

Reevaluación de los residuos cisteína en el señalamiento redox

Martin Aran, Santiago Mora Garcia, Laura Rimmaudo y Ricardo A. Wolosiuk

Instituto Leloir, Depto. Química Biológica-FCEN-UBA, IIBBA-CONICET, Patricias Argentinas
435, C1405 Buenos Aires, Argentina
e-mail: rwolosiuk@leloir.org.ar

Recibido el 02/10/2009. Aceptado el 14/12/2009.

Abreviaturas

PDOR: protein-disulfuro óxido-reductasa; Trx: tioredoxina; Prx: peroxirredoxina;

Resumen

La formación, escisión e isomerización de los puentes disulfuro juega un rol importante en la estructura y la función de las proteínas. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno pueden aumentar el estado de oxidación del átomo de azufre en las cisteínas generando los oxiácidos sulfénico ($-R-SOH$), sulfínico ($-R-SO_2H$) y sulfónico ($-R-SO_3H$). Las peroxirredoxinas, ubicua familia de peroxidasas desprovistas del grupo prostético hemo, utilizan esta modificación post-traducciona de las cisteínas para catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno o iniciar la respuesta al estrés oxidativo [$Prx-Cys-SH + H_2O_2 \rightarrow Prx-Cys-SOH + H_2O$]. La restitución del grupo tiol a las peroxirredoxinas procede en dos etapas adicionales (resolución, reducción) que requieren la participación de sistemas complejos para la transferir el poder reductor del NADPH. Además, una nueva proteína, la sulfirredoxina, cataliza la reducción del grupo sulfínico a sulfénico en un proceso dependiente de ATP. En este contexto, la modificación de las interacciones no-covalentes y la transformación de las uniones covalentes, e.g. fosforilación, acetilación, asisten a las peroxirredoxinas en la regulación de los procesos biológicos. Sobre estas bases, las actividades de las peroxirredoxinas están reguladas no sólo por los múltiples estados de oxidación del átomo de azufre sino también por la integración de la química no-redox. Esta característica dota a las peroxirredoxinas de mecanismos versátiles para percibir los múltiples cambios celulares y generar diferentes especies moleculares como respuesta adecuada a los estímulos ambientales.

Palabras clave: especies reactivas de oxígeno / estrés oxidativo / sulfénico / sulfínico / sulfónico / intercambio tiol-disulfuro / glutationilación de proteínas / peroxirredoxina / fosforilación / acetilación /

Summary

The formation, cleavage and isomerization of disulfide bonds play an important role in protein structure and function. However, reactive oxygen species may increase the oxidation state of the sulfur atom in cysteines yielding the oxyacids sulfenic ($-R-SOH$), sulfinic ($-R-SO_2H$) and sulfonic ($-R-SO_3H$). Peroxiredoxins, the ubiquitous family of peroxidases devoid of the heme prosthetic group, utilize this post-translational modification of cysteines for catalyzing the reduction of hydrogen peroxide or triggering the response to the oxidative stress [$Prx-Cys-SH + H_2O_2 \rightarrow Prx-Cys-SOH + H_2O$]. The restitution of the thiol group to peroxiredoxins proceeds in two steps (resolution, reduction) that require the participation of complex systems for transferring the NADPH reductant power. Moreover, a novel protein, sulfiredoxin, catalyzes the ATP-mediated reduction of the sulfinic group to sulfenic. In this context, the modification of non-covalent interactions and the transformation of covalent bonds, e.g. phosphorylation, acetylation, assist peroxiredoxins in the regulation of biological process. On this basis, the activities of peroxiredoxins are regulated through not only the oxidation states of the sulfur atom but also the non-redox chemistry. This feature endows peroxiredoxins with versatile mechanisms to perceive multiple cellular changes and generate different molecular species as adequate response to environmental stimuli.

Keywords: reactive oxygen species / oxidative stress / sulfenic / sulfinic / sulfonic / thiol-disulfide exchange / protein glutathionylation / peroxiredoxin / phosphorylation / acetylation /

Las células utilizan las reacciones de óxido-reducción (redox) para promover y modular el crecimiento de los organismos. Procesos biológicos tan diferentes como la inflamación y la fotosíntesis requieren inevitablemente la transferencia de electrones o de hidrógenos ($[H] \equiv H^+ + e^-$) para mantener las proporciones adecuadas de las formas [oxidada]/[reducida] de una especie química. Esta característica sugiere que las reacciones redox sirven para detoxificar eficientemente las especies reactivas o cumplir un rol en la regulación de los caminos metabólicos. La consecuencia inmediata de estas posibilidades es que la disfunción de los procesos redox estará asociada con determinadas patologías.

La señalización redox exhibe diferencias notables con los mecanismos que utilizan la química no-redox en la regulación celular. Un estímulo provoca solamente una respuesta “on/off” cuando los aminoácidos de las proteínas exhiben una única modificación post-traducciona (e.g. fosforilación, acetilación). En consecuencia, la respuesta paulatina a los estímulos requiere la utilización de varios sitios regulatorios en una proteína y/o la activación simultánea de varios pasos metabólicos. De manera que la respuesta gradual y continua en un camino de señalización basado en mecanismos “on/off” depende de un complejo sistema de proteínas y/o residuos *y no de un residuo proteico en particular*.

La presencia de una atmósfera rica en O_2 y el uso de esta molécula como oxidante final de las cadenas respiratorias por una parte significativa de la biósfera implica un flujo continuo de electrones hacia el O_2 para formar H_2O mediante oxidasas específicas. Este proceso está inevitablemente acompañado por la formación de especies derivadas de la reducción monoelectrónica, conocidas colectivamente como especies reactivas de oxígeno (ROS: reactive oxygen species). Si bien las ROS afectan de forma general sitios reactivos en los hidratos de carbono, los lípidos y los ácidos nucleicos, durante la última década numerosos estudios revelaron que las ROS también modulan el estado de oxidación del azufre en residuos cisteína específicos de las proteínas. La notable capacidad del azufre para adoptar múltiples estados de oxidación genera no sólo los oxiácidos sulfénico ($RSOH$), sulfínico (RSO_2H), y sulfónico (RSO_3H) sino también otras especies oxidadas [e.g. tiosulfatos (disulfuro-S-monóxidos, $RS(O)SR'$)], revelando que la función de los tioles en las cisteínas no está circunscripta exclusivamente a la formación y ruptura de puentes disulfuro. La flexibilidad de un único residuo cisteína para adoptar diferentes modificaciones post-traduccionales sugiere que varias de estas especies pueden participar en el señalamiento redox intracelular (1). Sobre estas bases, el reconocimiento del estímulo y su transducción no residen en un sistema complejo ni en múltiples modificaciones de una proteína sino *en un único residuo de aminoácido*.

El objetivo de esta revisión es describir los mecanismos redox que captan estímulos ambientales para generar las señales que llevan a la resistencia o la tolerancia celular al estrés impuesto. La primera sección resume las diferentes ROS que son generadas intracelularmente y que inician la transducción de la señal. La segunda sección contiene un panorama de los cambios en los estados de oxidación del átomo de azufre de las cisteínas que provocan

cambios en las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas. Evidentemente, las proteínas poseen otros residuos, tales como metionina e histidina, susceptibles a la modificación mediante química redox (2,3), pero en esta revisión destacaremos la importancia de los residuos cisteína por su extrema sensibilidad a los procesos redox y su vinculación a ciertas patologías. La tercera sección describe brevemente los sistemas enzimáticos que protegen a las células de los efectos letales causados por la formación excesiva de ROS. En este contexto, el énfasis fue puesto sobre las características bioquímicas de una familia de proteínas antioxidantes, las peroxirredoxinas (Prx), porque los estudios de la última década revelaron su importancia no sólo en la defensa antioxidante sino también en la señalización redox.

Especies reactivas de oxígeno

Hace 3.5×10^9 años, las cianobacterias comenzaron a utilizar la energía solar para incorporar el carbono inorgánico ambiental [CO_2 , HCO_3^-] a las cadenas alifáticas de los azúcares [$-\text{CH}_2-\text{HCOH}-$] empleando el H_2O como reductor [$\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}^+ + \text{O}_2 + 4 \text{e}^-$]. Este evento llevó a la acumulación de O_2 en la atmósfera (actualmente ca. 21%) y a la aparición de los sistemas respiratorios que dependen del O_2 . Sin embargo, la molécula de O_2 es moderadamente reactiva por la presencia de dos electrones desapareados en el orbital exterior (Figura 1A).

