

Tesis Doctoral

# Mecanismos de proliferación dependientes del estado redox celular: rol de AKT y otras kinasas involucradas en la progresión del ciclo celular

Antico Arciuch, Valeria Gabriela

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Antico Arciuch, Valeria Gabriela. (2009). Mecanismos de proliferación dependientes del estado redox celular: rol de AKT y otras kinasas involucradas en la progresión del ciclo celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Antico Arciuch, Valeria Gabriela. "Mecanismos de proliferación dependientes del estado redox celular: rol de AKT y otras kinasas involucradas en la progresión del ciclo celular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Química Biológica**

MECANISMOS DE PROLIFERACIÓN DEPENDIENTES  
DEL ESTADO REDOX CELULAR: ROL DE AKT  
Y OTRAS KINASAS INVOLUCRADAS  
EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

**Lic. Valeria Gabriela Antico Arciuch**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Química Biológica

**Director: Prof. Dr. Juan José Poderoso**  
**Consejera de estudios: Prof. Dra. María del Carmen Ríos**

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno  
Hospital de Clínicas "José de San Martín"  
Universidad de Buenos Aires

**Buenos Aires, 2009**

## “Mecanismos de proliferación dependientes del estado redox celular: rol de Akt y otras kinasas involucradas en la progresión del ciclo celular”

### Resumen

---

En las últimas décadas se demostró que la producción transitoria de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) constituye un evento muy importante de señalización disparado a través de la activación de receptores de superficie o determinado por el estado metabólico mitocondrial, y que modula el grado de fosforilación de determinadas proteínas. En este contexto, estudios recientes han confirmado la presencia de kinasas en la mitocondria que hemos interpretado como un mecanismo modulador en la disponibilidad celular de las kinasas. Las mitocondrias normales poseen la mayor concentración celular de ATP y  $H_2O_2$  en el estado estacionario y contribuyen naturalmente al grado de fosforilación y oxidación de proteínas, dos modificaciones post-traduccionales centrales en la activación de las kinasas. Sobre estas bases, formulamos la hipótesis que el estado redox produce efectos celulares diferenciales en consonancia con la activación de Akt1 y ERK1/2 en la mitocondria, y que en este compartimiento, el  $H_2O_2$  determina cambios conformacionales que favorecen la fosforilación y posterior translocación nuclear de las mismas.

Los estudios realizados en esta Tesis confirmaron que: 1) en la línea celular NIH/3T3, el  $H_2O_2$  efectivamente modula la progresión del ciclo celular a través de la oxidación y fosforilación selectiva de Akt1 en mitocondrias; 2) en la línea tumoral LP07, el  $H_2O_2$  asimismo promueve la oxidación selectiva de ERK1/2 o p38-JNK1/2 y posterior translocación al núcleo con efectos ulteriores en la proliferación celular; y 3) el sistema de tiorredoxinas (Trx) modula el destino celular regulando el nivel de oxidantes en las líneas celulares y provocando una activación selectiva en el eje central de Akt1 en el modelo tumoral analizado *in vivo*.

En la línea NIH/3T3, la modulación por  $H_2O_2$  involucró la entrada de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> a las mitocondrias, donde fue fosforilada en Thr<sup>308</sup> por PDK1. A concentración

celular limitada de  $H_2O_2$ , la fosforilación de Akt1 en Thr<sup>308</sup> en mitocondrias fue significativa, determinó su pasaje al núcleo y disparó mecanismos genómicos que favorecieron la proliferación celular. En cambio, a elevadas concentraciones de  $H_2O_2$ , la asociación Akt1-PDK1 fue interrumpida y P-Akt1 Ser<sup>473</sup> fue retenida en la mitocondria en detrimento de su translocación nuclear. La actividad disminuida de Akt1 favoreció la liberación de citocromo *c* al citosol conduciendo a la apoptosis. Los efectos diferenciales en la interacción Akt1-PDK1 dependieron de la oxidación selectiva de la Cys<sup>310</sup> de Akt1 a ácido sulfénico y sulfónico.

Las respuestas celulares observadas en la línea tumoral LP07 involucraron la activación selectiva de ERK1/2 y la interacción eficiente con MEK1/2 determinada por la oxidación de cisteínas conservadas pertenecientes a dominios redox sensibles. Estas modificaciones post-traduccionales que tuvieron lugar en la mitocondria determinaron el pasaje de la kinasa al núcleo. Considerando que las mitocondrias tumorales son disfuncionales, su incapacidad para incrementar la producción de  $H_2O_2$  podría interrumpir la oxidación sincronizada de ERK1/2 y la regulación del ciclo celular causando la persistencia del fenotipo proliferante.

En el mismo modelo tumoral analizado *in vivo*, el silenciamiento de Trx1 y 2 fue capaz de revertir el efecto de las condiciones redox proliferativas por una activación diferencial de Akt1. Los resultados obtenidos indicaron que al revertir la baja condición redox proliferante, P-Akt1 Ser<sup>473</sup> aumentó en la mitocondria en detrimento de la translocación al núcleo, mientras que en los tumores que exhibieron bajo  $H_2O_2$ , P-Akt1 Ser<sup>473</sup> se encontró predominantemente en el núcleo, sugiriendo una marcada modulación en la activación de la kinasa y su posterior translocación al núcleo.

En esta Tesis, se demuestra el rol central del  $H_2O_2$  en la activación y tráfico mitocondrial de Akt1 y ERK1/2 en la progresión del ciclo celular. Se concluye que la localización subcelular de estas kinasas en mitocondrias aporta un nuevo modelo para explicar la regulación de la activación por la oxidación de cisteínas específicas y la fosforilación en los residuos correspondientes. De esta forma, el ciclo intramitocondrial de Akt1 y ERK1/2 constituye un eje central para la modulación redox del destino celular en células normales o tumorales.

**Palabras clave:**  $H_2O_2$ , Akt1, ERK1/2, proliferación, apoptosis, Trx.

## **“Proliferation mechanisms dependent on cellular redox state: role of Akt and other kinases involved in cell cycle progression”**

### **Abstract**

---

Over the last decades, it has been demonstrated that the transitory production of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) constitutes a very important event in signaling that can be triggered by activation of surface receptors or determined by mitochondrial metabolic state, and that modulates the phosphorylation level of certain proteins. In this context, recent studies have confirmed the presence of kinases in the mitochondria that we interpreted as a modulatory mechanism in the cellular availability of the kinases. Normal mitochondria have the major cellular ATP and  $H_2O_2$  steady state concentrations and naturally contribute to the phosphorylation level and protein oxidation, two main posttranslational modifications in the activation of kinases. On these bases, we postulated the hypothesis that redox state produces differential cellular effects in accord to Akt1 and ERK1/2 activation in mitochondria, and that in this compartment,  $H_2O_2$  determines conformational changes that favor their phosphorylation and subsequent nuclear translocation.

The studies performed in this Thesis confirmed that: 1) in NIH/3T3 cell line,  $H_2O_2$  effectively modulates cell cycle progression through the oxidation and selective phosphorylation of Akt1 in mitochondria; 2) in the tumoral cell line LP07,  $H_2O_2$  promotes as well the selective oxidation of ERK1/2 or p38-JNK1/2 and further translocation to nucleus with later effects in cell proliferation; and 3) the thioredoxin system (Trx) modulates cell fate regulating the oxidant level and inducing a selective activation in the central axis of Akt1 in the tumoral model analyzed *in vivo*.

In NIH/3T3 cell line, the modulation by  $H_2O_2$  involved the entrance of P-Akt1 Ser<sup>473</sup> to mitochondria, where it was phosphorylated in Thr<sup>308</sup> by PDK1. At  $H_2O_2$  cellular limiting concentrations, the phosphorylation of Akt1 in Thr<sup>308</sup> in mitochondria was pronounced, determined its passage to nucleus and triggered genomic mechanisms

that favoured cell proliferation. Oppositely, at higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, Akt1-PDK1 association was disrupted and P-Akt1 Ser<sup>473</sup> was retained in mitochondria in detriment of its nuclear translocation. Akt1 low activity favoured the release of cytochrome *c* to cytosol triggering apoptosis. The differential effects in Akt1-PDK1 interaction depended on the selective oxidation of Cys<sup>310</sup> in Akt1 to sulfenic and sulfonic acid.

The cellular responses observed in LP07 cell line engaged the selective activation of ERK1/2 and the efficient interaction with MEK1/2 determined by the oxidation of conserved cysteines belonging to redox sensitive domains. These postranslational modifications that took place in mitochondria determined the passage to nucleus. Considering that tumoral mitochondria are dysfunctional, the incapacity to increase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration could disrupt the synchronized oxidation of ERK1/2 and the regulation of cell cycle causing the persistence of the proliferative phenotype.

In the same tumoral model analyzed *in vivo*, Trx1 and 2 silencing was able to revert the effect of redox proliferative conditions by a differential activation of Akt1. The obtained results indicated that in these conditions P-Akt1 Ser<sup>473</sup> increased in mitochondria instead of translocating to nucleus, while in tumors with low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> condition, P-Akt1 Ser<sup>473</sup> was found predominantly in nucleus, suggesting a pronounced modulation in the activation and translocation of the kinase.

In this Thesis, we demonstrated the key role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the activation and mitochondrial traffic of Akt1 and ERK1/2 in cell cycle progression. We conclude that the subcellular localization of these kinases in mitochondria provides a new model to explain the regulation of the activation by oxidation of specific cysteines and the phosphorylation in the corresponding residues. In this sense, the intramitochondrial cycle of Akt1 and ERK1/2 constitutes a central axis for the redox modulation of cell fate in normal and tumoral cells.

**Key words:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Akt1, ERK1/2, proliferation, apoptosis, Trx.

## Agradecimientos

---

***“La verdadera ciencia no es una parte diferente del arte, sino el arte mismo. En cuanto a la inspiración, es la razón misma adornada por el genio.”***

***Fryderyk Chopin***

A Juan José Poderoso, quién me ha enseñado el verdadero significado de la vida intrépida de la investigación científica, el amor por el trabajo, y la energía y pasión por el entendimiento. Por las conversaciones tan ricas y una demostración brillante de apertura de espíritu y de inspiración científica. Por compartir la alegría de ver y entender, por disfrutar de la búsqueda del conocimiento, de las sonrisas y de poder liberar la imaginación. Y por compartir además el entusiasmo por la docencia y la música como otra gran expresión del arte.

A María Cecilia Carreras, a quién le debo lo esencial de mi formación científica, por haberme guiado y acompañado en mis primeros pasos por el laboratorio, cuando apenas era una pequeña estudiante. Por acompañarme en cada etapa del crecimiento, por su ayuda, generosidad, entusiasmo, paciencia y rigor analítico. Por compartir conmigo no sólo horas de trabajo y palabras de aliento, sino por sus cálidas demostraciones de amistad.

A mis grandes amigas del laboratorio, aquellas que han compartido conmigo la vida y la alternancia de momentos apacibles, de aliento y euforia absoluta:

- A Dani, por tantas experiencias y viajes vividos, por brindarte tan desinteresadamente, por acompañarme desde el primer día hasta hoy incansablemente, por reírte conmigo, gracias por todo tu apoyo y gracias por tu inquebrantable amistad.
- A Clari, por tantas horas de trabajo juntas, charlas y encuentros emotivos y por mis primeros pasos en el laboratorio siempre junto a vos.

- A Sole, porque fuiste una gran maestra, por brindarme todo tu conocimiento, porque me enseñaste el amor por el trabajo y por tantas horas de amistad compartidas, aquí o a la distancia, siempre presentes.
- A Ana, por tu alegría incansable y tu ayuda siempre vigente, por las horas de música y charlas compartidas.
- A Pao, por tu disposición y entrega absolutas, y por tus consejos, y por todos los ejemplos de impulsión y creación.
- A Flor, por tu compañía, las charlas y por tu dulzura.

Gracias a Yae, Pía, Euge, Silvia, Ceci y Fer porque no sólo compartimos experimentos, sino aspiraciones, charlas de mañana, tarde y noche y sobre todo, por el gran apoyo como grupo.

A George, no sólo por tu ayuda incesante desde el comienzo, sino por la calidez de tu persona, los consejos, las horas de facultad, los aportes intelectuales, las risas, y gracias por tu amistad.

A Ro y Dami, dos personas excelentes, a quienes agradezco su inmensa amistad y apoyo constantes desde el primer día. A Emilia, por las horas de ciencia, docencia y por su cordialidad brindada.

A mis amigas de la infancia, aquellas que siempre estuvieron presentes a pesar que la vida nos abrió caminos diferentes, siempre dispuestas con todo su corazón: Nati, Julia, Ro, Romy, Kari, Carla y Vale.

A Jose, por todas las horas de facu y concursos compartidos, pero sobre todo, por tu sincera amistad, por tu cariño y preocupación constante, por tu generosidad.

A mis tíos, porque siempre me apoyaron en esta maravillosa carrera, por toda la contención y amor incondicional, por sus palabras. A Mandy, Graciela y Mario, quienes me adoptaron como una parte más de la familia, gracias por dejarme hacer más todas las emociones vividas.

A las chicas del laboratorio del Dr. Podestá, en especial a Ceci Poderoso, porque siempre estuvieron firmes en cada detalle experimental y se brindaron generosamente.

Al Dr. Jorge Boczkowski por la ayuda y disposición constantes, por darme la oportunidad de viajar y abrirme las puertas de su laboratorio y de su casa. Por su amabilidad y apoyo durante mi estancia en Paris.

A mis colegas docentes del Departamento de Química Biológica de la FCEN. Porque junto a ellos descubrí que lo que se lee se puede olvidar, lo que se escribe se puede recordar, pero lo que se enseña se aprende. Con ellos compartí el placer por la docencia y descubrí que para una voluntad firme, nada es imposible.

A mis abuelos.

***A Mamá y Papá, gracias por hacer de sus ojos una guía en mi camino, por iluminar y llenar de amor mi vida. Gracias por no soltar mis brazos nunca.***

***A mi Hermanita, por la belleza de su persona, por ser una fuente de inspiración constante, y por todos nuestros sueños, anhelos y momentos atesorados.***

***A Damián, gracias por su apoyo incondicional, su paciencia, confianza y amor, siempre presentes desde el comienzo de esta vertiginosa carrera.***

# Índice

---

	<b>Páginas</b>
<b>Introducción</b>	<b>1-64</b>
La mitocondria	1-25
Especies reactivas del oxígeno en la mitocondria	26-32
Transducción de señales y evolución del kinoma	33-35
Akt/Proteín-kinasa B	36-49
La cascada MEK/ERK	50-53
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la señalización celular	54-64
<b>Objetivos</b>	<b>65-66</b>
Hipótesis y Objetivos	65-66
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>67-87</b>
Líneas celulares y condiciones de cultivo	67
Obtención de las fracciones nuclear, mitocondrial y citosólica de células en cultivo	67-69
Fraccionamiento submitocondrial	70
Medición de proteínas por el método de Bradford	70-71
Medición de la actividad de Lactato dehidrogenasa	71
Medición de la actividad de Citocromo <i>c</i> oxidasa (Complejo IV)	71
Preparación de citocromo <i>c</i> reducido	71
Ensayo de proliferación	72
Determinación del contenido de ADN por citometría de flujo	72-73
Detección de apoptosis por citometría de flujo	73
Análisis de muerte celular por microscopía de fluorescencia (doble tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina)	73-74

Determinación espectrofluorométrica del potencial de membrana mitocondrial	74-75
Medición del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo	75
Western blot	75-76
Transfección transiente	77-78
Ensayo de actividad de Akt	78-79
Ensayo de interacción Akt1-P-PDK1	79
Ensayo de fosforilación y translocación de Akt1 a mitocondria <i>in vitro</i>	79-80
Purificación de vesículas de membrana plasmática	80
Ensayo de fosforilación de Akt1 en presencia de mitoplastos y vesículas	80
Microscopía confocal	80-83
Espectrometría de masa	83-84
Producción intracelular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	84
Animales	84-85
Generación de los tumores	85
Electroporación <i>in vivo</i> de los tumores	85
Aislamiento y purificación de mitocondrias a partir de tumores	85-86
Materiales	86
Análisis de los datos	87

---

## **Resultados** **88-126**

### **Primera Parte**

El destino celular depende del estado redox	88-94
Cinéticas de activación y redistribución de Akt1 ante diferentes estados redox	95-97
El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> modula la interacción Akt1-P-PDK1 y por lo tanto su completa activación en la mitocondria	98-101

El tráfico de Akt1 al núcleo requiere la fosforilación en Thr <sup>308</sup> en la mitocondria	101-106
Akt1 requiere ser fosforilada en Ser <sup>473</sup> para translocar a la mitocondria “ <i>ex vivo</i> ”	107-108
La mitocondria y la membrana plasmática cooperan para la activación completa de Akt1 <i>in vitro</i> en vesículas reconstituidas	109-111
Las Cys <sup>60</sup> y Cys <sup>310</sup> son los blancos principales para la oxidación de Akt1 por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	111-112

## **Segunda Parte**

El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> modula la interacción MEK1/2-ERK1/2 y la translocación al núcleo	113-114
Los tioles de las cisteínas de ERK2, p38 y JNK2 son oxidados específicamente por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114-115
La interacción ERK-MEK y la transferencia de ERK1/2 al núcleo dependen de la oxidación mitocondrial de las cisteínas redox sensibles	115-119

## **Tercera Parte**

El sistema de Trx modula el destino celular a través de la regulación del nivel de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	120-124
El sistema de Trx provoca una activación selectiva en el eje central de Akt1 en el modelo tumoral <i>in vivo</i>	124-126

## **Discusión y conclusiones**

---

Discusión	127-134
Conclusiones	134-137
Direcciones futuras	137

## **Trabajos publicados y Premios**

---

## **Referencias**

---

---

## La mitocondria

---

---

A principios del siglo XIX, el zoólogo alemán Theodor Schwann sentó las bases de la teoría celular dando lugar a la biología moderna. Los principios básicos formulados incluyeron el reconocimiento de membranas, núcleo y cuerpos celulares. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX cuando investigadores reconocieron por primera vez a las organelas que hoy en día se identifican como compartimientos diferenciados dentro de la célula. Las mitocondrias fueron entonces observadas al microscopio por varios citólogos y su nombre fue acuñado por Carl Benda en 1898. Llamativamente y antes que Benda introdujera el término mitocondria, Kolliker las había descrito como “gránulos” localizados en el interior de células musculares. En 1886, Altman identificó estos cuerpos usando nuevas técnicas de tinción y las llamó bioblastos. Además, en su libro *Die Elementarorganismen* postuló que estas estructuras eran unidades autónomas y básicas para la actividad celular y las describió como colonias bacterianas en el citoplasma de una célula huésped, un verdadero precursor de la teoría endosimbionte (Frey y Manella, 2000).

En 1912, Otto Warburg hipotetizó que existía una enzima capaz de procesar el oxígeno molecular y pudo demostrar que el cianuro alteraba la respiración celular. La hipótesis de Warburg no solo se centró en aquellas enzimas capaces de metabolizar el oxígeno, sino que posteriormente demostró que las células cancerosas eran más dependientes de la glucólisis para generar adenosina trifosfato (ATP), aún cuando existiera oxígeno abundante en el medio ambiente celular. Hoy en día, el efecto Warburg representa una característica prominente de las células malignas. Se piensa que la disfunción respiratoria mitocondrial puede deberse a mutaciones en el ADN mitocondrial que fuerza a las células malignas a aumentar la tasa de glucólisis para mantener un alto estado metabólico, lo cual constituye una paradoja dado que la producción de ATP es mucho menos eficiente a nivel de la glucólisis respecto de la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa (Frey y Manella, 2000).

El descubrimiento de los citocromos, del grupo hemo y de los flavín-nucleótidos corresponde al período 1920-1930 y la formulación del ciclo del ácido cítrico por Krebs constituyó uno de los logros más importantes en el estudio del metabolismo a partir de preparaciones de músculo. A medida que la organela pudo ser aislada en forma intacta

de algunos tejidos como el hígado (mediante centrifugación diferencial), Claude y colaboradores comenzaron los estudios sobre la funcionalidad de la mitocondria. A mediados del siglo XX, los ensayos acerca de la función mitocondrial se centraron en el mecanismo oxidativo y el conocimiento de los complejos multienzimáticos presentes en la organela (Kennedy y Lehninger, 1950). Los mismos investigadores luego extendieron la caracterización bioquímica de las organelas demostrando que: a) las reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se llevan a cabo en las mitocondrias a una velocidad que justifica casi la totalidad de la actividad encontrada en las células y b) estas reacciones son acompañadas por la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa). El criterio de integridad morfológica no podría haberse aplicado si al mismo tiempo y sinérgicamente el grupo de Porter y Palade no hubieran utilizado la microscopía electrónica. De esta forma, las mitocondrias pudieron ser visualizadas y comparadas *in situ* y luego del aislamiento lograron completarse los estudios sobre su funcionalidad. Una vez que fueron caracterizadas muchas de las reacciones bioquímicas mitocondriales fue posible determinar que las enzimas que catalizan estas reacciones no se encuentran simplemente dentro de la organela en una forma soluble. Los estudios pioneros de Sjöstrand y Palade en mitocondrias utilizando microscopía electrónica reconocieron a esta organela como un sistema con más de una membrana pero las distintas interpretaciones de las micrografías condujeron a postular diferentes modelos. El primero de ellos postulado por Sjöstrand planteaba la existencia de distintos compartimientos unidos a la membrana interna formando septos que dividían la matriz (Sjöstrand, 1956). Palade también observó los compartimientos de la membrana interna y los describió como prolongaciones irregulares a las que llamó “crestas mitocondriales” que se extendían desde la membrana interna (Palade, 1952). En 1978, el ganador del premio Nobel de Química, Peter Mitchell postuló la teoría quimiosmótica de la fosforilación oxidativa (Mitchell y Boyle, 1967). Esta teoría centró a la mitocondria como la principal fuente productora de ATP en la célula.

