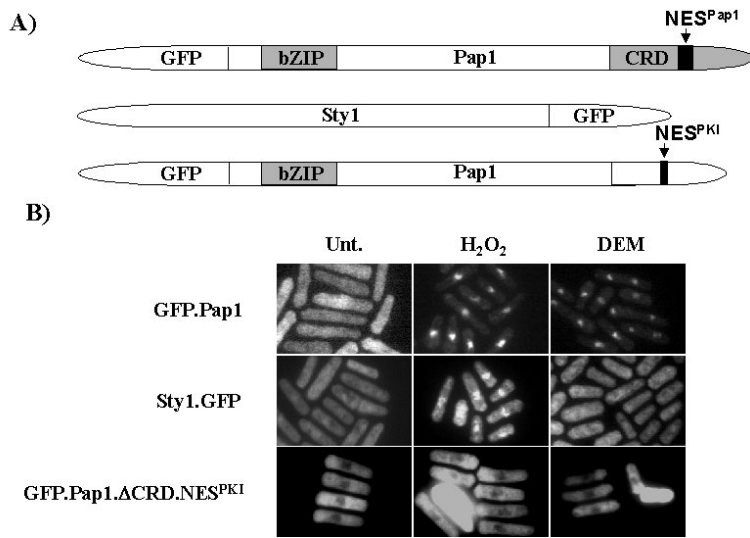


Figure 5. DEM specifically triggers nuclear accumulation of Pap1, but not of other NES-containing proteins such as Sty1 or protein kinase inhibitor. A) Schematic representation of GFP.Pap1, Sty1.GFP and GFP.Pap1 with the CRD region of Pap1 replaced by the nuclear export signal (NES) of the protein kinase inhibitor (GFP.Pap1.ΔCRD.NES^{PKI}). B) Localization of GFP.Pap1, Sty1.GFP, and GFP.Pap1.ΔCRD.NES^{PKI} in cells that had been left untreated (Unt.), treated with H₂O₂ (5 min exposure to 0.2 mM H₂O₂ for GFP.Pap1 and GFP.Pap1.ΔCRD.NES^{PKI}, 10 min exposure to 1 mM H₂O₂ for Sty1.GFP), or treated for 50 min with 4 mM DEM (DEM).

highly accessible in Pap1 tertiary structure, since they all react with DEM. Although it was described that Crm1 was modified in a cysteine residue by leptomycin B, DEM only affects the Crm1-dependent export of Pap1, whereas Crm1-dependent export of other NES-containing proteins such as Sty1 and the protein kinase inhibitor (PKI) are not impaired upon treatment with DEM (Fig. 5). These data indicate that DEM is directly modifying Pap1, but not Crm1, cysteine residues.

As determined by matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, DEM reacts with cysteine residues of Pap1 through the conjugation addition of the thiol groups to the unsaturated bond of DEM, which would generate irreversible adducts with a thioether structure (Fig. 3). Such modification would impede the access of Crm1 to its nuclear export signal and, subsequently, the irreversible nuclear accumulation of Pap1 (11). Therefore, DEM could be considered an alkylating agent of exposed cysteine residues. In this regard, other agents with this reactivity such as iodoacetamide (IA), are also capable of inducing nuclear accumulation of Pap1 (Fig. 4).

Concluding remarks

Fission yeast is a useful model system for studies on stress responses because the stress-activated pathways and transcription factors are highly conserved from yeast to higher eukaryotes. In particular, oxidative stress responses in *S. pombe* are mediated by

two interrelated pathways: upon exposure to low levels of H₂O₂ the transcription factor Pap1 is activated; but upon high levels of H₂O₂-stress, activation of the antioxidant response takes place through the Sty1 MAPK pathway. Pap1 senses oxidative stress through the redox state of highly conserved cysteine residues. In all cases, those modifications render non-exportable Pap1 forms, since the access of Crm1 to its NES is inhibited; nevertheless, the modifications suffered by these residues depend on the oxidant sensed. Thus, H₂O₂ seems to trigger the formation of an intramolecular disulfide bridge in Pap1, whereas DEM irreversibly alkylates some thiol groups in the protein.

As stated above, the molecular mechanism which renders active Pap1 are being elucidated. Less is known regarding Sty1 activation. Future studies will unravel how different signals can lead to the activation of the same MAP kinase signalling pathway.

Acknowledgements

We thank José Ayté for critical comments on the manuscript. For the experimental work, the technical assistance of Mercè Carmona is greatly appreciated. A.P.V and E.A.C. are recipients of predoctoral fellowships from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain, respectively. This work was supported by Dirección General de Investigación, Spain Grant PM99-0029 to E.H.

Reference List

1. Sies, H. (1991) Oxidative stress: introduction. In Sies, H., editor. *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, London
2. Carmel-Harel, O. and Storz, G. 2000, *Annu.Rev.Microbiol.* 54, 439-461
3. Storz, G. and Imlay, J. A. 1999, *Curr.Opin.Microbiol.* 2, 188-194
4. Dalton, T. P., Shertzer, H. G., and Puga, A. 1999, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 39, 67-101
5. Hidalgo, E., Ding, H., and Demple, B. 1997, *Trends Biochem.Sci.* 22, 207-210
6. Zheng, M. and Storz, G. 2000, *Biochem.Pharmacol.* 59, 1-6
7. Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M. 1991, *Genes Dev.* 5, 60-73
8. Jones, R. H. and Jones, N. C. 1989, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 2176-2180
9. Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D., and Parker, C. S. 1989, *Genes Dev.* 3, 283-292
10. Delaunay, A., Isnard, A. D., and Toledano, M. B. 2000, *EMBO J.* 19, 5157-5166
11. Castillo, E. A., Ayté, J., Chiva, C., Moldon, A., Carrascal, M., Abian, J., Jones, N., and Hidalgo, E. 2002, *Mol.Microbiol.* 45, 243-254
12. Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., and Ames, B. N. 1985, *Cell* 41, 753-762
13. Amabile-Cuevas, C. F. and Demple, B. 1991, *Nucleic Acids Res.* 19, 4479-4484
14. Finkel, T. 2003, *Curr.Opin.Cell Biol.* 15, 247-254
15. Banuett, F. 1998, *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62, 249-274
16. Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G. 1998, *Adv.Cancer Res.* 74, 49-139
17. Chang, L. and Karin, M. 2001, *Nature* 410, 37-40
18. Minden, A. and Karin, M. 1997, *Biochim.Biophys.Acta* 1333, F85-104
19. Wilkinson, M. G. and Millar, J. B. 1998, *Genes Dev.* 12, 1391-1397
20. Sprague, G. F., Jr. 1998, *Genes Dev.* 12, 2817-2820
21. Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L.,

- Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritzc, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S. J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S. M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V. A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R. R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J. L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S. L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W. R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G. V., Ussery, D., Barrell, B. G., Nurse, P., and Cerrutti, L. 2002, *Nature* 415, 871-880
22. Wood, V. and Bahler, J. 2002, *Comp.Funct.Genom.* 3, 282-288
23. Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. 2003, *Mol.Biol.Cell* 14, 214-229
24. Mata, J., Lyne, R., Burns, G., and Bahler, J. 2002, *Nat.Genet.* 32, 143-147
25. Turi, T. G., Webster, P., and Rose, J. K. 1994, *J.Biol.Chem.* 269, 24229-24236
26. Kumada, K., Yanagida, M., and Toda, T. 1996, *Mol.Gen.Genet.* 250, 59-68
27. Shimanuki, M., Saka, Y., Yanagida, M., and Toda, T. 1995, *J.Cell Sci.* 108 (Pt 2), 569-579
28. Penney, M., Wilkinson, C., Wallace, M., Javerzat, J. P., Ferrell, K., Seeger, M., Dubiel, W., McKay, S., Allshire, R., and Gordon, C. 1998, *J Biol.Chem.* 273, 23938-23945
29. Arioka, M., Kouhashi, M., Yoda, K., Takatsuki, A., Yamasaki, M., and Kitamoto, K. 1998, *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 62, 390-392
30. Spataro, V., Toda, T., Craig, R., Seeger, M., Dubiel, W., Harris, A. L., and Norbury, C. 1997, *J.Biol.Chem.* 272, 30470-30475
31. Toone, W. M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B. A., Toda, T., and Jones, N. 1998, *Genes Dev.* 12, 1453-1463
32. Nagao, K., Taguchi, Y., Arioka, M., Kadokura, H., Takatsuki, A., Yoda, K., and Yamasaki, M. 1995, *J Bacteriol.* 177, 1536-1543
33. Nishi, K., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. 1993, *Arch.Microbiol.* 160, 162-165
34. Toda, T., Shimanuki, M., Saka, Y., Yamano, H., Adachi, Y., Shirakawa, M., Kyogoku, Y., and Yanagida, M. 1992, *Mol.Cell Biol.* 12, 5474-5484
35. Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K. 1997, *Cell* 90, 1041-1050
36. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. 1997, *Cell* 90, 1051-1060
37. Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I., and Rosbash, M. 1997, *Curr.Biol.* 7, 767-775
38. Kudo, N., Taoka, H., Toda, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. 1999, *J.Biol.Chem.* 274, 15151-15158
39. Turi, T. G., Mueller, U. W., Sazer, S., and Rose, J. K. 1996, *J.Biol.Chem.* 271, 9166-9171
40. Nakagawa, C. W., Mutoh, N., and Hayashi, Y. 1995, *J Biochem.(Tokyo)* 118, 109-116
41. Casso, D. and Beach, D. 1996, *Mol.Gen.Genet.* 252, 518-529
42. Lee, J., Dawes, I. W., and Roe, J. H. 1997, *J.Biol.Chem.* 272, 23042-23049
43. Ariza, R. R., Cohen, S. P., Bachhawat, N., Levy, S. B., and Demple, B. 1994, *J.Bacteriol.* 176, 143-148
44. Wu, A., Wemmie, J. A., Edgington, N. P., Goebel, M., Guevara, J. L., and Moye-Rowley, W. S. 1993, *J.Biol.Chem.* 268, 18850-18858
45. Hu, Y., Jin, X., and Snow, E. T. 2002, *Toxicol.Lett.* 133, 33-45
46. Stutz, F., Neville, M., and Rosbash, M. 1995, *Cell* 82, 495-506
47. Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., and Taylor, S. S. 1995, *Cell* 82, 463-473
48. Mattaj, I. W. and Englmeier, L. 1998, *Annu.Rev Biochem.* 67, 265-306
49. Melchior, F. and Gerace, L. 1998, *Trends Cell Biol.* 8, 175-179

50. Weis, K. 1998, *Trends Biochem.Sci.* 23, 185-189
51. Wemmie, J. A., Wu, A. L., Harshman, K. D., Parker, C. S., and Moye-Rowley, W. S. 1994, *J.Biol.Chem.* 269, 14690-14697
52. Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. 1999, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 9112-9117
53. Corbett, A. H. and Silver, P. A. 1997, *Microbiol.Mol.Biol.Rev* 61, 193-211
54. Taura, T., Schlenstedt, G., and Silver, P. A. 1997, *J Biol.Chem.* 272, 31877-31884
55. Taura, T., Krebber, H., and Silver, P. A. 1998, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 7427-7432
56. Noguchi, E., Saitoh, Y., Sazer, S., and Nishimoto, T. 1999, *J Biochem.(Tokyo)* 125, 574-585
57. Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff, F. R., Petosa, C., Mattaj, I. W., and Kutay, U. 2001, *EMBO Rep* 2, 926-932
58. Lindsay, M. E., Holaska, J. M., Welch, K., Paschal, B. M., and Macara, I. G. 2001, *J Cell Biol.* 153, 1391-1402
59. Nemergut, M. E., Lindsay, M. E., Brownawell, A. M., and Macara, I. G. 2002, *J Biol.Chem.*
60. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. 2002, *Cell* 111, 471-481
61. Nguyen, A. N., Lee, A., Place, W., and Shiozaki, K. 2000, *Mol.Biol.Cell* 11, 1169-1181
62. Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A., and Toone, W. M. 2002, *Mol.Biol.Cell* 13, 805-816
63. Shieh, J. C., Wilkinson, M. G., Buck, V., Morgan, B. A., Makino, K., and Millar, J. B. 1997, *Genes Dev.* 11, 1008-1022
64. Samejima, I., Mackie, S., and Fantes, P. A. 1997, *EMBO J.* 16, 6162-6170
65. Shiozaki, K., Shiozaki, M., and Russell, P. 1997, *Mol.Biol.Cell* 8, 409-419
66. Samejima, I., Mackie, S., Warbrick, E., Weisman, R., and Fantes, P. A. 1998, *Mol.Biol.Cell* 9, 2325-2335
67. Degols, G. and Russell, P. 1997, *Mol.Cell Biol.* 17, 3356-3363
68. Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. 1998, *Genes Dev.* 12, 1464-1473
69. Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., and Jones, N. 1996, *Genes Dev.* 10, 2289-2301
70. Sanchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., Winge, I., Hidalgo, E., Bachs, O., and Aligue, R. 2002, *J Biol.Chem.* 277, 17722-17727
71. Smith, D. A., Toone, W. M., Chen, D., Bahler, J., Jones, N., Morgan, B. A., and Quinn, J. 2002, *J Biol.Chem.* 277, 33411-33421
72. Millar, J. B., Buck, V., and Wilkinson, M. G. 1995, *Genes Dev.* 9, 2117-2130
73. Gaits, F. and Russell, P. 1999, *Mol.Biol.Cell* 10, 1395-1407
74. Shiozaki, K. and Russell, P. 1995, *EMBO J.* 14, 492-502
75. Shiozaki, K., Akhavan-Niaki, H., McGowan, C. H., and Russell, P. 1994, *Mol.Cell Biol.* 14, 3742-3751
76. Nguyen, A. N. and Shiozaki, K. 1999, *Genes Dev.* 13, 1653-1663
77. Buck, V., Quinn, J., Soto, P. T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B. A., and Millar, J. B. 2001, *Mol.Biol.Cell* 12, 407-419
78. Aoyama, K., Aiba, H., and Mizuno, T. 2001, *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 65, 2347-2352
79. Nakamichi, N., Yamada, H., Aoyama, K., Ohmiya, R., Aiba, H., and Mizuno, T. 2002, *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 66, 2663-2672
80. Aoyama, K., Mitsubayashi, Y., Aiba, H., and Mizuno, T. 2000, *J.Bacteriol.* 182, 4868-4874
81. Neely, L. A. and Hoffman, C. S. 2000, *Mol.Cell Biol.* 20, 6426-6434
82. Degols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. 1996, *Mol.Cell Biol.* 16, 2870-2877
83. Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., and Jones, N. 1995, *EMBO J.* 14, 6193-6208
84. Boyland, E. and Chasseaud, L. F. 1968, *Biochem.J.* 109, 651-661
85. Kudo, N., Taoka, H., Yoshida, M., and Horinouchi, S. 1999, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 886, 204-207

2.- Papel de la proteína Hba1 en la regulación de la actividad de Pap1.

Este segundo bloque de resultados incluye:

- A) Metodología y resultados publicados en el artículo “Schizosaccharomyces pombe cells lacking the Ran-binding protein Hba1 show a multidrug resistance phenotype due to constitutive nuclear accumulation of Pap1. Esther A. Castillo, Ana P. Vivancos, Nic Jones, José Ayté and Elena Hidalgo. *The Journal of Biological Chemistry* (2003) Vol. 278, No. 42(17), 40565-40572”.
- B) Metodología y resultados no publicados que complementan los resultados anteriores.

2.1.- Metodología.

Este apartado incluye las cepas, plásmidos y técnicas experimentales utilizadas para la obtención de los resultados adicionales presentados (apartado B).

2.1.1.- Cepas y plásmidos utilizados.

En la Tabla III se detallan las cepas utilizadas en estos experimentos. Se utilizaron las cepas salvajes HM123 y PN513, la cepa $\Delta pap1$ EHH108, la cepa con una mutación termosensible para el gen esencial *crm1* TP113.6B, la cepa $\Delta sty1$ NT224 y la cepa $\Delta hba1$ *caf1⁺::ura4⁺*. También se utilizaron las cepas EHH14 y EA33 que expresan la proteína GFP-Pap1 y las cepas EHH5, EA16 y EA17 que expresan la proteína Sty1-GFP.

Los plásmidos utilizados aparecen en la Tabla IV. Se utilizó el plásmido pRep41-GFP-pap1 (Toone et al., 1998) que codifica para la proteína de fusión GFP-Pap1. A partir de este plásmido se obtuvo el plásmido p66.41x que codifica para una proteína GFP-Pap1 en la que ha sido sustituido su dominio CRD por la señal de exporte nuclear clásica de la proteína inhibidora de la PKA

(NES^{PKI})(GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI}). A partir del plásmido integrativo p85.41x (Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002) que codifica para la proteína GFP-Pap1, y al sustituir su fragmento *Bgl*II-SacI que codifica para la mayoría de Pap1 y el terminador *nmt*, por el fragmento *Bgl*II-SacI de p66.41x que codifica para Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} y el terminador *nmt*, se construyó el plásmido integrativo p98.41x que, al igual que p66.41x. codifica para la proteína de fusión GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI}.

Tabla III. Cepas utilizadas.

Nombre	Genotipo	Procedencia
HM123	<i>h leu1</i>	
PN513	<i>h leu1 ura4</i>	Laboratorio P. Nurse
EHH108	<i>h leu1 his2 ura4 pap1::ura4</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2002
<i>caf1::ura4⁺</i>	<i>h⁺ leu1 ura4 ade6 caf1::ura4⁺</i>	Benko <i>et al.</i> , 1998
TP113.6B	<i>h⁺ leu1 ura4 crm1-809</i>	Toda <i>et al.</i> , 1992
NT224	<i>h leu1 ura4 sty1-1</i>	
EHH14	<i>h leu1 his2 ura4 pap1::ura4 pnmt41x.GFP-Pap1</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2002
EHH5	<i>h leu1 sty1::GFP.kanMX6</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2003
EA16	<i>h⁺ leu1 ura4 crm1-809 sty1::GFP.kanMX6</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2003
EA17	<i>h leu1 ura4 caf4::ura4⁺ sty1::GFP.kanMX6</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2003
EA33	<i>h⁺ leu1 ade6 ura4 caf1::ura4⁺ pnmt41x.GFP-Pap1</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2003

También se utilizaron los plásmidos p20.41x y p20.42x que codifican para la proteína Hba1 (Castillo *et al.*, JBC, 2003). El fragmento *Bam*HI-*Hind*III del plásmido p20 (*Bluescript*) que codifica para Hba1 fue clonado en el vector pMAL-c2 para construir el plásmido pMBP-Hba1 que codifica para la proteína MBP-Hba1.

Tabla IV. Plásmidos utilizados.

Plásmido número	Descripción	Procedencia
pRep41-GFP-pap1	pnmt41x.GFP-Pap1	Toone <i>et al.</i>, 1998
p66.41x	pnmt41x.GFP-Pap1ΔCRD.NES^{PKI}	Este trabajo
p98.41x	pnmt41x.GFP-Pap1ΔCRD.NES^{PKI}	Este trabajo
p20.41x	pnmt41x.Hba1	Castillo <i>et al.</i>, 2003
p20.42x	pnmt42x.Hba1¹	Castillo <i>et al.</i>, 2003
p85.41x	pnmt41x.GFP-Pap1	Castillo <i>et al.</i>, 2002
pMBP-Hba1	pMBP-Hba1	Este trabajo

2.1.2.- Microscopia de fluorescencia.

La expresión de las proteínas de fusión GFP-Pap1, GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} fue inducida tras 17-20 h de crecimiento de las células en medio de cultivo sin tiamina. La expresión de la proteína Sty1.GFP en las cepas EHH5, EA16 y EA17 es independiente de la presencia o ausencia de tiamina, ya que se encuentra regulada por el promotor de *sty1*. 25 μ l de cultivo celular exponencial fueron cargados en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina. Tras eliminar por aspiración las células no fijadas en el vidrio, se añaden 2.5 μ l de glicerol 50% y se cubren con un cubreobjetos. Para la observación de las muestras se utiliza un microscopio Nikon Eclipse E600 a 100X aumentos y se capturan las imágenes utilizando una cámara Orca II Dual Scan Cooled CCD Camera y el programa Hamamatsu AquaCosmos 2.0 (Hamamatsu).

2.1.3.- Purificación de las proteínas unidas a MBP.

Se transformó la cepa bacteriana FB810 con el plásmido pMBP-Hba1 que codifica para la proteína MBP-Hba1. Esta cepa de FB810 fue inoculada en LB con 100 μ g/ml de ampicilina e incubada a 37°C en agitación. Tras aproximadamente 16 h (toda una noche), se hizo una dilución 1/25 del cultivo

en 100 ml de medio LB+ampicilina y se incubó este cultivo a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 1. Para inducir la expresión de la proteína de fusión MBP-Hba1 se añadió isopropil-S-tiol-D-galactosida (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM y se incubó a 25°C durante 4 h en agitación. Tras este periodo de tiempo las células fueron tratadas o no con 4 mM dietilmaleato (DEM) durante 1 h. Tras centrifugar el cultivo, las células fueron resuspendidas en 4 ml de tampón STET1X+DTT (50 mM Tris-HCl pH=8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH=8.0, 1% Tritón X-100, 1 mM DTT) y lisadas por sonicación. Se centrifugaron las muestras para eliminar las células no lisadas y los restos celulares y se purificó MBP-Hba1 con la resina de amilosa (*New England Biolabs*) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2.1.4.- Ensayo de interacción in vivo.

El plásmido episomal pRep41-GFP-pap1 y el plásmido integrativo p98.41x, con genes que codifican para las proteínas de fusión GFP-Pap1 y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI}, respectivamente, fueron utilizados para transformar la cepa salvaje HM123. Estas cepas fueron cultivadas en medio mínimo sin tiamina para inducir la expresión de la proteína de fusión durante aproximadamente 17 h. Tras este periodo de tiempo, el cultivo en fase exponencial fue centrifugado y resuspendido en tampón de Lisis (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 120 mM KCl, 5 mM EDTA pH=8.0, 0.1% NonidetP-40, 10% glicerol, 1 mM DTT, 0.5mM PMSF, 5 mg/ml leupeptina, 5 mg/ml aprotinina). Las células se rompieron vorteadando con bolas de cristal (*Glasperlen*) durante 20 segundos a 5.5 en una FastPrep FP120 (Bio101). Los lisados celulares fueron centrifugados y se determinó la concentración de la proteína por el método de *Bradford*. A 5 mg de lisado celular se le añadieron 3 μ l de anticuerpo α -Hba1 en tampón de Lisis y se incubó a 4°C durante 2 h. Tras 3 lavados con 1 ml de NET-N+DTT (20 mM Tris-HCl pH=8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH=8.0, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM DTT), las proteínas fueron separadas en un gel de SDS al 10% de poliacrilamida y transferidas a membranas de *Immobilon P* (*Millipore*) con una unidad de transferencia de *Bio-*

Rad. Para la detección de las proteínas GFP-Pap1 y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} se utilizó el anticuerpo policlonal α -Pap1 (Vivancos et al., 2004). Para la detección de Hba1 y Crm1 se utilizaron los anticuerpos policlonales α -Hba1 (Castillo et al., JBC, 2003) y α -Crm1.