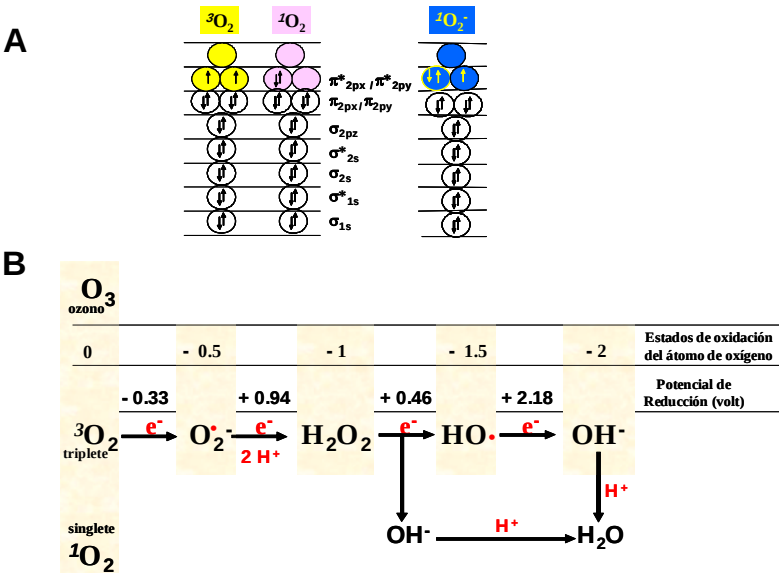


Figura 1. (A) Orbitales moleculares del O_2 . (B) Reducción monoelectrónica del oxígeno. Estados de oxidación y potenciales redox.

La reducción parcial del O_2 atmosférico [oxígeno triplete (3O_2)] produce dos categorías de ROS: los radicales, átomos o grupo de átomos que tienen uno o más electrones desapareados [anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($HO\cdot$)], y las especies neutras [ozono (O_3), oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno ($HO-OH$), hidroperóxidos orgánicos ($RO-OH$)]. Un amplio rango de macromoléculas (DNA, lípidos, proteínas) es modificado cuando la síntesis de las ROS no es controlada apropiadamente. El radical hidroxilo tiene una existencia extremadamente corta mientras que los hidroperóxidos son relativamente estables (4). Esta característica indica que el primero reaccionaría con las dianas en el sitio donde es generado mientras que los segundos podrían difundir para actuar sobre otros compartimentos o células.

Generación de especies reactivas de oxígeno

Las células de los diferentes organismos que pueblan la biosfera reciben numerosos estímulos provocados por su interacción con los seres vivos (estrés biótico) o los eventos físico-químicos (estrés abiótico). Una de las respuestas más extendidas ante estos factores exógenos es un aumento de los niveles intracelulares de ROS. Por ello, las células han desarrollado una serie de mecanismos enzimáticos complejos que generan y consumen las ROS para mantener sus concentraciones intracelulares bajo control.

Es ampliamente conocido que la respiración aeróbica en las membranas mitocondriales reduce parcialmente el O_2 generando el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$. Cerca del 2% del O_2 consumido en la respiración mitocondrial es destinado a la producción del $O_2^{\cdot-}$ (5). Por otra parte, la exposición de un sinnúmero de células y tejidos a una variedad de agentes físicos, químicos y biológicos produce $O_2^{\cdot-}$ en una reacción catalizada por la NADPH oxidasa asociada a la membrana plasmática [$NADPH + 2 O_2 \rightarrow NADP^+ + 2 O_2^{\cdot-} + H^+$] (Figura 2).

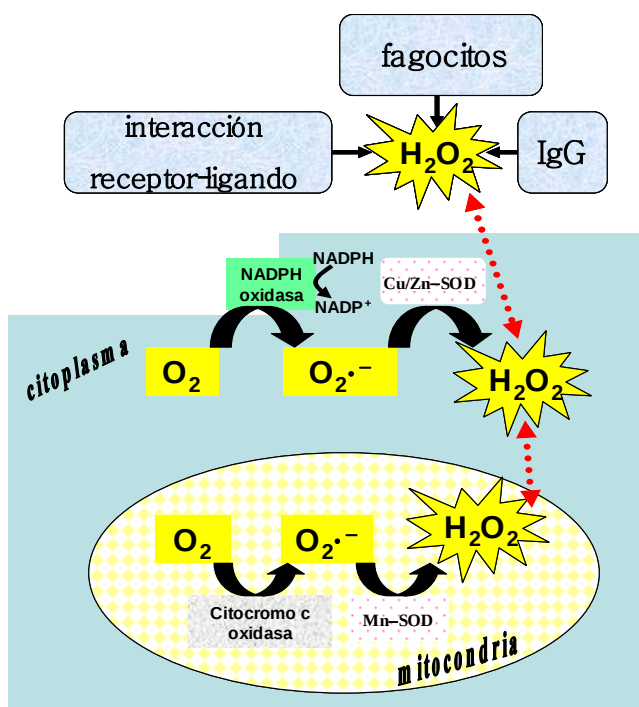
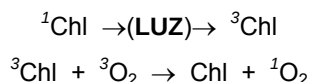


Figura 2. Formación intracelular y extracelular de H₂O₂ en el sistema inmune de mamíferos.

Por otro lado, numerosos efectos citotóxicos tienen su origen en la extrema capacidad oxidante del H₂O₂ [$\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$; $E_o = + 1.76 \text{ volt}$]. La síntesis del H₂O₂ aumenta como réplica a numerosos estreses regulando procesos biológicos tan diversos como la respuesta inmune en los mamíferos y el cierre de los estomas en las plantas. Es evidente que la utilización de un compuesto citotóxico como molécula señal implica (i) un ajustado control de su síntesis y degradación y (ii) su adecuada localización y nivel celular. Las enzimas antioxidantes actúan como sensores de los niveles de peróxidos intracelulares y, en consecuencia, modulan una pléyade de procesos biológicos que responden al H₂O₂.

Numerosas evidencias indican que la ruptura del anión superóxido [$2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$], espontánea o mediada por la superóxido dismutasa, implica una mayor producción de H₂O₂. Varios factores de crecimiento y citoquinas (PDGF, EGF, insulina, angiotensina II, TNF α) estimulan la activación de las NADPH oxidasas causando un aumento en el nivel celular de H₂O₂. Sin embargo, la generación celular de H₂O₂ no procede exclusivamente por esta vía metabólica porque los niveles de H₂O₂ también aumentan mediante mecanismos independientes de la NADPH oxidasa. Por ejemplo, la producción de extracelular de H₂O₂ aumenta cuando ligandos específicos interaccionan con los receptores de hematopoyetina pero disminuye cuando uno de los receptores ha sido mutado (6). Este H₂O₂ difunde a través de la membrana plasmática para participar en la modulación del señalamiento redox (Figura 2). En conjunto estos estudios revelan que la producción de H₂O₂ tiene lugar por mecanismos que implican a la cadena respiratoria, la NADPH oxidasa y las interacciones receptor-ligando.

En un contexto biológico totalmente diferente, los cloroplastos en las hojas de las plantas superiores poseen caminos metabólicos particulares para la producción de ROS. Bajo iluminación, el oxígeno singlete ¹O₂ es producido por la clorofila triplete en los centros de reacción del fotosistema II y en el sistema antena (7).



Utilizando el ¹O₂, la cadena fotosintética de transporte de electrones tiene la capacidad para generar el O₂^{·-} y el H₂O₂. Sin embargo, las células foliares poseen además una vía metabólica particular, denominada fotorrespiración, para producir cantidades apreciables de H₂O₂ (Figura 3). En los cloroplastos, la actividad oxigenasa de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) genera 2-fosfoglicolato que es transformado a glicolato. Este último compuesto fluye de los cloroplastos hacia los peroxisomas, donde es oxidado por la flavoenzima glicolato oxidasa con la producción simultánea de H₂O₂.