Un descubrimiento muy importante fue realizado en 1963 cuando se identificó por primera vez ADN en las mitocondrias (Nass y Nass, 1963). Este descubrimiento había sido anticipado por los hallazgos de herencia citoplasmática no mendeliana en levaduras. Estas evidencias reforzaron el interés científico por el origen evolutivo de la mitocondria dado que los cambios en la secuencia del ADN mitocondrial representan un reloj molecular particularmente apropiado para entender la evolución humana. En 1967, Lynn Margulis presentó evidencias sobre el origen bacteriano de las mitocondrias y

propuso la teoría de endosimbiosis seriada por la cual se establece que las células eucariotas se originaron como consecuencia de procesos simbióticos de varias células procariotas que culminaron con la fusión permanente en un único individuo (Sagan, 1967). Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación, en 1981 Sanger fue capaz de secuenciar el genoma mitocondrial y determinar que la tasa de mutación es 10 veces más alta que la del genoma nuclear.

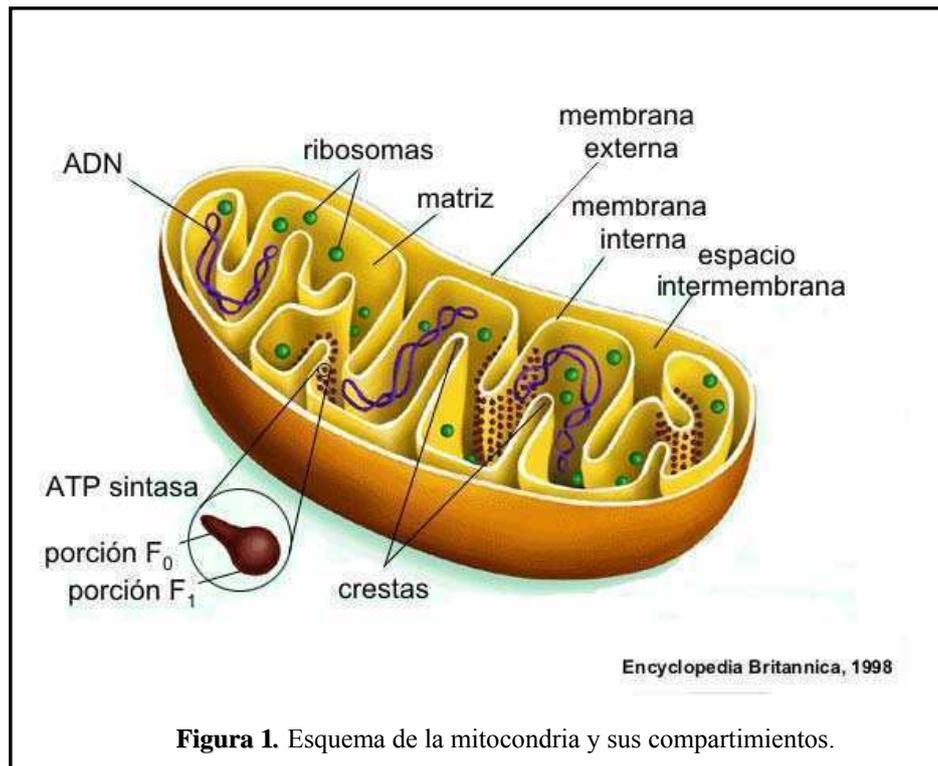
Una de las propiedades más remarcables de las células eucariotas superiores es su capacidad de comandar no solo mecanismos elaborados para la supervivencia celular sino también estrategias igualmente intrincadas para ejecutar la muerte celular. En este sentido, en la última década se ha hecho evidente que las mitocondrias no son meramente la fuente de energía de las células. Además, a esto se agrega que las mitocondrias funcionan como integradoras centrales del metabolismo y de la apoptosis dado que continuamente evalúan el estado energético celular o la presencia de señales que influyen la supervivencia. En respuesta a estas señales, permiten la liberación de factores o proteínas que inician el proceso de apoptosis. Por otra parte, desempeñan un rol crítico en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y en el balance redox celular. De esta forma, las investigaciones sobre la mitocondria han evolucionado desde la bioenergética hasta la biogénesis, a lo que se ha incorporado un enfoque genético que contribuye al diagnóstico de las enfermedades asociadas con la disfunción mitocondrial. Sin embargo, poco se sabe acerca de la comunicación intracelular, en términos de regulación de la transcripción de genes nucleares y mitocondriales o del tráfico de proteínas a la organela. De esta forma, ha emergido una nueva era en la investigación mitocondrial que concierne al rol de esta organela en la señalización intracelular. Este proceso tiene numerosas implicancias en el desarrollo, envejecimiento, mecanismos de adaptación al medio y en la progresión de enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Goldenthal y Marín-García, 2003; Horbinski y Chu, 2005).

### **Estructura de las mitocondrias**

El modelo de Palade evolucionó hasta el que se acepta en la actualidad y en el que la membrana interna constituye una superficie continua cerrada con una morfología compleja que se pliega en crestas que protruyen a lo largo de la matriz. La estructura de la mitocondria es crucial para su funcionamiento (Figura 1). Las dos membranas

especializadas dividen a la organela en un espacio intermembrana angosto y una matriz más extensa. La **membrana externa** consiste en una bicapa lipídica que contiene muchos canales formados por una proteína denominada porina tal como la que conforma el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) que funciona como un tamiz, filtrando moléculas de gran tamaño (mayores a 10 kDa y 20 Å de diámetro) y permitiendo el pasaje de moléculas hidrofílicas a través de la membrana lipídica. Además, aquí se localizan algunos factores que juegan un rol clave en la apoptosis como Bcl-2 y Bax, así como también importantes proteínas que participan en las vías de señalización celular. Dicha membrana participa en mecanismos de fisión, fusión y distribución de las organelas. La **membrana interna**, altamente intrincada, presenta un gran número de invaginaciones denominadas crestas que aumentan la superficie para permitir la inclusión de un mayor número de proteínas. Permite además, el pasaje de determinadas moléculas y es mucho más selectiva que la membrana externa. La membrana interna es rica en el fosfolípido cardiolipina que la hace impermeable a los iones, que resulta importante para la generación del gradiente electroquímico. La presencia de proteínas de transporte asegura la entrada de proteínas específicas y sustratos para las enzimas de la matriz (Szewczyk y Wojtczak, 2002). Es importante destacar, que en ella se encuentran asentados los complejos multienzimáticos que forman parte de la cadena de transporte de electrones y que cerca del 10-15% de los genes nucleares en los organismos eucariotas codifican para estas proteínas mitocondriales. Éstas se sintetizan en el citoplasma y son reconocidas por receptores en la superficie de las mitocondrias. Determinados complejos multiproteicos denominados translocasas de membrana interna y externa de la mitocondria median el importe y el destino intramitocondrial de estas proteínas. La fuente de energía que motoriza estos procesos es el ATP y se aprovecha además el potencial de membrana que resulta del bombeo de protones. Existen asimismo chaperonas y factores auxiliares que intervienen en el plegado y ensamblado para determinar su estructura terciaria nativa (Neupert y Herrmann, 2007). Debido a la poca selectividad de la membrana externa, el **espacio intermembrana** es químicamente equivalente al citoplasma. En él está presente un componente fundamental de la cadena de transporte de electrones, el citocromo *c*, que además cumple un rol fundamental en el mecanismo de apoptosis por vía mitocondrial. También se encuentran aquí proteínas remodeladoras de las crestas mitocondriales como la denominada Opa1. La **matriz mitocondrial** contiene iones, metabolitos, sustratos de reacciones redox, ADN circular bicatenario, ribosomas y numerosas

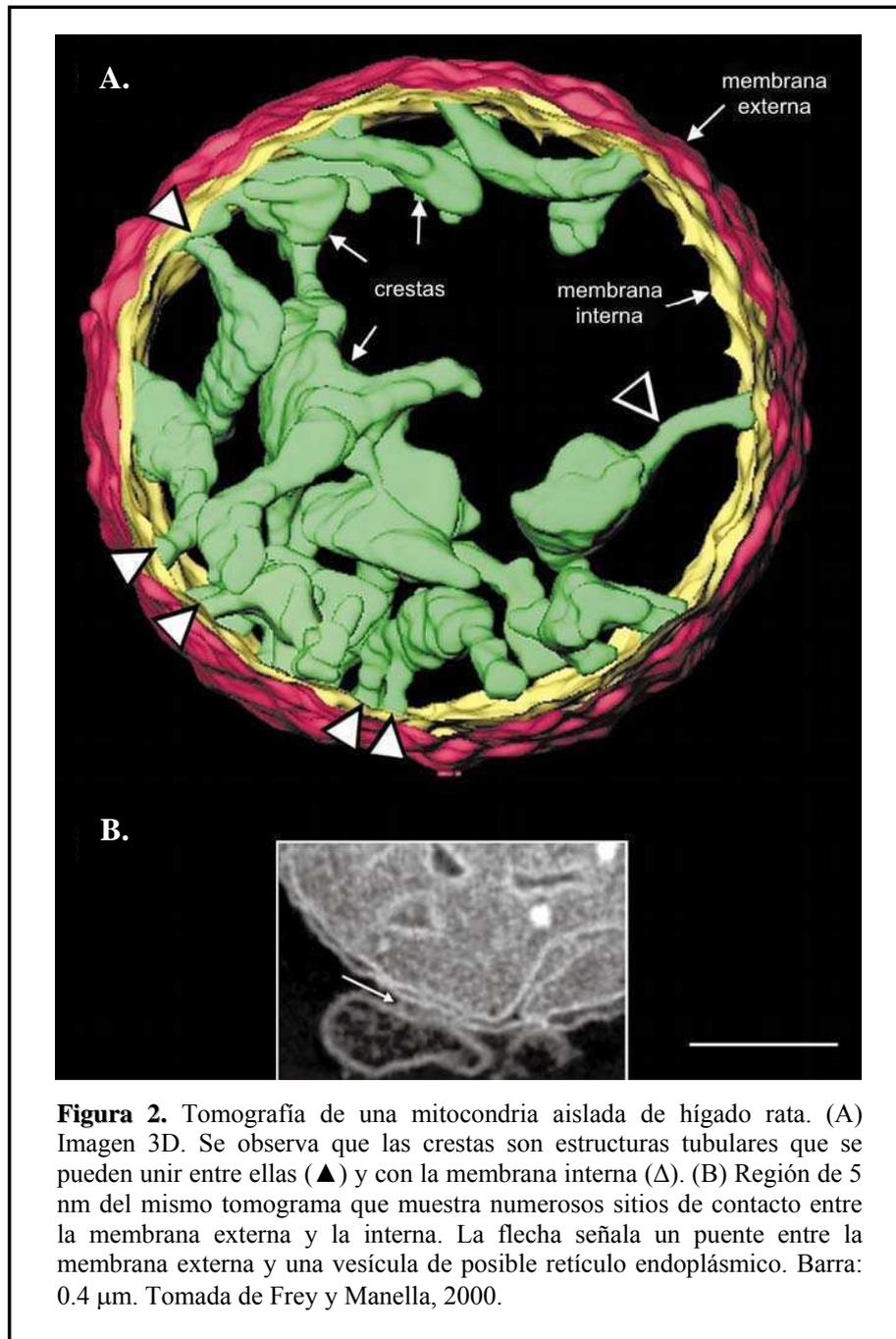
enzimas. En la matriz mitocondrial tienen lugar diversas rutas metabólicas claves para la vida, como el ciclo de Krebs, la beta-oxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los aminoácidos, y se localizan algunas reacciones de la síntesis de esteroides, urea y grupos hemo. Por lo tanto, están presentes todas las enzimas necesarias para llevar a cabo estos procesos así como también la enzima antioxidante superóxido dismutasa mangánica (Mn-SOD).



**Figura 1.** Esquema de la mitocondria y sus compartimientos.

La necesidad de reinvestigar el tema de la compartimentalización mitocondrial llevó a aplicar las nuevas tecnologías de *imaging* 3D, la tomografía por microscopía electrónica y reconstrucción en tres dimensiones. La microscopía electrónica convencional implica la toma de imágenes simples, que comprenden regiones de 50-100 nm de espesor. En la tomografía por microscopía electrónica, las imágenes de proyección múltiple representan vistas variadas de una muestra cuyo espesor puede variar de 0.25 a 1.5  $\mu\text{m}$ . Las primeras aplicaciones de esta técnica en mitocondrias aisladas de hígado de rata por Mannella y colaboradores (Frey y Manella, 2000) demostraron que el modelo estructural clásico era incorrecto dado que las reconstrucciones 3D evidenciaron la naturaleza tubular de las crestas mitocondriales que

se extienden hacia la matriz y se encuentran abiertas hacia el espacio intermembrana (Figura 2).



### Las mitocondrias y la célula

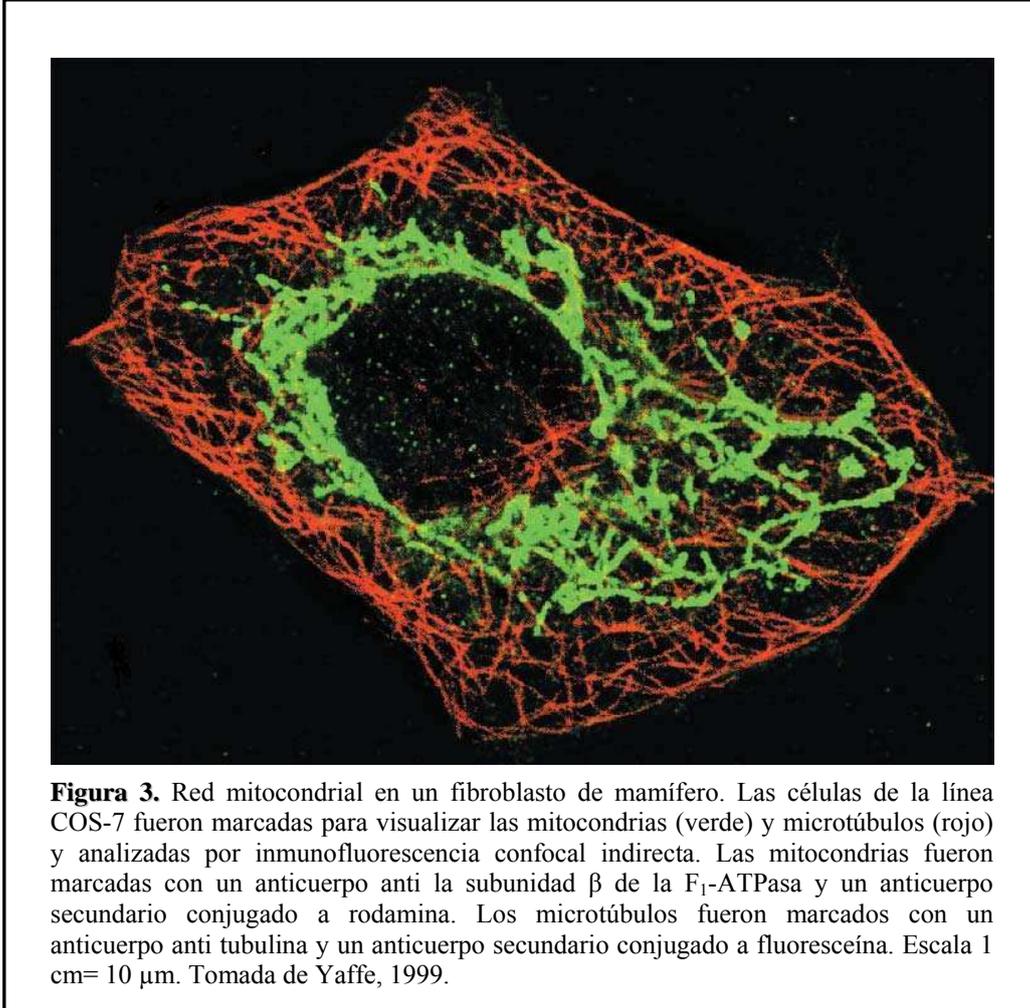
El número de mitocondrias por célula está íntimamente relacionado a la demanda energética de la misma. Los tejidos somáticos contienen desde algunas decenas hasta miríadas de mitocondrias por célula. Los espermatozoides humanos

contienen un número cercano a 15 mitocondrias mientras que los oocitos hasta 100000 (Lehninger, 1965). Aquellos órganos que son muy activos metabólicamente, como el hígado, cerebro y músculo cardíaco y esquelético, contienen el número más grande de mitocondrias y son los más susceptibles a determinadas drogas que actúan sobre estas organelas y al padecimiento de patologías mitocondriales.

Contrariamente a sus ancestros bacterianos, las mitocondrias no son entidades discretas; de hecho, las organelas aisladas son transitorias y están en constante comunicación a través de mecanismos de fusión para formar sincicios localizados o extendidos dentro de las células, constituyendo una red mitocondrial (Figura 3). Las mitofusinas involucradas en la fusión mitocondrial son GTPasas localizadas en la membrana mitocondrial externa. Los mamíferos poseen dos genes que codifican para mitofusinas, *Mfn1* y *Mfn2* (Chen y col., 2003) y además la proteína Opa1, una GTPasa de la familia de las dinaminas es esencial para que dicho proceso se lleve a cabo (Chen y col., 2005). *Mfn2* y Opa1 están asociadas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Zuchner y col., 2004). El proceso opuesto denominado fisión depende de la proteína Drp1 (dynamin-related protein; Smirnova y col., 2001), capaz de ensamblarse en membranas lipídicas resultando en su constricción o formación de vesículas dependiendo de las condiciones experimentales. La conjunción de ambos eventos, fusión y fisión, es responsable de la creación de un compartimento conectado y funcional. Por lo tanto, cambios en el balance entre fusión y fisión determinan el amplio rango de morfologías mitocondriales, desde pequeñas esferas hasta redes tubulares, como las que se observan en diferentes tipos celulares. Las mitocondrias pertenecientes a una clase morfológica particular pueden tener ventajas funcionales dependiendo del ambiente celular. Por ejemplo, las mitocondrias muy prolongadas pueden facilitar la transmisión rápida del potencial de membrana a través de distancias significativas dentro de la misma célula (Skulachev, 2001). Por el contrario, la fragmentación de la red mitocondrial puede facilitar el reclutamiento de organelas a compartimientos celulares que requieran ATP. Tal es el caso de la fragmentación de mitocondrias en neuronas de hipocampo que facilitaría la incorporación de mitocondrias en las protrusiones neuronales, que tienden a retraerse a menos que las mitocondrias sean reclutadas en zonas vecinas (Li y col., 2004).

Las células deficientes en *Mfn1* y *Mfn2* o con pérdida de Opa1 evidencian severos defectos funcionales (Chen y col., 2005). Estas células crecen muy lentamente y exhiben una actividad reducida de todos los complejos respiratorios. La deficiencia

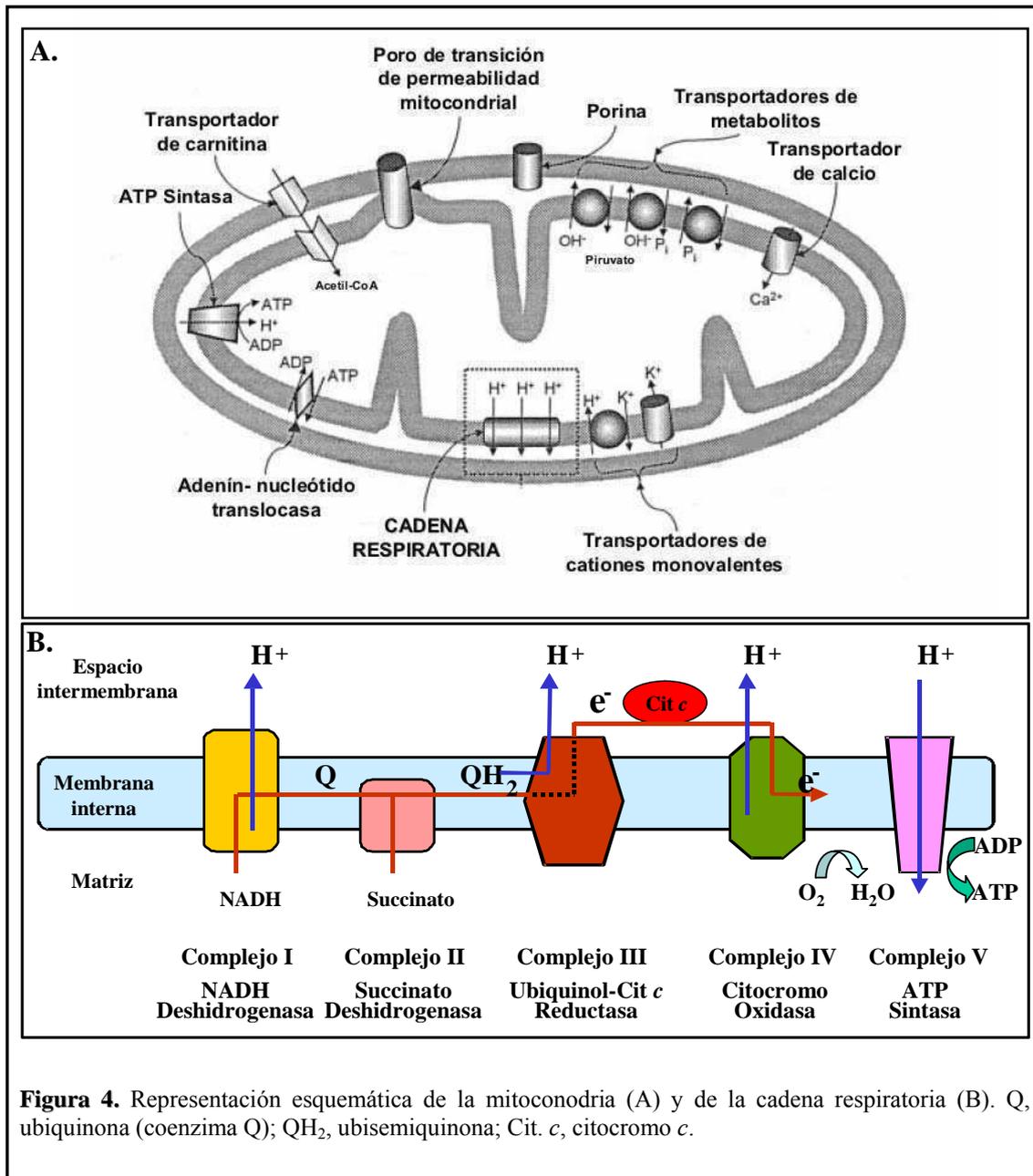
respiratoria está asociada con una heterogeneidad interorganelas vinculada a la existencia de un potencial de membrana reducido. Estas deficiencias en la función sugieren que las mitocondrias necesitan cooperar entre ellas a través de la fusión (Chen y col., 2005).