2.2.- Resultados.

El objetivo de este trabajo era entender a nivel molecular el papel de Hba1, una proteína con un dominio de unión a Ran (*Ran binding domain*) que en sobreexpresión confiere resistencia a brefeldina A, en la respuesta a estrés oxidativo en *S. pombe*. Mediante estudios de microscopía de fluorescencia y confocal (Fig. 3 Castillo et al., JBC, 2003; datos no publicados) determinamos que Hba1 está localizada en el nucleoplasma y no en la membrana nuclear. Además, demostramos que tanto la sobreexpresión de esta proteína Hba1 como la delección del gen que la codifica, *hba1*, inducía la acumulación nuclear del factor de transcripción Pap1 y de la MAPK Sty1 en ausencia de estrés (Fig. 1A, 2B y 4B Castillo et al., JBC, 2003). Estos resultados indicaban que Hba1 estaba participando con Crm1 en el transporte nuclear de ciertas proteínas con señal de transporte nuclear (NES) como Pap1 y Sty1. Además, la localización nuclear de Pap1 era suficiente para la activación constitutiva de su respuesta antioxidante específica (Fig. 1B y 2C Castillo et al., JBC, 2003); mientras que, por el contrario, la localización nuclear constitutiva de Sty1 observada en las cepas delecionadas para *hba1* no conlleva su fosforilación basal ni la inducción de la respuesta antioxidante dependiente de Atf1 (Fig. 5A y 5B Castillo et al., JBC, 2003). Por lo tanto, estos resultados permitían concluir que el fenotipo de resistencia aumentada a multidroga de las cepas en las que se ha delecionado *hba1* o que sobreexpresan la proteína Hba1, es debido a la acumulación nuclear constitutiva de Pap1 (Fig. 1C y 2D Castillo et al., JBC, 2003) y no a la de Sty1 (Fig. 5C Castillo et al., JBC, 2003). Sin embargo, también observamos que la localización nuclear constitutiva de Pap1 y, con ello, la expresión continuada de sus genes diana, no sólo confiere a las células

una resistencia aumentada a multidrogas, sino que además tiene como consecuencia problemas de crecimiento (Fig. 6 Castillo *et al.*, JBC, 2003).

2.2.1.- La proteína Hba1 sólo es necesaria para el exporte nuclear de ciertas proteínas con NES como GFP-Pap1 y Sty1-GFP, pero no para el exporte de la proteína quimérica GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI}.

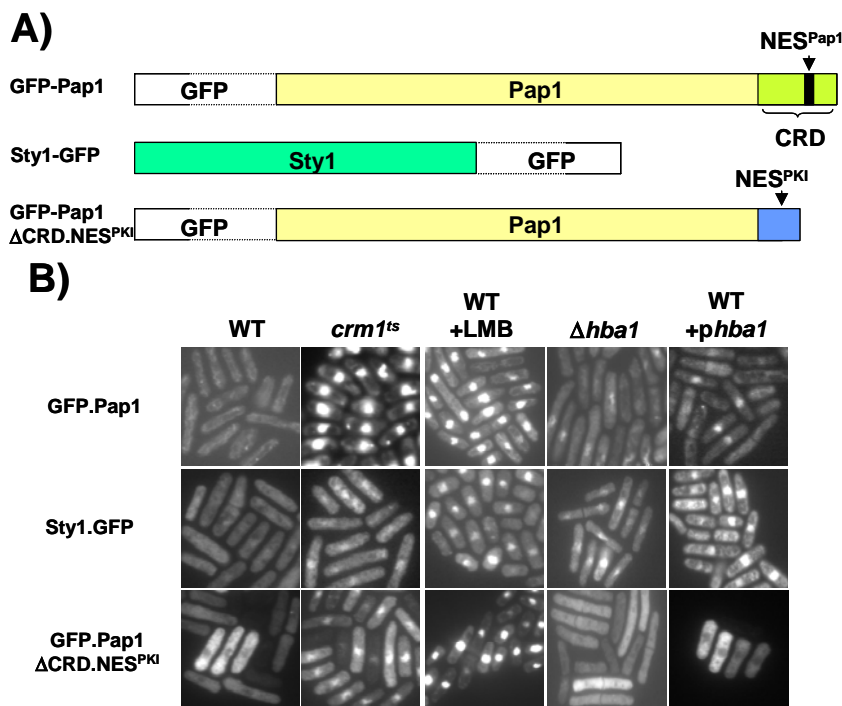


Fig. 17. Hba1 es necesaria para el exporte de GFP-Pap1 y Sty1-GFP, pero no para el exporte nuclear de la proteína GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI}.

- A. Esquema de las proteínas GFP-Pap1, Sty1-GFP y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} en el que se ha indicado la posición del dominio CRD, y las señales de exporte nuclear de Pap1 y la proteína PKI.
- B. Localización subcelular de las proteínas GFP-Pap1, Sty1-GFP y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} en células salvajes (WT), con la mutación *crm1-809* (*crm1^{ts}*), tratadas con 100 μ M leptomicina B durante 50 min (WT+LMB), delecionadas en *hba1* (Δ *hba1*) y transformadas con un plásmido que contiene *hba1* bajo el control de un promotor *nmt* (WT+*phba1*). La distribución celular fue determinada mediante microscopía de fluorescencia.

Los resultados publicados hasta el momento acerca de la proteína Hba1 indicaban que estaba implicada en el exporte nuclear de proteínas con NES como Pap1 y Sty1. Quisimos determinar si Hba1 también era importante para el exporte nuclear de la NES clásica de la proteína PKI, inhibidora de la proteína quinasa A. Para ello construimos una proteína en la que habíamos sustituido la señal de exporte nuclear de Pap1 (NES^{Pap1}) por la de la proteína PKI (NES^{PKI}) (Fig. 17A) y analizamos, mediante microscopía de fluorescencia, su localización subcelular en diferentes cepas y condiciones (Fig. 17B). Esta

proteína, localizada en el citoplasma en condiciones basales en una cepa salvaje (WT), presenta localización nuclear constitutiva en aquellas cepas en las que se ha inhibido el transporte nuclear dependiente de Crm1 debido a la mutación termosensible del gen *crm1* (*crm1^{ts}*) o en cepas salvajes sometidas a tratamiento con la droga leptomicina B, que inhibe el factor de transporte nuclear Crm1 (WT+LMB) (Fig. 17B). Sin embargo, la pérdida de función de Hba1 por sobreexpresión (WT+phba1) o deleción (Δ hba1) no conlleva la acumulación nuclear de esta proteína GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} aunque sí de las proteínas GFP-Pap1 y Sty1-GFP (Fig. 17B). Esto indica que la proteína Hba1 estaría actuando como un cofactor sólo necesario para el transporte de ciertas proteínas con NES como Pap1 y Sty1, no interviniendo en el transporte de la proteína con la NES^{PKI}.

2.2.2.- Hba1 interacciona *in vivo* con los componentes del complejo de transporte nuclear.

Los resultados observados hasta el momento indicaban que en *S. pombe* el factor de transporte nuclear Crm1 podía mediar, de forma independiente a Hba1, el transporte nuclear de la proteína que contiene la NES^{PKI}, mientras que para el transporte de otras como Pap1 y Sty1, Crm1 necesita la presencia de este cofactor Hba1. De esta forma, la proteína Hba1 se encontraría principalmente en aquellos complejos de transporte de Pap1 y Sty1. Se utilizaron cepas que sobreexpresaban las proteínas GFP-Pap1 y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} (Fig. 18A) para inmunoprecipitar la proteína Hba1 y determinar los componentes del complejo de transporte nuclear con los que estaba interactuando. Mediante estos experimentos de interacción *in vivo* pudimos determinar que Hba1 se encuentra interactuando con el factor de transporte nuclear Crm1 (Fig. 18C). Hba1 también interacciona *in vivo* con los sustratos de transporte GFP-Pap1 (que contiene la NES de Pap1) y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} (que contiene la NES clásica de PKI), aunque la interacción con la primera proteína es mucho más fuerte que con la que contiene la NES^{PKI} (Fig. 18B).

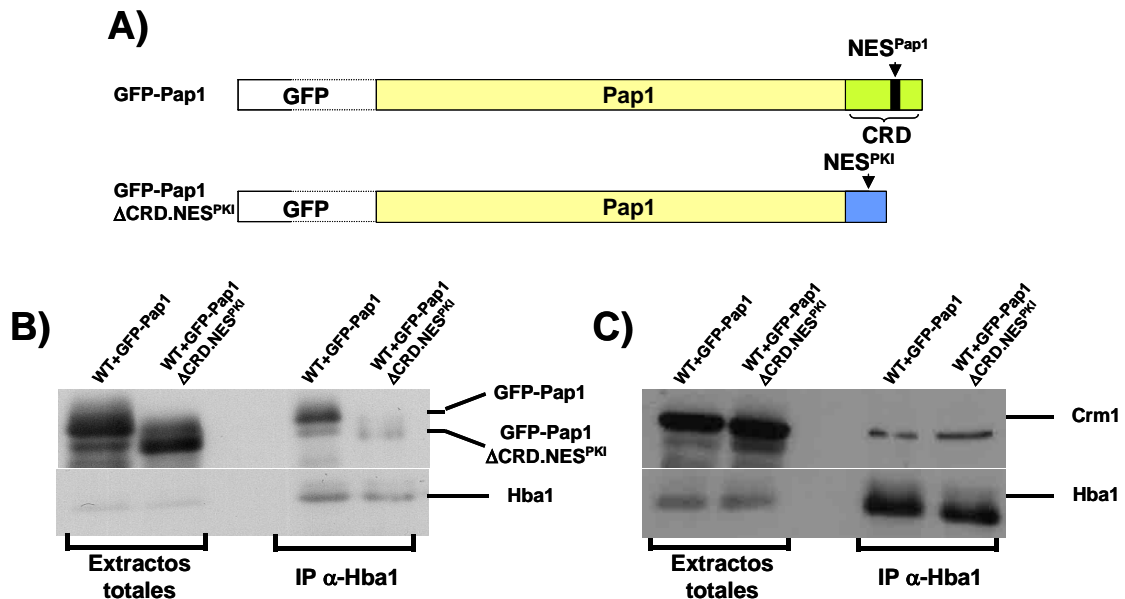


Fig. 18. Hba1 interacciona con los componentes del complejo de exporte nuclear dependiente de Crm1.

A. Esquema de las proteínas GFP-Pap1 y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} en el que se ha indicado la posición del dominio CRD, y las señales de exporte nuclear de Pap1 y la proteína PKI.

B y C. Interacción *in vivo* de Hba1 con los componentes del complejo de exporte nuclear. Extractos totales de cepas de *S. pombe* que expresan las proteínas GFP-Pap1 y GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI}, fueron incubados en condiciones nativas con un anticuerpo contra Hba1 para purificar la proteína Hba1 (IP α -Hba1) y las proteínas asociadas. Las proteínas purificadas fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y detectadas utilizando anticuerpos contra GST-Pap1 y contra GST-Hba1 (B) o contra Crm1 y GST-Hba1 (C).

2.2.3.- Dietilmaleato (DEM) modifica la proteína Hba1.

El compuesto dietilmaleato (DEM) es un agente pro-oxidante que induce la acumulación nuclear de Pap1. Este compuesto modifica de forma irreversible los residuos de cisteína del dominio C-terminal de Pap1 denominado CRD, impidiendo con ello que la señal de exporte nuclear (NES), situada en este dominio, sea reconocida por el factor de exporte nuclear (Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). Al purificar la proteína Hba1 a partir de extractos de cepas salvajes de *S. pombe* tratadas con DEM, vimos que aparecía una banda, inmunodetectada por un anticuerpo contra Hba1, que podría corresponder a una forma modificada por DEM (Fig. 19A). El mismo tipo de modificación se observó al purificar proteína MBP-Hba1 a partir de células de *E. coli* tratadas con DEM (Fig. 19B). Para determinar qué tipo de modificación estaba induciendo DEM sobre Hba1, se analizaron las formas de MBP-Hba1 no tratadas y tratadas con DEM mediante espectrometría de masas

MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*) (datos no publicados). El péptido que contenía la única cisteína de Hba1 (cisteína 98) presentaba una masa de 1321.6 Da en la forma no-tratada de MBP-Hba1, pero no en la forma tratada con DEM. En la muestra tratada con DEM aparecía un pico nuevo con una masa de 1493.6 Da, que correspondía a un incremento de masa de 172 Da. Este incremento de masa es el que ya se había observado entre la forma tratada con DEM y la no-tratada de MBP-CRD (Fig. 5 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), por lo que tanto las cisteínas del CRD de Pap1 como la de Hba1 están siendo modificadas de igual forma: la formación de un aducto de DEM unido al grupo tiol de la cisteína a través de un enlace tioéter.

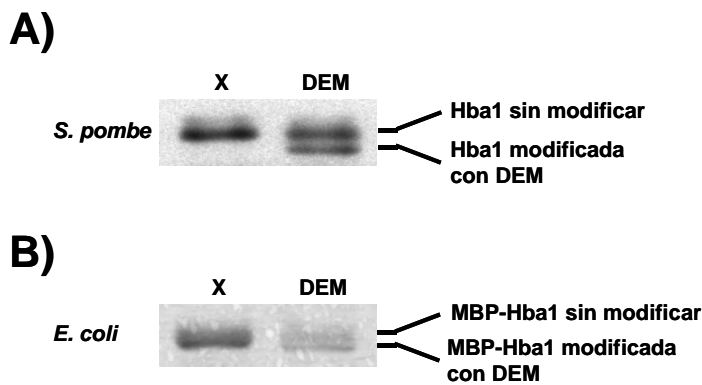


Fig. 19. DEM induce la modificación *in vivo* e *in vitro* de la proteína Hba1.

- A. Proteína Hba1 purificada a partir de células de *S. pombe* sin tratar (X) o tratadas con 4 mM DEM (DEM). Aparecen indicadas las formas sin modificar y modificadas por DEM de Hba1.
- B. La misma modificación se observa al purificar proteína MBP-Hba1 a partir de células de *E. coli* sin tratar (X) y tratadas con 4 mM DEM (DEM).

Schizosaccharomyces pombe Cells Lacking the Ran-binding Protein Hba1 Show a Multidrug Resistance Phenotype Due to Constitutive Nuclear Accumulation of Pap1*

Received for publication, June 4, 2003, and in revised form, July 25, 2003
Published, JBC Papers in Press, August 1, 2003, DOI 10.1074/jbc.M305859200

Esther A. Castillo^{‡§}, Ana P. Vivancos^{‡¶}, Nic Jones^{||}, José Ayté[‡], and Elena Hidalgo^{‡**}

From the [‡]Cell Signaling Unit, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain and ^{||}Paterson Institute for Cancer Research, Christie Hospital National Health Science Trust, Wilmslow Rd., M20 4BX Manchester, United Kingdom

In *Schizosaccharomyces pombe*, the transcription factor Pap1, and the mitogen-activated protein kinase Sty1 are excluded from the nucleus in a Crm1-dependent manner under non-stressed conditions. Upon oxidant treatment, both Sty1 and Pap1 concentrate into the nucleus, due to an enhanced import or an impaired export. Hba1, a protein that when overexpressed confers brefeldin A resistance, contains a Ran binding domain. The purpose of this project was to understand at the molecular level the role of Hba1 in the *S. pombe* oxidative stress response. Fluorescent and confocal microscopy studies demonstrate that Hba1 is located at the nucleoplasm and not at the nuclear envelope. We also demonstrate that either multiple copies or deletion of the *hba1* gene induces nuclear accumulation of Pap1 and Sty1. We propose that Hba1 assists Crm1 to export some nuclear export signal-containing proteins. Pap1 nuclear accumulation is sufficient for constitutive activation of its specific antioxidant response. On the contrary, constitutive nuclear localization of Sty1 in the $\Delta hba1$ strain does not trigger the Sty1-specific, Atf1-dependent antioxidant response in the absence of stress. We conclude that the increased multidrug resistance of strains lacking or overexpressing Hba1 is due to the accumulation of Pap1 in the nucleus under non-stressed conditions.

In eukaryotic cells, compartmentation calls for the existence of specific transport of macromolecules among compartments. Import and export out of the nucleus are processes equally important; all nuclear proteins have to be imported from its cytosolic synthesis compartment, and many proteins shuttle continuously between the nucleus and the cytoplasm. Furthermore, RNAs synthesized in the nucleus have to be exported to the cytoplasm by means of the formation of riboprotein complexes. This active transport between nucleus and cytoplasm requires the formation of transport complexes that, once assembled, are sent to one direction across the nuclear pore complex. The different conditions between both compartments

will facilitate the complex to disassemble once it has crossed the nuclear pore complex. The Ran GTPase is a protein present at both sides of the nuclear envelope, its GTP/GDP forms being preferential at each one of them. Ran is, therefore, essential to generate the asymmetry between nucleus and cytoplasm after GTP hydrolysis. The receptor protein Crm1 binds cooperatively with the nuclear form of Ran, Ran-GTP, and with export substrates. This tripartite complex will be exported and disassembled once it reaches the cytoplasm. Crm1 binds its substrates by recognizing some leucine-rich nuclear export signals (NES)¹ (for reviews, see Refs. 1–3).

Regulation of nuclear transport is an essential process utilized by eukaryotic cells to activate transcription factors or other regulatory proteins (for reviews, see Refs. 4 and 5). In *Schizosaccharomyces pombe* that is the case for the transcription factor Pap1 and for the MAP kinase Sty1 (6, 7). During normal exponential growth both proteins are mainly located at the cytoplasm, but they rapidly transfer to the nucleus upon stress conditions, where they trigger specific cellular responses (6, 8–10). This relocalization is transient, and the proteins rapidly shuttle back to its inactive cytoplasmic localization. For both proteins it has been described that their nuclear export is Crm1-dependent (6, 11).

Sty1, also known as Spc1 and Phh1, is a MAP kinase required for the cell to survive different stress conditions such as osmotic stress, heat shock, nutrient starvation, or multidrug/oxidative stress (6, 12–14). Some of the stress responses, including osmotic and oxidative stress, rely on the activation by Sty1 of the transcription factor Atf1 (15), a constitutively nuclear protein that upon Sty1 activation turns on the expression of anti-osmotic (*i.e. gpd1*) and antioxidant (*i.e. ctt1*) genes among others (14). Phosphorylation of Sty1 by the MAP kinase kinase Wis1 upon stress triggers Sty1 transport to the nucleus, where it transiently associates with and phosphorylates Atf1 (10), which in turn activates transcription of the stress response genes. According to previous reports (11), stress-induced nuclear accumulation of Sty1 is dependent on an active nuclear import process; partial loss of function of Crm1 does not lead to a constitutively nuclear Sty1, but to an enhanced retention of Sty1 in the nucleus upon stress.

The *pap1* gene has been consistently cloned as a multicopy plasmid conferring resistance to different types of drugs in *S. pombe*, such as brefeldin A (16), caffeine (17), or staurosporin (18). When overexpressed or stress-activated, Pap1 triggers transcription of a set of genes whose products constitute a

* This work was supported by Dirección General de Investigación, Spain Grant PM99-0029 (to E. H.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

¶ Recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain.

** Supported by a European Molecular Biology long term fellowship. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-93-542-2891; Fax: 34-93-542-2802; E-mail: elena.hidalgo@upf.edu.

¹ The abbreviations used are: NES, nuclear export signal; MAP, mitogen-activated protein; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione *S*-transferase.

powerful antioxidant cellular response; strains lacking *pap1* are hypersensitive to oxidants such as *tert*-butylhydroperoxide or diamide, heavy metals, and multidrugs. Interestingly enough, similar phenotypes have been described for a Δ *sty1* strain (6). Upon stress, Pap1 suffers post-translational modifications, which may probably hinder its carboxy-terminal NES and impede Crm1 binding and nuclear export (8). Thus, a strain with the *crm1-809* allele, exhibiting a partial nuclear export defect at permissive temperature (19), shows constitutive nuclear localization for Pap1. Mutations rendering a defective Crm1 or overexpression of some of the gene products regulated by Pap1, give rise to strains with increased resistance to drugs and oxidants (17, 19–22).

hba1 is one of the few genes whose overexpression was associated with increased multidrug resistance but had not been connected to Pap1 (23). It was described as an essential gene, although it has more recently been demonstrated that the *hba1* knockout is viable (20). Hba1 is a nuclear protein (23) that contains a Ran binding domain (24). Benko *et al.* (20) described the isolation of a strain resistant to caffeine and brefeldin A harboring a mutation at the *hba1* locus, although it was claimed that this phenotype might be due to hyperactivity of the gene product rather than to its inactivation (20). The closest homologue to Hba1 in *Saccharomyces cerevisiae*, the Yrb2 protein, has been better characterized. Although it was initially reported to have a role distinct from nuclear transport (25), deletion of the nonessential gene *yrb2* impairs nuclear protein export (26, 27). It has also been shown that Yrb2 interacts with Ran (25) and Crm1 (26). The role of the human orthologue of Hba1 and Yrb2, RanBP3 (28), in Crm1-mediated export of NES-containing substrates has been recently characterized. RanBP3 has been described to stabilize the interaction between Crm1 and its substrates and influence substrate choice *in vitro* and *in vivo* (29, 30). It has been shown not only to enhance the affinity of Crm1 for Ran-GTP and cargo but also for the Ran-guanine nucleotide exchange factor RCC1 (31).