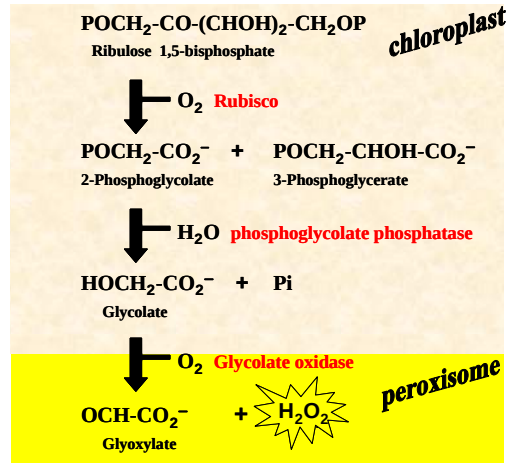


Figura 3. Procesos iniciales de la fotorrespiración en las hojas de las plantas superiores.

Las células animales y vegetales generan H_2O_2 como parte de los mecanismos de tolerancia y defensa frente al desafío provocado por agentes físicos o patógenos. Los últimos a su vez replican utilizando el H_2O_2 para incrementar los niveles de los factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en la detoxificación. Los estudios de señalamiento redox han alcanzado un notable desarrollo, impulsados por la idea de que los procesos oxidativos pueden ser utilizados para regular múltiples respuestas. En este aspecto, el H_2O_2 , ampliamente conocido por sus acciones citotóxicas, ahora constituye un modulador importante en la transducción de señales en los diferentes compartimentos de los eucariotes.

Modificación de las cisteínas en las cadenas polipeptídicas

Las alteraciones causadas por las ROS sobre el DNA, los lípidos y las proteínas son frecuentes en los organismos aeróbicos, tanto procarióticos como eucarióticos, siendo responsables de las patologías relacionadas al envejecimiento de los animales y a la senescencia de las plantas. Aunque una vasta literatura describe las transformaciones mediadas por las ROS en las moléculas de DNA y los lípidos en los sistemas biológicos, la revisión actual está circunscripta a los efectos ocasionados por las transformaciones redox sobre los aminoácidos de las proteínas. Estas modificaciones post-traduccionales constituyen actualmente los mecanismos más importantes para vincular las ROS con los caminos de transducción de señales porque diferentes estados de oxidación de residuos específicos determinan las funciones de las proteínas y sus uniones a los ligandos. Las proteínas implicadas en la señalización deben cumplir dos requisitos para provocar una respuesta eficiente: los residuos regulatorios deben residir en posiciones específicas y las transformaciones del estado de oxidación deben ser rápidas y reversibles.

Mientras las modificaciones post-traduccionales clásicas (e.g. fosforilación, acetilación) provocan un único cambio en el residuo afectado, los diferentes estados de oxidación del átomo de azufre en los residuos cisteína y metionina permiten generar varias formas de una proteína. Esta multiplicidad de especies sobre un mismo residuo permite sugerir la existencia de puntos de ramificación cuya efectividad en la respuesta a los estímulos dependerá de las características termodinámicas y cinéticas. La regulación termodinámica asume que todos los pares tiol-disulfuro celulares están en equilibrio de manera que la proporción $[-\text{Cys-SH}_{(\text{oxidado})}]/[-\text{Cys-SH}_{(\text{reducido})}]$ en una proteína estará determinada por el potencial redox celular (Figura 4, vía a). Cuando el buffer redox celular altera su proporción [oxidado]/[reducido], varía el contenido de puentes disulfuro en las proteínas reguladoras y éstas inician la transmisión de la señal que provoca la respuesta celular. En esta función, dos características celulares son importantes para el establecimiento del buffer redox celular. Por un lado la composición, ya que el par glutatión oxidado/glutatión reducido (GSH, γ -glutamyl-cysteinyl-glycine $[2 \text{ GSH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{GSSG}; E_0 = -240 \text{ mV}]$) y el par dehidroascorbato/ascorbato constituyen los principales buffer redox en las células animales y vegetales, respectivamente. Por otro lado la localización intracelular y el estado de desarrollo, por cuanto el potencial redox del par GSH/GSSG es -150 mV y -300 mV en el retículo endoplásmico y las mitocondrias, respectivamente mientras que en el citoplasma de células proliferativas y apoptóticas es de -260 mV y -170 mV , respectivamente.

Sin embargo, el intercambio tiol-disulfuro entre estas moléculas es lento y aparentemente las células no mantienen un rápido equilibrio termodinámico. Por esta razón, enzimas específicas [e.g. tioredoxina (Trx), glutaredoxina, protein-disulfuro isomerasa] catalizan el intercambio tiol-disulfuro para mantener la homeostasis celular cuando un estímulo altera al buffer redox.

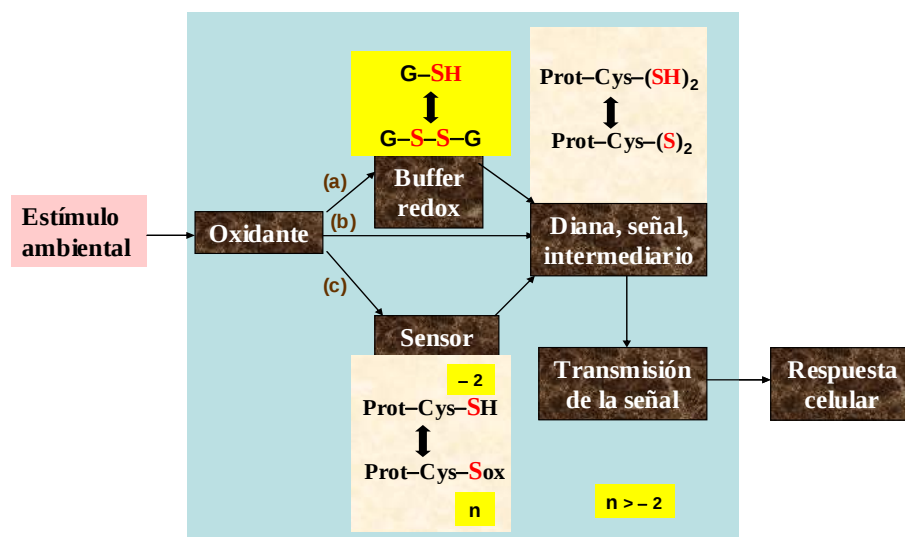


Figura 4. Mecanismos para el señalamiento redox.

Por otra parte, las propiedades cinéticas de las dianas pueden facilitar respuestas específicas a las ROS. La oxidación transitoria de estas dianas las capacita para desencadenar una respuesta y luego retornar al estado basal mediante la reducción enzimática (Figura 4, vía b). De esta forma actúa un grupo de proteínas denominadas sensores, cuyos tioles son extremadamente sensibles a los oxidantes. Producida la oxidación, el sensor afecta la funcionalidad de otras dianas mediante interacciones no-covalentes proteína-proteína o la transformación covalente de las dianas mediante el intercambio tiol-disulfuro (Figura 4, vía c).

Intercambio tiol-disulfuro

A pesar de las nuevas evidencias sobre las múltiples variaciones en una única cisteína, el intercambio tiol-disulfuro $[R_1-SH + R_2-S-S-R_3 \rightleftharpoons R_1-S-S-R_2 + R_3-SH]$ es aún el mecanismo más estudiado. La formación de los puentes disulfuro no sólo estabiliza las proteínas extracelulares, protege contra la inactivación, determina la asociación con otras proteínas sino también regula las funciones de las proteínas. Un variado grupo de enzimas denominadas colectivamente protein-disulfuro óxido-reductasas (PDOR) cataliza el intercambio tiol-disulfuro. La disponibilidad de las secuencias genómicas completas y los estudios de proteómica han revelado dos rasgos relevantes en esta ubicua familia de proteínas. Primero, la presencia del motivo -CXXC- en su centro activo, cuyas cisteínas participan en un proceso redox cíclico que forma un puente disulfuro intracatenario con diferentes tendencias catalíticas: las Trx y las glutarredoxinas derivan hidrógenos ($2 H^+ + 2 e^-$) hacia la ruptura de los puentes disulfuro (*E. coli* Trx, $E_o = -270$ mV; *E. coli* Grx, $E_o = -233$ mV) mientras que las DsbA bacterianas y protein-disulfuro isomerasas eucarióticas remueven hidrógenos de los tioles de las proteínas dianas (*E. coli* DsbA, $E_o = -106$ mV). Segundo, todos los miembros de esta superfamilia comparten una estructura terciaria común compuesta de cuatro cintas- β rodeadas de tres α -hélices. Esta unidad básica, denominada plegamiento Trx, es extremadamente versátil porque numerosas proteínas contienen dicho módulo unido a otros dominios. Un panorama más detallado del conocimiento en este campo se encuentra en varias revisiones recientes (8,9).