### La fosforilación oxidativa

Las mitocondrias generan la mayor parte (alrededor de un 90%) de la energía en las células animales (Saraste, 1999). Esta producción ocurre primariamente a través de un proceso denominado fosforilación oxidativa (OXPHOS), en el cual los electrones son transferidos a través de moléculas que componen la cadena de transporte de electrones. Estos electrones son generados a partir del NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido) que es producido por oxidación de nutrientes como la glucosa, y son transferidos en última instancia al oxígeno molecular. La cadena de transporte de

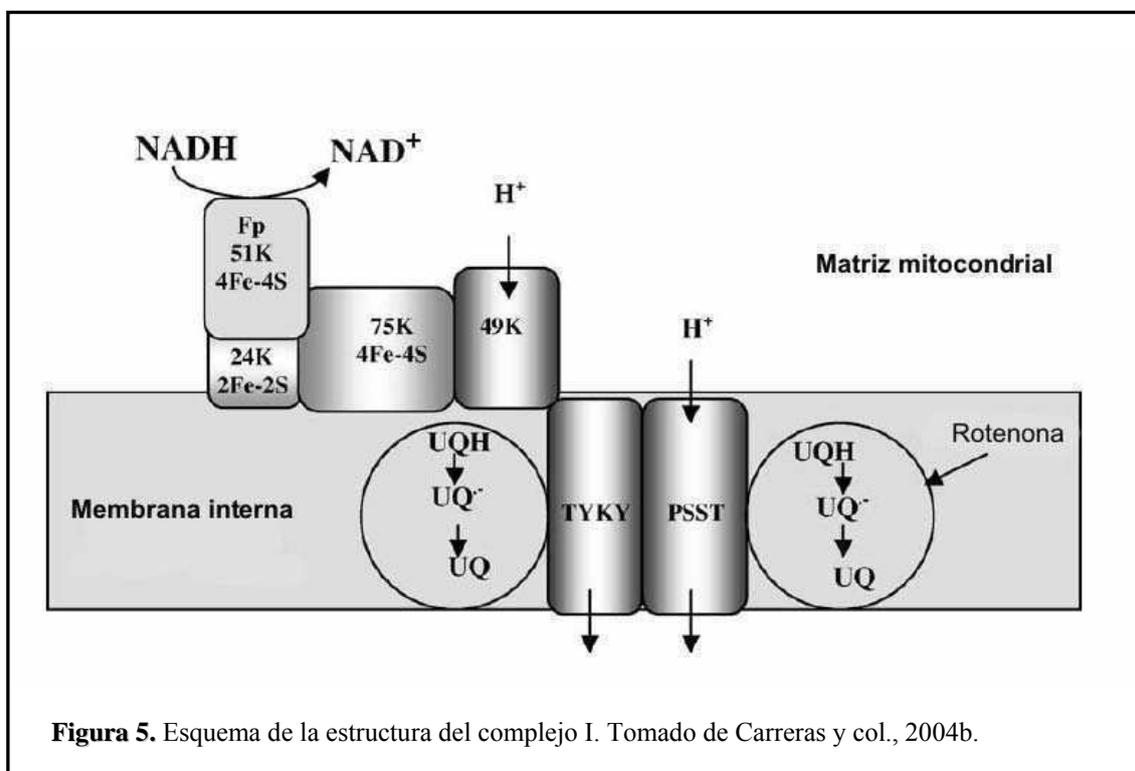
electrones consiste en cinco complejos respiratorios ensamblados en una orientación específica en la membrana mitocondrial interna. El pasaje de electrones entre estos cuatro primeros complejos libera la energía almacenada en forma de gradiente de protones a través de la membrana y luego es utilizado por la ATP sintasa (el quinto complejo enzimático) para producir ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Figura 4).



En los últimos 20 años, las investigaciones basadas en bioenergética mitocondrial han evolucionado con el salto tecnológico, pasando del estudio de

preparaciones de organelas crudas a abordajes moleculares directos. La información estructural tridimensional y los resultados cristalográficos disponibles en la actualidad han demostrado que los complejos se ensamblan en estructuras supramoleculares denominadas “supercomplejos” o respirasomas (Schägger, 2001).

El complejo I cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona, está compuesto por 40 unidades (Walker, 1992) y contiene centros flavina mononucleótido (FMN) e hierro-azufre. La distribución topológica de los componentes del complejo I se esquematiza en la Figura 5. En orden secuencial, los principales componentes del complejo I incluyen una flavoproteína de 54 kDa, proteínas de 24, 75 y 49 kDa y las proteínas TYKY y PSST unidas a la membrana interna y que transfieren los electrones a la ubiquinona; se han detectado dos *pooles* de ubiquinona unidos al complejo I (Raha y Robinson, 2000). La tasa de transferencia de electrones en el complejo I es relativamente alta; la oxidación del NADH procede a 250-500 nmol/min.mg prot, mientras que la tasa de transferencia de electrones del ubiquinol a la citocromo *c* reductasa es de 100-150 nmol/min.mg prot. El complejo I es sensible a la rotenona y el sitio de unión del inhibidor se encuentra en la subunidad PSST (Figura 5; Schuler y col., 1999).

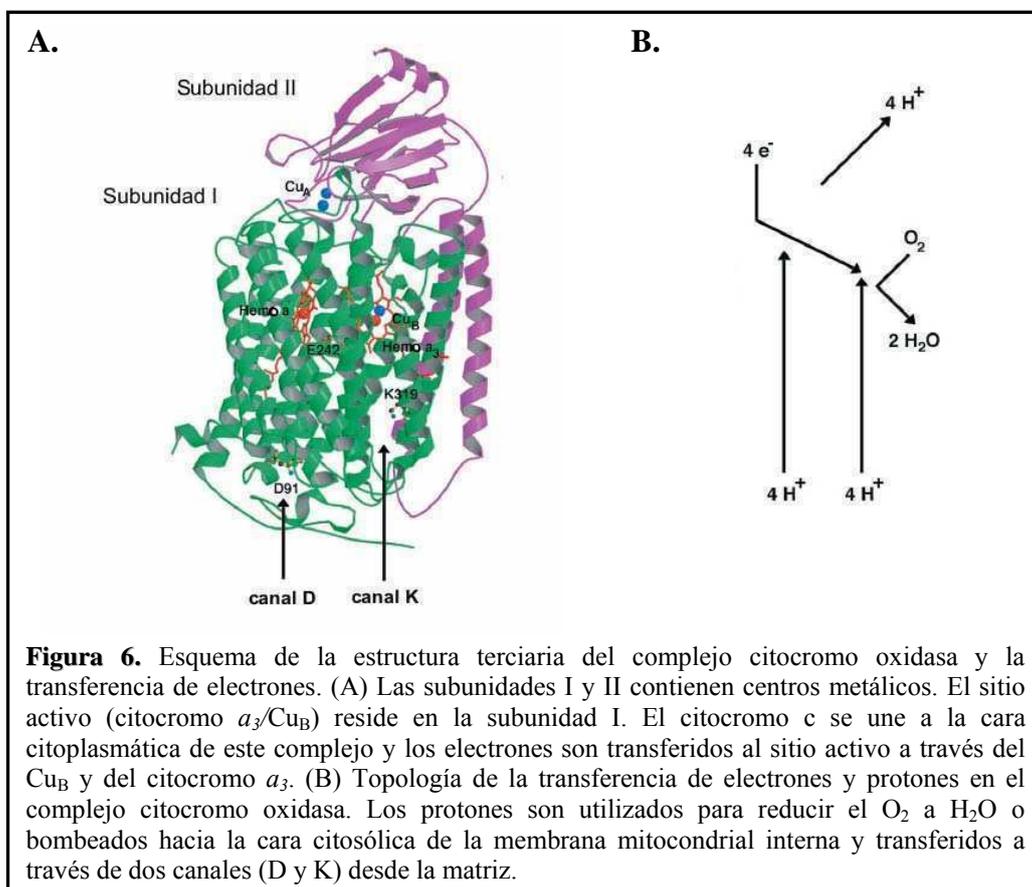


El complejo II es un componente del Ciclo de Krebs y participa en la transferencia de electrones desde el succinato hasta la ubiquinona. Contiene flavina adenina dinucleótido (FAD) y varios centros hierro-azufre (Sun y col., 2001). Se encuentra anclado a la membrana interna a través del citocromo *b*. Como la reacción de oxidación del succinato a fumarato libera menos energía, el complejo II no transloca protones al espacio intermembrana y de esta forma, sólo contribuye al transporte de electrones y no a la formación del gradiente electroquímico.

El complejo III o citocromo *bc<sub>1</sub>* es el encargado de transferir electrones desde el ubiquinol hacia el citocromo *c*. Las tres subunidades que conforman este complejo son el citocromo *b*, el citocromo *c<sub>1</sub>* y la proteína hierro-azufre de Rieske (Raha y Robinson, 2000). Esta reacción de transferencia de electrones está acoplada a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mediante un mecanismo conocido como el ciclo Q. El ubiquinol es un compuesto liposoluble que puede moverse dentro de la membrana y la oxidación de los quinoles conlleva el transporte activo de protones a través de la membrana. Este proceso requiere de la presencia de dos sitios activos, uno para la oxidación del ubiquinol y la liberación de protones sobre la cara externa de la membrana y otro para la reducción de la ubiquinona acoplada a la captación de protones del lado interno de la membrana. Este complejo es bloqueado entre el citocromo *b* y el citocromo *c<sub>1</sub>* por la antimicina A. La inhibición de este sitio hace que se acumule el radical semiquinona, lo cual aumenta notablemente la velocidad de producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) al auto-oxidarse este último a ubiquinol (Boveris y col., 1975). También puede bloquearse la transferencia de electrones entre estos citocromos con mixotiazol, sin la consecuente estimulación de la producción de radicales libres. El óxido nítrico (NO), un radical libre del nitrógeno, puede unirse a la región de citocromos *bc<sub>1</sub>* favoreciendo la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y su producto de dismutación, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ; Trumpower, 1990, Poderoso y col., 1996).

El complejo IV o citocromo oxidasa es el último complejo que interviene en el transporte de electrones (Calhoun y col., 1994) y genera un gradiente de protones transmembrana por un mecanismo diferente al del citocromo *bc<sub>1</sub>*. Su sustrato, el citocromo *c*, es una hemoproteína hidrosoluble que dona electrones hacia la cara externa de la membrana mitocondrial interna. Estos electrones son transferidos al sitio activo, el cual contiene un anillo hemo de hierro y cobre, que son utilizados para reducir al  $O_2$  a dos moléculas de  $H_2O$  (Figura 6). En los mamíferos, este complejo está formado por 13

subunidades y múltiples cofactores con centros metálicos de cobre, magnesio y zinc (Scout, 1995). El complejo utiliza la energía liberada en la transferencia de electrones para bombear dos protones al espacio intermembrana por cada dos electrones que transfiere. El complejo IV se inhibe, a nivel del grupo hemo, por cianuro, monóxido de carbono (CO), azida y  $\cdot\text{NO}$ , todos inhibidores competitivos del  $\text{O}_2$ , pero con diferente afinidad por la enzima. El  $\cdot\text{NO}$  posee alta afinidad por el complejo IV ( $\text{IC}_{50} = 0.1 \mu\text{M}$ ), que compite con el  $\text{O}_2$  por el sitio de unión a la enzima, el centro  $\text{Cu}_\text{B}$  y el citocromo  $a_3$  (Torres y col., 1995). La inactivación es reversible y dependiente de la dosis (Poderoso y col., 1996). El efecto inhibitorio del  $\cdot\text{NO}$  puede lograrse en concentraciones bajas fisiológicas (50-100 nM  $\cdot\text{NO}$  inhiben el 50% de la actividad de la citocromo oxidasa). Asimismo, al ser el  $\cdot\text{NO}$  un inhibidor competitivo de la citocromo oxidasa, si disminuye la presión parcial de  $\text{O}_2$ , aumenta el efecto del  $\cdot\text{NO}$ , y disminuye así el consumo de oxígeno. Cuando la relación  $\text{O}_2 : \cdot\text{NO}$  es 1:150, el consumo de oxígeno se reduce al 50 % del máximo (Poderoso y col., 2000). Asimismo, los efectos del  $\cdot\text{NO}$  sobre el complejo IV y el metabolismo del oxígeno son parte de mecanismos adaptativos y fisiológicos que ocurren como respuesta a cambios en la disponibilidad de  $\text{O}_2$  (Poderoso y col., 1996, 1998).



La ATP sintasa mitocondrial (ATPasa  $F_1F_0$  o complejo V) es la enzima capaz de sintetizar ATP a partir del gradiente electroquímico generado a través de la membrana mitocondrial y además puede hidrolizar ATP para bombear protones contra el gradiente electroquímico. El complejo multiproteico V en los mamíferos posee 16 proteínas diferentes (Lutter y col., 1993) y tiene un tamaño mayor a los 500 kDa. La región de membrana ( $F_0$ ) contiene el canal de protones y está unido al componente catalítico hidrofílico ( $F_1$ ), localizado en la cara matricial de la membrana, ambas porciones unidas por un tallo de dos estructuras paralelas (Böttcher y col., 1998) llamado “rotor”. La formación del gradiente electroquímico favorece la catálisis de ATP por la subunidad  $F_1$ , acoplada al bombeo de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz a través de la subunidad  $F_0$ . La oligomicina es un inhibidor del complejo V ya que se une a uno de los polipéptidos (de 23 kDa) de la subunidad  $F_0$  y de esta forma, inhibe la síntesis de ATP.

El gradiente electroquímico de protones puede disiparse en presencia de agentes desacoplantes, disminuyendo de esta forma la síntesis de ATP (Wallace y Starkov, 2000). Entre los desacoplantes se encuentran algunos compuestos de naturaleza lipofílica y con capacidad de unir y liberar protones transportándolos a través de las membranas, como ácidos débiles, algunos compuestos fenólicos e hidrazonas como la carbonil cianuro *p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). Otros compuestos desacoplantes son los ionóforos, moléculas encargadas de transportar iones pequeños a través de las membranas. También existen proteínas desacoplantes, homólogas de los transportadores aniónicos mitocondriales (UCPs), cuya expresión es inducible por diversos factores entre los que se incluyen las hormonas tiroideas, la leptina y la exposición al frío. Estas proteínas actúan como transportadores de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz, disipando de esta manera el gradiente de protones (Lanni y col., 2003).

### **El genoma mitocondrial**

Las mitocondrias difieren del resto de las organelas, dado que poseen su propio ADN. Como ya fue mencionado anteriormente, las mitocondrias derivan evolutivamente de la endosimbiosis de un organismo del grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias con un ancestro de las células eucariotas que contenía un núcleo. En ellas se llevan a cabo numerosas reacciones importantes en el metabolismo celular, tanto anabólico

como catabólico. Sin embargo, la mayor parte de los genes de la protomitocondria original se han transferido al núcleo y, en los animales, los únicos genes que han permanecido en la mitocondria están asociados a la función de síntesis de ATP. Desde el punto de vista de su biogénesis, el sistema OXPHOS representa un caso único en la célula ya que requiere la contribución de los dos genomas celulares, nuclear y mitocondrial, para su formación (Lang y col., 1999). La mayoría de las proteínas que componen la mitocondria, incluidas aquellas necesarias para la expresión de su genoma, están codificadas en el núcleo, se sintetizan en el citoplasma, generalmente en forma de precursores, y finalmente se importan, ensamblan y procesan en el interior de la organela. Por el contrario, el genoma mitocondrial codifica solamente un pequeño número de polipéptidos componentes del sistema OXPHOS y los ARNs necesarios para la síntesis de los mismos (Lang y col., 1999).

El genoma mitocondrial presenta una serie de características únicas como son la utilización de un código genético modificado, una alta tasa de mutación, poliploidía, y tener un modo de organización y expresión muy específico. Sin embargo, lo que más llama la atención es el modo de transmisión del mismo (Ephrussi y col., 1949). Debe enfatizarse que el genoma mitocondrial se hereda exclusivamente por vía materna (Anderson y col., 1989). Las pocas mitocondrias de los espermatozoides se degradan selectivamente en los primeros estados del desarrollo embrionario permaneciendo solamente las mitocondrias derivadas del óvulo que se utilizan para repoblar el nuevo individuo. Por esta razón el genoma mitocondrial ha sido utilizado para construir árboles evolutivos ya que permite trazar líneas genéticas directas. Además, su alta tasa de mutación (10 veces más alta que el ADN nuclear) hace más fácil la resolución de diferencias entre individuos cercanamente emparentados. Por otro lado, el ADN mitocondrial (ADNmt) no recombina lo que facilita la interpretación de los resultados. Este modo de herencia que impide la recombinación de los genomas mitocondriales paternos parece haber contribuido, junto con la tasa de producción de ROS en el interior de la mitocondria, a la migración de genes mitocondriales al núcleo, donde podrían sufrir recombinación y mediante el proceso de selección natural, podrían haberse eliminado variantes deletéreas (Wallace, 2007).

El ADNmt es una molécula circular, de doble cadena, superenrollada y que se encuentra presente en la matriz. La cadena pesada (H) es rica en guanina y la liviana (L) es rica en citosina. Particularmente, el genoma mitocondrial humano posee 16 kpb y contiene sólo 37 genes. Trece genes codifican para polipéptidos del sistema OXPHOS.

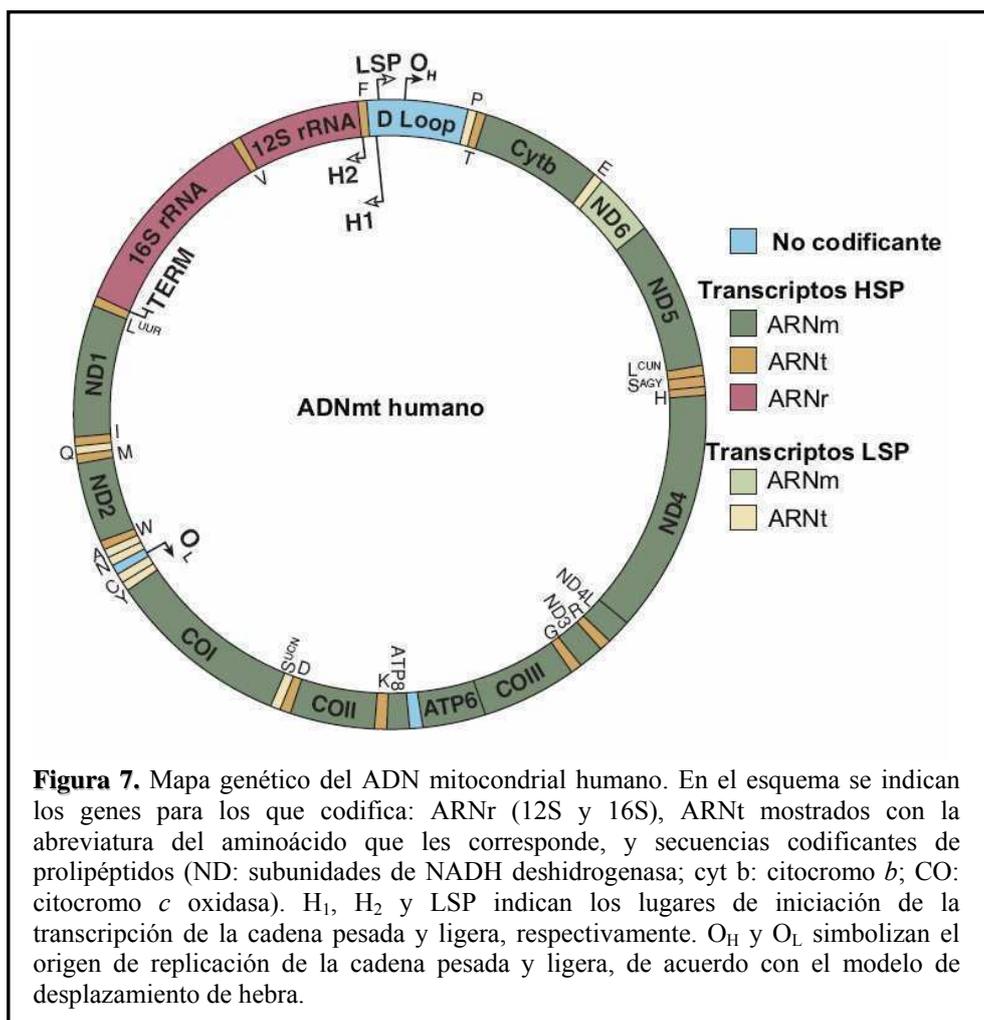
Entre estos polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial se encuentran 7 subunidades del **complejo I** o NADH deshidrogenasa (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5 y 6), 1 subunidad del **complejo III** o ubiquinol-citocromo *c* reductasa (cyt b), 3 subunidades del **complejo IV** o citocromo oxidasa (COI, II y III) y 2 subunidades del **complejo V** o ATP sintasa (ATP6 y 8). Ninguna subunidad del **complejo II** está codificada por el genoma de la organela. Además de los genes que codifican para estos polipéptidos, 22 genes codifican para ARN de transferencia (ARNt) y 2 para ARN ribosomal (ARNr) (12S y 16S) (Figuras 7 y 8).