In this study we show that overexpression of Hba1 enhances caffeine resistance of *S. pombe* in a Pap1-dependent manner. We demonstrate that the same effect is accomplished by deletion of the *hba1* gene; that is, the lack of function of Hba1 confers caffeine resistance to strains harboring the mutation. Furthermore, either deletion of *hba1* or overexpression of its gene product trigger nuclear accumulation of Pap1, and in those strains the transcription of Pap1-dependent genes is constitutively increased. Another reported substrate of Crm1, the MAP kinase Sty1, also shows constitutive nuclear localization under those conditions, although its specific antioxidant response is not switched on in this case. Implications of these results regarding the role of Hba1 in nuclear export and the activation mechanisms of Pap1 and Sty1 are discussed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains and Growth Conditions—We used in our experiments the wild-type strains HM123 ($h^- leu1$) and PN513 ($h^- leu1 ura4$; P. Nurse laboratory stock), the Δ *pap1* strain EHH108 ($h^- leu1 his2 ura4 pap1::ura4^-$) (8), the *crm1* mutant TP113.6B ($h^+ leu1 ura4 crm1-809$) (19), and the Δ *sty1* strain NT224 ($h^- leu1 ura4 sty1-1$). We used strain EHH14 (EHH108 with an integrated copy of the wild-type *GFP.pap1* chimeric gene under the control of the *ntm* (no message in thiamine) promoter (8)) to visualize the localization of a GFP. Pap1 fusion as well as strain EHH14.C501A,C523A,C532A, encoding a constitutively nuclear GFP.Pap1 mutant fusion (8). Dr. Benko kindly provided strains *caf1-21* (*ura4-D18 h^-*) and *caf1^+::ura4^+* (*ura4-D18 ade6-704 leu1-32 h^+*) harboring mutations at the *hba1* locus (20). Strain *caf1^+::ura4^+* was transformed with linearized plasmid p85.41x, which contains the *ntm*-driven *GFP.pap1* gene (see above); yielding strain was named EA33. To construct an *S. pombe* strain expressing a GFP-tagged version of Hba1, we designed specific primers to PCR-amplify a fragment containing the carboxyl-terminal *hba1*-coding sequence fused in-frame to a GFP-cod-

ing sequence followed by the heterologous selectable marker *kanMX6* and a 3', non-coding *hba1* sequence using as template plasmid pFA6a-GFP(S65T)-*kanMX6* (32). Strain HM123 was transformed with the linear fragment, and recombinants were selected on their ability to grow on G418/Geneticin (Invitrogen), as described before (32). The resulting strain was named EHH2 (HM123 with *hba1::GFP* linked to *kanMX6*). The same strategy was used to generate strain EHH5 (HM123 with *sty1::GFP* linked to *kanMX6*), EA16 (TP113.6B with *sty1::GFP* linked to *kanMX6*), and EA15 (wild-type PN513 with *sty1::GFP* linked to *kanMX6*). We then crossed EA15 with the *caf1^+::ura4^+* strain and selected for *ura^+*, kanamycin-resistant clones, yielding strain EA17 ($h^- leu1 ura4 caf1^+::ura4^+ sty1::GFP$ linked to *kanMX6*). To construct an *S. pombe* strain with the *pap1* and *hba1* loci deleted, we first transformed wild-type strain PN513 with a linear fragment containing *pap1::kanMX6*, obtained by PCR amplification using *pap1*-specific primers and plasmid pFA6a-*kanMX6* as a template (32). We then crossed the resulting strain, AV4 ($h^- leu1 ura4 pap1::kanMX6$) with the Δ *hba1* strain *caf1^+::ura4^+* and selected for *ura^+*, kanamycin-resistant clones, yielding strain AV6 ($h^- leu1 ura4 caf1^+::ura4 ade^+ pap1::kanMX6$). We constructed a double Δ *hba1* Δ *sty1* strain transforming the *caf1^+::ura4^+* strain with a linear fragment containing *sty1::kanMX6*, obtained by PCR amplification using *sty1*-specific primers and plasmid pFA6a-*kanMX6* as a template, as described above. We named this strain EA32. Cells were grown in rich medium (YE5S) or in synthetic minimal medium (EMM2) as described (33, 34).

Plasmids—We used plasmid pRep41-*GFP.pap1* (6) to trigger the expression of a GFP.Pap1 fusion protein in *S. pombe* cells. We PCR-amplified the *hba1*-coding sequence from an *S. pombe* cDNA library using primers specific for the gene and containing *Bam*HI and *Sma*I restriction sites. After digestion of pRep41x (35) with *Bam*HI and *Sma*I, we subcloned the digested PCR fragment containing the *hba1* gene, yielding plasmid p20.41x. The same strategy was followed to clone the *crm1* open reading frame in pRep41x, yielding plasmid p30.41x.

Caffeine Sensitivity Assay—*S. pombe* strains were grown in liquid minimal (MM) or rich (YE5S) media to an absorbance at 600 nm of 0.5. Cells were then diluted in the same media, and the indicated number of cells in 5 μ l was spotted onto MM or YE5S agar media with or without 30 mM caffeine. The spots were allowed to dry, and the plates were incubated at 30 °C for 2–4 days.

RNA Analysis—Cells grown in minimal media to a final absorbance at 600 nm of 0.5 were left either untreated or were treated for the indicated times with H₂O₂ at the indicated concentrations or with 4 mM diethylmaleate, also known to trigger Pap1 activation (8). 25–50 ml of yeast cultures were then centrifuged at 1500 rpm for 3 min and washed with H₂O, and cell pellets were immediately frozen in dry ice. Each sample was then resuspended in 0.4 ml of AE buffer (50 mM sodium acetate, pH 5.3, 10 mM EDTA, pH 8.0). Sodium dodecyl sulfate was then added to a final concentration of 1%, and proteins and DNA were extracted by adding 0.3 ml of acidic phenol and incubation at 65 °C for 5 min. Samples were cooled down in dry ice, 0.3 ml of chloroform was added, and the aqueous phase was separated by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 2 min at 4 °C. After chloroform extraction, RNA was precipitated with ethanol. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm, and equal amounts (10 μ g) were loaded in formaldehyde-agarose gels (36) containing ethidium bromide to confirm equal loading by visualizing ribosomal RNA. RNA was then transferred to GeneScreen Plus nylon membranes (PerkinElmer Life Sciences). Hybridization and washes were performed as recommended by the manufacturer. The blots were hybridized with the Pap1-dependent *apt1* probe containing the complete open reading frame of the p25-encoding gene or with the Sty1-, Atf1-dependent *gpx1* probe, containing a 419-bp fragment of the glutathione peroxidase-encoding gene. Probes were labeled with [α -³²P]dCTP using a random primer system from Roche Applied Science.

Western Blot Analysis—To purify a GST.Hba1 fusion protein, *Escherichia coli* FB810 cells (37) transformed with the pGEX-derivative plasmid pGST.*hba1* were inoculated into LB broth (38) with 100 μ g/ml of ampicillin and incubated at 37 °C for ~16 h with vigorous shaking. The overnight culture was diluted 25-fold into 100 ml of fresh medium and incubated at 37 °C until the culture reached an optical density of 1 at 600 nm. Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside was then added to a final concentration of 0.5 mM, and shaking was continued at 25 °C for 4 h. The cells were then harvested, and the cell pellet was frozen. Cells were then resuspended in 4 ml of STET extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100) and broken by sonication. Debris and unbroken cells were removed by centrifugation. GST-Hba1 was bound to glutathione S-

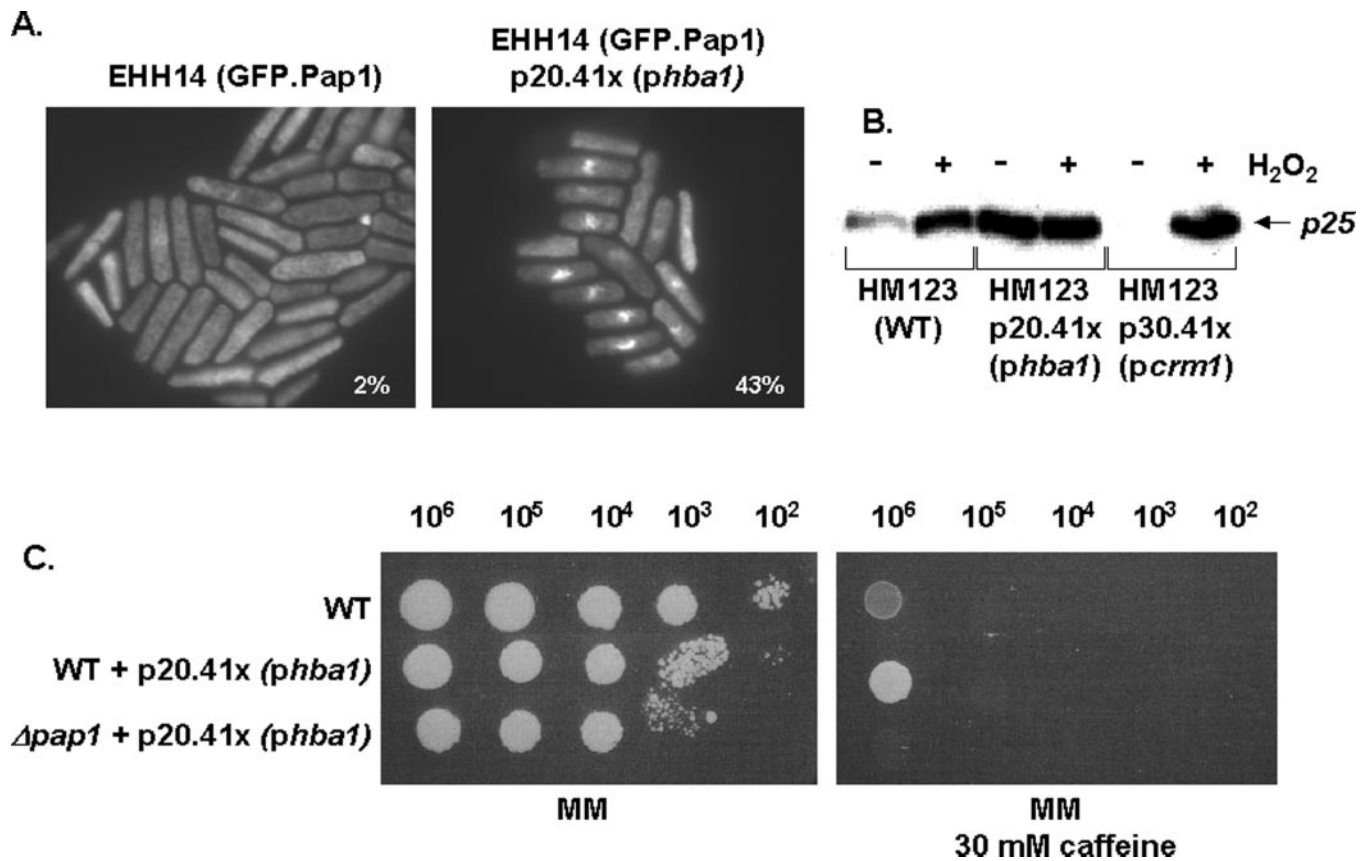


FIG. 1. Overexpression of Hba1 triggers Pap1 activation. *A*, localization of GFP.Pap1 protein in a strain overexpressing Hba1. Strain EHH14 (Δ *pap1* with an integrated version of the *GFP.pap1* gene under the control of the *nmT* promoter) was transformed or not with a plasmid containing the *hba1* gene under the control of the *nmT* promoter (p20.41x or *phba1*). The cellular distribution of GFP.Pap1 protein under non-stressed conditions was determined by fluorescence microscopy in both strains. *B*, Northern blot analysis of Pap1-dependent *p25* expression. Total RNA from wild-type strain HM123, HM123 transformed with plasmid p20.41x, or with plasmid p30.41x containing the *crm1* gene under the control of the *nmT* promoter was obtained. Cultures had been left untreated (–) or were treated for 15 min with 0.5 mM H₂O₂ previous to RNA extraction (+). *C*, caffeine resistance analysis of strains overexpressing Hba1 and carrying or not carrying a deletion on the *pap1* gene. Strains HM123 (WT), HM123 transformed with p20.41x, and EHH108 (Δ *pap1*) transformed with p20.41x, were grown in minimal media (MM) to a final A₆₀₀ of 0.5 and spotted onto minimal media plates with or without 30 mM caffeine. Plates were incubated at 30 °C for 3–4 days.

transferase-Sepharose (Amersham Biosciences) beads following manufacturer's instructions. Polyclonal antisera were obtained at the Imperial Cancer Research Fund Biological Resources following a standard rabbit immunization protocol. For immunoblotting, samples of *S. pombe* extracts were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels and transferred to Immobilon P membranes (Millipore) with a Bio-Rad transfer unit. The filters were probed with the anti-Hba1 antisera, and bound antibody was detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibodies (Amersham Biosciences). Phosphorylated Sty1 was detected with a commercial anti-p38 MAP kinase antibody (New England Biolabs).

Fluorescence Microscopy—25 μ l of exponentially growing yeast cultures were loaded onto poly-L-lysine-coated multi-well slides, and the remaining suspension was immediately withdrawn by aspiration. Three microliters of Hoescht 33342 (1 μ g/ml in 50% glycerol) was added, and a coverslip was placed over the microscope slide. Fluorescence microscopy was carried out on a Nikon Eclipse E600 microscope at 100 \times magnification. Images were captured by use of an Orca II Dual Scan Cooled CCD Camera (Hamamatsu) using Hamamatsu Aqua-Cosmos 2.0 software.

RESULTS

Overexpression of Hba1 Triggers Activation of Pap1—The fungal metabolite brefeldin A, an inhibitor of protein secretion, was used by Rose and co-workers (16) in a genetic screening to identify proteins capable of conferring resistance to this drug. Mutations at the *pap1* or *crm1* loci leading to constitutive activation of the Pap1-dependent antioxidant response yielded strains resistant to brefeldin A. Interestingly, overexpression of another protein, Hba1, also led to the same resistant phenotype (23). We decided to analyze whether Hba1 could have a

role in protein nuclear transport and, consequently, might exert its role in brefeldin A resistance through regulation of Pap1 subcellular localization, as it had been previously described for Crm1. A wild-type strain containing an integrated *GFP.pap1* allele was transformed with a plasmid containing the *hba1* gene under the control of the thiamine-repressible, intermediate strength promoter *nmT* 41x (35). The localization of the GFP.Pap1 fusion protein, as determined by fluorescence microscopy under basal or non-stressed conditions, was cytosolic (Fig. 1A). However, when Hba1 was overexpressed, the localization of the fusion protein was nuclear even in the absence of stress. Once established that Pap1 was constitutively nuclear upon Hba1 overexpression, we analyzed whether the change of cellular localization was sufficient to trigger Pap1-dependent *p25/apT1* expression. As shown in Fig. 1B, the level of *p25* transcript, as determined by Northern blot analysis, was constitutively high in a wild-type strain overexpressing Hba1 (HM123-p20.41x). As a control of regulation by nuclear export, the same strain overexpressing Crm1 (HM123-p30.41x) showed undetectable levels of *p25* expression in the absence of oxidative stress when compared with the basal level of wild-type HM123.

Pap1 overexpression or activation has been frequently associated to multidrug resistance. We determined that Hba1 overexpression could also lead not only to brefeldin A resistance, as described by Rose and co-workers (23), but also to caffeine resistance (Fig. 1C). Such phenotype was abolished when Hba1

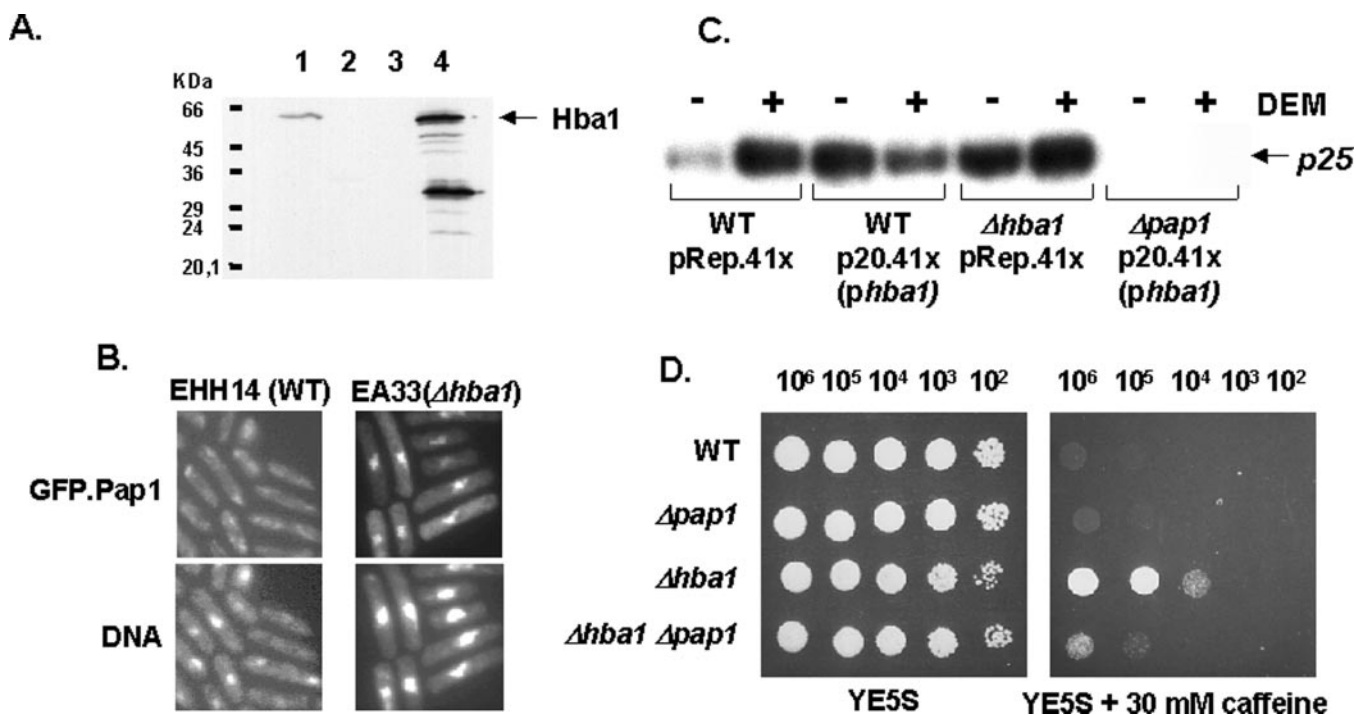


FIG. 2. Deletion of *hba1* induces nuclear accumulation of Pap1. *A*, Western blot analysis of strains carrying mutations or modifications at the *hba1* allele. 40 μ g of total protein extracts of strains HM123 (wild-type strain; lane 1), *caf1*⁺::*ura4*⁺ (lane 2), *caf1*-21 (lane 3), and HM123 transformed with plasmid p20.41x (containing the *hba1* gene; lane 4) were loaded on a denaturing gel and immunoblotted with anti-Hba1 polyclonal antibody. The positions of molecular weight markers are indicated (sizes are given in kDa). *B*, localization of GFP.Pap1 protein in strain *caf1*⁺::*ura4*⁺. The cellular distribution of a GFP.Pap1 protein under non-stressed conditions was determined by fluorescence microscopy in strains EHH14 (WT) and EA33 (Δ *hba1*), both carrying an integrated version of the *GFP.pap1* gene under the control of the *nmt* promoter. Cells were also stained with Hoescht to visualize the nuclei. *C*, Northern blot analysis of Pap1-dependent *p25* expression. Total RNA from strains HM123 (WT) transformed with an empty vector (pREP.41x) or with p20.41x (*phba1*), *caf1*⁺::*ura4*⁺ (Δ *hba1*) with an empty vector, and strain EHH108 (Δ *pap1*) with p20.41x (*phba1*) was obtained. Cultures had been left untreated (–) or were treated for 50 min with 4 mM diethylmaleate (DEM) before RNA extraction (+). *D*, caffeine resistance analysis of strains carrying deletions on the *hba1* and/or *pap1* genes. Strains HM123 (WT), EHH108 (Δ *pap1*), *caf1*⁺::*ura4*⁺ (Δ *hba1*), and AV6 (Δ *hba1* Δ *pap1*) were grown in minimal media to a final absorbance at 600 nm of 0.5 and spotted onto rich media (YE5S) plates with or without 30 mM caffeine. Plates were incubated at 30 °C for 2–3 days.

was overexpressed in a Δ *pap1* strain (Fig. 1C), indicating that the multidrug resistant phenotype conferred by Hba1 overexpression is dependent on Pap1. Whereas loss of function of the nuclear exporter Crm1 leads to a nuclear and constitutively active Pap1 (6, 17), overexpression of Hba1 can also trigger Pap1 activation, which led us to believe that Hba1 could have some role in Pap1 nuclear import.

Lack of Function of Hba1 Also Induces Pap1 Activation—A strain carrying a mutation at the *hba1* locus was isolated in a screening for caffeine resistant *S. pombe* cells (20). The authors claimed that the caffeine resistance conferred by the mutated allele, named *caf1*-21, had to be consequence of hyperactivity rather than inactivation of the gene product (20). We PCR-amplified and sequenced the mutated allele, detecting a GC to TA nonsense mutation at base pair 265, leading to an incomplete protein of only 88 residues (full-length Hba1 is 399 amino acids long). We further confirmed the absence of a full-length Hba1 protein in the *caf1*-21 strain by Western blot analysis of total protein extracts, using antibodies raised against GST.Hba1 (Fig. 2A). Hba1 could be detected in extracts prepared from a wild-type strain as a single band of ~60 kDa with denaturing electrophoresis (lane 1, Fig. 2A). Overexpression of the protein in a strain carrying plasmid p20.41x led to a >10-fold increase in Hba1 concentration (lane 4, Fig. 2A). Extracts from strains carrying the *caf1*-21 allele or deleted for *hba1* showed no detectable full-length Hba1 (lanes 3 and 2, respectively, Fig. 2A).

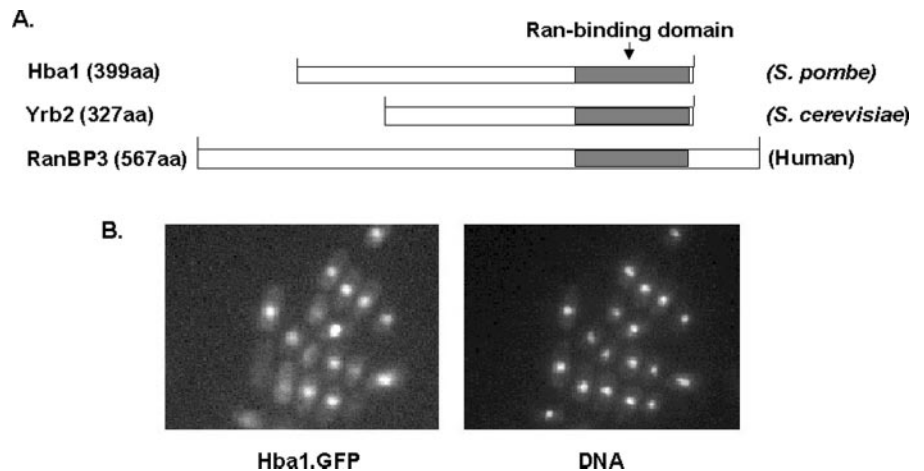
Once confirmed that the caffeine-resistant *caf1*-21 strain was defective for Hba1, we tested whether Pap1 cellular localization was altered in this strain. A GFP.Pap1 fusion protein

was constitutively nuclear in a *caf1*-21 background (data not shown), as it was in a Δ *hba1* strain (Fig. 2B). Northern blot analysis confirmed that either multiple copies or deletion of *hba1* triggered Pap1-dependent transcription of the *p25/ap1* gene even under non-stressed conditions and that such an effect was totally dependent upon the presence of Pap1 (Fig. 2C). Thus, the activation of the Pap1-dependent antioxidant/multidrug response of a strain deleted for *hba1* led to a caffeine-resistant phenotype, as shown in Fig. 2D, whereas a double *hba1/pap1* knockout strain showed a sensitivity to the drug similar to a wild-type or a Δ *pap1* strain.

Hba1 Is Required for the Nuclear Export of Both Pap1 and Sty1—Originally, Hba1 was described as a protein containing a Ran-binding protein domain, and therefore, it could be involved in either nuclear import or export (23, 24). Hba1 has homology to the *S. cerevisiae* protein Yrb2 and to the human RanBP3, especially at the Ran binding domain (Fig. 3A). When overexpressed all three orthologs were localized to the nucleus (23, 25, 30). We decided to confirm Hba1 nuclear localization expressing an Hba1.GFP fusion protein at wild-type level. As shown in Fig. 3B, the fusion protein conferred nuclear staining by fluorescence microscopy. We also performed confocal microscopy studies of the Hba1.GFP strain, which further demonstrated that the fusion protein was located at the nuclear matrix and not at the nuclear membrane (data not shown). That seems to indicate that Hba1 participates in the protein export pathway rather than in protein nuclear import.