Por otra parte, algunas enzimas presentes en organismos multicelulares catalizan la inserción de puentes disulfuro en las proteínas utilizando O_2 y liberando H_2O_2 $[Prt-(SH)_2 + O_2 \rightarrow Prt-(S)_2 + H_2O_2]$ (10). Es destacable que esta reacción particular no es totalmente independiente de las PDOR, por cuanto el sitio catalítico de esta la familia de enzimas (i.e. Quiescin-sulfhidril oxidasa) está constituido por un dominio Trx y un dominio FAD.

Glutacionilación de proteínas: Es evidente que el par redox GSSG/GSH tiene un rol importante en los procesos de señalización mediante la modificación de las cisteínas via el intercambio tiol-disulfuro. Utilizando este mecanismo, una gran cantidad de proteínas tienen la capacidad de unir reversiblemente el glutatión al tiol de un residuo cisteína mediante la formación de un heterodisulfuro $[Prot-(S)_2 + G-SH \rightarrow HS-Prot-S-S-G]$ (11,12). Esta modificación post-traducciona, denominada S-glutacionilación, causa un cambio funcional

específico en la diana que es importante para la modulación de los intermediarios implicados en los procesos de señalización. Alternativamente, la S-glutathionilación de las proteínas puede servir para prevenir la oxidación de (i) las proteínas a S-oxiácidos (ver abajo), y/o (ii) el GSH a GSSG.

Hay un amplio consenso en que las ROS y la regulación redox cumplen papeles cruciales en procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. En este contexto, la glutathionilación de las proteínas ha sido asociada a la respuesta inflamatoria en enfermedades vinculadas con la inflamación crónica como infecciones virales, diabetes, arterioesclerosis y cáncer. Los mecanismos implicados no han sido meticulosamente caracterizados pero la glutathionilación afecta la actividad de numerosas proteínas que funcionan como factores de transcripción, moléculas de adhesión, enzimas y citoquinas (12). El mecanismo catalítico implicado en la formación de HS-Prot-S-S-G en las células es aún desconocido mientras que la escisión de este heterodisulfuro es catalizada eficientemente por una PDOR particular que ha sido caracterizada en la mayoría de los procariotes y eucariotes, i.e. la glutarredoxina (13).

Formación de oxiácidos en los residuos cisteína de las proteínas

Los estudios recientes muestran claramente que la formación y ruptura de la unión disulfuro no basta para explicar los múltiples efectos de las proteínas dotadas de azufres reactivos. El átomo de azufre tiene una configuración electrónica ($3s^2 3p^4$) que le permite adoptar estados de oxidación entre +6 y -2. En las proteínas, los tioles de las cisteínas constituyen el estado más reducido (estado de oxidación: -2) pero la capacidad del azufre para asumir múltiples estados de oxidación y formar uniones con el oxígeno, el nitrógeno, los halógenos y el selenio origina un rango de modificaciones post-traduccionales que están estrechamente vinculadas a la señalización redox. El presente análisis está restringido a los oxiácidos porque los nuevos experimentos muestran que los grupos sulfénico [R-SOH], sulfínico [R-SO₂H] y sulfónico [R-SO₃H] juegan un rol significativo en la remoción del H₂O₂ y en la señalización redox (Figura 5).

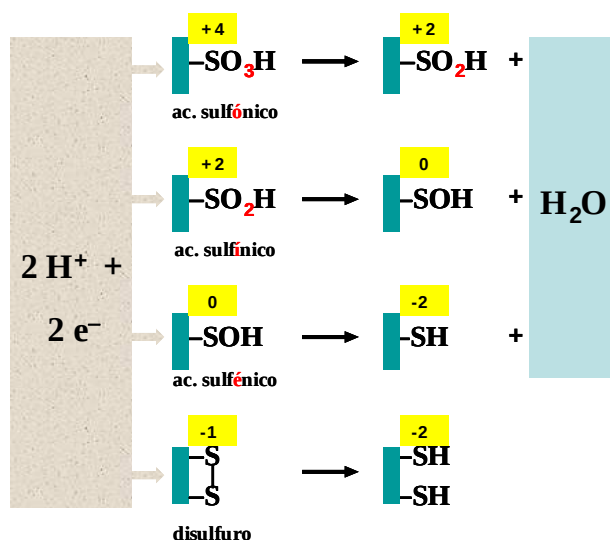


Figura 5. Reducción bielectrónica del átomo de azufre de las cisteínas.

Estas especies sobreoxidadas, cuyas cargas negativas imponen nuevos requerimientos estéricos, pueden ser dañinas cuando afectan las proteínas al azar. Sin embargo, la formación de oxiácidos puede favorecer el plegamiento (estructura terciaria), la oligomerización (estructura cuaternaria) y los procesos redox (función) cuando son manejadas adecuadamente por procesos enzimáticos que implican cisteínas específicas.

La modificación de los grupos tiol en las proteínas con oxidantes tales como H_2O_2 o peroxinitrito (ONO-O^-) produce ácido sulfénico, el más simple oxiácido de azufre orgánico. El microambiente que circunda las cisteínas controla la reactividad de los tioles y la estabilidad de las modificaciones determinando la dirección de las reacciones posteriores. El ácido sulfénico puede condensar con otro tiol proteico o con GSH formando un puente disulfuro cuya escisión retrotrae la proteína a su estado totalmente reducido. Por ejemplo, el factor de transcripción sensor de estrés oxidativo OxyR de *E.coli* y otras bacterias contiene una cisteína altamente reactiva que forma no sólo un disulfuro intramolecular sino también ácido sulfénico en respuesta al estrés oxidativo (14). Este sensor procariótico modula la homeostasis redox activando la expresión de dos enzimas que remueven el H_2O_2 ; i.e. la catalasa y la alquilhidroperóxido reductasa (AhpCF)(15). Sin embargo, a menudo el R-SOH es vulnerable a sobreoxidaciones que conducen a las formas más estables R-SO₂H y R-SO₃H. Esta capacidad dual del -Cys-SOH para proceder en direcciones opuestas sugiere que la formación reversible constituye un mecanismo adecuado por el cual los oxidantes celulares como H_2O_2 pueden modular la catálisis enzimática, la homeostasis redox y los eventos de señalización. Consistente con este concepto, las evidencias acumuladas implican al ácido sulfénico no sólo en una amplia variedad de procesos celulares sino también en numerosas patologías (16).

Una combinación de estudios estructurales y enzimáticos con la protein-tirosina fosfatasa revelaron que el grupo sulfénico también puede reaccionar con el nitrógeno de la unión peptídica generando la sulfenil-amide (sulfenamide) (Figura 6) (17,18).

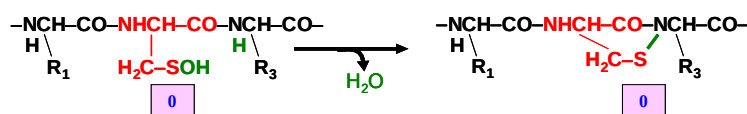


Figura 6. Formación del grupo sulfenamida intramolecular en la protein-tirosina fosfatasa.

La presencia de esta estructura cíclica en la cadena polipeptídica imparte un profundo cambio en el sitio activo de la protein-tirosina fosfatasa regulando en consecuencia la interacción con otros dominios proteicos (19,20). La recuperación de la protein-tirosina fosfatasa reducida por la acción del GSH sugiere que la formación de la sulfenamida constituye un proceso acoplado a la señalización redox. [Nota: la transformación de sulfénico a sulfenamida no implica un cambio en el estado de oxidación del átomo de azufre]. Como la glutationilación, esta modificación proteica inusual (i) contribuye a la regulación de la actividad enzimática y (ii)

protege las cisteínas previniendo la formación de ácido sulfinico y sulfónico. Congruente con la ubicuidad de este mecanismo, la proteína OhrR de *Bacillus subtilis*, un regulador transcripcional sensible a peróxidos, contiene un grupo sulfenamida estable en solución y, posiblemente, *in vivo* (14). En conjunto, estos nuevos estudios revelan que el grupo sulfénico es una modificación post-traducciona con capacidades regulatorias equivalentes a las del clásico intercambio tiol-disulfuro.