Las moléculas de ADNmt se encuentran asociadas a proteínas específicas dentro de la organela (Garrido y col., 2003). El factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA), la proteína de unión al ADN de hebra única (mtSSB), la helicasa Twinkle y la ADN polimerasa  $\gamma$  (POL $\gamma$ ) son parte de estas estructuras denominadas nucleoides. Llamativamente, la subunidad catalítica de la POL $\gamma$  y la helicasa Twinkle poseen una alta homología con ciertas proteínas codificadas por los bacteriófagos T3 y T7. Este hecho ha llevado a proponer a ciertos autores que algunos de los genes requeridos para la replicación y expresión del ADNmt fueron adquiridos a partir de un ancestro de un bacteriófago de linaje impar, tempranamente en la evolución de la célula eucariota, y posiblemente cercanamente en el tiempo en que el evento de endosimbiosis ocurrió y con él, la aparición de las primeras mitocondrias (Shutt y Gray, 2006).

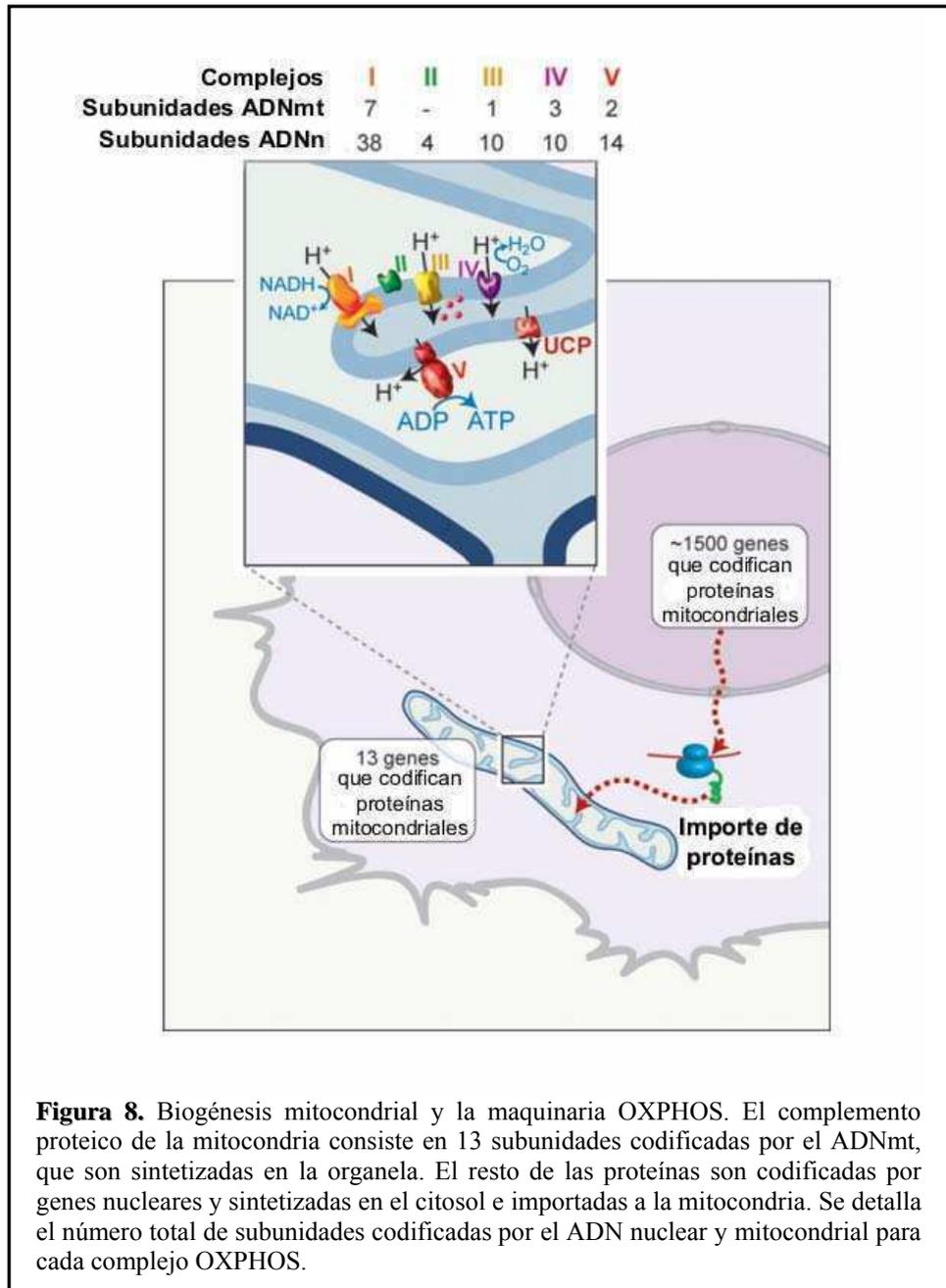
La existencia de varias moléculas de ADNmt por mitocondria (de 2 a 10) (Legros y col., 2004) y de numerosas mitocondrias por célula origina una situación particular, diferente de aquella encontrada en el núcleo, en relación al número de variantes alélicas. Así, una mutación en un ADNmt creará una población mixta de moléculas de tipo salvaje y mutante, situación conocida como heteroplasmia. En principio, el reparto de mitocondrias entre las células hijas en la división celular es al azar y esto puede provocar variaciones en los porcentajes de mutación a lo largo de las líneas germinales lo que representa la base de la afección multisistémica característica de las enfermedades mitocondriales (Legros y col., 2004).

Los desórdenes mitocondriales constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades entre las que se encuentran las encefalomiopatías. En ellas, los tejidos más afectados son el cerebro y el músculo ya que son los más dependientes del metabolismo oxidativo y están asociadas a defectos genéticos que afectan a componentes de la cadena respiratoria y a su correcto ensamblaje.

A pesar de las evidencias que apoyan la idea de transferencia de genes mitocondriales al núcleo, el ADN mitocondrial ha permanecido dentro de la organela a lo largo de la evolución. No se tiene respuesta a este hecho pero se ha sugerido una serie de causas: 1) las proteínas que están codificadas por el genoma mitocondrial presentan un alto grado de hidrofobicidad lo que dificultaría su importe a la mitocondria; de hecho, la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa y el citocromo *b* son los componentes más hidrofóbicos de la cadena respiratoria y son de los pocos polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial; 2) estas proteínas podrían ser tóxicas en el citoplasma; 3) la existencia de un genoma en la mitocondria permitiría una regulación local, rápida y más fina de la expresión de los genes que codifica; y 4) es plausible que no se haya terminado todavía de transferir toda la información que contiene al núcleo, posiblemente por el código genético diferente que utiliza (Wallace, 2007).



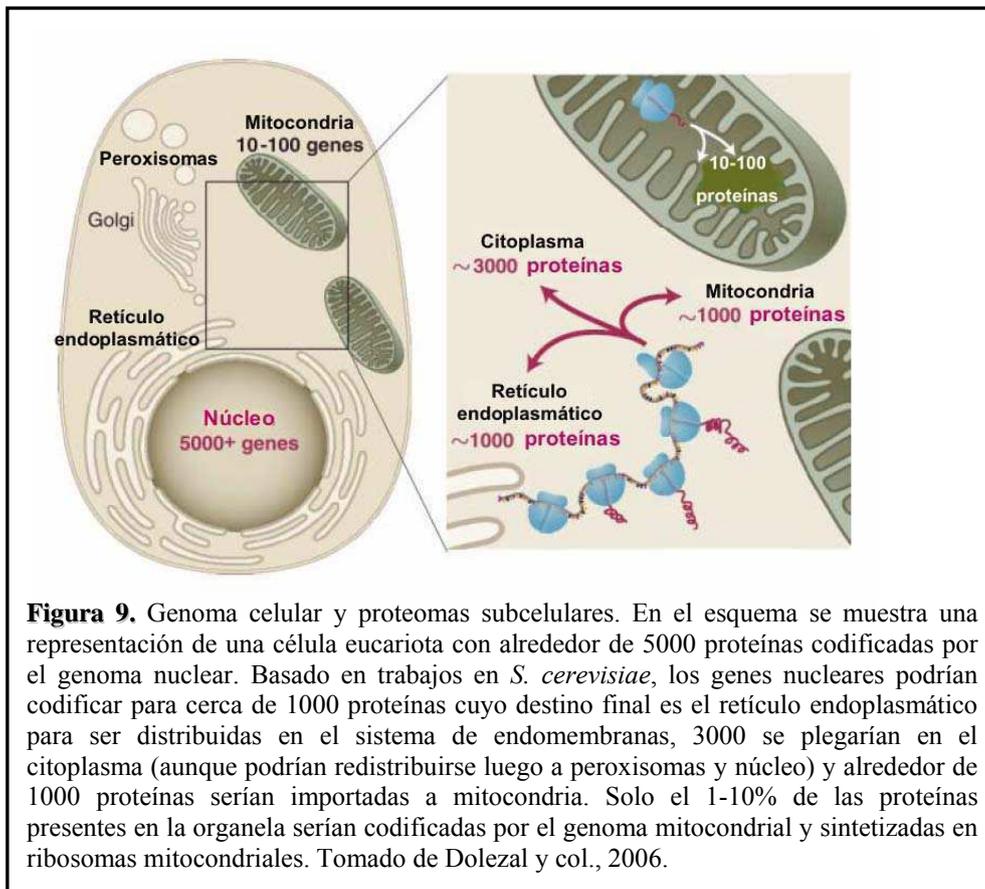
**Figura 7.** Mapa genético del ADN mitocondrial humano. En el esquema se indican los genes para los que codifica: ARNr (12S y 16S), ARNt mostrados con la abreviatura del aminoácido que les corresponde, y secuencias codificantes de polipéptidos (ND: subunidades de NADH deshidrogenasa; cyt b: citocromo *b*; CO: citocromo *c* oxidasa). H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y LSP indican los lugares de iniciación de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente. O<sub>H</sub> y O<sub>L</sub> simbolizan el origen de replicación de la cadena pesada y ligera, de acuerdo con el modelo de desplazamiento de hebra.



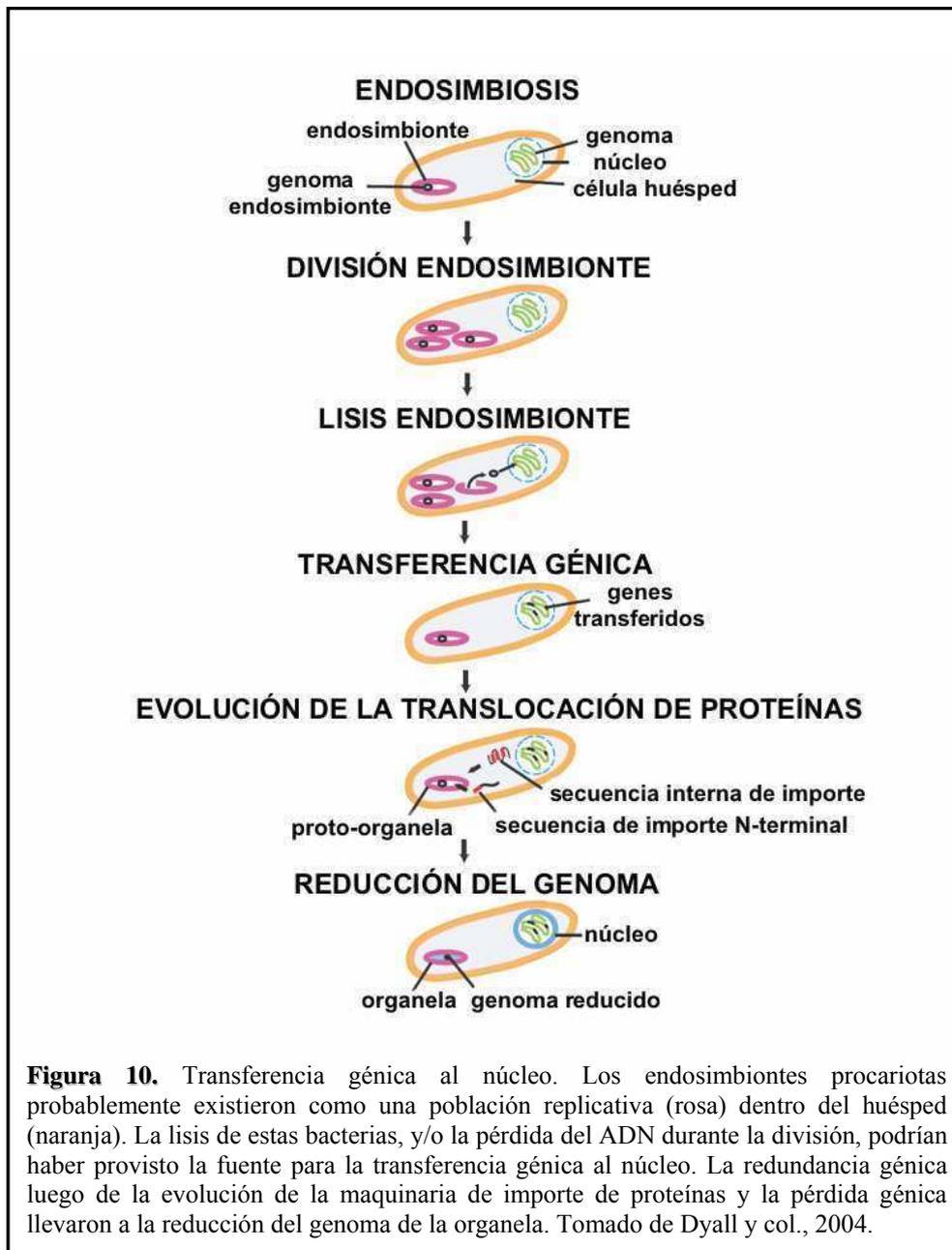
## **Translocación de proteínas a la mitocondria**

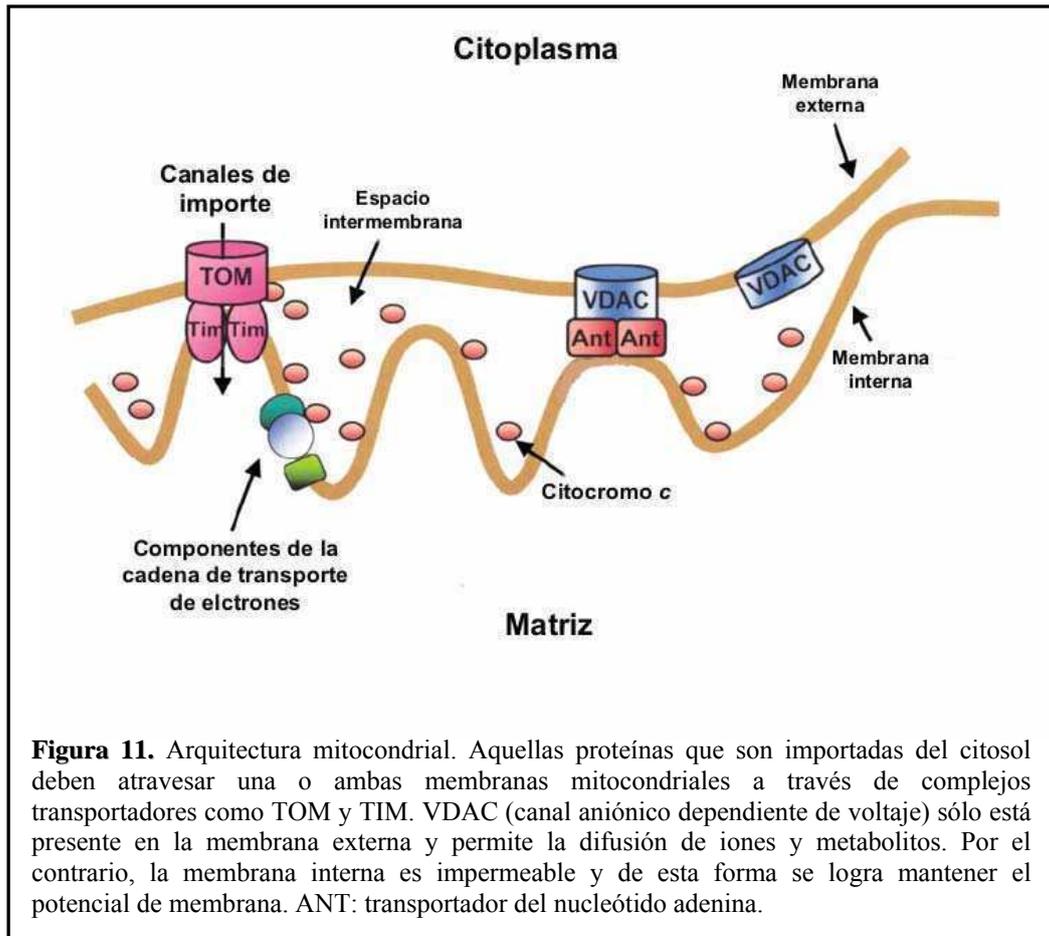
A lo largo de la evolución, la mitocondria ha sufrido cierta presión de selección para mantener las funciones codificadas por el organismo procariota que le dio origen. Este proceso fue acompañado por el establecimiento de genes nucleares que codifican para productos que optimizan la condición de aquellos compartimientos derivados de endosimbiontes (Kurland y Andersson, 2000). Ya sea por la generación *de novo* o por transferencia horizontal de genes, estos acontecimientos llevaron a una reducción masiva del genoma endosimbionte (Figura 9). Por lo tanto, se hizo evidente la evolución conjunta de sistemas de importe de proteínas que reconocieran y relocalizaran los polipéptidos codificados por el genoma nuclear en las organelas nacientes (Figura 10; Dolezal y col., 2006; Dyall y col., 2004).

El proceso de importe de proteínas a la mitocondria involucra mecanismos moleculares complejos, muchos de los cuales son dependientes de la utilización de energía. De hecho, aquellas proteínas que son liberadas de la organela durante la inducción de la apoptosis (citocromo *c*, AIF y Smac/DIABLO) son originalmente importadas desde el citosol. Resulta interesante conocer que las mitocondrias que carecen de ADN aún conservan el potencial de membrana y las funciones de importe mitocondrial a pesar de que no pueden llevar a cabo la fosforilación oxidativa. La compleja maquinaria de importe depende del destino intramitocondrial de la proteína a ser translocada y puede incluir chaperonas (que pliegan y despliegan las proteínas), translocasas de membrana externa (TOM), translocasas de membrana interna (TIM), y para las proteínas que deben alcanzar la matriz como destino final, se requieren chaperonas que utilizan ATP, necesario para que las mismas atraviesen la membrana interna y alcancen su plegado final (Schleyer y col., 1982). En la Figura 11 se esquematiza la arquitectura mitocondrial y los complejos responsables de la translocación de proteínas a la organela.



**Figura 9.** Genoma celular y proteomas subcelulares. En el esquema se muestra una representación de una célula eucariota con alrededor de 5000 proteínas codificadas por el genoma nuclear. Basado en trabajos en *S. cerevisiae*, los genes nucleares podrían codificar para cerca de 1000 proteínas cuyo destino final es el retículo endoplasmático para ser distribuidas en el sistema de endomembranas, 3000 se plegarían en el citoplasma (aunque podrían redistribuirse luego a peroxisomas y núcleo) y alrededor de 1000 proteínas serían importadas a mitocondria. Solo el 1-10% de las proteínas presentes en la organela serían codificadas por el genoma mitocondrial y sintetizadas en ribosomas mitocondriales. Tomado de Dolezal y col., 2006.