Pap1 is not the only oxidative stress sensor which activity is regulated at the level of cellular localization. Sty1 also concentrates at the nucleus upon H₂O₂ stress (11). We decided to

FIG. 3. Hba1 is a nuclear protein. *A*, scheme of the Hba1 protein and its orthologs in *S. cerevisiae* (Yrb2) and human (RanBP3). The Ran binding domain is indicated. *B*, localization of Hba1.GFP protein. The cellular distribution of Hba1.GFP in strain EHH2 (wild-type strain where the *hba1* allele has been substituted with an *hba1.GFP* under non-stressed conditions) was determined by fluorescence microscopy. Cells were stained with Hoechst 33342 to visualize the nuclei (DNA).



study how Hba1 function could affect the localization of NES-containing cargo Sty1 (Fig. 4A). Inhibition of nuclear export with the Crm1 binding drug leptomycin B or expression of the GFP fusions in a *crm1* mutant background (19) resulted in nuclear localization of GFP.Pap1 (Fig. 4B) as it had been described before (6, 9, 39). A Sty1.GFP fusion, expressed at wild-type levels, also accumulated in the nucleus upon Crm1 inhibition (both by leptomycin B treatment or in the *crm1* mutant background), even though the same *crm1* mutation had been reported to trigger an enhanced retention of Sty1 in the nucleus after stress withdrawal but not the basal nuclear localization of Sty1 (11).

Both GFP.Pap1 and Sty1.GFP fusion proteins had nuclear localization under non-stressed conditions when Hba1 function was impaired either by deletion or overexpression of the *hba1* gene (Fig. 4B). Therefore, Hba1 seems to participate, together with Crm1, in both Pap1 and Sty1 export. The protein levels of GFP.Pap1 and Sty1.GFP were not modified in the different strain backgrounds, as determined by Western blot analysis (data not shown).

Nuclear Accumulation of Pap1, but Not of Sty1, Triggers an Antioxidant Response as Well as Growth Defects and Caffeine-resistant Phenotypes—Recent studies found that *S. pombe* mounts two separate responses upon H₂O₂ stress, an adaptive response to low levels of H₂O₂, which protects the cell from subsequent exposures to higher concentrations of H₂O₂, and an acute or survival response, which allows the cell to survive a sudden and potentially lethal exposure to H₂O₂ (13, 40). Pap1 is required for the response to low level H₂O₂ stress, whereas Sty1/Atf1 regulate the response to high levels of the oxidant. Combination of Pap1-dependent and Sty1/Atf1-dependent responses would protect *S. pombe* against a wide range of oxidants and drugs at different concentrations (40).

Drug and antioxidant resistance of strains with impaired Hba1 function could be due to nuclear accumulation of either Pap1, Sty1, or both. Therefore, it was essential to verify whether the Sty1-dependent transcriptional response was also constitutively active in those strains and could, therefore, exert some protective role against caffeine. Sty1 is phosphorylated and transferred to the nucleus by a variety of environmental stimuli including oxidative, osmotic, and physical stresses (41–43). First, we analyzed whether the change of Sty1 cellular sublocalization upon export defects was concomitant with a phosphorylation of the MAP kinase. A wild-type and a $\Delta hba1$ strain were subjected to stress by hydrogen peroxide (Fig. 5A) and sodium arsenite (data not shown), and phosphorylation of Sty1 was determined by Western blot analysis using an anti-phospho-p38 MAPK antibody. No significant differences at the basal or induced levels were detected between both strains.

Transcription of the gene *gpx1*, encoding glutathione peroxidase, upon oxidative stress has recently been reported to depend exclusively on Sty1 and Atf1 activation but not on Pap1 (40). As shown in Fig. 5B, expression of *gpx1* was unaffected in a $\Delta hba1$ strain compared with a wild-type strain, both at the basal and oxidative stress-induced levels. Unlike Pap1, nuclear localization of Sty1 upon Hba1 loss-of-function is not concomitant with a Sty1 gain-of-function, since it is not phosphorylated in the absence of stress, and its specific antioxidant response is not constitutively triggered. We confirmed this fact analyzing the multidrug resistant phenotype of a double knockout strain; cells lacking both Hba1 and Sty1 retained the caffeine resistance phenotype of a $\Delta hba1$ strain (Fig. 5C).

According to the previous data, the phenotypes observed in strains lacking a functional Hba1 (growth defects (44) and increased caffeine tolerance; see Figs. 1 and 2) could be exclusively due to the constitutive nuclear location of Pap1. To test this hypothesis we analyzed the phenotype of a strain, EHH14.C501A,C523A,C532A, harboring an integrated *GFP.pap1* allele encoding a fusion protein with three cysteine to alanine substitutions close to the NES of Pap1, which renders a constitutively nuclear and transcriptionally active GFP.Pap1 (8). As shown in Fig. 6A, such a strain is as resistant to the presence of 30 mM caffeine in plates as the *hba1* knockout when compared with a wild-type strain. Furthermore, the same growth defects were observed in the $\Delta hba1$ strain and in the EHH14.C501A,C523A,C532A strain, as reflected by their reduced colony size (data not shown) and their impaired growth curves, which presented an elongated duplication time (3.08 ± 0.02 h for the wild-type strain (HM123), 4.82 ± 0.38 h for $\Delta hba1$ strain (*caf1⁺::ura4⁺*), and 5.10 ± 0.65 h for EHH14.C501A,C523A,C532A strain, all grown in minimal media at 30 °C) and a reduced maximum of absorbance at 600 nm when compared with a wild-type strain (Fig. 6B).

DISCUSSION

Antioxidant defenses and multidrug resistance often use the same signal transduction pathways for cell signaling both in prokaryotic and eukaryotic cells. Thus, the identification of molecular components of antioxidant pathways has often been accomplished through genetic screenings of mutant clones resistant to different drugs. In particular, mutations at different loci whose gene products up-regulate the activity of the transcriptional factor Pap1 have been previously associated with an increased resistance to several drugs. It had been reported that overexpression of Hba1, a RanBP-like protein, could confer brefeldin A resistance (23) and that certain mutations at the *hba1* locus could also increase caffeine tolerance (20). In this manuscript we demonstrate that Hba1 participates in the Crm1-

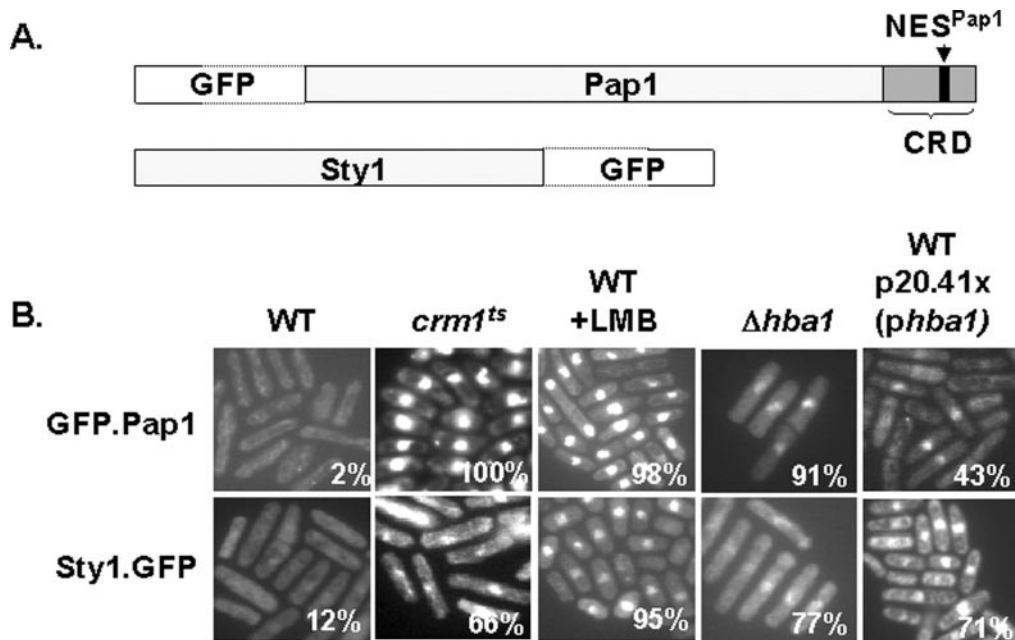


FIG. 4. Hba1 is required for the nuclear export of Pap1 and Sty1. A, scheme of GFP.Pap1 and Sty1.GFP fusion proteins; the NES within the cysteine-rich domain (CRD) of Pap1 is indicated. B, localization of GFP.Pap1 and Sty1.GFP fusion proteins in wild-type (WT) cells, cells carrying the *crm1-809* allele (*crm1^{ts}*), cells treated with 100 μ M leptomycin B for 50 min (LMB), Δ *hba1* cells, and wild-type cells transformed with a plasmid containing *hba1* under the control of the *nmt* promoter (*phba1*). The cellular distribution of the fusion proteins was determined by fluorescence microscopy. Strain names from left to right and top to bottom panels are as follows: EHH14 (Δ *pap1* with integrated *GFP.pap1* allele), TP113.6B (*crm1-809*) with pRep41-*GFP.Pap1*, EHH14 after leptomycin B treatment, EA33 (*caf1⁺::ura4⁺* (Δ *hba1*) with integrated *GFP.pap1* allele), EHH14 with p20.41x (*phba1*), EHH5 (wild-type strain with integrated *sty1.GFP*), EA16 (TP113.6B with integrated *sty1.GFP*), EHH5 after leptomycin B treatment, EA17 (*caf1⁺::ura4⁺* with integrated *sty1.GFP*), and EHH5 with p20.41x. The percentage of cells showing nuclear accumulation of GFP.Pap1 is indicated.

dependent nuclear export of some NES-containing cargoes and that loss of function of Hba1 either by mutation or overexpression triggers basal nuclear accumulation of the antioxidant activating proteins Pap1 and Sty1. As a consequence of such nuclear accumulation, the Pap1-dependent transcriptional response, but not the Sty1-dependent response, is constitutively active under non-stressed conditions. The same constitutive gain-of-function is accomplished when *S. pombe* cells express Pap1 mutant proteins with impaired nuclear export. In both cases, the Pap1-dependent transcriptional response is constitutively activated, and that constitutes the molecular basis for an increased tolerance to caffeine, but it also causes defects in cell cycle progression in the absence of stress.

Many of the gene products isolated through genetic screenings to multidrug resistance exert their protective role due to its connection to the Pap1-dependent transcriptional response. Thus, overexpression of the multidrug ABC-type transporters Hba2 and Pmd1 confer pleiotropic multidrug resistance (21, 22); interestingly, they both are transcriptionally up-regulated by Pap1 in response to oxidative stress (6). So far the loss-of-function of three gene products can lead to Pap1 nuclear accumulation and, consequently, to activated Pap1-dependent transcription: Crm1, Hba1, and thioredoxin reductase. Crm1 and Hba1 are involved in the nuclear export of Pap1 under non-stressed conditions, and in their absence Pap1 accumulates in the nucleus (6, 9, 19). The interaction of Pap1 with the export machinery requires that some cysteine residues of the protein are kept in the thiol, reduced state. Thus, loss of thioredoxin reductase activity also leads to Pap1 basal nuclear localization probably because the cysteines are oxidized even in the absence of oxidative stress.² In any case, nuclear accumulation of this transcription factor and activation of Pap1-dependent gene

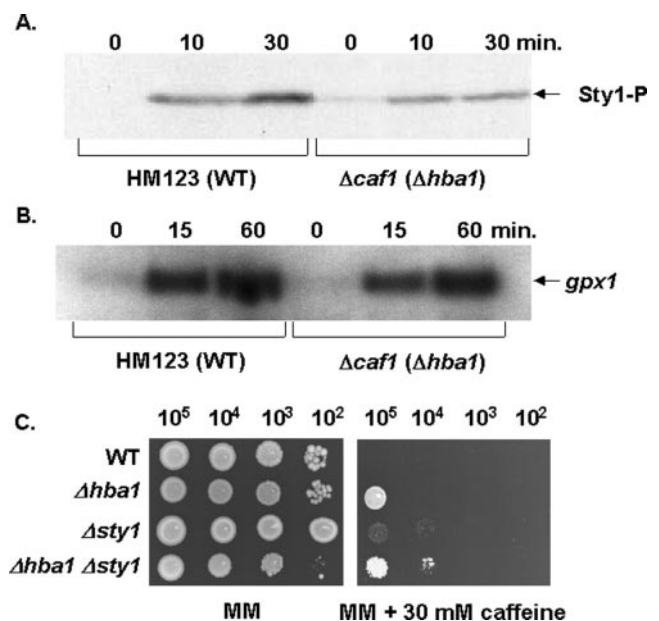
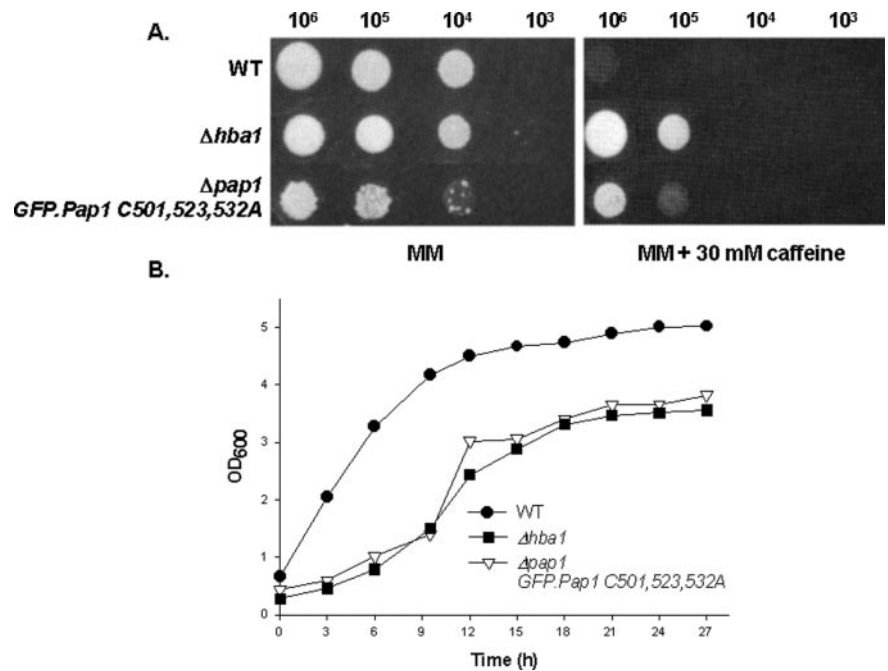


FIG. 5. Nuclear accumulation of Sty1 in a Δ *hba1* strain does not trigger the Sty1-dependent antioxidant response. A, Western blot analysis of phosphorylated Sty1 in wild-type and Δ *hba1* strains. Total protein extracts of strains HM123 (WT) and *caf1⁺::ura4⁺* (Δ *hba1*) were obtained before and after 10 or 30 min of 1 mM H₂O₂ stress. 10 μ g of each extract were loaded on denaturing gels and immunoblotted with anti-phosphorylated p38 polyclonal antibody. B, Northern blot analysis of the Sty1-Atf1-dependent *gpx1* transcription in wild-type and Δ *hba1* strains. Total RNA from the same strains as in A was obtained before and after 15 and 60 min of 1 mM H₂O₂ stress. C, caffeine resistance analysis of strains carrying deletions on the *hba1* and/or *sty1* genes. Strains HM123 (WT), *caf1⁺::ura4⁺* (Δ *hba1*), NT224 (Δ *sty1*), and EA32 (Δ *hba1* Δ *sty1*) were grown in minimal media (MM) to a final absorbance at 600 nm of 0.5 and spotted onto minimal media plates containing or not containing 30 mM caffeine. Plates were incubated at 30 °C for 3–4 days.

² A. P. Vivancos, E. A. Castillo, J. Ayté, and E. Hidalgo, unpublished data.

FIG. 6. Nuclear accumulation of Pap1 is sufficient to confer caffeine-resistant and growth defect phenotypes.

A, caffeine resistance analysis of a strain carrying a constitutively nuclear Pap1 protein. Strains HM123 (WT), *caf1⁺::ura4⁺* (Δ *hba1*) and EHH14.C501A,C523A,C532A (harboring a constitutively nuclear Pap1; Δ *pap1* *GFP.Pap1 C501A,C523A,C532A*) were grown in minimal media (MM) to a final absorbance at 600 nm of 0.5 and spotted onto minimal media plates containing or not containing 30 mM caffeine. Plates were incubated at 30 °C for 3–4 days. **B**, comparative growth curves of strains HM123 (WT), *caf1⁺::ura4⁺* (Δ *hba1*), and EHH14.C501A,C523A,C532A (Δ *pap1* *GFP.pap1 C501A,C523A,C532A*).



expression are concomitant, indicating that the post-transcriptional modifications suffered by the protein upon signal activation may alter its conformation and affect its interaction with the export complexes, but those changes are not required for its positive modulation of the transcription machinery.

We have shown that constitutive activation of Pap1 not only confers multiple drug resistance, but it also impairs growth. The level of reactive oxygen species and the intracellular redox state are tightly modulated by enzymatic and non-enzymatic cellular activities (45). At least for *E. coli* it has been described that the steady-state concentrations of H₂O₂ are kept within a 2-fold range among different strains by modulating the levels of catalase (46). Furthermore, those levels are very similar to the ones described for mammalian cells (47), suggesting that H₂O₂ may be required as a mitogenic signal. Constitutive activation of Pap1 could lead to an increase in the cellular battery of antioxidant activities and to a decrease in the steady-state concentration of intracellular H₂O₂, which could impair cell growth. Another possible explanation is that Pap1 could be exerting a direct role in cell cycle arrest upon mild, mutagenic oxidative stress, and nuclear accumulation of the protein upon export inhibition might constitutively decrease the growth rate of the cells.

The results shown here have important implications regarding Sty1 regulation of gene expression. Sty1 activity has been described to rely on its level of phosphorylation and is, therefore, regulated by its immediate upstream kinase, Wis1, and two phosphatases, Pyp1 and Pyp2. Sty1 phosphorylation and Sty1 nuclear translocation have always been described to be linked. We describe here that, as for Pap1, inhibition of the export machinery (either of Crm1 or of Hba1) can lead to constitutive nuclear accumulation of the MAP kinase, contrary to what had been previously described (11). Nevertheless, that change of cellular sub-localization under uninduced conditions does not dramatically modify either the basal level of phosphorylation of Sty1 nor its transcriptional activity. Furthermore, the constitutively nuclear Sty1 kinase seems to respond to stress following similar kinetics to those described for cytosolic Sty1, even though its main regulators may be physically separated in different cell compartments. It has been described that Wis1 and the tyrosine phosphatases Pyp1/2 are always kept at the cytosol (11); therefore, the constitutive nuclear

accumulation of Sty1 upon export inhibition could lead to transient isolation from its regulatory proteins. Nevertheless, recent work indicates that Wis1 could also accumulate at the nucleus upon certain types of stress (48). Further work will be required to unravel how the stress-induced kinetics of Sty1 activation in a wild-type *versus* a Δ *hba1* strains can be so similar.

The role of Hba1 on Crm1-dependent export of NES-containing cargoes is not clear and will need further elucidation. If export efficiency *in vivo* correlates with cargo exporter affinity *in vitro* then Crm1 affinity for NES-containing substrates is not sufficient to guarantee a rapid and efficient export *in vivo*; under those circumstances, Hba1 and other family members could act as cofactors of such multiple export interactions and stabilize the otherwise weak tripartite complex formed by Crm1-RanGTP export cargo. Regarding this role of Hba1 as an export cofactor, it is not surprising that both deletion of *hba1* or overexpression of its gene product can lead to the same export defect phenotype, since the same ability to inhibit export complex formation at higher concentrations have been previously described for the *S. cerevisiae* homologue Yrb2 *in vivo* (26, 27) and for the human homologue RanBP3 *in vivo* and *in vitro* (29). An excess of any of these cofactor family members could be sequestering Ran-GTP or even the putative exported cargoes, removing them, and inhibiting their export, since Crm1 concentration would be limiting. It is also worth noting that some NES-containing proteins, such as the NES of protein kinase inhibitor, do not seem to require Hba1 function to be exported, at least in *S. pombe* cells.³ It remains unclear which substrates do require the participation of these export cofactors. Hba1 might be working as a scaffold to promote the efficient assembly of export complexes, probably decreasing the *K_d* of Crm1 for some but not all NES-containing substrates. Another interesting feature of Hba1 is that it is a phosphoprotein (23), although it has not been described as a stress- or drug-dependent phosphorylation *in vivo*.³ In fact, Sty1 MAP kinase cannot phosphorylate Hba1 *in vitro*,³ ruling out the possibility that the *in vivo* observed phosphorylation of Hba1 is Sty1-dependent.

³ E. A. Castillo, J. Auté, and E. Hidalgo, unpublished data.

Acknowledgments—We thank Dr. Zigi Benko (University of Debrecen, Hungary) for generosity in providing strains *caf1-21* and *caf1⁻::ura4⁺*. We thank the Imperial Cancer Research Fund (now Cancer Research UK, London), where some of this work was performed. We also thank Drs. Teresa Iglesias and Manolo Arellano for help and support performing confocal microscopy. The technical assistance of Mercè Carmona is also acknowledged as well as the scientific contribution of Alice Zuin.