Regulación de la respuesta a ROS via las Enzimas Antioxidantes

La utilización de componentes citotóxicos como moléculas para la señalización impone que la formación, la localización y la actividad las ROS deben ser reguladas ajustadamente. Contrarrestando el desafío oxidativo, la reacción espontánea con una batería de moléculas antioxidantes (e.g. GSH, vitamina E, ascorbato, carotenoides, flavonoides) y un sistema enzimático transforman las ROS en componentes biológicos menos agresivos. En este aspecto, cuatro enzimas son muy eficientes en la transformación de las dos ROS particulares, i.e. $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 . La superóxido dismutasa ($2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) previene la interacción destructiva del anión superóxido con los lípidos y las proteínas de membranas. Por otro lado, la transformación de H_2O_2 implica la participación de tres familias de peroxidasas: catalasa, glutathion-peroxidasas y Prxs. La catalasa es una hemoproteína, generalmente localizada en los peroxisomas, con actividad de H_2O_2 -dismutasa ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$) que eliminaría el H_2O_2 o prevendría su liberación hacia el exterior. Alternativamente, las restantes peroxidasas catalizan la reducción del H_2O_2 utilizando el poder reductor de un dador de electrones ($ROOH + 2 AH \rightarrow ROH + H_2O + 2 A$). En los mamíferos, es posible distinguir varias isoformas de las glutathion peroxidasas [$H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$] por la distribución intracelular, pero una de ellas, generalmente citosólica y Se-dependiente, reduce el H_2O_2 utilizando los electrones cedidos por el NADPH, via la glutathion reductasa [$NADPH + H^+ + GSSG \rightarrow 2 GSH + NADP^+$]. En cambio, el H_2O_2 producido en las hojas de las plantas superiores es removido por el sistema de la ascorbato peroxidasa [$H_2O_2 + L\text{-ascorbato} \rightarrow \text{dehidroascorbato} + 2 H_2O$] (21). Finalmente, las Prxs exhiben la capacidad peroxidasa para transformar $HO\text{--}OH$, $ONO\text{--}OH$ (peroxinitrito) y $RO\text{--}OH$ (alquilhidroperóxidos). Esta gran familia de proteínas ha recibido considerable atención en la última década no sólo por controlar el tenor celular de H_2O_2 sino también por participar activamente en el señalamiento redox (22).

Peroxirredoxinas

Las Prxs constituyen una gran familia de peroxidasas en la superfamilia de proteínas que exhiben plegamiento de tipo Trx. La dificultad para definir el rol que estas proteínas ubicuas juegan en la respuesta al estrés oxidativo es la complejidad de isoformas. La gran diversidad en la estructura primaria, las características de la estructura cuaternaria y el ciclo

catalítico para la reducción del hidropéroxido permitió agrupar esta familia de proteínas en diversas subfamilias que se localizan en diferentes compartimentos celulares (Tabla 1).

Subfamilia	Plantas superiores (Arabidopsis thaliana)					Mamíferos (humano)		
	Denominación usual		MATDB	precursor (residuos)	Ubicación	Denominación		Ubicación
A	2-Cys Prx típica	A	At3g11630	266	cloroplasto	Prx	1	citoplasma
		B	At5g06290	271	cloroplasto		2	citoplasma
							3	mitocondria
							4	secreción
B	1-Cys Prx		At1g48130	216	núcleo	Prx 6		citoplasma
C	Prx Q		At3g26060	216	cloroplasto	NO posee		
D	2-Cys Prx atípica (Type II)	A	At1g65990	553	pseudogen ?	Prx 5		citoplasma, núcleo
		B	At1g65980	162	citoplasma			
		C	At1g65970	162	citoplasma			
		D	At1g60740	162	citoplasma			
		E	At3g52960	234	peroxisoma			
		F	At3a06050	199	mitocondria			

Tabla 1. Subfamilias de las Prxs en las plantas superiores y en los mamíferos (23).

No todos los organismos vivos contienen todas las subfamilias ni el mismo número de isoformas. Por ejemplo, *Escherichia coli* (una gamma proteobacteria) contiene tres Prxs (24), *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) cinco (25), *Homo sapiens* (mamífero) seis (26,27) y *Arabidopsis thaliana* (planta) diez (28).

Contrastando con los mayores sistemas de detoxificación de H_2O_2 , que usan grupos prostéticos unidos covalentemente al sitio activo, las Prxs emplean el átomo de azufre de una cisteína conservada evolutivamente, denominada cisteína peroxidática Cys_P , para la ruptura de la unión peroxilo $-O-O-$ con formación de un grupo sulfénico $[-Cys_P-SH + H_2O_2 \rightarrow -Cys_P-SOH + H_2O]$. La presencia o ausencia de una segunda Cys, denominada cisteína resolutive Cys_R $[-Cys_P-SOH + HS-Cys_R \rightarrow -Cys_P-S-S-Cys_R + H_2O]$, permite agrupar a las Prxs en dos subfamilias: las 2-Cys Prx que conservan la Cys activa en la función catalítica y las 1-Cys Prx que carecen de ella, requiriendo inevitablemente un tiol externo para proseguir el ciclo catalítico. A su vez, la ubicación del segundo tiol en la estructura primaria del polipéptido y la capacidad para formar puentes disulfuro intercatenarios e intracatenarios permite dividir a las 2-Cys Prx en “típicas” y “atípicas”, respectivamente (29,30).

2-Cys Prx típicas

La subfamilia de las 2-Cys Prx típicas muestra una importante conservación de la estructura primaria en bacterias y eucariotas. Por ejemplo, la estructura primaria de la 2-Cys Prx de los cloroplastos de colza es 52% idéntica al ortólogo de mitocondrias de ratón. Dada la amplitud de funciones relacionadas a esta subfamilia, en esta revisión enfatizaremos los aspectos bioquímicos relevantes resaltando (i) la utilización de los estados de oxidación del

azufre en las cisteínas para modificaciones post-traduccionales y (ii) las interacciones no-covalentes que inician respuestas apropiadas al estrés oxidativo.

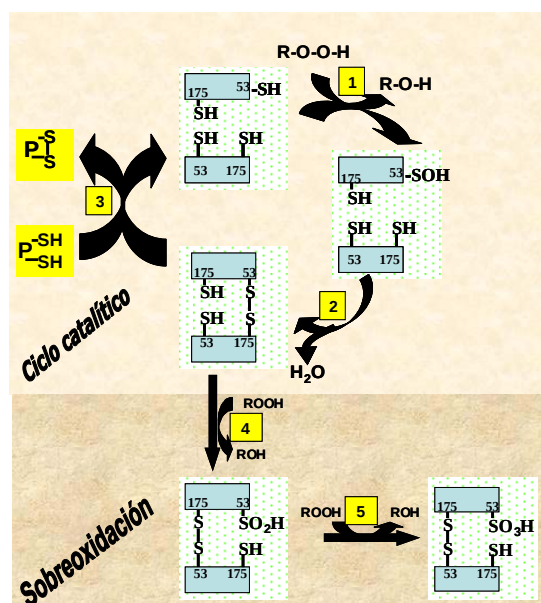


Figura 7. 2-Cys Prx. Rol de las cisteínas conservadas evolutivamente en el ciclo catalítico y en la sobreoxidación.