## Secuencias de importe

### - *Presecuencias:*

Algunos precursores citosólicos de proteínas mitocondriales contienen información necesaria y suficiente para dirigirlos a la organela. En la mayoría de los casos, esta información está presente en forma de una secuencia clivable en la región N-terminal, también llamada presecuencia o prepéptido. Por lo general, las secuencias de importe N-terminal se llaman MTS (*matrix-tagged sequence*) porque acercan el extremo N-terminal de la proteína dentro de la membrana interna y hasta la matriz. En ausencia de otra información, estas secuencias dirigen a la proteína hacia la matriz. Consisten en secuencias de 10-80 aminoácidos que poseen el potencial de formar hélices anfipáticas con una cara hidrofóbica y otra cargada positivamente. En la mayoría de los casos, la secuencia N-terminal es clivada de los precursores por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) a medida que los sitios de clivaje alcanzan la matriz (Lemire y col., 1989; Abe y col., 2000).

- *Secuencias internas:*

Muchos precursores mitocondriales no contienen presecuencias N-terminales pero sí poseen señales internas. Típicamente, estas secuencias carecen de patrones consistentes y la naturaleza de estas señales permanece desconocida hasta el momento, aunque fueron bien caracterizadas para la familia de los transportadores de membrana interna. En estas proteínas, la secuencia está escondida en la proteína madura entre aminoácidos importantes para el plegado y la función (Neupert, 1997; Pfanner y Geissler, 2001). Las señales internas se encuentran en proteínas destinadas a todos los compartimientos mitocondriales.

### **Chaperonas citosólicas**

Las proteínas cuyo destino final es la mitocondria se encuentran formando complejos en el citoplasma con chaperonas tales como Hsp70 y Hsp90 que las estabilizan, dado que no presentan su estado de conformación final son susceptibles de degradarse y agregarse. Además, estas proteínas son capaces de asistirles en el reconocimiento de la superficie mitocondrial. La translocasa de membrana externa 70 (Tom70) posee dominios de repetición de tetratricopéptidos (TPR) similares a los encontrados en cochaperonas citosólicas de Hsp70 y Hsp90 (Wiedemann y col., 2004) y la interacción entre las chaperonas y Tom70 es esencial para el proceso de translocación (Fan y col., 2006).

### **Translocasa de membrana externa**

El complejo TOM media virtualmente el importe de todas las proteínas de la mitocondria. Reconoce las proteínas precursoras en el citoplasma, contribuye al desplegamiento de las mismas, participa en la transferencia a través de los poros de la membrana externa y media la inserción de algunas de las proteínas cuyo destino es la misma membrana. La composición y estructura del complejo TOM es similar en animales, hongos y plantas. Está formado por 7 componentes que pueden ser agrupados de acuerdo a su función como receptores o como parte del poro de membrana. Tom20 y Tom70 son los principales componentes que reconocen a las preproteínas. Ambos se encuentran anclados por sus segmentos transmembrana N-terminal en la membrana mitocondrial externa. El dominio citosólico de Tom70 contiene 11 motivos de

repetición de tetratricopéptidos (Wu y Sha, 2006) que tienen preferencia por precursores hidrofóbicos que contienen secuencias internas de importe. Estos motivos no sólo reconocen a los precursores sino que además interactúan específicamente con las chaperonas citosólicas Hsp70 y Hsp90. La unión al ATP dispara la liberación del precursor de su chaperona y permite la inserción y pasaje a través del poro TOM (Young y col., 2003). Por otra parte, Tom20 es el principal receptor para proteínas con presecuencias N-terminal. El poro de importe general del complejo consiste en el componente central, Tom40 y tres pequeñas subunidades asociadas Tom5, Tom6 y Tom7. Tom22 conecta a Tom20 con el poro central de translocación.

### **Translocasa de membrana interna**

La translocación de proteínas de membrana interna está mediada por dos complejos denominados TIM23 (involucrado en el transporte de proteínas con presecuencia) y TIM22 (relacionado con el transporte de proteínas con secuencias de reconocimiento internas). El complejo TIM23 está formado principalmente por dos proteínas integrales de membrana, Tim23 y Tim17 (Bauer y col., 1996). Truscott y col. (2001) mostraron que Tim23 puede formar un poro en la membrana a través del cual las proteínas con presecuencia atraviesan la membrana externa. Este complejo actúa de manera coordinada con el complejo TOM entre las membranas externa e interna cuando la proteína está en tránsito. Tim44 se encuentra asociado a Tim23, que actúa como un ancla para la chaperona Hsp70 mitocondrial, de localización matricial. El complejo TIM22 incluye a las proteínas integrales de membrana Tim22 (Sirrenberg y col., 1996), Tim54 y Tim18. Tim22 tiene la capacidad de formar un poro por lo cual, es la proteína involucrada directamente en el pasaje de las proteínas con secuencias internas a través de la membrana interna (Kovermann y col., 2002). Este canal se encuentra cerrado en ausencia de precursores proteicos o cuando el potencial de membrana es bajo.

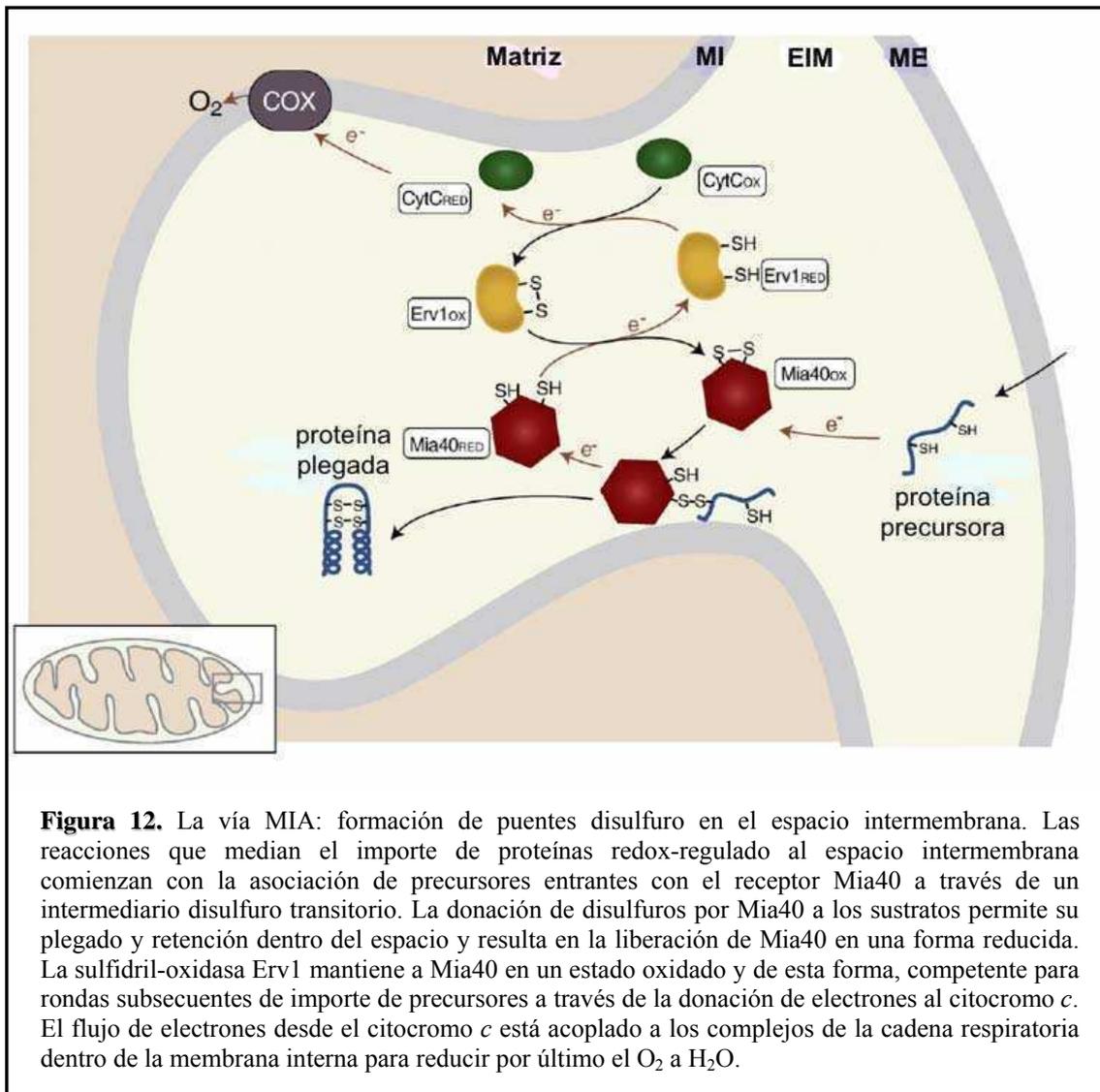
Los pequeños transportadores Tim (Tim9 y Tim10) se encuentran en el espacio intermembrana, actúan como chaperonas y están involucrados en el pasaje de las proteínas desplegadas a través del espacio intermembrana (Truscott y col., 2002).

### **Proteínas del espacio intermembrana**

Mientras casi todas las proteínas de la matriz parecen utilizar la misma ruta de importe (descrita anteriormente) y emplear ATP y el potencial de membrana para su translocación, las proteínas destinadas al espacio intermembrana se clasifican en 3 grupos diferentes basadas en su vía de importe y requerimientos energéticos. Los miembros del primer grupo tienen presecuencias bipartitas y emplean el complejo TIM23 para su importe como por ejemplo, el citocromo *b<sub>2</sub>*. Muchas proteínas proapoptóticas alcanzan el espacio intermembrana debido a sus secuencias bipartitas (AIF, Smac/DIABLO) y son clivadas por peptidasas específicas (Hartl y col., 1987). El segundo grupo está representado por proteínas de bajo peso molecular que quedan atrapadas en el espacio debido a su conformación y plegamiento. Estas proteínas, son importadas por un mecanismo independiente del complejo TIM23 y poseen las siguientes características: carecen de una secuencia N-terminal, poseen bajo peso molecular y contienen patrones conservados de residuos cisteínas (e histidinas) que favorecen la unión de cofactores o la formación de puentes disulfuro. Estas proteínas parecen ser importadas por un mecanismo de atrapamiento debido a su plegamiento, que incluye la difusión de las proteínas desplegadas a través del complejo TOM. Tal es el caso del citocromo *c*, que posee un grupo hemo que actúa como motivo de unión a cofactores o las pequeñas proteínas TIMs que contienen el motivo **Cys-X-X-X-Cys**, crucial para el importe mitocondrial y correcto ensamblado (Curran y col., 2002). Las proteínas del tercer grupo se asocian con sitios de unión sobre la membrana externa o interna y no contienen presecuencias mitocondriales como ocurre con la creatinkinasa y la adenilato kinasa (Herrmann y Hell, 2005).

El descubrimiento de la maquinaria de ensamblaje del espacio intermembrana (MIA) ha generado una nueva perspectiva, que explota el mecanismo de intercambio tiol-disulfuro, para explicar cómo la biogénesis de las pequeñas proteínas Tim y otros componentes del espacio intermembrana se lleva a cabo. Mia40 se expresa ubicuamente en hongos, plantas y animales, y posee 6 residuos cisteína esenciales, 4 de los cuales se encuentran organizados en dos motivos **Cys-X<sub>9</sub>-Cys** (Chacinska y col., 2004; Terziyska y col., 2005). Esta proteína interactúa directamente con las nuevas proteínas importadas al espacio intermembrana, y esta interacción involucra la formación de puentes disulfuro transitorios a bajo potencial redox (0.30 V), equivalente al potencial redox de la cadena respiratoria (-0.32 V en NADH a +1.14 V en COX) (Figura 12). De esta forma, Mia40 se comporta como un componente oxidante que dona disulfuros a los precursores entrantes. Este proceso constituye un mecanismo de óxido-reducción muy

delicado y se ha demostrado la existencia de una sulfidril-oxidasa dependiente de FAD llamada Erv1 que funciona en cooperación con Mia40 (Figura 12; Milenkovic y col., 2007; Herrmann y Köhl, 2007).



## Especies reactivas del oxígeno en la mitocondria

---

La mitocondria es la fuente más importante de ROS en la mayoría de las células de mamíferos (Cadenas y Davies, 2000; Turrens, 2003). Esta producción de ROS contribuye al daño mitocondrial en un gran número de patologías pero es también fundamental en la señalización redox celular normal (Dröge, 2002). El primer reporte acerca de la mitocondria como productora de ROS apareció en 1966 (Jensen, 1966) seguido de los trabajos pioneros de Chance y colaboradores que demostraron que las mitocondrias aisladas eran capaces de producir  $H_2O_2$  (Boveris y Chance, 1973; Chance y col., 1979). Más tarde, fue confirmado que el  $H_2O_2$  provenía de la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  generado dentro de la mitocondria (Loschen y col., 1971). El descubrimiento paralelo que la mitocondria contiene su propia superóxido dismutasa (Mn-SOD) confirmó el significado biológico de la producción mitocondrial de  $O_2^{\cdot -}$  (Weisiger y Fridovich, 1973).

Las especies reactivas del oxígeno incluyen al  $O_2^{\cdot -}$ , al radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) y especies no radicalarias como el  $H_2O_2$ . Por otro lado, las especies reactivas del nitrógeno (RNS) incluyen al  $\cdot NO$  y al anión peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (Kamata e Hirata, 1999). Las ROS derivan de la reducción del oxígeno molecular, componente obligado de organismos eucariotas. El producto inicial,  $O_2^{\cdot -}$  resulta de la adición de un solo electrón al  $O_2$ . Pero el  $O_2^{\cdot -}$  puede ser rápidamente dismutado por la SOD, produciendo  $H_2O_2$  y  $O_2$ , y este último puede ser reutilizado para generar  $O_2^{\cdot -}$  nuevamente. En presencia de metales de transición, el  $H_2O_2$  puede ser convertido en el radical  $HO^{\cdot}$ , altamente reactivo (Dröge, 2002).

Diferentes reacciones pueden contribuir a la generación de especies activas en las mitocondrias. A pesar de que la cadena de transporte de electrones es un sistema muy eficiente, la misma naturaleza de las reacciones alternadas de óxido-reducción en las que interviene un electrón, predispone a cada miembro de la cadena a reacciones paralelas con el  $O_2$ . De esta forma, como la ubiquinona dentro de la cadena de transporte de electrones cicla entre los estados de quinona (completamente oxidada), semiquinona (producto reducido de un electrón) y quinol (completamente reducido) existe una tendencia a que un electrón pase al  $O_2$  directamente (generando  $O_2^{\cdot -}$ ). Muchos *clusters* hierro-azufre de la cadena respiratoria también están sujetos a estas reacciones

con el  $O_2$ . Además de estas reacciones que ocurren en la cadena de transporte de electrones localizada en la membrana interna, la enzima monoamino oxidasa de membrana externa, cataliza la desaminación oxidativa de aminas biogénicas y es una fuente adicional de  $H_2O_2$  que contribuye a un aumento en la concentración en estado estacionario de especies reactivas tanto dentro de la matriz mitocondrial como en el citosol.

La tasa fisiológica de la producción mitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  depende del estado metabólico mitocondrial. El estado 4 de reposo está caracterizado por un tasa relativamente lenta de respiración, falta de disponibilidad de ADP y está asociado con un tasa baja de producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ , probablemente como consecuencia del alto estado de reducción de los componentes de la cadena respiratoria. Por el contrario, el activo estado 3, con una alta tasa de consumo de  $O_2$  y amplia disponibilidad de ADP, muestra una velocidad relativamente lenta de producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  debido al estado altamente oxidado de los componentes de la cadena respiratoria. Finalmente, el estado anóxico 5, con una limitación en el suministro de  $O_2$  y una carencia de respiración, no muestra reducción parcial de  $O_2$  a  $O_2^{\cdot-}$  ni a  $H_2O_2$  (Boveris y Chance, 1973). Además de la tasa metabólica, la presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) y la disponibilidad de ADP, la producción mitocondrial de ROS está asimismo modulada por el  $\cdot NO$  a través de mecanismos que involucran la unión reversible a la citocromo oxidasa, inhibición de la transferencia de electrones en el segmento  $bc_1$  y la oxidación del ubiquinol a ubisemiquinona con subsecuente autoxidación y generación de superóxido. Estos efectos son llevados a cabo a partir de concentraciones crecientes de  $\cdot NO$  que difunden a partir de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) o generados intramitocondrialmente por la isoforma mitocondrial (Boveris y col., 1999; Poderoso y col., 1996, 1998, 1999).

La tasa relativamente alta de producción de  $O_2^{\cdot-}$  en la membrana mitocondrial interna se encuentra en relación funcional con la localización de la Mn-SOD en la matriz. La velocidad de producción de  $O_2^{\cdot-}$ , liberado vectorialmente hacia el espacio de la matriz, y la actividad de la Mn-SOD definen una concentración en estado estacionario de  $O_2^{\cdot-}$  ( $[O_2^{\cdot-}]_{ss}$ ) estimada utilizando la aproximación donde la tasa de producción iguala a la tasa de utilización ( $+d[O_2^{\cdot-}]/dt = -d[O_2^{\cdot-}]/dt$ ). La  $[O_2^{\cdot-}]_{ss}$  en la matriz puede ser calculada considerando los aspectos anteriormente expuestos. Asumiendo que la tasa de producción de  $O_2^{\cdot-}$  por la mitocondria es de  $0.57 \times 10^{-6} M s^{-1}$ , la  $[O_2^{\cdot-}]_{ss}$  en la matriz puede estimarse en  $10^{-10} M$  (Boveris y col., 1972; Boveris y Cadenas, 1975).

Los efectos tóxicos del  $O_2^{\cdot-}$  también están mediados por el  $ONOO^-$  que se forma como consecuencia de la rápida reacción entre el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $\cdot NO$  ( $k = 1.9 \times 10^{10} M$ ). La protonación del  $ONOO^-$  es seguida por la rápida homólisis del ácido. Esto genera dos radicales de vida media muy corta, el dióxido de nitrógeno ( $\cdot NO_2$ ) y el  $HO^{\cdot}$ . Estos radicales son los mediadores de gran parte del espectro de las reacciones de oxidación del  $ONOO^-$  (Pryor y Squadrito, 1995). La altísima reactividad del  $ONOO^-$  se ve limitada en parte por su baja vida media (0.67 seg) que asegura una baja difusión (Denicola y col., 1998). Esta particularidad determina que el  $ONOO^-$  actúe solamente en el sitio en el cual es producido.

La oxidación del ubiquinol (UQH) por  $\cdot NO$  produce ubisemiquinona ( $UQ^{\cdot-}$ ) (reacción 1) que por autooxidación genera quinona (UQ) y  $O_2^{\cdot-}$  (reacción 2). Esto produce un aumento del estado estacionario de  $O_2^{\cdot-}$  y por lo tanto aumenta también la capacidad de reaccionar con el  $\cdot NO$  formando  $ONOO^-$  (reacción 3; Poderoso y col., 1999).



El  $\cdot NO$  también inhibe la transferencia de electrones por el complejo III, a nivel de la región de los citocromos  $bc_1$  (Poderoso y col., 1996, 1998). La consecuencia de esta inhibición es nuevamente el aumento de los niveles de ubisemiquinona y por lo tanto de  $O_2^{\cdot-}$  y de  $ONOO^-$  (reacciones 2 y 3). Por lo tanto, el control fino que el  $\cdot NO$  ejerce sobre de la regulación del consumo de oxígeno, llevado a cabo a través de reacciones de oxido-reducción que involucran a los complejos I, III y IV y al ubiquinol, es de gran relevancia para la fisiología mitocondrial con implicancias en la producción energética celular.

El  $H_2O_2$  difunde fuera de la mitocondria y contribuye a la concentración de  $H_2O_2$  en el citosol. El equilibrio entre la velocidad de producción y la velocidad de degradación de esta molécula por las enzimas citosólicas catalasa y glutatión peroxidasa, lleva a la concentración de  $H_2O_2$  en el estado estacionario ( $[H_2O_2]_{ss}$ ) (Allen y Tresini, 2000), que está definida por la siguiente ecuación:

$$+d[H_2O_2]/dt = -d[H_2O_2]/dt = k1 [\text{peroxidasa}] + k2 [\text{catalasa}]$$

donde:  $+d[\text{H}_2\text{O}_2]/dt$  es la tasa de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependiente de L-arginina,  $k1$  es la constante para la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa, y  $k2$  la constante de reacción de segundo orden para el metabolismo del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la catalasa (Allen y Tresini, 2000).

Durante muchos años, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue considerado como el subproducto inevitable pero indeseado de la existencia aerobia. Dado el daño inflingido por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se asumía que, cuanto más rápida fuera la eliminación de este tóxico, mejor sería para la célula. Sin embargo, hoy en día se sabe que las células de mamífero son capaces de producir  $\text{H}_2\text{O}_2$  y mediar diversas respuestas fisiológicas como proliferación, diferenciación y migración (Sundaresan y col., 1995; Rhee y col., 2000). Esta visión ha llevado a plantear implicancias de la señalización “redox” celular en la regulación de procesos normales y la progresión de patologías, incluyendo angiogénesis, estrés oxidativo, envejecimiento y cáncer. Este cambio en la interpretación del rol del  $\text{H}_2\text{O}_2$  ha evolucionado a partir de un entendimiento más claro de la química redox y su influencia en la biología, es decir, de la señalización celular basada en mecanismos reductivo-oxidativos. Particularmente, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  está implicado en modificaciones reversibles de cisteínas que subyacen el control de la homeostasis celular y diversas respuestas biológicas. A medida que los componentes y mecanismos involucrados en la bioquímica celular redox se hicieron más definidos, surgieron nuevas áreas de investigación sustentadas en la influencia espacio-temporal del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las vías de señalización intracelular.