REFERENCES

- Mattaj, I. W., and Englmeier, L. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 265–306
- Macara, I. G. (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 570–594 table
- Lei, E. P., and Silver, P. A. (2002) *Dev. Cell* **2**, 261–272
- Komeili, A., and O'Shea, E. K. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 355–360
- Carmo-Fonseca, M. (2002) *Cell* **108**, 513–521
- Toone, W. M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B. A., Toda, T., and Jones, N. (1998) *Genes Dev.* **12**, 1453–1463
- Wilkinson, M. G., and Millar, J. B. (1998) *Genes Dev.* **12**, 1391–1397
- Castillo, E. A., Ayte, J., Chiva, C., Moldon, A., Carrascal, M., Abian, J., Jones, N., and Hidalgo, E. (2002) *Mol. Microbiol.* **45**, 243–254
- Kudo, N., Taoka, H., Toda, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 15151–15158
- Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. (1998) *Genes Dev.* **12**, 1464–1473
- Gaits, F., and Russell, P. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 1395–1407
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1996) *Genes Dev.* **10**, 2276–2288
- Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 214–229
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., and Jones, N. (1996) *Genes Dev.* **10**, 2289–2301
- Nguyen, A. N., Lee, A., Place, W., and Shiozaki, K. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 1169–1181
- Turi, T. G., Webster, P., and Rose, J. K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24229–24236
- Kumada, K., Yanagida, M., and Toda, T. (1996) *Mol. Gen. Genet.* **250**, 59–68
- Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M. (1991) *Genes Dev.* **5**, 60–73
- Toda, T., Shimanuki, M., Saka, Y., Yamano, H., Adachi, Y., Shirakawa, M., Kyogoku, Y., and Yanagida, M. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5474–5484
- Benko, Z., Sipiczki, M., and Carr, A. M. (1998) *Mol. Gen. Genet.* **260**, 434–443
- Turi, T. G., and Rose, J. K. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 410–418
- Nishi, K., Yoshida, M., Nishimura, M., Nishikawa, M., Nishiyama, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 761–769
- Turi, T. G., Mueller, U. W., Sazer, S., and Rose, J. K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9166–9171
- Corbett, A. H., and Silver, P. A. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 193–211
- Taura, T., Schlenstedt, G., and Silver, P. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31877–31884
- Taura, T., Krebber, H., and Silver, P. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7427–7432
- Noguchi, E., Saitoh, Y., Sazer, S., and Nishimoto, T. (1999) *J. Biochem. (Tokyo)* **125**, 574–585
- Mueller, L., Cordes, V. C., Bischoff, F. R., and Ponstingl, H. (1998) *FEBS Lett.* **427**, 330–336
- Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff, F. R., Petosa, C., Mattaj, I. W., and Kutay, U. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 926–932
- Lindsay, M. E., Holaska, J. M., Welch, K., Paschal, B. M., and Macara, I. G. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 1391–1402
- Nemergut, M. E., Lindsay, M. E., Brownawell, A. M., and Macara, I. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 17385–17388
- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., III, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998) *Yeast* **14**, 943–951
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 795–823
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., and Warbrick, E. (1993) *Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Maundrell, K. (1993) *Gene (Amst.)* **123**, 127–130
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Benson, F. E., Stasiak, A., and West, S. C. (1994) *EMBO J.* **13**, 5764–5771
- Miller, J. H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K. (1997) *Cell* **90**, 1041–1050
- Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A., and Toone, W. M. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 805–816
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1995) *Nature* **378**, 739–743
- Degols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2870–2877
- Buck, V., Quinn, J., Soto, P. T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B. A., and Millar, J. B. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 407–419
- Benko, Z., Miklos, I., Carr, A. M., and Sipiczki, M. (1997) *Curr. Genet.* **31**, 481–487
- Sies, H. (ed) (1991) *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, Inc., London
- Gonzalez-Flecha, B., and Demple, B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13681–13687
- Gonzalez-Flecha, B., Cutrin, J. C., and Boveris, A. (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 456–464
- Nguyen, A. N., Ikner, A. D., Shiozaki, M., Warren, S. M., and Shiozaki, K. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 2651–2663

DISCUSIÓN

1.- La actividad transcripcional de Pap1 está regulada exclusivamente a nivel de localización celular a través de su exporte mediado por Crm1.

El factor de transcripción Pap1, citoplasmático en condiciones basales, se acumula en el núcleo en respuesta a agentes oxidantes como H₂O₂ y DEM. Toone y colaboradores observaron que la pérdida de función de Crm1, factor de exporte nuclear, conducía a una localización nuclear constitutiva de Pap1, lo que indicaba que la localización subcelular de Pap1 estaba regulada por el sistema de exporte nuclear dependiente de Crm1 (ver apartado “4.1.2.- Regulación de la actividad de Pap1 por cambios en su localización subcelular. Efecto de los agentes oxidantes H₂O₂ y dietilmaleato (DEM)”).

La misma localización nuclear constitutiva de Pap1 se observa en cepas en las que se ha inhibido la función de la proteína Hba1, por sobreexpresión o delección del gen *hba1*. Como veremos en el apartado 4 de esta Discusión, la proteína Hba1 participa en el exporte nuclear dependiente de Crm1 de ciertas proteínas como Pap1 y Sty1; por este motivo, su inactivación, al igual que la del factor de exporte nuclear Crm1, genera una proteína Pap1 nuclear constitutiva.

Nuestros resultados (Fig. 11) indican que la localización subcelular de Pap1 también es dependiente de su dominio C-terminal rico en cisteínas (CRD) ya que su delección conduce a una localización nuclear del factor de transcripción incluso en ausencia de estrés. Estos mismos resultados fueron posteriormente publicados por Kudo y colaboradores (Kudo et al., 1999b), que describieron que el dominio CRD juega un papel muy importante en el exporte nuclear de Pap1 debido a que contiene la señal de exporte nuclear (NES) reconocida por Crm1 e imprescindible para que el factor de transcripción pueda ser exportado fuera del núcleo en ausencia de estrés (Fig. 20). Al igual que la delección, ciertas sustituciones aminoacídicas del dominio CRD pueden inhibir la interacción de Crm1 con la NES, dando lugar a mutantes de Pap1 cuya localización es nuclear constitutiva (Kudo et al., 1999b).

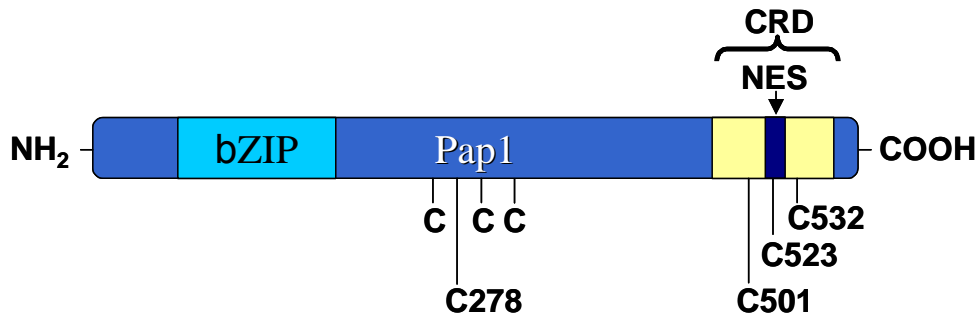


Figura 20. Estructura del factor de transcripción Pap1 de *Schizosaccharomyces pombe*.

La caracterización de las proteínas mutantes de GFP-Pap1 en las que las cisteínas del dominio CRD (Fig.20) han sido sustituidas por otros residuos nos ha permitido concluir que dichos cambios pueden afectar de dos formas diferentes a la localización subcelular de la proteína: en primer lugar y, tal como esperábamos, algunas sustituciones evitan la activación de Pap1 tras estrés por H₂O₂ o DEM; pero, en segundo lugar, algunas mutaciones directamente empeoran *per se* el exporte nuclear de Pap1 en ausencia de estrés. Por ejemplo, observamos que los mutantes GFP-Pap1.C523D, GFP-Pap1.C501,523,532A (Fig. 1 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002) y GFP-Pap1.C523,532A (datos no publicados) presentaban localización nuclear incluso en ausencia de estrés. La sustitución de la cisteína 523 a alanina genera un Pap1 mutante que no presenta alterada su localización citoplasmática basal (Fig. 1 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), lo que indica que este residuo no es importante para el exporte nuclear, pero que la adición de la carga negativa por la sustitución de la cisteína a aspártico podría estar impidiendo el acceso de Crm1 a la NES. La mutación C501A tampoco afecta al exporte nuclear de Pap1 en ausencia de estrés (Fig. 1 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). Sin embargo, el mutante GFP-Pap1.C532A presenta cierta localización nuclear en ausencia de estrés (Fig. 1, Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), indicando que cambios en la región de la cisteína 532 afectan al exporte nuclear Crm1-dependiente de Pap1. Por otra parte, la sustitución a treonina de esta cisteína 532, parece afectar en menor medida al acceso de Crm1: la proteína GFP-Pap1.C532T se localiza por igual en citoplasma y núcleo, sin llegar a acumularse en este último (Fig. 14); sin embargo, este mutante GFP-Pap1.C532T parece haber perdido la capacidad de responder a

H₂O₂ y sólo es capaz de acumularse parcialmente en el núcleo en respuesta a DEM (Fig. 14). De hecho, algo similar se observa en aquellas células que expresan una proteína GFP-Pap1 en la que se han eliminado 8 aminoácidos del extremo C-terminal de Pap1, manteniendo los tres residuos de cisteína del CRD (datos no publicados), lo que indica que la estructura de este extremo C-terminal del polipéptido es muy importante para la respuesta a estrés del factor de transcripción.

El papel de los residuos de cisteína en la respuesta a los oxidantes H₂O₂ y DEM se analiza con más profundidad en los apartados 2 (“El factor de transcripción Pap1 como sensor de H₂O₂”) y 3 (“Dietilmaleato (DEM) modifica los residuos de cisteína del dominio CRD”) de esta Discusión.

Todos los datos presentados hasta el momento indican que inhibir el transporte nuclear, a través de los componentes de la maquinaria de transporte como Crm1 o Hba1 o de la NES, es suficiente para que Pap1 se acumule en el núcleo. Esto es debido a que la región N-terminal de Pap1 contiene la información necesaria para ser importada al interior del núcleo, tal como ya había sido descrito por Ding y colaboradores (Ding et al., 2000), los cuales localizaron una secuencia aminoacídica similar a una señal de localización nuclear (NLS) situada en esta región de Pap1. La localización nuclear constitutiva de la proteína GFP-NLS^{Pap1}, que contiene únicamente el extremo N-terminal del polipéptido (Fig. 13), verifica la presencia de una NLS en esta región de Pap1.

De esta forma, Pap1 es sustrato de transporte y exportación nuclear al tener una NLS en su extremo N-terminal y una NES en el dominio CRD. El análisis de la localización subcelular de ciertos mutantes de GFP-Pap1 en condiciones basales o tras oxidantes como DEM, permite determinar si ambos transportes a través de la membrana nuclear están regulados en respuesta a estrés oxidativo (Fig. 13). El transporte nuclear dependiente de la NLS no presenta regulación por estrés oxidativo, ya que, una proteína que contiene únicamente la NLS de Pap1 (GFP-NLS^{Pap1}) es importada al núcleo de forma constitutiva. Por otra parte, el transporte nuclear, imprescindible para la localización citoplasmática de Pap1, está regulado en respuesta a oxidantes ya que la exclusión nuclear observada en las proteínas GFP-GST-CRD, que contiene únicamente el dominio CRD de Pap1, y GFP-NLS^{Pap1}-CRD, que además del CRD contiene la NLS no regulada

por estrés, se inhibe al tratar las células con un agente oxidante como DEM (Fig. 13). En resumen, el factor de transcripción Pap1 está siendo importado al núcleo de forma constitutiva y es la presencia o ausencia de exporte nuclear dependiente de Crm1 lo que define la localización subcelular de Pap1: en ausencia de estrés, el exporte nuclear determina la localización citoplasmática de Pap1 mientras que la inhibición del exporte tras estrés oxidativo, permite que el factor de transcripción se acumule en el núcleo.

La expresión basal de los genes dependientes de Pap1 está aumentada en aquellas cepas en las que el factor de transcripción se encuentra localizado en el núcleo de forma constitutiva. Esto indica que la localización nuclear de Pap1 es suficiente para que éste se una a las regiones promotoras y active la expresión de sus genes antioxidantes como *trr1* (Fig. 2 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002) u *obr1/p25* (Fig. 2 Castillo *et al.*, JBC, 2003), de manera que las modificaciones de Pap1 inducidas en respuesta a estrés oxidativo (ver apartados 2 y 3 de esta Discusión), no son necesarias para la activación del factor de transcripción, sino únicamente para su localización nuclear. Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIPs) realizados en nuestro laboratorio (Carine Nicot, comunicación personal), indican que la proteína mutante GFP-Pap1.C523D cuya localización es nuclear constitutiva, se encuentra unida a las regiones promotoras de sus genes diana como *obr1/p25* incluso en ausencia de estrés. Sin embargo, electroforesis en geles no reductores de extractos en los que el estado redox de las cisteínas de Pap1 se ha preservado gracias a un pH fuertemente ácido (Vivancos *et al.*, 2004) y obtenidos a partir de células que expresan el mutante de GFP-Pap1.C532D, indican que dicha proteína se encuentra en el núcleo en forma reducida (Ana Vivancos, comunicación personal). Con esto podemos concluir que la oxidación de Pap1 no es necesaria para su unión a DNA ni para la activación de la transcripción. Por otra parte, el homólogo funcional de Pap1 en *E. coli*, el factor de transcripción OxyR, necesita ser oxidado por H₂O₂ para poder unirse a los promotores que regula y activar la transcripción de sus genes diana (ver apartado 3.1. de Introducción: “Sensores de estrés oxidativo en *Escherichia coli*”).

Estos resultados indican que la compartimentalización de las células eucariotas permite que ciertos factores de transcripción como Pap1 se

encuentren constitutivamente activos pero separados físicamente de los promotores que regulan. En respuesta a señales específicas, se acumulan en el interior del núcleo donde se unen a los promotores de sus genes diana.

2.- El factor de transcripción Pap1 como sensor de H₂O₂: formación de un puente disulfuro intramolecular.

Los organismos procariotas han desarrollado proteínas sensoras de estrés oxidativo, como los factores de transcripción OxyR y SoxR de *E. coli*, cuya oxidación por H₂O₂ y O₂^{•-}, respectivamente, no conlleva una pérdida de función sino una modificación reversible que desencadena una respuesta celular antioxidante. En las células eucariotas también encontramos sensores que, al igual que OxyR, responden específicamente a H₂O₂: los factores de transcripción Pap1 y Yap1 de *S. pombe* y *S. cerevisiae*, respectivamente. La caracterización de estos sensores de estrés oxidativo, OxyR, Yap1 y Pap1 está permitiendo conocer los mecanismos moleculares utilizados por procariotas y eucariotas para detectar rápidamente aumentos intracelulares de H₂O₂ (ver apartado 3 de Introducción: “Estrés oxidativo y respuestas celular a estrés oxidativo”).

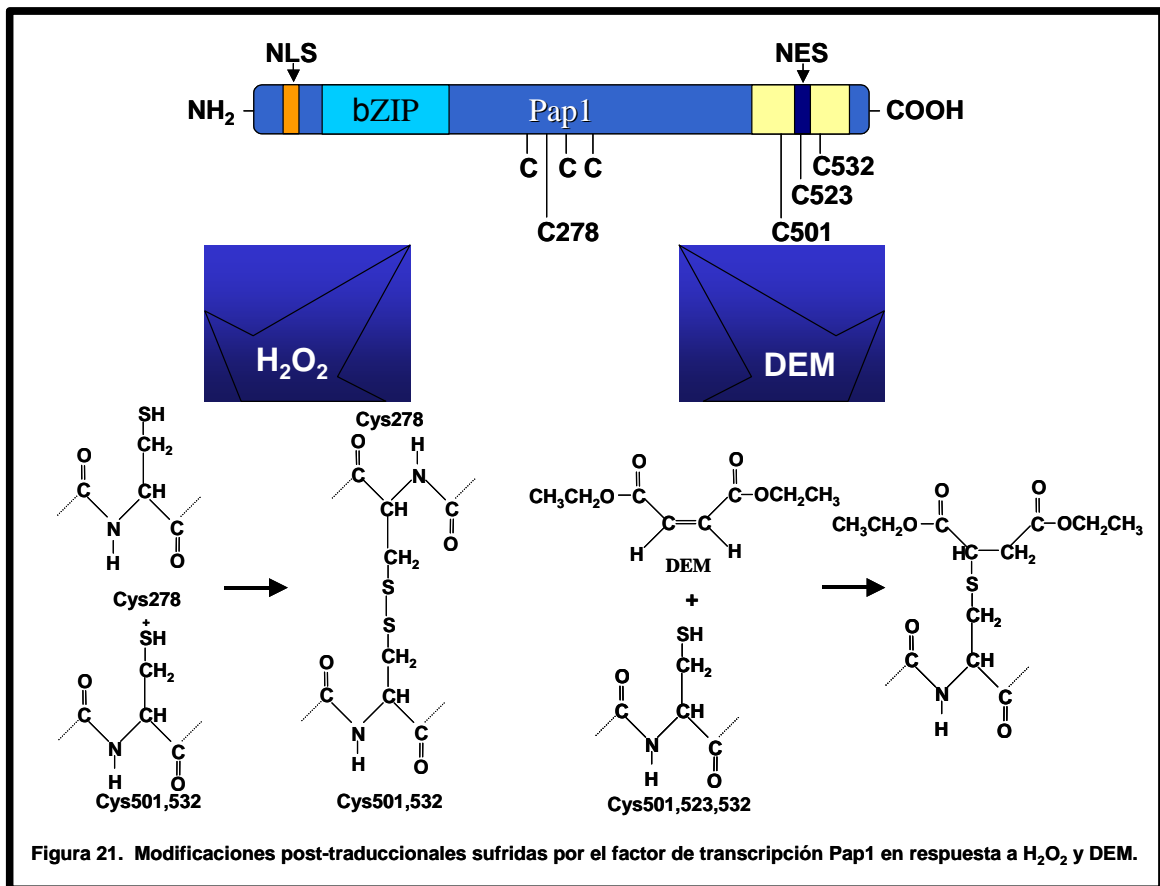
La cinética de acumulación nuclear de la proteína GFP-Pap1 tras tratamientos con concentraciones bajas de H₂O₂ indica que la respuesta de Pap1 a este oxidante es rápida y reversible, como corresponde a una respuesta antiestrés (Fig. 3 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002).

El factor de transcripción Pap1 contiene dos dominios ricos en cisteínas situados en el centro y en la región C-terminal (CRD) del polipéptido (Fig. 20); ambas regiones son imprescindibles para la respuesta a H₂O₂, ya que mutantes de GFP-Pap1 que sólo contienen uno de los dos dominios son incapaces de acumularse en el núcleo tras tratamientos con este oxidante (Fig. 12 y 13). Mediante el análisis de la localización subcelular de mutantes por sustitución de la proteína GFP-Pap1, pudimos determinar que son necesarios los dos dominios ricos en cisteína porque las cisteínas 278 y 501, situadas cada una en dominios diferentes, están implicadas en la respuesta a H₂O₂. Sin

embargo, sólo la cisteína 278 parece ser imprescindible para la respuesta a este oxidante. Así, en las células que expresan el mutante GFP-Pap1.C501A no se ha abolido por completo la acumulación nuclear de esta proteína de fusión ni la inducción de sus genes diana antioxidantes en respuesta a H₂O₂ (Fig. 1 y 2 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). En estos mutantes podrían ser utilizados los residuos de cisteína 523 y 532 del CRD, lo que explicaría que la cisteína 501 no sea imprescindible. La sustitución a alanina del residuo de cisteína 523 no afecta a la localización subcelular de Pap1 ni a su capacidad de acumularse en el núcleo en respuesta a H₂O₂, lo que parece descartar a esta cisteína como necesaria para sensor este oxidante. Sin embargo, el mutante en el que se ha sustituido a alanina la cisteína 532, GFP-Pap1.C532A, aunque presenta cierta localización nuclear constitutiva (ver apartado 1 de esta Discusión), es capaz de acumularse en el núcleo en respuesta a H₂O₂ (Fig. 14); por otra parte, la proteína doble mutante GFP-Pap1.C501,532A, no es capaz de incrementar su localización nuclear en respuesta a H₂O₂ (Fig. 14), lo que indica que ambos residuos, las cisteínas 501 y 532, son importantes para la señalización de este oxidante.

En el factor de transcripción OxyR también se ha descrito que para la respuesta a H₂O₂ es esencial un único residuo de cisteína, la cisteína 199, que, tras estrés por H₂O₂, se oxida a sulfénico (R-SOH) y reacciona con el residuo de cisteína 208, formando un puente disulfuro intramolecular. La actividad glutarredoxina 1 reduce este puente disulfuro, permitiendo que la activación de OxyR sea reversible (ver apartado 3.1 de Introducción: “Sensores de estrés oxidativo en *Escherichia coli*”). Los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que la respuesta a H₂O₂ del factor de transcripción Pap1 es muy similar a la de OxyR; esto significaría que H₂O₂ podría estar oxidando el residuo de cisteína 278 que formaría un puente disulfuro con las cisteínas 501 o 532 de Pap1, induciéndose así su acumulación nuclear. La delección del gen *trr1* que codifica para la tiorredoxina reductasa, enzima implicada en el sistema reductor de puentes disulfuro de la tiorredoxina, tiene como consecuencia la acumulación nuclear de Pap1 incluso en ausencia de estrés (Fig. 15), lo que indica que para que Pap1 sea retenido en el citoplasma es necesario que se mantenga en forma reducida. Por lo tanto, la forma citoplasmática corresponde a una forma reducida de Pap1, mientras que la forma nuclear es una forma

oxidada en la que seguramente se ha generado un puente disulfuro intramolecular en el que participan las cisteínas 278 y 501/532. De esta forma, la actividad reductasa de puentes disulfuro del sistema de la tioredoxina no sólo es necesaria para inactivar a Pap1 tras estrés oxidativo sino también para mantener a Pap1 en su forma citoplasmática e inactiva.



Estas pruebas genéticas fueron posteriormente complementadas con pruebas bioquímicas que indican que tras tratamientos con concentraciones bajas de H₂O₂, aparece una forma oxidada de Pap1, sensible a agentes reductores, dependiente de la presencia de las cisteínas 278 y 501/532, y que es consecuencia de la formación de un puente disulfuro entre dichos residuos (Vivancos et al., 2004). Este puente disulfuro intramolecular generado produciría un cambio conformacional que resultaría en una pérdida de la interacción de la NES con el factor de exportación nuclear Crm1, y, por lo tanto, promovería la acumulación nuclear de Pap1 y la activación de la respuesta antioxidante Pap1-dependiente (Fig. 21; Fig. 7 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002).

En *E. coli*, se han descrito dos modelos diferentes que intentan explicar el/los mecanismo/s de activación del factor de transcripción OxyR en respuesta a H₂O₂ (ver apartado 3.1 de Introducción: “Sensores de estrés oxidativo en *Escherichia coli*”): aunque al principio se describió la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 199 y 208 en respuesta a H₂O₂ (Zheng et al., 1998), algunos autores afirman que sólo sería necesaria la oxidación a sulfénico (R-SOH) de la cisteína 199 (Kim et al., 2002) para la activación del factor de transcripción. En Pap1 sólo uno de los residuos que participarían en la formación del puente disulfuro, la cisteína 278, parece ser esencial para que el factor de transcripción responda a H₂O₂. Esto podría indicar que la oxidación a sulfénico (R-SOH) de la cisteína 278 sería suficiente para la acumulación nuclear de Pap1 y que, el puente disulfuro que presentan las formas nucleares de Pap1 (Vivancos et al., 2004) no sería imprescindible para su entrada en el núcleo. Sin embargo, nuestros resultados indican que el dominio rico en cisteínas central no es suficiente para la acumulación nuclear de Pap1 en respuesta a H₂O₂: si sustituimos el dominio CRD de Pap1 por la señal de exporte nuclear clásica de la proteína PKI (GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI}), y, por lo tanto, mantenemos el residuo de cisteína 278, obtenemos una proteína de localización citoplasmática pero incapaz de acumularse en el núcleo en respuesta a H₂O₂ (Fig. 12). Esto indica que para la respuesta a este oxidante no es suficiente la oxidación a sulfénico (R-SOH) de la cisteína 278, sino que es necesaria probablemente la formación de un puente disulfuro con alguna de las cisteínas localizadas en el dominio CRD. Añadir un residuo de cisteína a la NES^{PKI}, no hace que esta proteína GFP-Pap1 Δ CRD.NES^{PKI} responda a H₂O₂ (Fig. 12), lo que indica que el puente disulfuro no se produce de forma accidental, sino que las cisteínas del CRD de Pap1 presentan ciertas propiedades que les permiten participar en la respuesta a estrés oxidativo.