Actividad peroxidasa: La actividad peroxidasa en la familia de las Prx comienza en la Cys_P ubicada en la región N-terminal de la cadena polipeptídica. Numerosos aminoácidos conservados alrededor de la Cys_P disminuyen el pKa del grupo tiol [$\text{Cys}_P\text{-SH} \rightarrow \text{Cys}_P\text{-S}^- + \text{H}^+$] y, en consecuencia, estabilizan el anión tiolato para el ataque nucleofílico sobre el oxígeno terminal de la unión peróxido (RO-OH). Este proceso genera el ácido sulfénico (R-SOH) en la Cys_P con la simultánea reducción del peróxido (Figura 7, reacción [1]). La comparación de numerosos sitios proclives a la formación de Cys-SOH en las proteínas reveló recientemente como varios factores (residuos polares, uniones hidrógeno) afectan la reactividad de los residuos cisteína (31). Luego de la formación del sulfenato en el sitio activo de las 2-Cys Prx, la reducción de la cisteína a la forma tiol ocurre en dos etapas (32). Primero, el sulfenato reacciona con el tiol localizado en la Cys_R de la subunidad complementaria formando un puente disulfuro intercatenario y liberando simultáneamente agua (Figura 7, reacción [2]). Segundo, un sistema reductor complementario cierra el ciclo catalítico mediante un intercambio tiol-disulfuro con el par de cisteínas específicas de las PDOR (Figura 7, reacción [3]). Uno de los rasgos bioquímicos interesantes del ciclo peroxidático es que al menos tres transformaciones redox diferentes tienen lugar en el sitio activo. Esencialmente, los tioles localizados en (1) la Cys_P, (2) la Cys_R, y (3) el motivo -CXXC- de la PDOR son los reductores para la formación sucesiva de ácido sulfénico en la Cys_P, el disulfuro intercatenario y el tiol en la Cys_P, respectivamente.

Además, la primera y la última etapa implican la transferencia de hidrógenos ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) mientras que la segunda, una deshidratación, constituye la reducción y la oxidación de la Cys_P y la Cys_R , respectivamente. En consecuencia, el átomo de azufre de la Cys_P pasa por tres diferentes estados de oxidación durante el ciclo peroxidático: tiol (-2) $\rightarrow$ ácido sulfénico (0) $\rightarrow$ disulfuro (-1) $\rightarrow$ tiol (-2).

Oxidación de la Cys_P : la oxidación de la Cys_P en la 2-Cys Prx con oxidantes tales como el H_2O_2 y el peroxinitrito genera ácido sulfénico, el más simple oxiácido del azufre orgánico. Este grupo tiene una corta existencia por cuanto su reactividad lo hace vulnerable a la reducción con tioles (Figura 7, reacción 2 y 3) o a las sobreoxidaciones que conducen a los ácidos sulfinico y sulfónico (Figure 7, reacción 4 y 5). La naturaleza transitoria de $-\text{Cys}_\text{P}-\text{SOH}$ es adecuada para que los oxidantes celulares puedan modular directamente la catálisis enzimática, la homeostasis redox y los eventos de señalización celular. Consistente con esta idea, numerosos estudios han implicado a $-\text{Cys}_\text{P}-\text{SOH}$ en una amplia variedad de procesos celulares y en numerosas patologías (16).

Reducción del sulfenato: La reactividad nucleofílica y electrofílica del átomo de azufre en los sulfenatos facilita su reacción con otro grupo sulfenato o con un tiol formando tiosulfatos $[-\text{S}-\text{S}(\text{O})-]$ o disulfuros, respectivamente (33,34). La primera reacción no ha sido encontrada en los sistemas biológicos pero la segunda ocurre frecuentemente con formación de puentes disulfuro vinculando dominios situados en la misma o en diferentes cadenas polipeptídicas (15).

En caso particular de las 2-Cys Prxs típicas, el ácido sulfénico reacciona con la Cys_R de la otra subunidad liberando agua y simultáneamente formando un disulfuro intermolecular. Congruente con este mecanismo, la mutante de la 2-Cys Prx desprovista de la Cys_R remueve el H_2O_2 en presencia de un tiol exógeno (e.g. ditioneitol) mientras que la contraparte carente de la Cys_P es completamente inactiva (35,36). Es decir, el tiol exógeno mantiene la actividad peroxidasa porque reemplaza la Cys_R en el mecanismo que conduce a la formación de un disulfuro con $-\text{Cys}_\text{P}-\text{SOH}$.

Reducción del disulfuro intermolecular: Una amplia variedad de PDOR y las reductasas asociadas participan en la reducción que restituye los grupos tioles a la Cys_P y a la Cys_R . El par Trx/NADP-Trx reductasa fue identificado inicialmente en levaduras y mamíferos como el sistema que transporta el poder reductor del NADPH hacia el disulfuro intercatenario de la 2-Cys Prx (Figura 8).

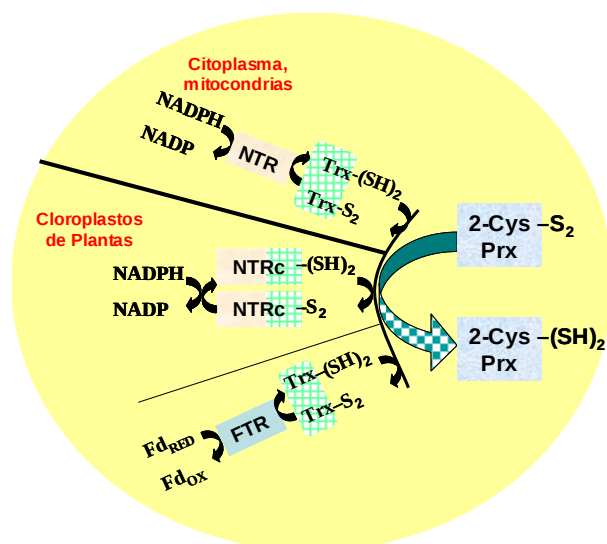


Figura 8. Reducción del puente disulfuro intercatenario de la 2-Cys Prx.

Sin embargo, los dadores fisiológicos de hidrógenos varían enormemente con el organismo, la ubicación intracelular, el estado de desarrollo y la respuesta a los estímulos ambientales. Por ello, no sorprende que los cloroplastos de las plantas superiores cuenten con dos sistemas para la reducción de la cistina intercatenaria: uno, que utiliza el NADPH via la NADP-Trx reductasa c (NTRc), y otro, que emplea la ferredoxina reducida generada por la luz en el sistema fotosintético via el par Trx/ferredoxina-Trx reductasa. Además, bacterias, tripanosomátidos y helmintos utilizan en esta función respectivamente a la alquilhidroperóxido reductasa (37), la triparredoxina (38), y el glutation (39). En este contexto, la capacidad de la Trx para reducir las 2-Cys Prx eucarióticas introduce un nivel mayor de complejidad por la multiplicidad de isoformas que estas PDOR exhiben en los diferentes seres vivos; e.g. tres isoformas en levaduras, dos en humanos y diecinueve en plantas (9).

Actividad Chaperona: El análisis bioquímico exhaustivo de los caminos metabólicos ha revelado que numerosas proteínas cumplen más de una función (40). El aspecto relevante de estas proteínas, denominadas “moonlighting proteins”, es el uso de las modificaciones covalentes post-traduccionales y las interacciones no-covalentes para alternar entre diferentes funciones y responder en consecuencia a los cambios metabólicos. El estudio de las 2-Cys Prxs de levaduras y humanas reveló que poseen una actividad chaperona que está asociada a las transiciones en la estructura cuaternaria (41,42). Estudios en procariotas y eucariotas mostraron que la 2-Cys Prx tiende a formar ensamblados de alto peso molecular con pérdida de la actividad peroxidasa y la simultánea aparición de la capacidad chaperona cuando las células son expuestas a un estrés oxidativo o térmico (43,44). En línea con cambios en las interacciones no-covalentes proteína-proteína, el estrés oxidativo libera una 2-Cys Prx asociada a los ribosomas de levaduras promoviendo su agregación (45). Dado que la 2-Cys

Prx establece interacciones no-covalentes con otras proteínas, sería esperable que algunas funciones enzimáticas puedan ser ajustadas mediante dicho mecanismo. Apoyando esta suposición, una de las enzimas claves para la asimilación fotosintética de CO₂, la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos, es estimulada por la 2-Cys Prx en un proceso que no utiliza la capacidad redox de esta última (46).

Modificaciones post-traduccionales de la 2-Cys Prx: La identificación de funciones adicionales en las 2-Cys Prx cambió la visión clásica de un catalizador en la reducción de los hidroperóxidos a modulador clave en importantes procesos biológicos. Dos mecanismos surgen para adecuar la estructura de las 2-Cys Prx a las diferentes actividades: las modificaciones post-traduccionales y las interacciones no-covalentes con ligandos de bajo peso molecular.