### **Defensas antioxidantes**

Las células poseen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para eliminar las ROS/RNS y mantener la homeostasis redox. Un grupo principal de antioxidantes enzimáticos, que catalizan la dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  está constituido por la superóxido dismutasa (SOD). Existen múltiples isoformas de SOD en diferentes compartimientos celulares. La SOD1 (Cu/Zn-SOD) es el principal *scavenger* de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en el citoplasma, el espacio intermembrana, el núcleo y los lisosomas, mientras que la SOD2 (Mn-SOD) y la SOD3 son enzimas exclusivas de las mitocondrias y matriz

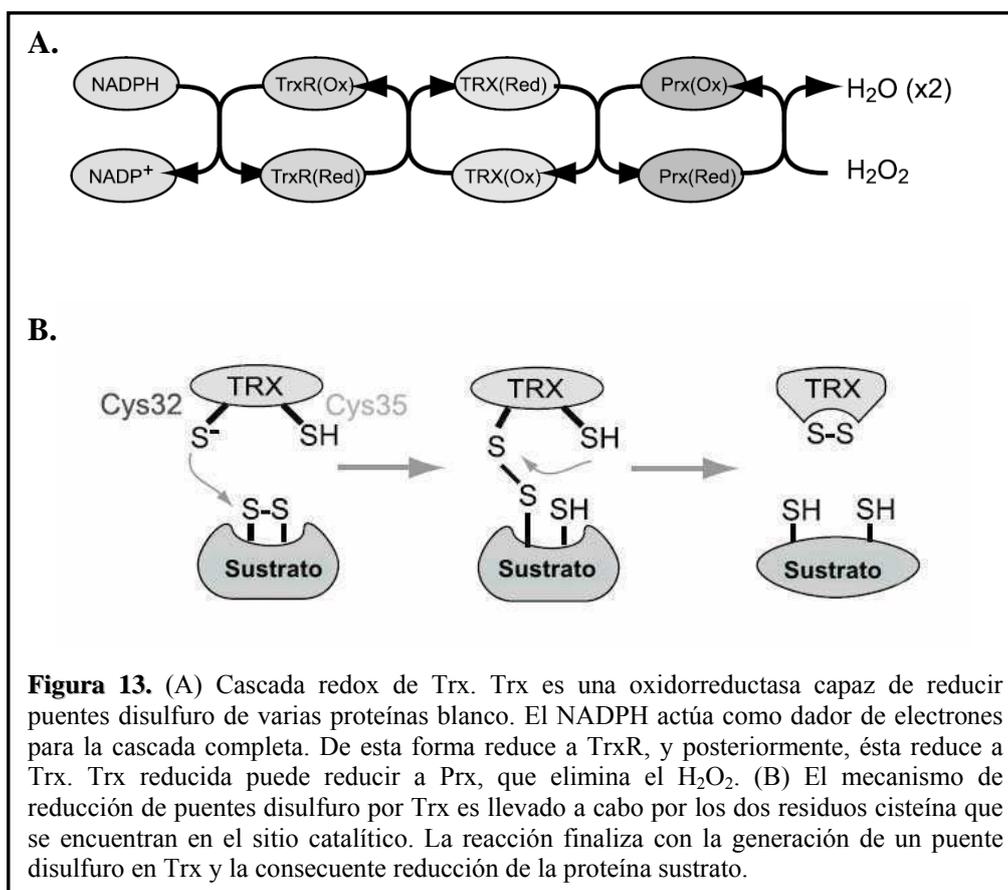
extracelular, respectivamente (Faraci y Didion, 2004). La posterior conversión de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$  ocurre a través de la acción de la catalasa, una enzima que habitualmente se encuentra localizada en los peroxisomas, pero que también se localiza en las mitocondrias, con una actividad variable según los distintos tejidos (Radi y col., 1991), interpretándose su concentración como un marcador aeróbico (Mayer, 1980). El  $H_2O_2$  puede ser convertido también a  $O_2$  a través de reacciones acopladas a la conversión de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG), catalizado por la glutatión peroxidasa (GPX). En humanos se encuentran presentes 5 isoformas de GPX dependientes de selenio (Brigelius-Floh, 2006). GPX1 se expresa de forma ubicua y es el principal *scavenger* para  $H_2O_2$  e hidroperóxidos lipídicos. GPX2 es específica de epitelios y está altamente expresada en el tracto gastrointestinal, mientras que GPX3 es una enzima glicosilada extracelular que se encuentra presente en plasma. Resulta interesante, que GPX3 puede usar tiorredoxina (Trx) y glutarredoxina en adición a GSH como dadores de electrones para reducir un amplio espectro de hidroperóxidos. GPX4 está presente en fracciones nucleares, citosólicas y mitocondriales, con variantes de *splicing*, y es la principal enzima que previene la oxidación de fosfolípidos de membrana. Una isoforma recientemente descubierta, la GPX6 está localizada preferencialmente en las mucosas de los tejidos embrionarios. Además, enzimas tales como las glutatión-S-transferasas (GSTs) poseen una actividad peroxidasa independiente de selenio (Sheehan y col., 2001).

Los antioxidantes no enzimáticos son reconocidos por ejecutar reacciones de intercambio tiol-disulfuro, pero también juegan un rol central en el mantenimiento del balance redox celular. Además de ser un cofactor de varias enzimas antioxidantes, el GSH posee numerosas funciones. Éstas incluyen el *scavenging* directo de  $HO^\cdot$ , oxígeno singulete y la regeneración de otros antioxidantes como vitamina C y E a sus formas activas (Nakamura y col., 1997).

### **Tiorredoxinas**

El sistema de tiorredoxinas constituye un mecanismo antioxidante de tioles muy importante e incluye a las Trx y a las tiorredoxín-reductasas (TrxR). Las Trx son proteínas multifuncionales de 12 kDa que contienen dos cisteínas redox-sensibles en su sitio activo y un sitio activo conservado (**Cys-Gly-Pro-Cys**; Bourdon y Blache, 2001; Kondo y col., 2006). Estas proteínas se encuentran conservadas en muchos tipos de

organismos procariotas y eucariotas. Muchas proteínas son sustratos para la actividad de Trx como las peroxirredoxinas (Prx) que neutralizan el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y su actividad es reconstituída *in vitro* por acción de las TrxR y del NADPH. Con respecto al mecanismo de actividad oxidoreductasa de Trx, se sabe que los dos residuos cisteína del motivo catalítico juegan roles diferentes (Figura 13A; Kallis y Holmgren, 1980). El grupo tiol del residuo cisteína N-terminal (Cys<sup>32</sup> en Trx1 de humanos) ataca uno de los átomos de azufre de los residuos cisteína que forman puentes disulfuro en proteínas sustratos. El grupo tiol de la cisteína N-terminal es fácilmente desprotonado por los residuos que lo rodean, incluyendo el Asp<sup>26</sup> y puede de esta forma realizar un ataque nucleofílico (Dyson y col., 1997). Esto resulta en la formación de una reacción intermediaria entre Trx y la proteína sustrato que está unida por un puente disulfuro. La reacción subsiguiente es realizada por el grupo tiol del residuo cisteína C-terminal (Cys<sup>35</sup>), que ataca el átomo de azufre del residuo cisteína N-terminal formando el puente disulfuro en el complejo intermediario y liberando la proteína sustrato de Trx. En consecuencia, se forma un puente disulfuro entre los dos residuos cisteína de Trx que posteriormente es reducido por la TrxR (Figura 13B; Thelander, 1967).



En la actualidad se conocen dos Trx de mamíferos, Trx1 y Trx2 (Spyrou y col., 1997). Trx1 es una proteína ubicua que tiene múltiples funciones. Juega un rol muy importante como molécula clave en la cascada de neutralización de ROS. Si bien en esta cascada Trx1 reduce a Prx, que luego directa y eficientemente neutraliza las ROS, numerosos reportes indican que Trx1 es también capaz de neutralizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> directamente, y puede proteger a las células del estrés oxidativo reduciendo los puentes disulfuro incorrectos de determinadas proteínas (Funato y Miki, 2007). Esta isoforma se localiza principalmente en el citosol y transloca al núcleo cuando las células son estimuladas con tratamientos que generan ROS. Una vez en el núcleo, Trx1 modula el estado redox de factores de transcripción y sus proteínas reguladoras como NF-κB y Ref-1 y controla la actividad transcripcional (Hayashi y col., 1993; Hirota y col., 1997). En 1997, Spyrou y colaboradores reportaron una proteína novel con alta homología a Trx1 y la denominaron Trx2. Esta isoforma se localiza en mitocondria y posee una secuencia de 60 aminoácidos en el dominio N-terminal que le marca a la proteína su destino mitocondrial. Además, Trx2 parece ser más resistente a la oxidación que Trx1 (Spyrou y col., 1997). Numerosos reportes han descripto un aumento en los niveles de ARNm de Trx1 en tumores de mama y otros tipos de cáncer sólidos como colon, hígado, pulmón y próstata (Cha y col., 2009). El aumento en los niveles proteicos de Trx1 podría estar relacionado con la resistencia a la quimioterapia (Arnér y Holmgren, 2006).

---

## Transducción de señales y evolución del kinoma

---

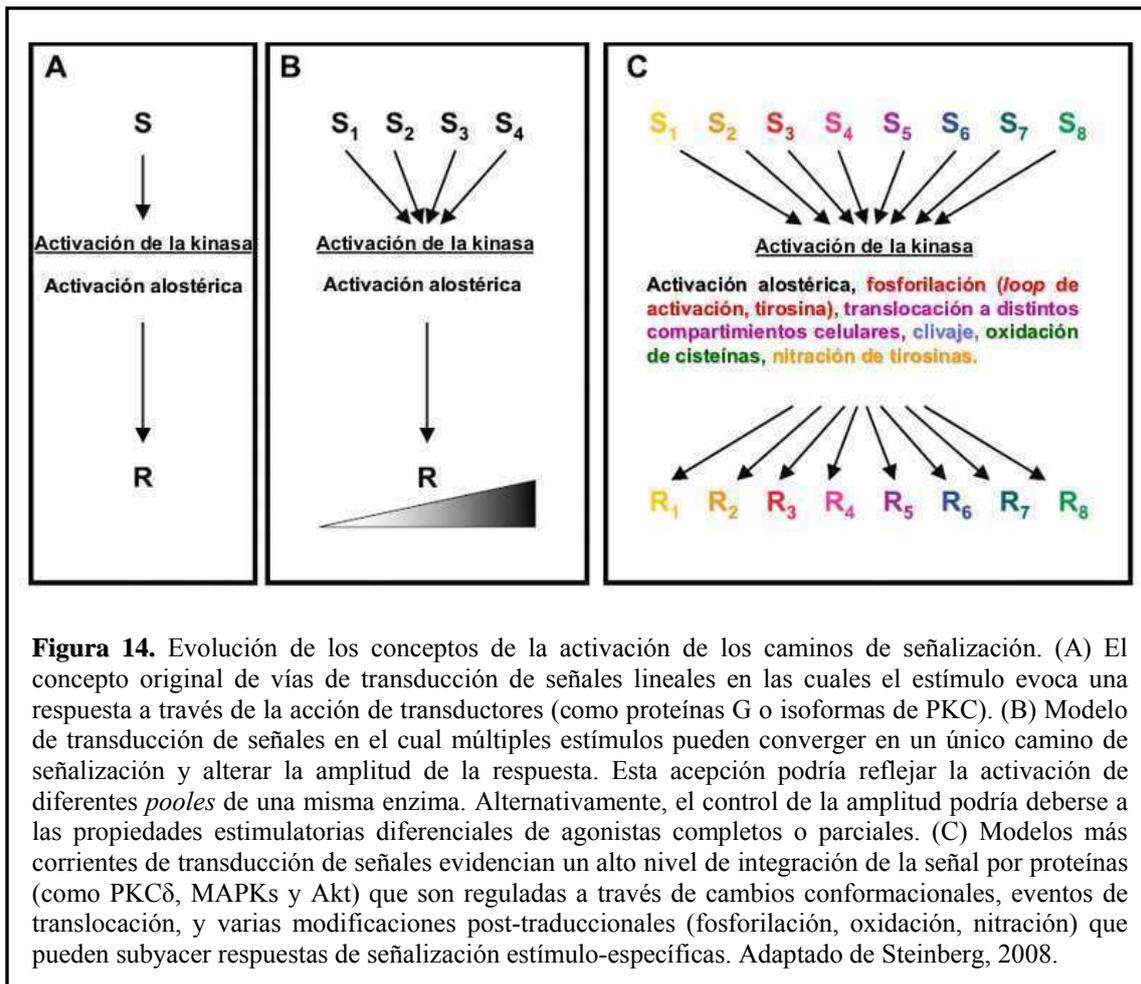
Las cascadas de señalización celular median el desarrollo ordenado, crecimiento, homeostasis y reproducción de organismos multicelulares. Este sistema le permite a las células responder a los estímulos ambientales integrando numerosas señales extra e intercelulares en una respuesta coordinada. El término “transducción de señales” fue acuñado por primera vez en 1969 por Martin Rodbell en un intento por describir cómo las células reciben, procesan y en última instancia, transmiten información de señales externas como hormonas, drogas o incluso la luz. Rodbell consideraba a la transducción de señales como un proceso en el cual los receptores de superficie celular reciben información del medio exterior y la transmiten a un amplificador (o efector como la adenilato ciclasa) a través de alguna forma de mensajeros intracelulares. De esta forma definió el término “transductor” para la molécula encargada de procesar esta información, identificando a las proteínas G y recibiendo en 1994 el Premio Nobel en Fisiología y Medicina. Originalmente, entendía a los transductores de señales como interruptores de encendido/apagado (Figura 14A). Sin embargo, este sencillo modelo fue revisado subsecuentemente para incorporar muchas proteínas que actúan como reóstatos y que controlan la amplitud de la señal de salida (Figura 14B). Estudios recientes sugieren un nivel de control molecular más alto por medio del cual, determinadas moléculas de señalización actúan como mini-procesadores que integran señales de múltiples estímulos extracelulares a través de cambios conformacionales funcionalmente importantes en respuesta a cofactores, eventos de translocación y modificaciones post-traduccionales (fosforilación, nitración de tirosinas, oxidación de cisteínas) como modo de sensado del microambiente intracelular ajustando la señal de salida (Figura 14C). Este tipo de control regulatorio aún más elaborado y matizado es probablemente un mecanismo general que se aplica a muchas proteínas señalizadoras, sugiriendo que el campo de la transducción de señales se encuentra aún en etapas de extenso estudio (Steinberg, 2008).

Desde el descubrimiento hace casi 50 años atrás de la fosforilación reversible como moduladora de la actividad de la glucógeno sintasa (Friedman y Larner, 1963), ha surgido un vasto interés en el rol de la fosforilación en la regulación de la funcionalidad de las proteínas. La secuenciación completa del genoma humano ha permitido la

identificación de casi todas las proteín-kinasas humanas y el tamaño considerable del kinoma se ha estimado en un 2% de todos los genes (Manning y col., 2002). De esta forma, las proteín-kinasas eucariotas constituyen una de las familias de genes más grande de todos los eucariotas. La distribución de las subfamilias de kinasas entre los *phyla* ha demostrado que existían 53 tipos de kinasas en el antecesor común a todos los eucariotas. La emergencia de los metazoos vino acompañada de 76 nuevas clases de kinasas, incluyendo el grupo tirosín-kinasa mientras que las levaduras han perdido 28 clases de su antecesor (Manning y col., 2002).

A pesar de la divergencia evolutiva, la mayoría de las proteín-kinasas contienen un dominio catalítico que pertenece a la superfamilia de proteín-kinasas eucariotas (ePK) y todas las otras proteín-kinasas se clasifican como proteín-kinasas atípicas (aPKs). Las ePKs se clasifican en 7 grupos principales y se subdividen en familias y hasta subfamilias, basadas en la secuencia de sus dominios ePKs: AGC, CAMK, CMGC, CK1, STE, TKL y TK kinasas (<http://kinase.com>). Todas las proteín-kinasas participan en las vías de transducción de señales fosforilando su sustrato y en consecuencia, modificando la actividad del mismo (activación o inactivación) y de esta forma, desencadenando una respuesta celular determinada ante el estímulo recibido.

Los sistemas de señalización intracelular no son exclusivos de células eucariotas sino que también juegan un rol fundamental en los organismos procariotas. Las ePKs poseen una gran riqueza de ancestros filogenéticos en procariotas que comparten el mismo mecanismo catalítico y se las denomina ePK-like (ELK). Solamente unas pocas han sido estudiadas en profundidad aunque la secuenciación del genoma ha provisto de nuevas perspectivas en estos grupos y ha permitido analizar 45000 secuencias de PKL que se han agrupado en 20 familias principales, en contraposición a la mayoría de las kinasas del genoma humano que corresponden a una única familia, la ePK (Kannan y col., 2007). La mayoría de los mecanismos de señalización en procariotas se pensaba que ocurrían a través de kinasas histidín-aspartato estructuralmente distintas. Sin embargo, existe evidencia acerca de la importancia de diferentes familias de ELKs en procariotas y los estudios cristalográficos han demostrado la gran similitud en la estructura y mecanismo catalítico con las ePKs (Kannan y col., 2007).



## Akt/Proteín-kinasa B

---

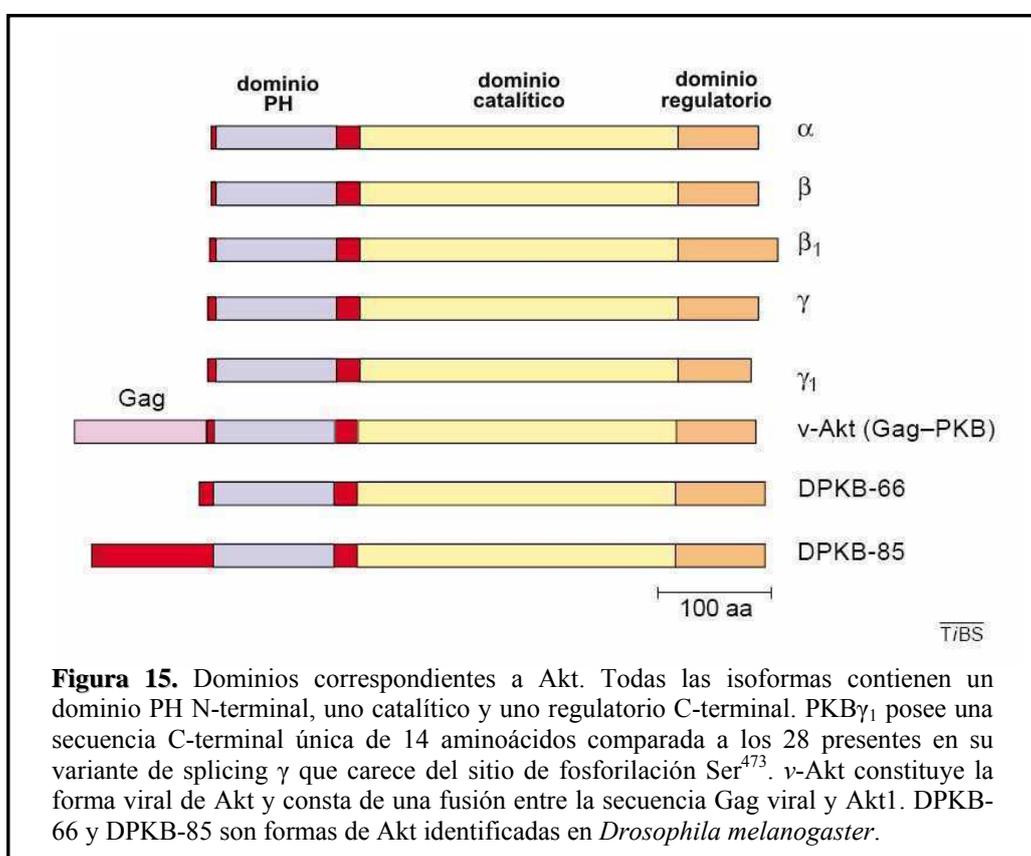
Las primeras investigaciones sobre Akt se remontan a su descubrimiento por Staal y colaboradores en 1977, en un virus transformante de leucemia, en ratones con una alta incidencia de linfomas espontáneos. Este virus, llamado Akt8 producía focos de transformación maligna en la línea epitelial CCL-64. Una característica única de Akt8 era su incapacidad de inducir formación de focos en otras líneas celulares como fibroblastos NIH/3T3, lo que sugería que el virus contenía previamente un oncogén aún no descrito. El grupo de Staal aisló este retrovirus a partir de la línea CCL-64 infectada con Akt8 y demostró que contenía una secuencia oncogénica procedente de la célula, a la cual llamaron Akt (Staal y col., 1977). A pesar de las características importantísimas de Akt, la identidad de este oncogén transformante responsable de estos efectos permaneció desconocida por muchos años.