3.- Dietilmaleato (DEM) modifica los residuos de cisteína del dominio CRD de Pap1 por la formación de un tioéter.

Todos los sensores de estrés oxidativo que han sido caracterizados hasta el momento reconocen señales de diferente origen y reactividad. Por ejemplo,

en el factor de transcripción OxyR se ha descrito que el residuo de cisteína 199 puede ser modificado por diferentes señales dando lugar a diferentes formas activas que difieren en su estructura y en su afinidad con el DNA (Kim et al., 2002). Al igual que OxyR, el factor de transcripción Pap1 no sólo responde a H₂O₂, sino que también es capaz de acumularse en el núcleo tras tratamientos con otros compuestos como dietilmaleato (DEM), utilizado como pro-oxidante en investigación básica y clínica por su capacidad de reducir los niveles de glutatona (GSH) de la célula (ver apartado 4.1.2 de Introducción: “Regulación de la actividad de Pap1 por cambios en su localización subcelular. Efecto de los agentes oxidantes H₂O₂ y dietilmaleato (DEM)”).

La respuesta de Pap1 a este agente pro-oxidante, DEM, no parece ser una respuesta antiestrés como la descrita en el apartado anterior para H₂O₂, ya que DEM induce una acumulación nuclear lenta e irreversible del factor de transcripción (Fig. 3 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). Además, los residuos de cisteína de Pap1 implicados en la respuesta a estrés por H₂O₂ no son los mismos requeridos para la respuesta a este oxidante (Fig. 1 y 2 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). De hecho, para la respuesta a DEM sólo es necesario el dominio CRD de Pap1, ya que las proteínas de fusión GFP-GST-CRD y GST-NLS-CRD (Fig. 13) que contienen únicamente el dominio CRD se acumulan en el núcleo en respuesta a DEM como la proteína salvaje GFP-Pap1. Además, la cinética de acumulación de la proteína GFP-GST-CRD en respuesta a este oxidante es idéntica a la observada para la proteína completa (Fig. 3 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002).

Observamos que si tratábamos células de *E. coli* que estaban expresando la proteína GST-CRD o MBP-CRD con DEM se producía un aumento en su peso molecular que se traducía en un cambio de movilidad en gel reductor (Fig. 4 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol.; Fig. 16). La sustitución a alaninas de los tres residuos de cisteína del dominio CRD hace que el cambio de movilidad observado tras tratamientos con DEM se pierda por completo en el caso de la proteína MBP-CRD (Fig. 16), y parcialmente en GST-CRD ya que la proteína GST contiene residuos de cisteína que pueden ser modificados por DEM (Fig. 4 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). Esto nos estaba indicando que el oxidante DEM modificaba de forma covalente los residuos de cisteína del dominio CRD. Este cambio de movilidad tras tratamiento con DEM, también

fue detectado en la proteína GST-CRD expresada en células de *S. pombe* (Fig. 6 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002).

El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de la proteína MBP-CRD expresada en células de *E. coli* tratadas o no con DEM, indicó que los tres residuos de cisteína del dominio CRD estaban siendo modificados por DEM. La modificación inducida por DEM conlleva un aumento de peso molecular de 172 Da por residuo de cisteína (Fig. 5 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002), que podría corresponder a la conjugación del grupo tiol de la cisteína al doble enlace de DEM, y la formación de aductos irreversibles con una estructura tioéter (Fig. 21). Esta modificación covalente impediría la interacción de Crm1 con la NES induciendo una acumulación nuclear de Pap1 irreversible (Fig. 7 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002). Para comprobar que el factor de exporte nuclear Crm1 no interacciona con la forma de CRD modificada por DEM, purificamos proteína GST-CRD expresada en células de *S. pombe* tratadas o no con H₂O₂ y DEM, y determinamos en qué condiciones GST-CRD estaba interaccionando con la proteína Crm1. La interacción de CRD con Crm1 sólo se rompe tras tratamientos con DEM y no tras estrés por H₂O₂, indicando que la modificación inducida por DEM está impidiendo la interacción entre el factor de exporte nuclear y la NES de Pap1 (Fig. 6 Castillo *et al.*, Mol. Microbiol., 2002).

La misma acumulación nuclear irreversible de Pap1 se observa en respuesta al agente alquilante iodoacetamida (IA) (Fig. 4 Castillo *et al.*, Recent Research Developments...), lo que parece indicar que ambos compuestos, DEM y IA, están actuando como agentes alquilantes de residuos de cisteína. Agentes alquilantes como IA o N-etilmaleimida (NEM) han sido utilizados en experimentación para determinar la accesibilidad de residuos de cisteína, y, con ello, la capacidad de este residuo de ser oxidado en respuesta a estrés oxidativo o de participar en puentes disulfuro con otras cisteínas. El agente alquilante de cisteínas DEM está reaccionando con los tres residuos de cisteína del dominio CRD de Pap1, lo que significa que estas tres cisteínas son igual de accesibles, al menos en la proteína truncada MBP-CRD. Esto explicaría por qué la cisteína 501 de este CRD no es imprescindible para la respuesta del factor de transcripción a H₂O₂: las dos cisteínas restantes, igual de accesibles que la 501, podrían suplir la función del residuo mutado (ver apartado 2 de esta

Discusión: “El factor de transcripción Pap1 como sensor de H₂O₂: formación de un puente disulfuro intramolecular”).

El factor de exporte nuclear Crm1 también contiene un residuo de cisteína accesible, la cisteína 529, que al ser modificado tras tratamientos con la droga leptomicina B (LMB) inactiva la función de este exportador e induce la acumulación nuclear de proteínas con NES (ver apartado 4.1.2.3 de Introducción: “Maquinaria de exporte nuclear en *Schizosaccharomyces pombe*”). Tratamientos con DEM no inducen la acumulación nuclear de Sty1 y de una proteína que contiene la NES de la proteína PKI (Fig. 5 Castillo *et al.*, Recent Research Development...), proteínas cuyo exporte nuclear es dependiente de Crm1. Esto indica que DEM no modifica la cisteína de Crm1 y, por ello, no afecta al exporte en general, sino específicamente al de Pap1, o bien que, un aducto tioéter en esa posición del polipéptido de Crm1 no afecta a la formación del complejo de exporte. Al igual que la cisteína de Crm1, un residuo de cisteína introducido en la secuencia de la NES^{PKI} no es capaz de ser modificado por DEM, ya que la proteína GFP-Pap1ΔCRD.NES^{PKI} que no se acumula en el núcleo en respuesta a DEM, continúa sin responder a este oxidante aunque esta NES contenga un residuo de cisteína (GFP-Pap1ΔCRD.NES^{PKI(D11C)}) (Fig. 12). Esto indica que la región en la que se encuentran los residuos de cisteína de Crm1 y de esta proteína GFP-Pap1ΔCRD.NES^{PKI(D11C)}, podría no ser favorable para la modificación por DEM.

4.- Caracterización del exporte nuclear dependiente de Crm1: la proteína Hba1 como cofactor de exporte.

hba1 fue inicialmente clonado como un gen que, en elevado número de copias, confería a las células un fenotipo de resistencia a la droga brefeldina A (Turi *et al.*, 1996). Posteriormente se aisló un alelo mutante (*caf1-21*) de este gen que, al igual que la sobreexpresión, confería resistencia a cafeína a las células portadoras (Benko *et al.*, 1997). Aunque los autores indicaron que esta mutación debía causar un aumento en la actividad de la proteína para la que codifica, la secuenciación del alelo mutado y el análisis por Western Blot de la

proteína que expresa, nos indicó que la mutación consistía en la introducción de un codón STOP que daba lugar a una proteína incompleta y, por lo tanto, no podíamos detectar en extractos de dicha cepa proteína Hba1; esto indicaba que esta mutación producía el mismo efecto de pérdida de función que una delección (Fig. 2A Castillo *et al.*, JBC, 2003).

El gen *hba1* codifica para una proteína nuclear (Fig. 3 Castillo *et al.*, JBC, 2003), Hba1, con un dominio de unión a Ran y que, por lo tanto, podría estar implicada en importe o exporte nuclear. Mediante microscopia confocal, determinamos que estaba localizada en la matriz nuclear y no en la membrana nuclear (datos no publicados). Esta proteína, a diferencia de las identificadas anteriormente por su implicación en resistencia a multidrogas (ver apartado 4.1.1 de Introducción: “Aislamiento y caracterización de Pap1; genes Pap1-dependientes”), no fue inicialmente relacionada con la actividad transcripcional de Pap1. Nuestros resultados muestran que la actividad de Hba1 es esencial para la localización subcelular de Pap1 (ver apartado 1 de esta Discusión: “La actividad transcripcional de Pap1 está regulada exclusivamente a nivel de localización celular a través de su exporte mediado por Crm1”).

El fenotipo de resistencia a cafeína que confiere la sobreexpresión y delección del gen *hba1* se pierde al deleccionar *pap1*, lo que indica que dicho fenotipo es dependiente de la actividad transcripcional de Pap1 (Fig. 1C y 1D Castillo *et al.*, JBC, 2003). Además, en estas cepas Pap1 se encuentra en el núcleo de forma constitutiva activando la expresión de sus genes diana incluidos los de resistencia a drogas (Fig. 1A, 1B, 2B y 2C Castillo *et al.*, JBC, 2003). La localización de Hba1 en la matriz nuclear, la presencia en la proteína de un dominio de unión a Ran y el hecho que su delección induzca la localización nuclear de Pap1 indica que Hba1 está implicada en el exporte nuclear del factor de transcripción. La acumulación nuclear constitutiva de Pap1 observada en las cepas que sobreexpresan Hba1, podría ser debida a que dicha sobreexpresión tiene como consecuencia la pérdida de función de la proteína Hba1, tal como se ha observado para sus homólogos en mamífero y *S. cerevisiae*: la sobreexpresión de RanBP3 y Yrb2 inhibe el exporte nuclear de proteínas con NES, al retener en el núcleo componentes de la maquinaria de exporte como Crm1 (ver más abajo).

En respuesta a diferentes tipos de estrés, la MAPKK Wis1 fosforila a la MAPK Sty1 induciendo su entrada en el núcleo donde fosforila y activa entre otros el factor de transcripción Atf1. Una vez activada la respuesta antiestrés, Sty1 es exportada de nuevo al citoplasma donde es defosforilada por las fosfatasas Pyp1 y Pyp2 (ver apartado 4.2 de Introducción: “MAPK Sty1: papel en la respuesta a estrés oxidativo”). Los trabajos descritos hasta el momento, indicaban que la acumulación nuclear de Sty1 en respuesta a estrés, era debida a un proceso de importe nuclear activo y que la pérdida de función de Crm1 no afectaba a la localización de la quinasa en condiciones basales, teniendo sólo como consecuencia una mayor retención de Sty1 en el núcleo después de estrés (Gaits and Russell, 1999). Sin embargo, nuestros resultados indican que, al igual que ocurre con Pap1, la pérdida de función de Crm1 induce una localización nuclear constitutiva de la MAPK Sty1 (Fig. 4B Castillo *et al.*, JBC, 2003). Esto significa que el exporte nuclear dependiente de Crm1 es imprescindible para la localización citoplasmática basal de Sty1 y que, por lo tanto, su acumulación nuclear en respuesta a estrés es debida, al menos en parte, a la inhibición del exporte nuclear dependiente de Crm1.

La localización citoplasmática basal de Sty1, además de ser dependiente de Crm1, también es dependiente de Hba1, debido a que en las cepas que sobreexpresan Hba1 o están delecionadas para *hba1*, la MAPK Sty1 se encuentra retenida en el núcleo incluso en ausencia de estrés (Fig. 4B Castillo *et al.*, JBC, 2003).

De esta forma, la proteína Hba1 es necesaria para el exporte nuclear de las proteínas de respuesta a estrés oxidativo Pap1 y Sty1, ya que su pérdida de función conlleva la localización nuclear constitutiva de ambas proteínas. Esto podría significar que el fenotipo de resistencia a multidroga de cepas que no expresan Hba1 podría ser debido a la acumulación nuclear tanto de Pap1 como de Sty1. Sin embargo, así como la localización nuclear del factor de transcripción Pap1 es suficiente para la expresión de sus genes diana (ver apartado 1 de esta Discusión: “La actividad transcripcional de Pap1 está regulada exclusivamente a nivel de localización celular a través de su exporte mediado por Crm1”), la localización nuclear constitutiva de Sty1 no conlleva ni su fosforilación basal ni la activación de la expresión génica dependiente de Atf1 (Fig. 5A y 5B Castillo *et al.*, JBC, 2003). Además, el fenotipo de

resistencia a cafeína de las cepas en las que se ha perdido la función de Hba1, que desaparece al deletar el gen *pap1*, no se ve afectado por la deleción de *sty1* (Fig. 5C Castillo *et al.*, JBC, 2003). Lo más sorprendente es que la localización nuclear constitutiva de Sty1 no impide que esta MAPK sea fosforilada en respuesta a estrés como lo hace la proteína citoplasmática y que, por lo tanto, induzca la expresión de los genes dependiente de Atf1 (Fig. 5A y 5B Castillo *et al.*, JBC, 2003). Recientemente se ha descrito que la MAPKK Wis1 está regulada, al igual que Sty1 y Pap1, por un transporte nuclear dependiente de Crm1 y que tras diferentes tipos de estrés se acumularía en el núcleo debido a la inhibición del transporte nuclear (Nguyen *et al.*, 2002). De esta forma, la entrada de Wis1 en el núcleo tras estrés oxidativo permitiría la fosforilación y activación de una proteína Sty1 nuclear constitutiva.

Todos los datos indicaban que habíamos caracterizado un componente esencial de la maquinaria de transporte nuclear dependiente de Crm1. Sin embargo, resultados posteriores nos indicaron que Hba1 no era necesaria para el transporte nuclear de la NES clásica de la proteína inhibidora de la PKA (PKI) (Fig. 17). Utilizamos una proteína quimérica en la que habíamos sustituido la NES de Pap1 por la NES de la proteína PKI, cuyo transporte es también dependiente de Crm1; esta proteína se acumula en el núcleo al inhibir el transporte dependiente de Crm1 por mutaciones termosensibles o tratamientos con leptomicina B, pero, sin embargo, su transporte nuclear no se ve afectado por la pérdida de función de Hba1 (Fig. 17). Esto parece indicar que Hba1 está implicada en el transporte nuclear dependiente de Crm1 de sólo ciertas proteínas como Pap1 y Sty1, actuando como un cofactor.

La proteína Hba1 presenta homología en su dominio de unión a Ran (RanBD) con las proteínas RanBP3 de humanos y Yrb2 de *S. cerevisiae*, proteínas de la familia de las RanBP (*Ran binding proteins*), implicadas también en el transporte nuclear mediado por Crm1/Xpo1. Trabajos recientes indican que las proteínas RanBP3 y Yrb2 interactúan con componentes de la maquinaria de transporte nuclear dependiente de Crm1. Por ejemplo, Yrb2, además de interactuar con la proteína Ran (Gsp1p en *S. cerevisiae*) (Noguchi *et al.*, 1997), interactúa con el factor de transporte nuclear Crm1 (Xpo1 en *S. cerevisiae*) (Taura *et al.*, 1998), y con la proteína intercambiadora RCC1 (Prp20p en *S.cerevisiae*) (Taura *et al.*, 1997) importante para la formación del

complejo de exporte. Al igual que Yrb2, la proteína RanBP3 se une directamente a Crm1, y a RCC1. La unión de esta proteína RanBP3 a Crm1 aumenta la afinidad por RanGTP y por la proteína a exportar, facilitando así que se forme el complejo de exporte. Por otra parte, la interacción de RanBP3 con RCC1, no sólo aumenta la actividad intercambiadora de esta última, sino que también facilita que esta actividad catalítica interactúe con el factor de exporte nuclear, facilitando así, el ensamblaje eficiente del complejo de exporte dependiente de Crm1 (Nemergut et al., 2002). Tal como hemos visto para Hba1, la sobreexpresión de estas proteínas, RanBP3 y Yrb2, inhibe el exporte nuclear debido a que el exceso de proteína secuestraría el factor de exporte nuclear impidiendo que éste participe en el exporte de las proteínas con NES.

La proteína Hba1, al igual que Yrb2 y RanBP3, interacciona *in vivo* con el factor de exporte nuclear Crm1 (Fig. 18). Si, al igual que ocurre con Yrb2 y RanBP3, la sobreexpresión de Hba1 estuviera impidiendo la función de Crm1 al retenerlo en el núcleo, se estaría inhibiendo tanto el exporte dependiente de Hba1 como el independiente. Sin embargo, dicha sobreexpresión sólo inhibe el exporte nuclear de Pap1 y Sty1, y no el de la proteína NES^{PKI}, cuyo exporte es independiente de Hba1. Además de la interacción con Crm1, también hemos observado interacción *in vivo* de Hba1 con la proteína que contiene la NES, aunque se observa mayor interacción con la proteína que contiene la NES de Pap1 que con aquella que contiene la NES de PKI (Fig. 18). Estos datos estarían indicando que en estas células se podrían estar generando dos tipos de complejos de exporte: aquéllos que son independientes de Hba1 y los que necesitan este cofactor para el ensamblaje. Lo que podría determinar si Hba1 es necesaria o no para el exporte de una proteína sería la afinidad de la misma por el factor de exporte nuclear Crm1: la NES^{PKI} presentaría una elevada afinidad con Crm1, mientras que Pap1 y Sty1 tendrían una baja afinidad por Crm1. En el caso de Pap1, esta interacción con Crm1 sí que parece ser muy débil debido a que aún no se ha podido identificar una interacción *in vivo* ni *in vitro* entre ambas proteínas. Estas diferencias de interacción de Hba1 con los sustratos de exporte sí que permitirían explicar la razón por la cual la sobreexpresión de esta proteína inhibe el exporte nuclear de ciertas proteínas con NES: el exceso de Hba1 retendría en el núcleo sólo a aquellas proteínas con las que está interaccionando como la proteína Pap1.

El factor de exporte nuclear Crm1 contiene un residuo de cisteína, la cisteína 529, que resulta modificado tras tratamientos con la droga leptomicina B (LMB), inactivando su función induciendo la acumulación nuclear de proteínas con NES (ver apartado 4.1.2.3 de Introducción: “Maquinaria de exporte nuclear en *Schizosaccharomyces pombe*”). Recientemente, un grupo de investigadores ha descrito un modelo estructural de la proteína Crm1 humana en el que esta cisteína 529 se encuentra adyacente a los residuos críticos para el reconocimiento de la NES. La unión de LMB a esta cisteína impediría la unión de la proteína a exportar con la región de interacción con la NES (Petosa et al., 2004). Además, mediante estudios *in vivo* se ha determinado que la modificación por LMB de esta cisteína 529 es dependiente de la región N-terminal de Crm1 humana, donde se encuentra el dominio de interacción con RanGTP (Daelemans et al., 2005). Los autores afirman que esto puede ser debido a que la formación del complejo de tres componentes (CRM1-RanGTP-NES), su transporte a través del NPC y su desensamblaje en el citoplasma sea necesario para la acción de LMB; otra de las hipótesis que presentan es que la unión de la proteína RanGTP a CRM1 podría inducir un cambio conformacional en el complejo que permitiría a LMB modificar la cisteína 529.

Sin embargo, este residuo de cisteína de Crm1, aunque modificado por LMB, no es modificado por el agente alquilante DEM (ver apartado 3 de esta Discusión: “Dietilmaleato (DEM) modifica los residuos de cisteína del dominio CRD de Pap1 por la formación de un tioéter”). El otro componente del complejo de exporte nuclear, Hba1, también contiene un residuo de cisteína. A diferencia del de Crm1, este residuo sí que se modifica por DEM *in vivo* e *in vitro* (Fig. 19) lo que indica que, por lo tanto, se encuentra accesible en la estructura de la proteína. La modificación por DEM podría tener como consecuencia la inactivación de Hba1 o su pérdida de interacción con los componentes de la maquinaria de exporte. Esta hipótesis explicaría por qué tratamientos con DEM inducen la acumulación nuclear del mutante de Pap1 en el que se han sustituido los tres residuos de cisteína del CRD (GFP-Pap1.C501,523AC532T) (Fig. 14), teóricamente insensible a este agente alquilante. Posteriores estudios son necesarios para determinar si este residuo de cisteína permite la regulación de la actividad de Hba1 en respuesta a estrés

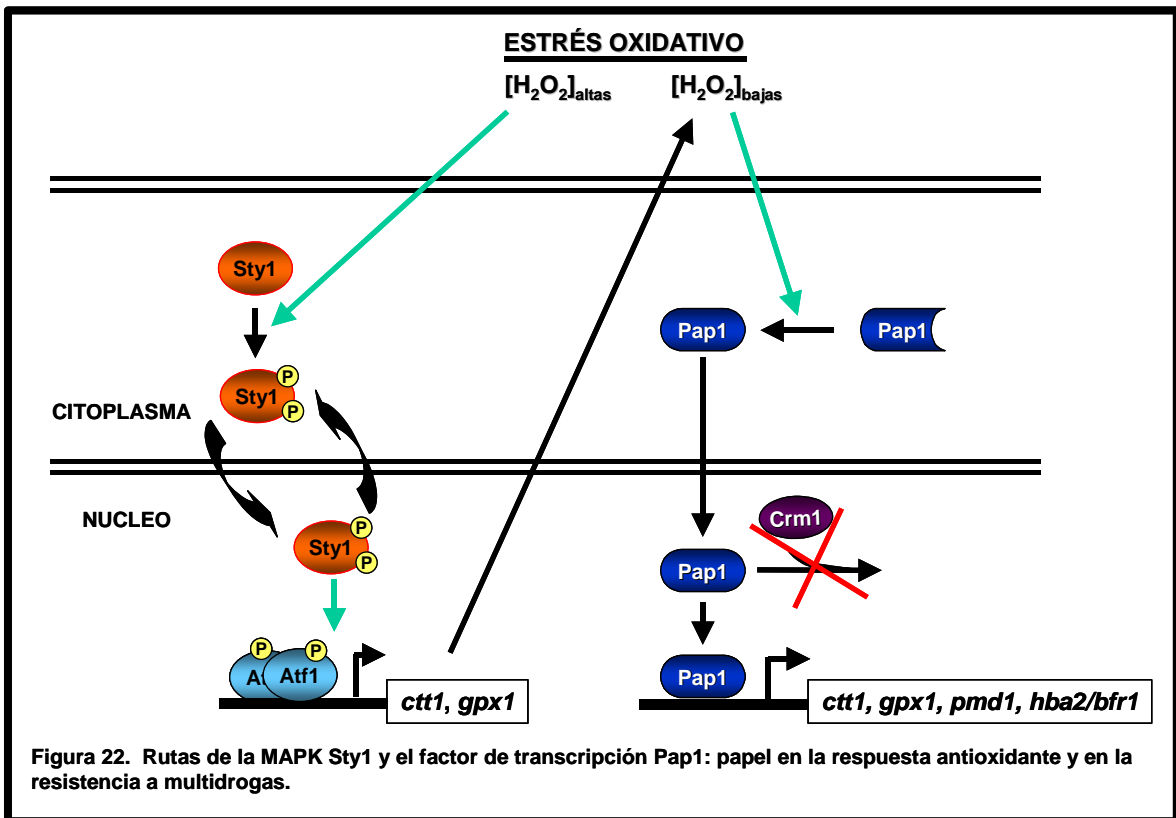
oxidativo o la formación de puentes disulfuro intermoleculares con otras proteínas del complejo de exporte nuclear.