Fosforilación: La fosforilación de la 2-Cys Prx humana en la treonina-90 provoca la formación de especies de alto peso molecular que disminuyen marcadamente la actividad peroxidasa pero incrementan la actividad chaperona (47). En línea con estos estudios, la 2-Cys Prx es fosforilada en una posición idéntica con reducción de la actividad peroxidasa cuando los ratones son tratados con drogas que inducen la enfermedad de Parkinson (48). Mientras que los residuos serina, treonina y tirosina son fosforilados en la mayoría de las proteínas implicadas en la transducción de señales, los grupos fosforilo unidos a residuos histidina, aspártico y cisteína son menos frecuentes. En el último lustro, dos líneas de investigación plantearon la fosforilación de la Cys_P y la Cys_R. Por un lado, en *S. cerevisiae* se postula que la conversión de ácido sulfinico a tiol implica la fosforilación de la Cys_P como un paso esencial (49). Por otro lado, estudios recientes revelaron la incorporación de un grupo fosforilo en las especies sobreoxidadas de la Cys_R, implicando a los anhídridos mixtos fosforil-sulfinico [Prx-Cys_R-S(O)OPO₃²⁻] y fosforil-sulfónico [Prx-Cys_R-S(O₂)OPO₃²⁻] como una nueva alternativa para la modificación post-traducciona de las proteínas (50). Actualmente no son conocidos los roles de la supuesta fosforilación de la Cys_P y la autofosforilación de la Cys_R pero evidentemente sugieren la factibilidad de su participación en la transducción de señales. Es notable que la incorporación covalente del grupo fosforilo en los oxiácidos de la 2-Cys Prx integra en un único residuo la química no-redox del ATP con los múltiples estados de oxidación del átomo de azufre (Figura 9) constituyendo un mecanismo versátil para percibir cambios en los estados energéticos y redox de la célula(23).

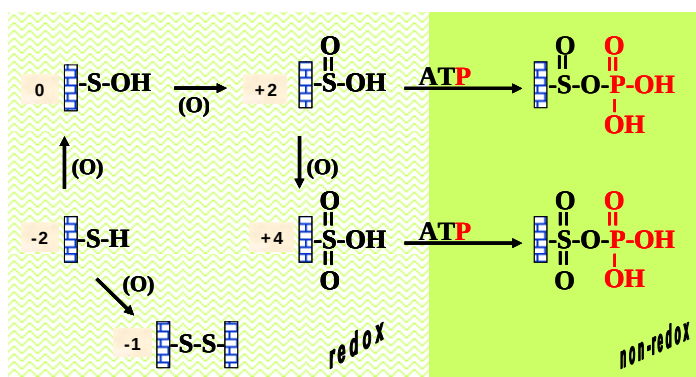


Figura 9. Química dual del átomo de azufre en la Cys_R

Acetilación: Estudios recientes han mostrado que las dos isoformas de la 2-Cys Prx humana están acetiladas en un residuo lisina específico cuando líneas celulares humanas son (i) tratadas con el inhibidor o (ii) desprovistas de una histona desacetilasa particular (51). Estos resultados *in vivo* sugieren que la ausencia de una actividad desacetilasa mantiene el grupo acetilo en la 2-Cys Prx. En línea con estos estudios, la 2-Cys Prx incorpora el grupo acetilo cuando es incubada *in vitro* con acetil-CoA y la histona acetiltransferasa. Sorprendentemente, esta acetilación específica incrementa no sólo la actividad peroxidasa sino también la resistencia a la sobreoxidación.

Interacciones no-covalentes: Simultáneamente con el hallazgo de la autofosforilación en la 2-Cys Prx fue observado que la acción concertada del ATP y el Mg²⁺ inhibe la actividad peroxidasa pero sólo el catión bivalente reduce la actividad chaperona (50). Estos estudios revelaron (i) la regulación cinética de la actividad peroxidasa diferente del control termodinámico dado por la disponibilidad del sustrato H₂O₂ y (ii) el control diferencial de las actividades peroxidasa y chaperona por reguladores desprovistos de capacidad redox. Experimentos complementarios mostraron que la presencia de ATP y Mg²⁺ conduce la estructura cuaternaria de la 2-Cys Prx a ensamblados de gran tamaño, los cuales retornan a la forma inicial cuando son removidos los moduladores (M. Aran, resultados no publicados). Estos estudios sugieren que la acción concertada de ATP y Mg²⁺ induce una variedad de especies de alto peso molecular, las cuales a su vez generan nuevas funciones. Las proteínas dotadas de una alternancia en la estructura cuaternaria que permite respuestas funcionales a la concentración de proteínas y a los reguladores alostéricos han sido denominadas morfeínas (52).

Conclusiones

La fisiología normal de las células, el envejecimiento y el estrés sistémico o local generan ROS (53). Aunque estas especies reactivas han sido consideradas tóxicas para los seres vivos, los estudios recientes sugieren que tienen una importancia central en los procesos de señalización celular. Esta peculiaridad requiere que, para regular los niveles intracelulares de ROS, los organismos dispongan un sistema complejo que atempere los efectos deletéreos y permita una respuesta adecuada a los estímulos. Los antioxidantes modulan químicamente y enzimáticamente el balance complejo entre las velocidades de formación de las ROS (estrés oxidativo) y la habilidad celular para remover estas especies reactivas (capacidad antioxidante). De esta manera, los antioxidantes reducen los niveles de ROS y determinan la acumulación de las formas oxidadas en las proteínas sensoras –e.g. OxyR, OhrR, Hsp33.

El cambio conceptual en la última década ha sido que las funciones bioquímicas de los grupos tiol en las proteínas no sólo participan en la formación de los puentes disulfuro sino también utilizan otros estados de oxidación del átomo de azufre. En particular, el derivado sulfénico juega un rol muy importante en los sitios catalíticos de las enzimas (protein-tirosina fosfatasa), regula la actividad de factores de transcripción específicos (OxyR, OhrR) y percibe el estrés oxidativo. La naturaleza transitoria y la presencia en múltiples procesos sugiere fuertemente que el grupo sulfénico en las cisteínas constituye un mecanismo por el cual las ROS pueden desencadenar respuestas celulares. En este contexto, el estado de oxidación del átomo de azufre (0) puede aumentar por sobreoxidación a los ácidos sulfínico (+2) y sulfónico (+4) o disminuir por formación de un puente disulfuro (-1), modificaciones que también estarían implicadas en señalamiento, envejecimiento o patologías (54). Esta peculiaridad admite la posibilidad de reconocer el estímulo y transducir paulatinamente la respuesta con un único residuo de aminoácido, una notable ventaja respecto a mecanismos “on/off” que requieren complejos sistemas de proteínas y/o residuos para la misma función.

En este contexto, la formación de –Cys-SOH en las Prxs, y en particular las 2-Cys Prx, juega un rol importante en la percepción y regulación de los estímulos ambientales. Esta familia de proteínas no sólo exhibe una amplia diversidad de sitios de fosforilación y acetilación sino también puede ser modulada alostéricamente por intermediarios metabólicos. Además de utilizar al ATP para modular la estructura cuaternaria via transformaciones covalentes e interacciones no-covalentes, la 2-Cys Prx posee la capacidad de recurrir a la química no-redox para manejar situaciones de estrés oxidativo. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la respuesta al desafío oxidativo depende no sólo de la dosis y la duración del estímulo sino también de la localización subcelular de la diana a ser protegida. Por ello no sorprende que, en las plantas con metabolismo C4, el contenido de la 2-Cys Prx sea mayor en las células del mesófilo que en las células de la vaina (55). En el futuro, el análisis detallado de los organismos transgénicos establecerá el rol que los sistemas antioxidantes juegan en la expresión temporal y espacial de los genes que participan en la respuesta a los estímulos ambientales.