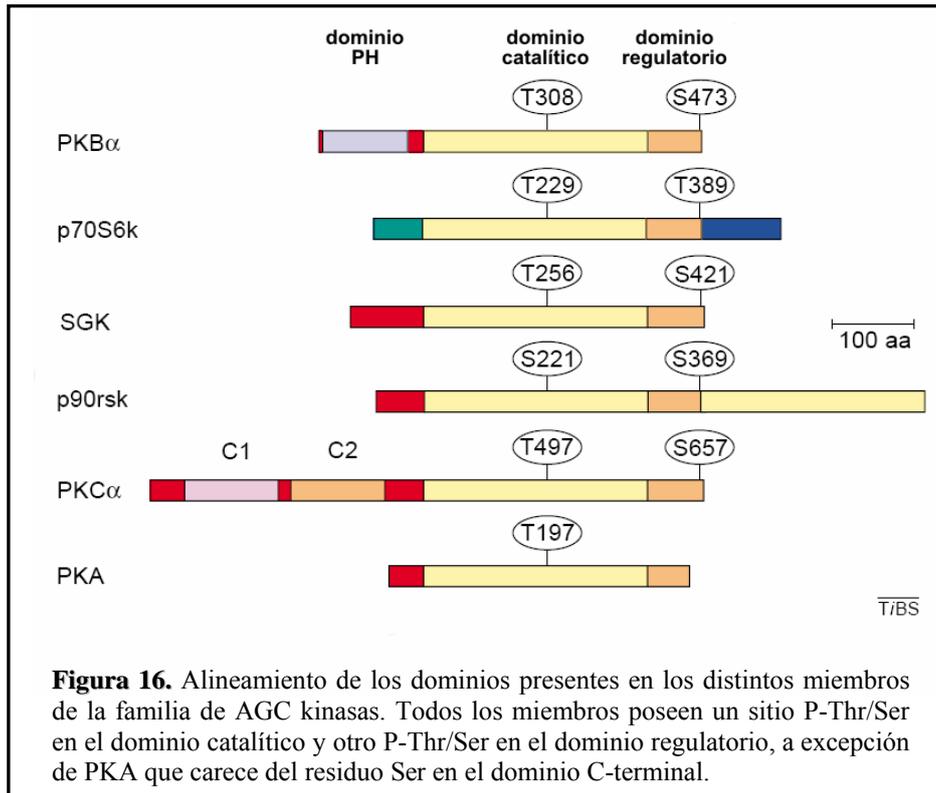
En 1991, tres grupos de investigación independientes identificaron el gen correspondiente a Akt/PKB. El primero de estos reportes (Jones y col., 1991) identificó un gen que codificaba para una serín-treonín-kinasa, al que llamaron Rac (relacionada con PKA y PKC kinasas), subsecuentemente renombrada Akt/PKB. Estos autores demostraron la actividad kinasa *in vitro* utilizando histona H1 como sustrato. El mismo año, un segundo reporte de Bellacosa y colaboradores (Bellacosa y col., 1991) describió el clonado de *v*-Akt. La proteína codificada constituía una fusión entre la proteína viral Gag y la isoforma  $\alpha$  de PKB. En forma similar, describieron la semejanza de Akt con PKC y sugirieron que la migración retardada de la proteína en un SDS-PAGE era el resultado de la fosforilación de la misma. Finalmente, Coffey y Woodgett usaron una técnica de *screening* por PCR para identificar un ADNc novel de homología significativa con PKA y PKC, al que llamaron PKB (Coffey y Woodgett, 1991). Junto con el descubrimiento de una segunda isoforma Akt2/PKB $\beta$ , los tres trabajos establecieron a Akt como una nueva proteín-kinasa ampliamente expresada e implicada en diversos procesos celulares.

En la actualidad, se han identificado tres isoformas de Akt en células de mamíferos: Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  y Akt3/PKB $\gamma$  (Figura 15) involucradas en el metabolismo de la glucosa, regulación de la transcripción, proliferación, apoptosis, migración y angiogénesis. Las tres isoformas se encuentran codificadas por genes

ubicados en distintas regiones cromosómicas, correspondiendo en humanos la ubicación 14q32.32 para Akt1, 19q13.1-q13.2 para Akt2, y 1q43-q44 para Akt3. El análisis de la secuencia aminoacídica de Akt revela la existencia de una región N-terminal denominada *pleckstrin homology* (PH) que comprende cerca de 100 aminoácidos. Este motivo fue reconocido inicialmente en la pleckstrina, el principal sustrato de PKC en las plaquetas. A pesar que el dominio PH no es altamente conservado en todos los eucariotas, su estructura sí lo es. Ésta consta de siete láminas plegadas  $\beta$  antiparalelas que forman un bolsillo hidrofóbico constituyendo módulos con afinidad de unión a lípidos, además de estar involucrados en interacciones proteína-proteína. A continuación del dominio PH, la secuencia de Akt consta de un pequeño segmento conector  $\alpha$ -hélice, un dominio catalítico o kinasa y un dominio C-terminal regulatorio (Figura 15).

Akt pertenece al grupo de proteín-kinasas que integran la llamada familia AGC (proteín-kinasa A, proteín-kinasa dependiente de GMPc y proteín-kinasa C). Las AGC kinasas contienen regiones de alta homología en sus dominios kinasa. Asimismo, para su completa activación requieren ser fosforiladas en un residuo del dominio kinasa y en otro ubicado en el motivo hidrofóbico C-terminal (Figura 16).





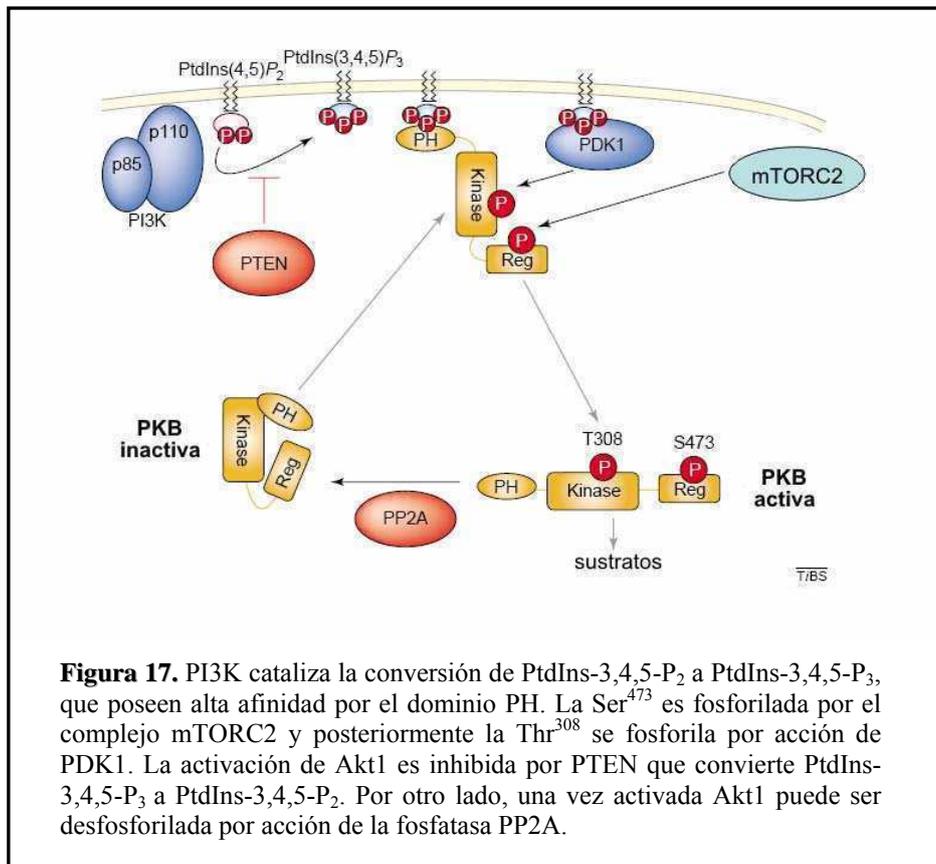
Mientras el ARNm de Akt1 es ubicuo, la expresión de Akt2 es elevada en tejidos que responden a la insulina, como la grasa parda, el músculo esquelético y el hígado. La expresión de Akt3 es ubicua y presenta bajos niveles en músculo esquelético e hígado. Akt1 está involucrada principalmente en mecanismos de proliferación celular y los ratones mutantes para Akt1 exhiben un tamaño pequeño desde el nacimiento hasta la adultez (Chen y col., 2001). El retardo en el crecimiento afecta tanto tejidos embrionarios como extraembrionarios. Akt2 es requerida para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa; su ausencia lleva a la hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, en forma semejante a algunas características clínicas importantes de la diabetes mellitus tipo 2 en humanos. Los ratones que carecen de Akt2 son diabéticos e incapaces de disminuir los niveles de glucosa en respuesta a la insulina. En los *knock out* machos, la resistencia a la insulina progresa hacia una forma severa de diabetes acompañada por la apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas (Cho y col., 2001). A pesar que la pérdida de función en los *knock out* para Akt3 no ha sido todavía completamente caracterizada, se ha observado que la disrupción del gen de Akt3 no afecta el tamaño embrionario (Yang y col., 2003). Sin embargo, la importancia crucial de Akt se pone de manifiesto por la letalidad embrionaria que presentan los ratones doble *knock out* para Akt1 y Akt3. Al

evaluar la sobreexpresión de Akt, algunos estudios demostraron que la isoforma constitutivamente activa Akt1 (myrAkt1) o la mutante E40K en el timo de ratones eran capaces de inducir linfomas tímicos; myrAkt1 indujo linfomas de latencia corta mientras que E40K favoreció la inducción de linfomas en órganos linfoides periféricos en edad avanzada (Malstrom y col., 2001). Asimismo, a pesar que el tamaño del timo era normal, los timocitos de los ratones que expresaban myrAkt1 eran significativamente más grandes que aquellos de los no transgénicos, confirmando el rol de Akt1 en la regulación del tamaño celular.

### **Mecanismos de activación de Akt**

Akt es activada clásicamente en respuesta a señales inducidas por factores de crecimiento y citoquinas, así como también estrés oxidativo, a través de receptores tirosín-kinasa. Esta activación depende de fosfatidilinositol trifosfato (PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>), un lípido presente en membranas que se convierte a partir de fosfatidilinositol bifosfato (PtdIns-4,5-P<sub>2</sub>) por acción de la enzima fosfoinositol 3-kinasa (PI3K). La interacción de PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> con el dominio PH de Akt favorece la unión con sus activadores río arriba y su consecuente fosforilación en dos sitios: uno en el dominio kinasa y otro en el extremo C-terminal, que corresponden a la Thr<sup>308</sup> y Ser<sup>473</sup> para la isoforma Akt1. La fosforilación en Ser<sup>473</sup> precede y facilita la fosforilación en Thr<sup>308</sup> (Sarbasov y col., 2005). La kinasa responsable de fosforilar Akt1 en Thr<sup>308</sup> fue clonada en primer lugar y su secuencia reveló la presencia de un dominio PH por lo que fue denominada proteína-kinasa dependiente de 3-fosfoinositol 1 (PDK1; Alessi y col., 1997). Sin embargo, la kinasa responsable de la fosforilación en Ser<sup>473</sup> fue dilucidada mucho tiempo después y se le atribuye al complejo mTORC2 (compuesto por mTOR, Rictor y GβL y mSIN1), específicamente a sus subunidades SIN1 y MIP1 (Sarbasov y col., 2005, Alessi y col., 2009). De hecho, la mutante de Akt1 S473D y Akt1 monofosforilada en Ser<sup>473</sup> por el mTORC2 son blancos más eficientes para PDK1 que Akt1 no fosforilada (Jacinto y col., 2006). Estos hallazgos sugieren que la fosforilación en Ser<sup>473</sup> provee un sitio de anclaje para PDK1 (Figura 17; Frödin y col., 2002). La fosforilación de Akt1 en Thr<sup>308</sup> causa un cambio conformacional inducido por la carga que permite al sustrato unirse con mas afinidad y aumentar en forma considerable la tasa de catálisis, en forma similar a lo que ocurre con otros miembros de la familia de AGC kinasas. La fosforilación en

Thr<sup>308</sup> gobierna estrictamente la activación de PKB y su mutación a un residuo no fosforilable como alanina reduce significativamente su actividad (Alessi y col., 1996).



La localización de Akt en la membrana plasmática es necesaria para la fosforilación en Ser<sup>473</sup> (Scheid y col., 2002). Por otra parte, la inhibición de la actividad de PDK1 con staurosporina reduce el nivel de fosforilación en Thr<sup>308</sup>, sin afectar la fosforilación en Ser<sup>473</sup>, indicando que la localización en membrana plasmática coopera con la actividad basal de PKB para activar la fosforilación en Ser<sup>473</sup> (Scheid y col., 2002). Asimismo, la fosforilación en el residuo treonina provocaría un cambio en la estructura terciaria de la proteína que haría que el dominio hidrofóbico no responda y de esta forma fuese menos susceptible a la acción de fosfatasas. De este modo, la forma doblemente fosforilada y totalmente activa es más estable.

Una vez activada, Akt es responsable de la fosforilación de numerosos sustratos localizados típicamente en el citoplasma y el núcleo modulando la función de muchas proteínas involucradas en la regulación de la supervivencia, progresión del ciclo celular, crecimiento, apoptosis y metabolismo de la glucosa, y por lo tanto juega un rol clave en el desarrollo de múltiples patologías como enfermedades neurodegenerativas, diabetes y cáncer (Brazil y Hemmings, 2001).

## Procesos celulares regulados por Akt

Hasta el momento han sido identificados un gran número de genes cuya expresión es regulada por Akt. Todos los sustratos de Akt poseen el mismo motivo básico de fosforilación: **RXXRXXS/T**. La regulación por Akt puede ocurrir a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional.

### Inhibición de la apoptosis

La inhibición de la apoptosis por Akt puede estar mediada por múltiples mecanismos, algunos de los cuales son célula-específicos. Akt inactiva por fosforilación los factores proapoptóticos Bad (en Ser<sup>136</sup>) y procaspasa-9, así como también la familia de factores de transcripción Forkhead que inducen la expresión de factores proapoptóticos como Fas ligando, Bim y PUMA (p53-up-regulated mediator of apoptosis). La fosforilación de las proteínas Forkhead induce su localización citoplasmática posiblemente unidas a proteínas 14-3-3 y por lo tanto, son incapaces de mediar la transcripción en el núcleo. Además, la activación de Akt se ha relacionado, en células cancerosas, con resistencia aumentada a la apoptosis inducida por TRAIL/APO-2L (TNF-related apoptosis-inducing ligand), un miembro de la superfamilia TNF que tiene actividad antitumoral (Kandasamy y Srivastava, 2002). Asimismo, Akt activa al factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding protein) y a IκB kinasa (IKK), un regulador positivo de NF-κB, ambos reguladores de la expresión de genes con actividad antiapoptótica (Pugazhenthil y col., 2000). La regulación de la actividad del factor de transcripción NF-κB ocurre primariamente por la modulación de su molécula inhibitoria asociada, IκB (inhibidor de NF-κB). IκB es fosforilada por un complejo kinasa que consiste en IKK (IκB kinasa) α e IKKβ, que marca a la proteína para su ubiquitinación y degradación, liberando el factor de transcripción activo. IKKα puede ser activado por múltiples kinasas, una de las cuales es Akt. NF-κB regula positivamente la expresión de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> y otras proteínas inhibidoras de la apoptosis o IAPs.

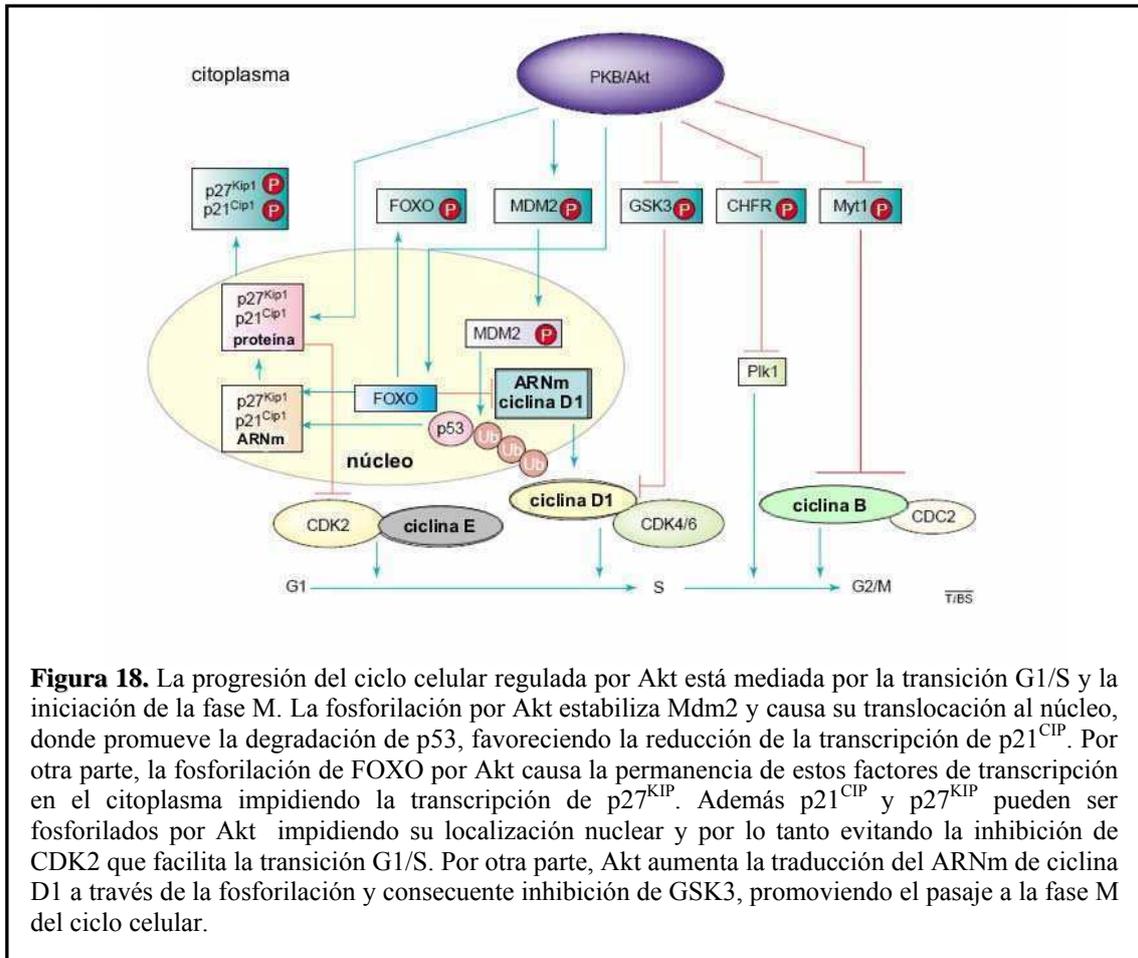
Otro integrante de la familia Bcl-2 regulado por Akt es el factor proapoptótico Bax, que una vez inserto en la mitocondria es un regulador fundamental de la permeabilidad mitocondrial que conlleva a la apoptosis. Bax es fosforilado por Akt en su sitio inhibitorio (Ser<sup>184</sup>) cerca del dominio C-terminal que contribuye a la supresión de la muerte celular mediada por Bax en neutrófilos (Gardai y col., 2004). Bax forma un

dímero con Bcl-2 y previene la actividad represora de muerte, por lo que la proporción de Bcl-2 y Bax determina la sensibilidad de las células a la apoptosis en respuesta a un estímulo específico. Por otra parte, Ahmed y colaboradores han demostrado que la activación de Akt induce la expresión de Bcl-2 en células BAF/3 (Ahmed y col., 1997). Estudios posteriores demostraron que la apoptosis neuronal inducida por  $\text{NO}$  estaba acompañada por una disminución en la expresión de Bcl-2 y un aumento de la síntesis de Bax. Asimismo, la activación de la kinasa es necesaria y suficiente para inhibir los cambios inducidos por  $\text{NO}$  en la expresión de Bcl-2 y Bax en respuesta a la acción protectora de IGF-1 en células neuronales (Matsuzaki y col., 1999). Además, Akt1 activada puede causar un efecto protector en neuronas primarias de hipocampo a través de su asociación con la proteína de andamiaje JIP1 (JNK interacting protein 1), que actúa evitando el reclutamiento y ensamblaje de JNK y retrasando el inicio de la apoptosis en respuesta a agentes inductores de exotoxicidad (Kim y col., 2002).

La mayoría de los estudios que demuestran la inhibición de la apoptosis por Akt han sido realizados en células en cultivo. Sin embargo, estudios más recientes han confirmado que Akt es capaz de inhibir la apoptosis en animales. Los ratones con homocigotas mutantes para PTEN exhiben en el octavo día de gestación, regiones cefálicas severamente expandidas por inhibición de la apoptosis regulada durante el desarrollo (Stambolic y col., 1998). Asimismo, la protección de la apoptosis fue observada en fibroblastos embrionarios derivados de estos ratones, así como también en timocitos de ratones transgénicos para myrAkt o Akt E40K (Malstrom y col., 2001).