5.- MAPK Sty1 y factor de transcripción Pap1: papel en la respuesta antioxidante y en la resistencia a multidrogas.

En *S. pombe* existen dos rutas de respuesta a estrés oxidativo, la ruta de la MAPK Sty1, que además responde a otros tipos de estrés, y la ruta del factor de transcripción Pap1 (ver apartado 4 de Introducción: “*Schizosaccharomyces pombe*: sistema modelo para el estudio de la respuesta a estrés oxidativo en eucariotas”). La activación de una u otra ruta en respuesta a H₂O₂ depende de la concentración de dicho oxidante (Quinn et al., 2002; Vivancos et al., 2004): concentraciones bajas inducen una respuesta adaptativa mediada por el factor de transcripción Pap1, mientras que concentraciones altas inducen una respuesta de supervivencia, o aguda, activada por la ruta de la MAPK Sty1. El factor de transcripción Pap1 se acumula en el núcleo rápidamente a concentraciones bajas de H₂O₂; a concentraciones altas de este oxidante, Pap1 también se acumula en el núcleo aunque de forma dependiente de la MAPK Sty1 y a tiempos más largos; así, a medida que aumentamos la concentración del oxidante se retrasa la entrada de Pap1 en el núcleo. Resultados de nuestro laboratorio (Vivancos et al., 2004) indican que a concentraciones elevadas de H₂O₂ se activaría la ruta de la MAPK Sty1 y con ello la expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes, lo que permitiría reducir los niveles de H₂O₂ en la célula hasta llegar a las concentraciones de activación de Pap1 (Fig. 22).

El gen que codifica para el factor de transcripción Pap1 fue inicialmente aislado debido a que su sobreexpresión confería a las células un fenotipo de resistencia a multidrogas. Junto con *pap1* también fueron aislados otros genes como *pad1*, *crm1*, *trr1* y *hba1*, que codificaban para proteínas cuya ganancia o pérdida de función confería a las células un fenotipo de resistencia a multidrogas (ver apartado 4.1.1 de Introducción: “Aislamiento y caracterización de Pap1; genes Pap1-dependientes”). La caracterización de Hba1 ha permitido

determinar que todos estos genes codifican para proteínas que regulan la actividad transcripcional de Pap1 y que el fenotipo de resistencia a drogas como cafeína es debido a una activación del factor de transcripción (ver apartado 4 de esta Discusión: “Caracterización del exporte nuclear dependiente de Crm1: la proteína Hba1 como cofactor de exporte”). La implicación de Pap1 en resistencia a multidrogas es probablemente debida a que este factor de transcripción regula la expresión de genes antioxidantes y de genes que codifican para proteínas implicadas en la resistencia a drogas como *pmd1* y *hba2/bfr1* que codifican para transportadores de tipo ABC, implicados probablemente en la exclusión al espacio extracelular de dichas drogas.



De esta forma, la expresión constitutiva de los genes diana de Pap1 parece ser beneficiosa para la célula debido a que la hacen más resistente a estrés oxidativo, multidrogas y metales pesados. Sin embargo, la localización nuclear constitutiva de Pap1 y/o la expresión continuada de sus genes diana también tiene un efecto nocivo para la célula: problemas de crecimiento que se traducen en tiempos de duplicación mayor y una parada del crecimiento a densidades ópticas menores que en las cepas salvajes (Fig. 6 Castillo *et al.*,

JBC, 2003). En *E.coli* (Gonzalez-Flecha and Demple, 1995) y en células de mamífero (Gonzalez-Flecha et al., 1993) se ha observado que para el buen funcionamiento de la célula, son necesarias concentraciones basales de oxidantes como H₂O₂. Por ello, en cepas de *E. coli* en las que la tasa de producción de H₂O₂ está disminuida, se regula la actividad de la catalasa para mantener concentraciones intracelulares constantes (0.1-0.2 μM) de este oxidante. De igual forma, en estas cepas que expresan un Pap1 nuclear constitutivo, la expresión de genes antioxidantes como catalasa puede estar reduciendo los niveles de H₂O₂ por debajo de los niveles basales, alterando el funcionamiento normal de la célula. También es posible que Pap1 tenga un papel en parar el ciclo celular para evitar mutaciones en el DNA tras estrés oxidativo, y que su acumulación nuclear y/o la expresión de algún gen diana, sea la señal de parada o retraso del ciclo celular.

Incrementos en los niveles o activación de componentes de la ruta de respuesta a estrés de la MAPK Sty1 nunca han sido relacionados con fenotipos de resistencia a multidrogas. Esto podría ser debido a que, en primer lugar y, pese a la gran cantidad de genes inducidos tras la activación de la ruta de la MAPK Sty1, entre ellos no se encuentre ninguno implicado directamente en resistencia a drogas. En segundo lugar, para la expresión constitutiva de los genes diana de la ruta de la MAPK Sty1 es necesario que esta quinasa presente localización nuclear constitutiva y que, además, se encuentre fosforilada por la MAPKK Wis1 (Fig. 5 Castillo *et al.*, JBC, 2003). En tercer y último lugar, la fosforilación constitutiva de Sty1 y, por lo tanto, su activación continuada es tóxica para la célula tal y como indica el hecho que la doble delección de las fosfatasas Pyp1 y Pyp2, encargadas de fosforilar a Sty1, sea inviable (Millar et al., 1995).

De esta forma, la activación del factor de transcripción Pap1, pero no la de la ruta de la MAPK Sty1, no sólo induce una respuesta antioxidante, sino que también induce actividades detoxificadoras de drogas como cafeína. Sin embargo, Pap1 no se activa en respuesta a esta droga (datos no mostrados) al menos a las concentraciones y tiempos probados, lo que parece indicar que en presencia de oxidantes, es necesaria la activación de una respuesta antioxidante y una respuesta detoxificadora.

6. Los organismos modelo *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a estrés.

6.1. Sensores específicos de estrés oxidativo en levaduras: Pap1 de *S. pombe* y Yap1 de *S. cerevisiae*.

Pap1 y Yap1 forman parte de la familia de los factores de transcripción AP-1 de levaduras que actúan como sensores de estrés oxidativo y regulan directamente la transcripción de genes antioxidantes.

En condiciones basales, estos factores de transcripción están siendo exportados fuera del núcleo por el factor de exporte nuclear Crm1 (Xpo1 en *S. cerevisiae*), que reconoce una NES situada en el dominio C-terminal rico en cisteínas (CRD) de ambas proteínas. En respuesta a estrés oxidativo, se inhibe el transporte nuclear dependiente de Crm1 produciéndose la acumulación nuclear de Pap1 y Yap1 (Kuge et al., 1997; Toone et al., 1998) (ver apartado 4.1.2 de Introducción: “Regulación de la actividad de Pap1 por cambios en su localización subcelular. Efecto de los agentes oxidantes H₂O₂ y dietilmaleato (DEM)”). Los mecanismos moleculares por los cuales diferentes agentes oxidantes como H₂O₂, dietilmaleato (DEM) o diamida inhiben la interacción entre Crm1 y la NES son muy similares para ambos sensores de estrés oxidativo.

Tanto Pap1 como Yap1 contienen dos dominios ricos en cisteína situados en la región central de la proteína y en el dominio CRD. Como hemos visto anteriormente, (ver apartado 2 de esta Discusión: “El factor de transcripción Pap1 como sensor de H₂O₂: formación de un puente disulfuro intramolecular”), H₂O₂ parece estar induciendo la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 278 y 501/532 de Pap1, localizados en diferentes dominios ricos en cisteína. En Yap1, cisteínas situadas en posiciones equivalentes, las cisteínas 303 y 598 del polipéptido, también están implicadas en la formación *in vivo* de un puente disulfuro en respuesta a H₂O₂ (Delaunay et al., 2000; Delaunay et al., 2002). Pero en Yap1 también se ha descrito la formación *in vitro* de otro puente disulfuro diferente en respuesta a H₂O₂ en el que están

implicadas las cisteínas 310 y 629 del polipéptido (Wood et al., 2003a; Wood et al., 2003c). En ambos casos, y al igual que ocurre para Pap1, ambos residuos de cisteína están situados en diferentes dominios del polipéptido. La formación de este puente disulfuro intramolecular, induciría un cambio conformacional de la proteína que haría que la NES situada en el CRD fuera inaccesible para Crm1, produciéndose la acumulación nuclear del factor de transcripción. Este cambio conformacional redox-dependiente se ha demostrado mediante estudios estructurales de la forma reducida y oxidada de una proteína Yap1 truncada que sólo posee los dominios ricos en cisteína (Wood et al., 2004).

La cinética de acumulación nuclear de Pap1 es dependiente de la concentración de H_2O_2 , de manera que, cuanto mayor es la concentración de este oxidante, más tarda Pap1 en localizarse en el núcleo. Además, a concentraciones altas de H_2O_2 , la acumulación nuclear de Pap1 es dependiente de la presencia de la MAPK Sty1 (ver apartado 5 de esta Discusión : “MAPK Sty1 y factor de transcripción Pap1: papel en la respuesta antioxidante y en la resistencia a multidrogas”). Por otra parte, la cinética de localización nuclear de Yap1, no es dependiente de la concentración de H_2O_2 , sino que cualquier concentración del oxidante induce la acumulación nuclear rápida del factor de transcripción. Estas diferencias en las cinéticas de acumulación nuclear pueden ser explicadas si estos factores de transcripción no son sensores directos de H_2O_2 , sino que reciben la señal de activación de sensores diferentes para cada levadura.

Estudios recientes indicarían que H_2O_2 no oxida directamente a Yap1; la glutatona peroxidasa Gpx3/Orp1 actuaría como sensor directo, transduciendo la señal de oxidación a través de la formación de un puente disulfuro intermolecular entre la Cys36 de Gpx3/Opr1 y la Cys598 de Yap1. La rotura de dicho puente disulfuro intermolecular permitiría la resolución del complejo, liberando Yap1 con el puente disulfuro intramolecular descrito previamente, y regenerándose Gpx3/Orp1 reducido. De esta forma, Gpx3/Orp1 tendría una función dual como detoxificador y sensor de H_2O_2 (Delaunay et al., 2002). Recientemente, se ha descrito otra proteína, Ybp1, cuya interacción con Yap1 es necesaria para su oxidación por Gpx3/Orp1, aunque no se conoce su función exacta (Veal et al., 2003).

Pap1 tampoco parece ser el sensor directo de H₂O₂ sino que para su oxidación es necesaria la presencia de Tpx1, una peroxirredoxina homóloga a Tsa1 de *S. cerevisiae* (Vivancos *et al.*, en proceso de revisión). Los resultados obtenidos hasta el momento en este trabajo indican que Tpx1, a diferencia de Gpx3/Orp1, se inactiva a concentraciones altas de H₂O₂ impidiendo así que se active el factor de transcripción Pap1. Esto explicaría porque la activación de Pap1 es dependiente de concentraciones de H₂O₂, mientras que Yap1 responde de igual forma a todas las concentraciones de H₂O₂.

El compuesto DEM, utilizado como pro-oxidante celular en investigación básica y en clínica, induce la acumulación nuclear irreversible de Pap1 al modificar covalentemente los residuos de cisteína de su dominio CRD e impedir el acceso de Crm1 a la NES (ver apartado “3.- Dietilmaleato (DEM) modifica los residuos de cisteína del dominio CRD de Pap1 por la formación de un tioéter” de esta Discusión). Otros agentes alquilantes como IA producen la misma acumulación nuclear irreversible de Pap1. Este mecanismo de activación también se ha observado en Yap1: el compuesto electrófilo N-etilmaleimida (NEM) modifica los residuos de cisteína del dominio CRD, de forma independiente a la ruta de Gpx3/Orp1, y esto es suficiente para inducir la acumulación nuclear y activación del factor de transcripción. De igual forma, otros agentes alquilantes de residuos de cisteína como iodoacetamida (IA), metales pesados como cadmio (Cd) y selenio (Se), y benomil también activarían por el mismo mecanismo a Yap1 (Azevedo *et al.*, 2003).

En Yap1 se ha observado un tercer mecanismo de activación que no se ha descrito en Pap1 que consiste en la formación de al menos uno de los tres puentes disulfuro descritos entre las cisteínas de la región C-terminal (Kuge *et al.*, 2001) en respuesta al oxidante diamida.

6.2. Rutas de la MAPK Sty1 y MAPK Hog1: respuesta global a estrés y respuesta específica a estrés osmótico.

La cascada de MAPKs es un mecanismo de señalización que las células eucariotas utilizan para responder a diferentes estímulos externos (Schaeffer and Weber, 1999). Estas cascadas han sido identificadas en rutas de

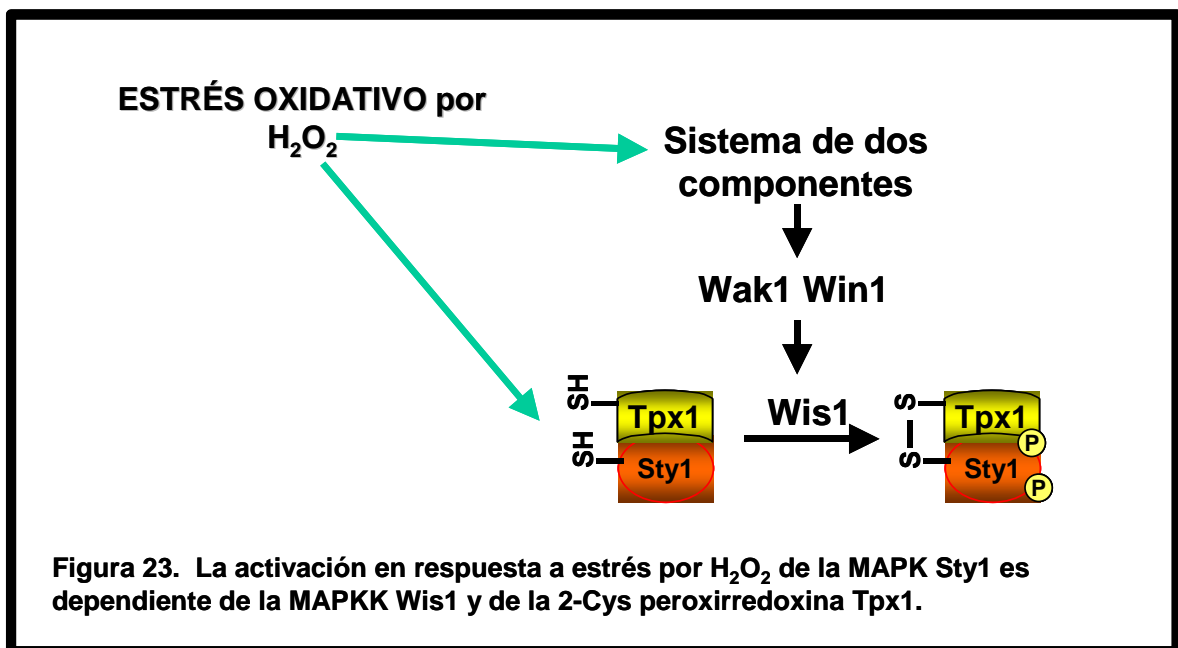
señalización que regulan diferentes procesos celulares como proliferación, diferenciación, muerte celular y homeostasis (Cobb and Goldsmith, 1995; Herskowitz, 1995). La primera MAPK dedicada a la señalización de estrés fue descubierta en la ruta de Hog1 (*High Osmolarity Glycerol response*) de *S. cerevisiae* (Brewster et al., 1993). Posteriormente, fueron identificados homólogos de esta MAPK en otras especies como JNKs y p38/RK/CSBP de mamíferos (Derijard et al., 1994; Han et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Lee et al., 1994; Rouse et al., 1994), CaHOG1 de *Candida albicans* (San Jose et al., 1996) y Sty1/Spc1 de *S. pombe* (Kato et al., 1996; Millar et al., 1995; Shiozaki and Russell, 1995a).

La ruta de la MAPK Sty1, al igual que las rutas de MAPKs de mamífero y *C. albicans*, son activadas en respuesta a diferentes tipos de estrés como estrés osmótico, estrés oxidativo, y choque térmico. Por otra parte, se había descrito que la ruta de la MAPK Hog1 sólo respondía a estrés por alta osmolaridad (Schuller et al., 1994). Sin embargo, existen estudios que indican que mutantes delecionados para el gen HOG1 son sensibles a H₂O₂ (Singh, 2000), lo que sugiere un papel de Hog1 en la respuesta a estrés oxidativo. Recientemente, se ha descubierto que Hog1, al igual que la MAPK Sty1, se fosforila en respuesta a H₂O₂. Sin embargo, la fosforilación de Hog1 es más tardía que la de Sty1, lo que parece indicar que el mecanismo de activación de ambas quinasas es diferente (Bilsland et al., 2004).

Tanto la MAPK Sty1 como la MAPK Hog1 se acumulan en el núcleo en respuesta a estrés. La acumulación nuclear de Hog1 en respuesta a estrés es debida a una activación del importe, mientras que su relocalización en el citoplasma una vez activada la respuesta antiestrés es dependiente del factor de exporte nuclear Xpo1/Crm1 (Ferrigno et al., 1998). Sin embargo, en *S. pombe*, Crm1 es necesario para la localización citoplasmática de la MAPK Sty1 tanto antes como después de estrés (ver apartado 4 de esta Discusión: “Caracterización del exporte nuclear dependiente de Crm1: la proteína Hba1 como cofactor de exporte”), lo que indica que para que Sty1 se acumule en el núcleo en respuesta a estrés es necesaria la activación del importe nuclear (Gaits and Russell, 1999) y la inhibición del exporte nuclear dependiente de Crm1.

Estudios recientes han descrito que para la activación de la MAPK Sty1 en respuesta a H_2O_2 y, por lo tanto, para la expresión de genes antioxidantes Atf1-dependientes como *ctt1* y *gpx1*, sería esencial la 2-Cys peroxirredoxina Tpx1 (ver apartado “2.- Actividades enzimáticas antioxidantes” de Introducción) (Fig. 4). Sin embargo, esta regulación dependiente de Tpx1 es específica de estrés oxidativo, ya que la activación de Sty1 por estrés osmótico no se ve afectada en un mutante deleciónado para el gen *tpx1*.

Según sus resultados, Tpx1, además de estar implicada en reducir peróxidos, también sería importante para la activación, en respuesta a H_2O_2 , de la MAPK Sty1 a través de un mecanismo directo que implica la formación de un puente disulfuro intermolecular entre ambas proteínas. Sin embargo, la activación de Sty1 dependiente de Tpx1 requiere de la actividad de la MAPKK Wis1; de esta forma, para que se produzca la activación de Sty1, inducida por H_2O_2 , es necesaria su fosforilación dependiente de Wis1, así como, la formación del puente disulfuro con Tpx1.



Tpx1, al igual que el resto de 2-Cys Prxs, contiene dos residuos de cisteína necesarias para su actividad tiorredoxina peroxidasa, las cisteínas 48 y 169. Aunque la cisteína 169 es necesaria para la actividad catalítica de Tpx1, no es importante para la regulación de la actividad de Sty1. El residuo de

cisteína 48 (cisteína peroxidática) de Tpx1 y la cisteína 35 de Sty1 son las implicadas en el puente disulfuro entre ambas proteínas (Veal et al., 2004).

De esta forma, la activación de la MAPK Sty1 en respuesta a estrés oxidativo no sólo depende de la transducción de la señal a través del sistema de dos componentes y de la fosforilación por la MAPKK Wis1 (ver apartado 4.2 de Introducción: “MAPK Sty1: papel en la respuesta a estrés oxidativo”), sino también requiere de la formación de un puente disulfuro intermolecular con la peroxirredoxina Tpx1 (Fig. 23). Este complejo sistema de regulación seguramente sea necesario para la activación de la quinasa únicamente tras tratamientos con dosis altas de H₂O₂.

En resumen, la regulación de la actividad de la MAPK Sty1 se realiza a través de mecanismos diferentes, dependiendo del tipo de estrés al que responda (ver apartado 4.2 de Introducción: “MAPK Sty1: papel en la respuesta a estrés oxidativo”). Además, los mecanismos moleculares utilizados para la activación de esta MAPK son más complejos que los descritos para su homóloga en *S. cerevisiae*, Hog1.

La homología estructural y funcional entre las rutas de las MAPKs Sty1 y Hog1 y las rutas de señalización de estrés descritas en eucariotas superiores, permite que los estudios realizados en las levaduras *S. cerevisiae* y, especialmente, *S. pombe* puedan ser extrapolados a otros organismos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1.- La actividad del factor de transcripción Pap1, sensor de estrés oxidativo en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, está exclusivamente regulada a nivel de localización subcelular.

2.- La inhibición del exporte nuclear Crm1-dependiente es suficiente para la acumulación nuclear de Pap1 y la transcripción de sus genes diana.

3.- En respuesta a estrés oxidativo, el sensor Pap1 sufre modificaciones post-traduccionales que impiden el acceso del factor de exporte nuclear Crm1 a la señal de exporte nuclear (NES), localizada en el dominio C-terminal rico en cisteínas (CRD) de Pap1.

4.- Pap1 sufre modificaciones post-traduccionales diferentes en respuesta a los oxidantes H₂O₂ y dietilmaleato (DEM).

5.- En respuesta a H₂O₂ se induce, seguramente, la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 278 y 501/532 de Pap1; la actividad de la tiorredoxina reductasa es esencial para mantener una forma citoplasmática y reducida de Pap1, seguramente debido a que participa con el sistema de la tiorredoxina en la reducción del puente disulfuro intramolecular.

6.- La acumulación nuclear irreversible de Pap1 tras tratamientos con DEM, indica que la respuesta a este oxidante no es una respuesta fisiológica o antiestrés. El compuesto DEM actúa como un agente alquilante al modificar los residuos de cisteína del dominio CRD de Pap1 formando aductos irreversibles con una estructura tioéter.

7.- La proteína Hba1 está relacionada con la regulación de la actividad transcripcional de Pap1, por lo que, el fenotipo de resistencia a multidrogas de las cepas delecionadas para *hba1* es dependiente del gen *pap1*.

8.- La proteína Hba1 participa en el transporte nuclear mediado por Crm1 de ciertos sustratos como el factor de transcripción Pap1 y la MAPK Sty1, pero no de otros como la proteína PKI. La pérdida de función de Hba1, por sobreexpresión o deleción del gen *hba1*, induce la localización nuclear constitutiva de Pap1 y Sty1.

9.- La localización nuclear constitutiva de Sty1 no implica ni su fosforilación basal ni la activación de su respuesta específica.