Referencias

- 1.- Jacob, C. Giles, G.I., Giles, N.M. and Helmut Sies, H. (2003) Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 4742-4758.
- 2.- Lee, J.W. and Helmann, J.D. (2006) The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**, 363-367.
- 3.- Zhang, X.H. and Weissbach, X. (2008) Origin and evolution of the protein-repairing enzymes methionine sulfoxide reductases. *Biol. Rev.* **83**, 249-257.
- 4.- Winterbourn, C.C. and Hampton, M.B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Rad. Biol. Med.* **45**, 549-561.
- 5.- Cabisco, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. and Ros, J. (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 27393-27398.
- 6.- DeYulia, G.J., Cárcamo, J.M., Borquez-Ojeda O., Shelton, C.C. and Golde, D.W. (2005) Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. *Proc. Natl. Acad. USA* **102**, 5044-5049.
- 7.- Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F.M., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F. and Mueller, M.J. (2008) Singlet Oxygen Is the Major Reactive Oxygen Species Involved in Photooxidative Damage to Plants. *Plant Physiol.* **148**, 960-968.
- 8.- Buchanan, B.B. and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 187-220.
- 9.- Mora-Garcia, S., Stolorowicz, F. and Wolosiuk, R.A. (2005) Redox signal transduction in plant metabolism. Control of primary metabolism in plants (Plaxton, W. and McManus, M. eds.). *Annu. Plant Rev.* Vol. **22**. p. 150-186. Blackwell Publishing. Oxford, UK.
- 10.- Thorpe, C., Hooper, K.L., Raje, S., Glynn, N.M., Burnside, J., Turi, G.K., and Coppock, D.L. (2002). Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* **405**, 1-12.
- 11.- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D. and Milzani, A. (2009) Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *T. Biochem. Sci.* **34**, 85-96.
- 12.- Shelton, M.D. and Mieyal, J.J. (2008) Regulation by Reversible S-Glutathionylation: Molecular Targets Implicated in Inflammatory Diseases. *Mol. Cells* **25**, 332-346.
- 13.- Lemaire, S.D. (2004) The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynth. Res.* **79**, 305-318.
- 14.- Lee, J.W., Soonsanga, S. and Helmann, J.D. (2007) A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8743-8748.
- 15.- Kiley, P.J. and Storz, G. (2004) Exploiting thiol modifications. *PLoS Biol.* **2**, e400.
- 16.- Poole LB, Karplus PA & Claiborne A (2004) Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 325-347.

- 17.- Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K. and Barford, D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenylamide intermediate. *Nature* **423**, 769-773.
- 18.- van Montfort R.L.M., Congreve M., Tisi D., Carr R. and Jhoti H. (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* **423**, 773-776.
- 19.- Yang J., Groen A., Lemeer S., Jans A., Slijper M., Roe S.M., den Hertog J. and Barford D. (2007) Reversible oxidation of the membrane distal domain of receptor PTPalpha is mediated by a cyclic sulfenamide. *Biochemistry* **46**, 709-719.
- 20.- Tonks N.K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 833-846.
- 21.- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **50**, 601-639.
- 22.- Rhee, S. G. (2006) Cell signaling: H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* **312**, 1882-1883.
- 23.- Aran, M., Ferrero, D.S., Pagano, E. and Wolosiuk, R.A. (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins. Modulation by covalent transformations and noncovalent interactions. *FEBS J.* **276**, 2478-2493.
- 24.- Zhou, Y., Wan, X.Y., Wang, H.L., Yan, Y.D., Hou, Y.D. and Jin, D.Y. (1997) Bacterial Scavengase p20 Is Structurally and Functionally Related to Peroxiredoxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 848-852.
- 25.- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W. and Kim, I.H. (2000) Distinct Physiological Functions of Thiol Peroxidase Isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 5723-5732.
- 26.- Zhou, Y., Kok, K.H., Chun, A.C., Wong, C.M., Wu, H.W., Lin, M.C.M., Fung, P.C.W., Kung, H.F. and Jin, D.Y. (2000) Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 921-927.
- 27.- 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**, 20346-30354.
- 28.- Dietz, K.J., Horling, F., Konig, J. and Baier, M. (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J. Exp. Bot.* **53**, 1321-1329.
- 29.- Knoop, B., Loumaye, E. and van der Eecken, V. (2007) Evolution of the peroxiredoxins. In: *Peroxiredoxin Systems. Structures and Functions, Subcellular Biochemistry* **44**, edited by Flohé, L. and Harris, J.R. New York: Springer, pp 27-40.
- 30.- Copley, S.D., Novak, W.R.P. and Babbitt, P.C. (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: Evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* **43**, 13981-13995.
- 31.- Salsbury Jr, F.R., Knutson, S.T., Poole, L.B. and Fetrow, J.S. (2008) Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Prot. Sci.* **17**, 299-312.

- 32.- Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.R. and Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *T. Biochem. Sci.* **28**, 32-40.
- 33.- Allison, W. (1976) Formation and reactions of sulfenic acids in proteins. *Acc. Chem. Res.* **9**, 293-299.
- 34.- Claiborne, A., Mallett, T.C., Yeh, J.I., Luba, J. and Parsonage, D. (2001) Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Adv. Protein Chem.* **58**, 215-276.
- 35.- Chae, H.Z., Chung, S.J. and Rhee, S.G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **269**, 27670-27678.
- 36.- Jara, M., Vivancos, A.P., Calvo, I.A., Moldon, A., Sanso, M. and Hidalgo, E. (2007) The Peroxiredoxin Tpx1 is essential as a H₂O₂ scavenger during aerobic growth in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2288-2295.
- 37.- Poole, L.B., Reynolds, C.M., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Ellis, H.R. and Calzi, M.L. (2000) AhpF and other NADH: peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6126-6133.
- 38.- Nogoceke, E., Gommel, D.U., Kiess, M., Kalisz, H.M. and Flohe, L. (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyzes trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.* **378**, 827-836.
- 39.- Sayed, A.A. and Williams, D.L. (2004) Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **279**, 26159-26166.
- 40.- Jeffery, C.J. (2004) Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 663-668.
- 41.- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W. *et al.* (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**, 625-635.
- 42.- Moon, J.C., Hah, Y.S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.W. *et al.* (2005) Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **280**, 28775-28784.
- 43.- Matsumura, T., Okamoto, K., Iwahara, S., Hori, H., Takahashi, Y., Nishino, T. and Abe, Y. (2008) Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization. *J. Biol. Chem.* **283**, 284-293.
- 44.- Chuang, M.H., Wu, M.S., Lo, W.L., Lin, J.T., Wong, C.H. and Chiou, S.H. (2006) The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2552-2557.
- 45.- Trotter, E.W., Rand, J.D., Vickerstaff, J. and Grant, C.M. (2008) The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. *Biochem. J.* **412**, 73-80.

- 46.- Caporaletti, D., D'Alessio, A.C., Rodriguez-Suarez, R.J., Senn, A.M., Duek, P.D. and Wolosiuk, R.A. (2007) Nonreductive modulation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by 2-Cys peroxiredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 722-727.
- 47.- Jang, H.H., Kim, S.Y., Park, S.K., Jeon, H.S., Lee, Y.M., Jung, J.H., Lee, S.Y., Chae, H.B., Jung, Y.J., Lee, K.O. et al. (2006) Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions. *FEBS Lett.* **580**, 351-355.
- 48.- Qu, D., Rashidian, J., Mount, M.P., Aleyasin, H., Parsanejad, M., Lira, A., Haque, E., Zhang, Y., Callaghan, S., Daigle, M. et al. (2007) Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease. *Neuron* **55**, 37-52.].
- 49.- Rhee S.G., Jeong W., Chang T.S. and Woo H.A. (2007) Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int. Suppl.* **106**, S3-8.
- 50.- Aran, M., Caporaletti, D., Senn, A.M., Tellez de Iñon, M.T., Girotti, M.R., Llera, A.S. and Wolosiuk, R.A. (2008) ATP-dependent modulation and autophosphorylation of rapeseed 2-Cys peroxiredoxin. *FEBS J.* **275**, 1450-1463.
- 51.- Parmigiani, R.B., Xu, W.S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P. and Marks, P.A. (2008) HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 9633-9638.
- 52.- Jaffe, E.K. (2005) Morpheesins. A new structural paradigm for allosteric regulation. *T. Biochem. Sci.* **30**, 490-497.
- 53.- Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.
- 54.- Cross, J.V. and Templeton, D.J. (2006) Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1819-1827.
- 55.- Majeran, W., Cai, Y., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2005) Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell* **17**, 3111-3140.