10.- La fosforilación de Sty1, imprescindible para la activación de su respuesta antioxidante, se produce incluso aunque la MAPK se encuentre localizada en el núcleo constitutivamente.

11.- La localización nuclear constitutiva de Pap1 y, por lo tanto, la expresión continuada de sus genes diana tiene un efecto dual: las células que expresan un Pap1 nuclear constitutivo son más resistentes a estrés oxidativo y multidrogas, pero, además, presentan un crecimiento defectivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., 3rd, and Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1157-1161.
- Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S. Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K. D., Pincus, M. R., Sardana, M., Henderson, C. J., Wolf, C. R., *et al.* (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J* 18, 1321-1334.
- Amabile-Cuevas, C. F., and Demple, B. (1991). Molecular characterization of the soxRS genes of Escherichia coli: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res* 19, 4479-4484.
- Aoyama, K., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001). Genetic analysis of the His-to-Asp phosphorelay implicated in mitotic cell cycle control: involvement of histidine-kinase genes of Schizosaccharomyces pombe. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2347-2352.
- Arioka, M., Kouhashi, M., Yoda, K., Takatsuki, A., Yamasaki, M., and Kitamoto, K. (1998). Multidrug resistance phenotype conferred by overexpressing bfr2+/pad1+/sks1+ or pap1+ genes and mediated by bfr1+ gene product, a structural and functional homologue of P-glycoprotein in Schizosaccharomyces pombe. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 390-392.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6161-6165.
- Asp, E., and Sunnerhagen, P. (2003). Mkp1 and Mkp2, two MAPKAP-kinase homologues in Schizosaccharomyces pombe, interact with the MAP kinase Sty1. *Mol Genet Genomics* 268, 585-597.
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., and Toledano, M. B. (2003). Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med* 35, 889-900.
- Beckman, J. S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 9, 836-844.
- Beddow, A. L., Richards, S. A., Orem, N. R., and Macara, I. G. (1995). The Ran/TC4 GTPase-binding domain: identification by expression cloning and characterization of a conserved sequence motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3328-3332.
- Benko, Z., Miklos, I., Carr, A. M., and Sipiczki, M. (1997). Caffeine-resistance in S. pombe: mutations in three novel caf genes increase caffeine tolerance and affect radiation sensitivity, fertility, and cell cycle. *Curr Genet* 31, 481-487.
- Benov, L. T., and Fridovich, I. (1994). Escherichia coli expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* 269, 25310-25314.
- Benson, F. E., Stasiak, A., and West, S. C. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *Embo J* 13, 5764-5771.
- 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. *Mol Microbiol* 53, 1743-1756.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Kempf, T., Hermes, I., and Ponstingl, H. (1995a). Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast

- Rna1p involved in mRNA processing and transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1749-1753.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., and Ponstingl, H. (1995b). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *Embo J* 14, 705-715.
- Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980-984.
- Bowie, A., and O'Neill, L. A. (1997). Studies into the mechanism of NF kappa B activation by IL1, TNF and H2O2 in primary and transformed endothelial cells. *Biochem Soc Trans* 25, 125S.
- Boyland, E., and Chasseaud, L. F. (1968). Enzymes catalysing conjugations of glutathione with alpha-beta-unsaturated carbonyl compounds. *Biochem J* 109, 651-661.
- Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., and Gustin, M. C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259, 1760-1763.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27, 951-965.
- Buck, V., Quinn, J., Soto Pino, T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B. A., and Millar, J. B. (2001). Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Biol Cell* 12, 407-419.
- Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V., and Chumakov, P. M. (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304, 596-600.
- Carmel-Harel, O., and Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* 54, 439-461.
- Casso, D., and Beach, D. (1996). A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 252, 518-529.
- Chae, H. Z., and Rhee, S. G. (1994). A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *Biofactors* 4, 177-180.
- Chance, B., Schoener, B., Oshino, R., Itshak, F., and Nakase, Y. (1979). Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem* 254, 4764-4771.
- Chander, M., and Demple, B. (2004). Functional analysis of SoxR residues affecting transduction of oxidative stress signals into gene expression. *J Biol Chem* 279, 41603-41610.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105, 103-113.
- Choi, H. J., Kang, S. W., Yang, C. H., Rhee, S. G., and Ryu, S. E. (1998). Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* 5, 400-406.

- Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N., and Hoshi, T. (1997). Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 9932-9937.
- Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* *270*, 14843-14846.
- Compan, I., and Touati, D. (1993). Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* *175*, 1687-1696.
- Coon, M. J., Ding, X. X., Pernecky, S. J., and Vaz, A. D. (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb J* *6*, 669-673.
- Coutavas, E., Ren, M., Oppenheim, J. D., D'Eustachio, P., and Rush, M. G. (1993). Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature* *366*, 585-587.
- Czapski, G. (1984). Reaction of .OH. *Methods Enzymol* *105*, 209-215.
- Daelemans, D., Costes, S. V., Lockett, S., and Pavlakis, G. N. (2005). Kinetic and molecular analysis of nuclear export factor CRM1 association with its cargo in vivo. *Mol Cell Biol* *25*, 728-739.
- Danielson, U. H., Esterbauer, H., and Mannervik, B. (1987). Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *Biochem J* *247*, 707-713.
- Declercq, J. P., Evrard, C., Clippe, A., Stricht, D. V., Bernard, A., and Knoops, B. (2001). Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol* *311*, 751-759.
- Delaunay, A., Isnard, A. D., and Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* *19*, 5157-5166.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* *111*, 471-481.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* *76*, 1025-1037.
- Ding, D. Q., Tomita, Y., Yamamoto, A., Chikashige, Y., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2000). Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes Cells* *5*, 169-190.
- Ding, H., Hidalgo, E., and Dimple, B. (1996). The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J Biol Chem* *271*, 33173-33175.
- Ellis, H. R., and Poole, L. B. (1997). Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* *36*, 13349-13356.
- Farr, S. B., D'Ari, R., and Touati, D. (1986). Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 8268-8272.
- Fernandes, A. P., and Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* *6*, 63-74.

- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., and Silver, P. A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *Embo J* 17, 5606-5614.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15, 247-254.
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., and Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268, 22369-22376.
- Fridovich, I. (1998). The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci* 7, 2688-2690.
- Fuangthong, M., and Helmann, J. D. (2002). The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6690-6695.
- Fuentes, A. M., and Amabile-Cuevas, C. F. (1997). Mercury induces multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli* through activation of SoxR, a redox-sensing regulatory protein. *FEMS Microbiol Lett* 154, 385-388.
- Fujii, Y., Shimizu, T., Toda, T., Yanagida, M., and Hakoshima, T. (2000). Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat Struct Biol* 7, 889-893.
- Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. (1998). Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev* 12, 1464-1473.
- Gaits, F., and Russell, P. (1999). Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/Styl in fission yeast. *Mol Biol Cell* 10, 1395-1407.
- Garner, B., Witting, P. K., Waldeck, A. R., Christison, J. K., Raftery, M., and Stocker, R. (1998). Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J Biol Chem* 273, 6080-6087.
- Gaudu, P., and Weiss, B. (1996). SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10094-10098.
- Georgiou, G., and Masip, L. (2003). Biochemistry. An overoxidation journey with a return ticket. *Science* 300, 592-594.
- Ginn-Pease, M. E., and Whisler, R. L. (1996). Optimal NF kappa B mediated transcriptional responses in Jurkat T cells exposed to oxidative stress are dependent on intracellular glutathione and costimulatory signals. *Biochem Biophys Res Commun* 226, 695-702.
- Gonzalez-Flecha, B., Cutrin, J. C., and Boveris, A. (1993). Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 91, 456-464.
- Gonzalez-Flecha, B., and Demple, B. (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270, 13681-13687.
- Gorlich, D., and Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-1518.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31, 261-272.

- Hamamoto, T., Seto, H., and Beppu, T. (1983). Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. II. Structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* 36, 646-650.
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.
- Hassan, H. M., and Fridovich, I. (1979). Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J Biol Chem* 254, 10846-10852.
- Hausladen, A., Privalle, C. T., Keng, T., DeAngelo, J., and Stamler, J. S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 86, 719-729.
- Hayes, J. D., and Strange, R. C. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 61, 154-166.
- Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J. L., Drevet, J. R., and Roeckel-Drevet, P. (2002). Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur J Biochem* 269, 2414-2420.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80, 187-197.
- Hidalgo, E., Bollinger, J. M., Jr., Bradley, T. M., Walsh, C. T., and Demple, B. (1995). Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *J Biol Chem* 270, 20908-20914.
- Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3633-3638.
- Hofmann, B., Hecht, H. J., and Flohe, L. (2002). Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383, 347-364.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264, 13963-13966.
- Hubatsch, I., Ridderstrom, M., and Mannervik, B. (1998). Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem J* 330 (Pt 1), 175-179.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57, 395-418.
- Imlay, J. A., and Fridovich, I. (1991). Isolation and genetic analysis of a mutation that suppresses the auxotrophies of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 228, 410-416.
- Kang, J. G., Paget, M. S., Seok, Y. J., Hahn, M. Y., Bae, J. B., Hahn, J. S., Kleanthous, C., Buttner, M. J., and Roe, J. H. (1999). RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *Embo J* 18, 4292-4298.
- Kanoh, J., Watanabe, Y., Ohsugi, M., Iino, Y., and Yamamoto, M. (1996). *Schizosaccharomyces pombe* gad7+ encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes Cells* 1, 391-408.

- Kappus, H., and Sies, H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* 37, 1233-1241.
- Kato, T., Jr., Okazaki, K., Murakami, H., Stettler, S., Fantes, P. A., and Okayama, H. (1996). Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett* 378, 207-212.
- Kim, S. O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W. F., Jr., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A., and Stamler, J. S. (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* 109, 383-396.
- Kirkman, H. N., Galiano, S., and Gaetani, G. F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* 262, 660-666.
- Koo, M. S., Lee, J. H., Rah, S. Y., Yeo, W. S., Lee, J. W., Lee, K. L., Koh, Y. S., Kang, S. O., and Roe, J. H. (2003). A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. *Embo J* 22, 2614-2622.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999a). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9112-9117.
- Kudo, N., Taoka, H., Toda, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999b). A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J Biol Chem* 274, 15151-15158.
- 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. *Mol Cell Biol* 21, 6139-6150.
- Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* 16, 1710-1720.
- Kullik, I., Stevens, J., Toledano, M. B., and Storz, G. (1995). Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. *J Bacteriol* 177, 1285-1291.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G., and Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1179-1185.
- Lee, J., Dawes, I. W., and Roe, J. H. (1997). Isolation, expression, and regulation of the pgr1(+) gene encoding glutathione reductase absolutely required for the growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 272, 23042-23049.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., and et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.
- Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15036-15040.

- Loeb, J. D., Davis, L. I., and Fink, G. R. (1993). NUP2, a novel yeast nucleoporin, has functional overlap with other proteins of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* 4, 209-222.
- Lounsbury, K. M., Beddow, A. L., and Macara, I. G. (1994). A family of proteins that stabilize the Ran/TC4 GTPase in its GTP-bound conformation. *J Biol Chem* 269, 11285-11290.
- Marshall, H. E., Merchant, K., and Stamler, J. S. (2000). Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *Faseb J* 14, 1889-1900.
- Matthews, J. R., Wakasugi, N., Virelizier, J. L., Yodoi, J., and Hay, R. T. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20, 3821-3830.
- Melchior, F., and Gerace, L. (1998). Two-way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol* 8, 175-179.
- Messner, K. R., and Imlay, J. A. (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem* 277, 42563-42571.
- Millar, J. B., Buck, V., and Wilkinson, M. G. (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* 9, 2117-2130.
- Miller, A. F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol* 8, 162-168.
- Nagao, K., Taguchi, Y., Arioka, M., Kadokura, H., Takatsuki, A., Yoda, K., and Yamasaki, M. (1995). *bfr1+*, a novel gene of *Schizosaccharomyces pombe* which confers brefeldin A resistance, is structurally related to the ATP-binding cassette superfamily. *J Bacteriol* 177, 1536-1543.
- Nakagawa, C. W., Mutoh, N., and Hayashi, Y. (1995). Transcriptional regulation of catalase gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: molecular cloning of the catalase gene and northern blot analyses of the transcript. *J Biochem (Tokyo)* 118, 109-116.
- Nemergut, M. E., Lindsay, M. E., Brownawell, A. M., and Macara, I. G. (2002). Ran-binding protein 3 links Crm1 to the Ran guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 277, 17385-17388.
- Nguyen, A. N., Ikner, A. D., Shiozaki, M., Warren, S. M., and Shiozaki, K. (2002). Cytoplasmic localization of Wis1 MAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spc1/Sty1 MAPK in fission yeast. *Mol Biol Cell* 13, 2651-2663.
- Nguyen, A. N., Lee, A., Place, W., and Shiozaki, K. (2000). Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 11, 1169-1181.
- Nguyen, A. N., and Shiozaki, K. (1999). Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev* 13, 1653-1663.
- Nigg, E. A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787.
- Nishi, K., Yoshida, M., Nishimura, M., Nishikawa, M., Nishiyama, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1992). A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins. *Mol Microbiol* 6, 761-769.

- Noguchi, E., Hayashi, N., Nakashima, N., and Nishimoto, T. (1997). Yrb2p, a Nup2p-related yeast protein, has a functional overlap with Rna1p, a yeast Ran-GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol* 17, 2235-2246.
- Ohmiya, R., Kato, C., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. (1999). A fission yeast gene (*prr1(+)*) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *J Biochem (Tokyo)* 125, 1061-1066.
- Ohmiya, R., Yamada, H., Kato, C., Aiba, H., and Mizuno, T. (2000). The Prr1 response regulator is essential for transcription of *ste11+* and for sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet* 264, 441-451.
- Ouspenski, I., Elledge, S. J., and Brinkley, B. R. (1999). New yeast genes important for chromosome integrity and segregation identified by dosage effects on genome stability. *Nucleic Acids Res* 27, 3001-3008.
- Penney, M., Wilkinson, C., Wallace, M., Javerzat, J. P., Ferrell, K., Seeger, M., Dubiel, W., McKay, S., Allshire, R., and Gordon, C. (1998). The Pad1+ gene encodes a subunit of the 26 S proteasome in fission yeast. *J Biol Chem* 273, 23938-23945.
- Petosa, C., Schoehn, G., Askjaer, P., Bauer, U., Moulin, M., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Baudin, F., Mattaj, I. W., and Muller, C. W. (2004). Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell* 16, 761-775.
- Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A., and Toone, W. M. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13, 805-816.
- Rai, P., Cole, T. D., Wemmer, D. E., and Linn, S. (2001). Localization of Fe(2+) at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe(2+) and H₂O₂. *J Mol Biol* 312, 1089-1101.
- Rodriguez-Gabriel, M. A., Burns, G., McDonald, W. H., Martin, V., Yates, J. R., 3rd, Bahler, J., and Russell, P. (2003). RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *Embo J* 22, 6256-6266.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-1037.
- Rowe, J. D., Tchaikovskaya, T., Shintani, N., and Listowsky, I. (1998). Selective expression of a glutathione S-transferase subclass during spermatogenesis. *J Androl* 19, 558-567.
- Salinas, A. E., and Wong, M. G. (1999). Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem* 6, 279-309.
- Samejima, I., Mackie, S., and Fantes, P. A. (1997). Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *Embo J* 16, 6162-6170.
- Samejima, I., Mackie, S., Warbrick, E., Weisman, R., and Fantes, P. A. (1998). The fission yeast mitotic regulator *win1+* encodes an MAP kinase kinase kinase that phosphorylates and activates Wis1 MAP kinase kinase in response to high osmolarity. *Mol Biol Cell* 9, 2325-2335.
- San Jose, C., Monge, R. A., Perez-Diaz, R., Pla, J., and Nombela, C. (1996). The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls

- glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* 178, 5850-5852.
- Sanchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., Winge, I., Hidalgo, E., Bachs, O., and Aligue, R. (2002). The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *J Biol Chem* 277, 17722-17727.
- Sazer, S. (1996). The search for the primary function of the Ran GTPase continues. *Trends Cell Biol* 6, 81-85.
- Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19, 2435-2444.
- Schlenstedt, G., Wong, D. H., Koepf, D. M., and Silver, P. A. (1995). Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *Embo J* 14, 5367-5378.
- 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. *Embo J* 13, 4382-4389.
- Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H., and Rhee, S. G. (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* 275, 20346-20354.
- Sherratt, P. J., Pulford, D. J., Harrison, D. J., Green, T., and Hayes, J. D. (1997). Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochem J* 326 (Pt 3), 837-846.
- Shieh, J. C., Wilkinson, M. G., Buck, V., Morgan, B. A., Makino, K., and Millar, J. B. (1997). The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev* 11, 1008-1022.
- Shimanuki, M., Saka, Y., Yanagida, M., and Toda, T. (1995). A novel essential fission yeast gene *pad1+* positively regulates *pap1(+)*-dependent transcription and is implicated in the maintenance of chromosome structure. *J Cell Sci* 108 (Pt 2), 569-579.
- Shiozaki, K., Akhavan-Niaki, H., McGowan, C. H., and Russell, P. (1994). Protein phosphatase 2C, encoded by *ptc1+*, is important in the heat shock response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 14, 3742-3751.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1995a). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378, 739-743.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1995b). Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *Embo J* 14, 492-502.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* 10, 2276-2288.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M., and Russell, P. (1997). Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell* 8, 409-419.

- Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69, 965-968.
- Sies, H. (1993). Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res* 299, 183-191.
- Sies, H., and Menck, C. F. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res* 275, 367-375.
- Sigalov, A. B., and Stern, L. J. (1998). Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. *FEBS Lett* 433, 196-200.
- Singh, K. K. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radic Biol Med* 29, 1043-1050.
- Smith, D. A., Toone, W. M., Chen, D., Bahler, J., Jones, N., Morgan, B. A., and Quinn, J. (2002). The *Srk1* protein kinase is a target for the *Sty1* stress-activated MAPK in fission yeast. *J Biol Chem* 277, 33411-33421.
- Spataro, V., Toda, T., Craig, R., Seeger, M., Dubiel, W., Harris, A. L., and Norbury, C. (1997). Resistance to diverse drugs and ultraviolet light conferred by overexpression of a novel human 26 S proteasome subunit. *J Biol Chem* 272, 30470-30475.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041-1050.
- Stadtman, E. R., and Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218.
- Storz, G., Tartaglia, L. A., and Ames, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248, 189-194.
- Stutz, F., Neville, M., and Rosbash, M. (1995). Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell* 82, 495-506.
- Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., and Jones, N. (1995). *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *Embo J* 14, 6193-6208.
- Tan, K. L., and Board, P. G. (1996). Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem J* 315 (Pt 3), 727-732.
- Tao, K. (1999). In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 457, 90-92.
- Tao, K., Fujita, N., and Ishihama, A. (1993). Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. *Mol Microbiol* 7, 859-864.
- Taura, T., Krebber, H., and Silver, P. A. (1998). A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7427-7432.
- Taura, T., Schlenstedt, G., and Silver, P. A. (1997). Yrb2p is a nuclear protein that interacts with Prp20p, a yeast Rcc1 homologue. *J Biol Chem* 272, 31877-31884.
- Toda, T., Shimanuki, M., Saka, Y., Yamano, H., Adachi, Y., Shirakawa, M., Kyogoku, Y., and Yanagida, M. (1992). Fission yeast pap1-dependent

- transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, crm1. *Mol Cell Biol* 12, 5474-5484.
- Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M. (1991). Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* 5, 60-73.
- Toledano, M. B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P. T., Schneider, T. D., and Storz, G. (1994). Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* 78, 897-909.
- Toone, W. M., and Jones, N. (1998). Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes Cells* 3, 485-498.
- Toone, W. M., and Jones, N. (1999). AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev* 9, 55-61.
- Toone, W. M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B. A., Toda, T., and Jones, N. (1998). Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev* 12, 1453-1463.
- Turi, T. G., Mueller, U. W., Sazer, S., and Rose, J. K. (1996). Characterization of a nuclear protein conferring brefeldin A resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 271, 9166-9171.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., and Flohe, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252, 38-53.
- Veal, E. A., Findlay, V. J., Day, A. M., Bozonet, S. M., Evans, J. M., Quinn, J., and Morgan, B. A. (2004). A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol Cell* 15, 129-139.
- Veal, E. A., Ross, S. J., Malakasi, P., Peacock, E., and Morgan, B. A. (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem* 278, 30896-30904.
- Veal, E. A., Toone, W. M., Jones, N., and Morgan, B. A. (2002). Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277, 35523-35531.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Jones, N., Ayte, J., and Hidalgo, E. (2004). Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol* 52, 1427-1435.
- Wahls, W. P., and Smith, G. R. (1994). A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes Dev* 8, 1693-1702.
- Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1996). *Schizosaccharomyces pombe* pcr1+ encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol Cell Biol* 16, 704-711.
- Weis, K. (1998). Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci* 23, 185-189.

- Wemmie, J. A., Wu, A. L., Harshman, K. D., Parker, C. S., and Moye-Rowley, W. S. (1994). Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem* 269, 14690-14697.
- Wen, W., Taylor, S. S., and Meinkoth, J. L. (1995). The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J Biol Chem* 270, 2041-2046.
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., and Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev* 10, 2289-2301.
- Wolff, B., Sanglier, J. J., and Wang, Y. (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* 4, 139-147.
- Wood, M. J., Andrade, E. C., and Storz, G. (2003a). The redox domain of the Yap1p transcription factor contains two disulfide bonds. *Biochemistry* 42, 11982-11991.
- Wood, M. J., Storz, G., and Tjandra, N. (2004). Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* 430, 917-921.
- Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003b). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650-653.
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003c). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28, 32-40.
- Wu, J., Dunham, W. R., and Weiss, B. (1995a). Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270, 10323-10327.
- Wu, J., Matunis, M. J., Kraemer, D., Blobel, G., and Coutavas, E. (1995b). Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* 270, 14209-14213.
- Wu, J., and Weiss, B. (1991). Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 2864-2871.
- Yan, C., Lee, L. H., and Davis, L. I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J* 17, 7416-7429.
- Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., Hwang, S. C., Chae, H. Z., Kim, K., and Rhee, S. G. (2002). Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem* 277, 38029-38036.
- Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Pante, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U., and et al. (1995). A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* 376, 184-188.
- Yoneda, Y. (1997). How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *J Biochem (Tokyo)* 121, 811-817.
- Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci* 886, 23-36.

- Yoshida, M., Nishikawa, M., Nishi, K., Abe, K., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1990). Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells. *Exp Cell Res* 187, 150-156.
- Yoshida, M., and Sazer, S. (2004). Nucleocytoplasmic transport and nuclear envelope integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods* 33, 226-238.
- Zhao, T., Singhal, S. S., Piper, J. T., Cheng, J., Pandya, U., Clark-Wronski, J., Awasthi, S., and Awasthi, Y. C. (1999). The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 367, 216-224.
- Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-1721.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D., and Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* 181, 4639-4643.
- Zimniak, L., Awasthi, S., Srivastava, S. K., and Zimniak, P. (1997). Increased resistance to oxidative stress in transfected cultured cells overexpressing glutathione S-transferase mGSTA4-4. *Toxicol Appl Pharmacol* 143, 221-229.