### **Regulación del ciclo celular**

El control del ciclo celular mediado por Akt reside en la regulación de la localización subcelular de los miembros de la familia FOXO (Forkhead Box O), inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas ( $p21^{\text{CIP1}}$  y  $p27^{\text{KIP1}}$ ) y  $\beta$ -catenina, y la concentración intracelular de p53 (vía estabilización de Mdm2) como ejes centrales de este camino de señalización (Figura 18).



La inhibición de GSK3 por Akt evita la fosforilación de  $\beta$ -catenina citoplasmática, impidiendo su degradación y de esta forma, es translocada al núcleo. Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina se une a diferentes factores de transcripción favoreciendo la expresión de varios genes, como ciclina D1, que induce la progresión del ciclo celular a través de la hiperfosforilación e inactivación de la proteína de retinoblastoma (Rb). Además, la fosforilación disminuida de ciclina D1 por GSK3 promueve su estabilización (Diehl y col., 1998). Luego de la estimulación con factores de crecimiento, Mdm2 es fosforilado por Akt y entra al núcleo, donde induce una disminución en los niveles de p53 y de su transactivación. En ausencia del factor supresor de tumor p19/p14<sup>ARF</sup>, el complejo Mdm2-p53 abandona el núcleo y pasa al citoplasma donde p53 es degradado a través del sistema ubiquitín-proteasoma (Sherr y Weber, 2000).

La transición de la fase G1/S por Akt ocurre a través del bloqueo de los inhibidores del ciclo celular p21<sup>CIP</sup> y p27<sup>KIP</sup> vía fosforilación, que media la localización

citoplasmática de los mismos y su unión a proteínas 14-3-3 (Datta y col., 1999). Por otra parte, los niveles de p21<sup>CIP</sup> y p27<sup>KIP</sup> son disminuídos a través de la fosforilación de los factores de transcripción de la familia FOXO, que una vez localizados en el citoplasma, son incapaces de promover la síntesis de los ARNm de dichos inhibidores (Figura 18; Medema y col., 2000).

La proteína 4E-BP1 inhibe la traducción de los ARNm al unirse al factor de iniciación de la traducción eIF-4E. La fosforilación de 4E-BP1 por Akt evita su unión al factor iniciador y remueve el efecto inhibitorio sobre la síntesis proteica (Gingras y col., 1998). La estimulación de la síntesis de proteínas por Akt puede favorecer la expresión de un gran número de genes relacionados con el crecimiento como c-myc y c-fos, que también pueden ser inducidos a nivel transcripcional, así como también las ciclinas G1, D1 y D3.

### **Señalización metabólica inducida por insulina**

La activación de la vía de Akt inducida por insulina juega un rol fundamental en la transducción de las señales que median muchos de los efectos metabólicos de la insulina, incluyendo el transporte de la glucosa, el metabolismo de lípidos, la síntesis de glucógeno y de proteínas.

Akt estimula el transporte de glucosa en respuesta a la insulina promoviendo la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Kohn y col., 1996) y el aumento de la expresión de GLUT1 y GLUT3 (Hajdich y col., 1998). Estudios posteriores sugieren que, luego de la estimulación de adipocitos de rata con insulina, Akt2 se transloca a las vesículas microsomales donde colocaliza con GLUT4 y lo fosforila (Kupriyanova y Kandror, 1999). La síntesis de glucógeno inducida por insulina es catalizada por la enzima glucógeno sintasa que es modulada por fosforilación. La inactivación de GSK3 por fosforilación de Akt, activa la glucógeno sintasa promoviendo la síntesis de glucógeno en adipocitos 3T3-L1 (Ueki y col., 1998).

Otra proteína cuya expresión es inducida por Akt a nivel traduccional en adipocitos 3T3-L1 es la leptina. La expresión de myrAkt (variante constitutivamente activa) causa la inducción de un aumento en los niveles de leptina de 20 veces respecto del control no miristoilado. Sin embargo, los niveles de ARNm de leptina no se ven afectados por la transfección de Akt constitutivamente activa por lo que esta kinasa es capaz de inducir la producción de leptina en adipocitos 3T3-L1 vía un mecanismo no transcripcional (Barthel y col., 1997).

## **Transformación y oncogénesis**

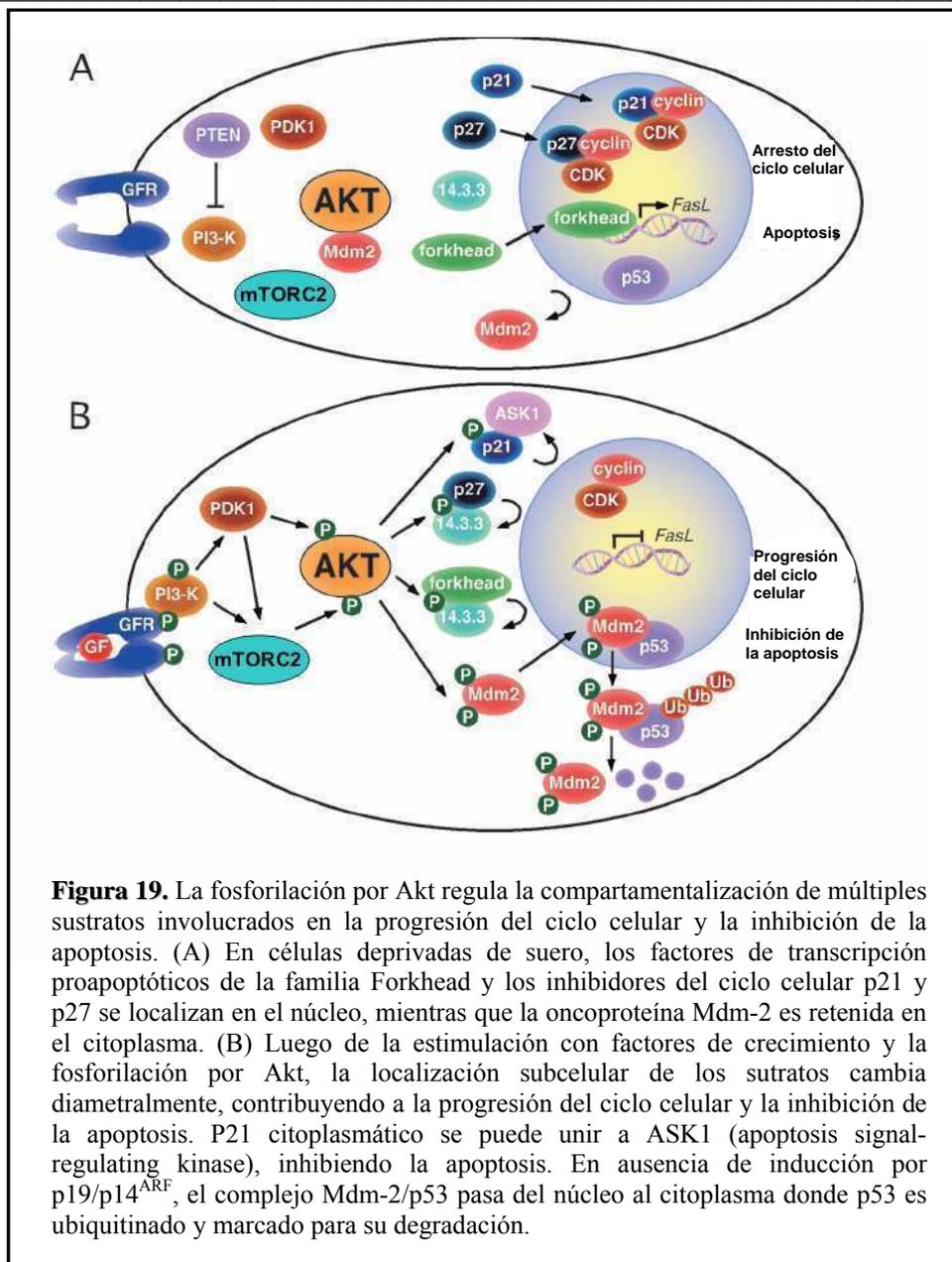
Históricamente, los eventos de transformación en cáncer han sido definidos como eventos de iniciación (que contribuyen a los eventos tempranos de la transición neoplásica) o eventos de progresión (referidos a los procesos transformantes subsecuentes). Los oncogenes codifican para proteínas que controlan la proliferación celular, apoptosis o ambos procesos. Pueden ser activados por alteraciones estructurales resultantes de mutaciones o fusiones, por yuxtaposición a elementos *enhancers* o por amplificación. Las mutaciones y translocaciones pueden ocurrir como eventos iniciadores o durante la progresión del tumor, mientras que las amplificaciones usualmente ocurren durante la progresión del tumor (Croce, 2008). Los productos de oncogenes pueden ser clasificados en seis grandes grupos: factores de transcripción, remodeladores de cromatina, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales y reguladores de la apoptosis. En muchos tumores, no sólo se han identificado mutaciones activadoras de oncogenes sino también pérdida de función de proteínas codificadas por genes supresores de tumores como p53 y Rb. Luego de la vía de p53, el camino de señalización PI3K-PTEN-Akt constituye una de las vías con mayor tasa de mutación asociadas con el cáncer. La vía de Akt se encuentra activada en el cáncer a causa de varios mecanismos que incluyen amplificación, sobreexpresión o mutaciones puntuales de los genes que codifican para Akt y sus activadores río arriba, sobreexpresión de la proteína blanco eIF4E, y delección o inactivación de supresores tumorales responsables de la regulación de la vía.

Hanahan y Weinberg (2000) han propuesto que los cambios genéticos y epigenéticos relacionados con el cáncer son representativos de un conjunto finito de alteraciones fisiológicas que juntas conducen a la célula a la malignidad. La vía de señalización de Akt juega un rol prominente en varios procesos considerados centrales en el cáncer. La sobreexpresión de Akt puede permitirle a la célula tumoral volverse más sensible a los niveles de factores de crecimiento que normalmente no provocarían proliferación.

Asimismo, el rol oncogénico de la actividad desregulada de Akt reside en su capacidad de inducir múltiples efectos simultáneos tanto en la supervivencia como en el crecimiento celular y apoptosis. GSK3 es una kinasa altamente conservada que es inhibida al ser fosforilada por Akt. GSK3 controla numerosos eventos críticos del ciclo celular, a través de reguladores como c-myc, ciclina D1 y E. Además, fosforila factores de transcripción que gobiernan el destino celular y la diferenciación incluyendo c-jun,

$\beta$ -catenina y Notch. En general, la fosforilación de proteínas por GSK3 resulta en una inactivación a causa de la vida media del sustrato fosforilado o del fosfo-sitio de anclaje para ubiquitín-ligasas. De esta forma, inactivando GSK3, Akt es capaz de estimular las funciones de estos sustratos. En consecuencia, en todos aquellos cánceres en que la actividad de Akt está aumentada se observan algunos de las siguientes características: fosforilación de Mdm-2 y consecuente degradación de p53, inactivación de proteínas proapoptóticas, inactivación de factores de transcripción FOXO, estabilización nuclear de  $\beta$ -catenina y aumento de la síntesis de ciclina D1, entre otros (Figura 19).

Además, Akt juega un rol en procesos adicionales característicos del cáncer, como angiogénesis sostenida, potencial replicativo ilimitado e invasión y metástasis. Akt promueve la angiogénesis aumentando la producción de óxido nítrico al mediar la activación de la eNOS, un modulador clave del tono vascular (Dimmeler y col., 1999). Por otra parte, Akt también estimula la actividad telomerasa a través de la fosforilación de la subunidad hTERT (human telomerase reverse transcriptase; Kang y col., 1999). Finalmente, Akt tiene un rol central en la invasión y metástasis estimulando la secreción de metaloproteasas de la matriz extracelular (Thant y col., 2000) e induciendo la transición epitelio-mesenquimática (Grille y col., 2003).



Numerosos estudios han demostrado la existencia de amplificaciones de Akt en tumores primarios y líneas tumorales (Scheid y Woodgett, 2001). Carpten y colaboradores (2007) han descrito una mutación activadora en el dominio PH de Akt1 en pacientes con cáncer de mama, ovario y carcinoma colorectal. Específicamente, la mutación G>A en el nucleótido 49 resulta en una sustitución de lisina por glutámico en el aminoácido 17 (E17K) que resulta en una proteína mutante con capacidad de unión a fosfatidilinositoles aumentada. Asimismo, las células en cultivo que portan este alelo mutado exhiben un fenotipo transformante (Carpten y col., 2007). Muy frecuentemente, Akt1 se encuentra activada en carcinoma de próstata, mama y ovario y se ha

demostrado que la activación constitutiva provoca transformación oncogénica en células NIH/3T3 (Sun y col., 2001).

Asimismo, se han descrito amplificaciones de Akt2 en líneas celulares de carcinoma ovárico. La amplificación de la región cromosómica 19q13.1-q13.2, localización nativa de Akt2, fue reportada en tumores de ovario primarios (Thompson y col., 1996) y en linfomas no Hodgkin (Arranz y col., 1996). Akt2 también se ha encontrado sobreexpresado en carcinomas pancreáticos primarios, carcinoma hepatocelular y líneas celulares derivadas de carcinoma pancreático (Cheng y col., 1996).

Por otra parte, Akt puede encontrarse constitutivamente activa debido a la actividad disminuida de PTEN (phosphatase and tensin homolog). PTEN tiene actividad dual de fosfatasa frente a proteínas y lípidos (3'-fosfatidilinositoles); específicamente desfosforila la posición 3'-OH del anillo inositol de PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> y PtdIns (3,4)P<sub>2</sub>. Consecuentemente, las mutaciones inactivadoras de PTEN incrementan los niveles de 3'-fosfatidilinositoles y por lo tanto provocan una actividad aumentada de la actividad de Akt y mayor transformación celular. En humanos, muchos cánceres como el de mama, el de endometrio, el de próstata, glioblastoma y tumores de la línea germinal, están asociados con mutaciones inactivadoras del gen supresor de tumor PTEN, que lleva a una hiperactividad desregulada de Akt. Las mutaciones de PTEN en la línea germinal dan lugar al síndrome autosómico dominante conocido como enfermedad de Cowden, que se encuentra asociado con un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de mama y otros tumores hormono-dependientes (Simpson y Parsons, 2001). La actividad de PTEN puede encontrarse disminuida con alta frecuencia en muchos cánceres primarios y metastáticos a causa de mutaciones, deleciones o metilaciones de su promotor (Carnero y col., 2008). Sin embargo, la actividad disminuida de PTEN no es la única causa de la actividad aumentada de Akt. Las alteraciones en receptores de factores de crecimiento y en Ras también resultan en hiperactividad de Akt en células tumorales (Shaw y Cantley, 2006) y las protegen de los insultos apoptóticos. La hiperactivación de Akt es encontrada más frecuentemente en tumores pobremente diferenciados que son más invasivos, crecen más rápido y responden menos al tratamiento. Por lo tanto, la confirmación patológica de Akt hiperactivada en tumores primarios es considerado un marcador de pronóstico negativo para el desarrollo de la enfermedad (LoPiccolo y col., 2008).

No sólo la sobreexpresión y la activación de Akt son frecuentes en el desarrollo del cáncer sino que la localización nuclear de Akt1 es clave para desencadenar los numerosos eventos que llevan a una proliferación desregulada y a una inhibición de la apoptosis. Uno de los mecanismos responsables de la regulación de la localización subcelular de Akt1 reside en la existencia de un secuencia de extrusión nuclear (NES) rica en leucina y altamente conservada (Saji y col., 2005). La localización subcelular de Akt1 difiere en células cancerosas invasoras respecto de las no invasoras por lo que los mecanismos de importación y extrusión del núcleo representan un paso importante para clarificar las señales involucradas en la progresión del cáncer. Cuando Akt1 es deficiente en la señal de extrusión nuclear es capaz de inducir migración celular. Cualquier modificación pre o posttraduccional en la región NES de Akt1 podría alterar la biología celular *in vivo* de forma tal de inducir migración celular. Esta posibilidad está basada en la evidencia de que mutaciones en la región NES no alteran la actividad kinasa de Akt cualquiera sea su localización subcelular (región aminoacídica 272-284) y por lo tanto podría constituir un potencial mecanismo regulador (Saji y col., 2005).

En resumen, Akt desempeña un rol clave en el desarrollo de la transformación y oncogénesis debido a su capacidad de mediar las respuestas proliferativas y antiapoptóticas, y a sus efectos en la adhesión, motilidad, invasión y metástasis así como también a su importante regulación a nivel de activación y localización subcelular.

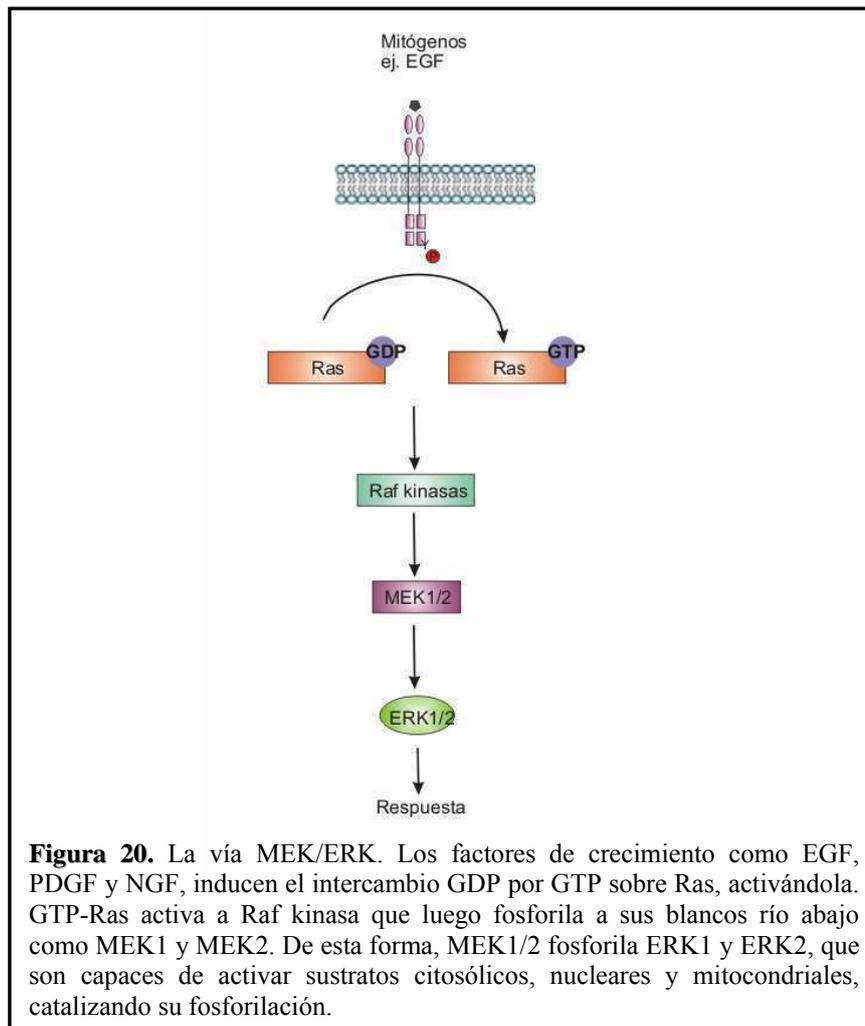
## La cascada MEK/ERK

---

Las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) pertenecen al grupo de proteín-kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y se activan en respuesta a receptores tirosín-kinasas, como el EGFR o VEGFR (Pearson y col., 2001). La unión al factor de crecimiento induce la dimerización del receptor y la fosforilación por tirosín-kinasas intrínsecas. Esta fosforilación del receptor induce el reclutamiento de proteínas que contienen dominios SH2 (de homología a Src 2) incluyendo al proteína adaptadora Grb2. Esta proteína se encuentra unida constitutivamente a Sos, el activador de Ras, y está normalmente localizado en el citosol. Esta relocalización activa a Sos, y así, es capaz de activar a Ras. La proteína Ras es una GTPasa dado que hidroliza guanosina trifosfato (GTP) a guanosina difosfato (GDP; Figura 20). Cuando se une a GTP, Ras es capaz de unirse y activar efectores río abajo y de esta forma propagar la señal. De esta forma, regulando el estado de unión a GTP/GDP de Ras, se logra un control fino de su actividad. Las células de mamífero contienen tres isoformas de Ras, H-Ras, K-Ras y N-Ras. Todas ellas poseen en su dominio C-terminal un motivo **CAAX**, en el cual una cisteína es seguida por dos aminoácidos alifáticos y por un aminoácido de cualquier tipo. Este motivo sufre una modificación postraduccional que consiste en una farnesilación, llevada a cabo por farnesil-transferasas, lo que resulta en la localización de las GTPasas Ras en la membrana (Mor y Philips, 2006). Cuando Ras se encuentra unido a GTP, recluta la kinasa Raf a la membrana, la cual se activa. Existen tres isoformas de Raf, llamadas A-Raf, B-Raf y C-Raf (también conocida como Raf-1). Las proteínas Raf (kinasas de las MAPKKs o MAPKKK) comparten una arquitectura común y todas funcionan como serín-treonín-kinasas (Wellbrock y col., 2004). Además, catalizan la fosforilación y activación de las kinasas de ERK 1 y 2 (MEK1/2), que luego activan ERK1 y ERK2 (Figura 20) en el motivo Thr-Glu-Tyr (TEY) en su *loop* de activación. La amplificación a través de esta vía de señalización es tal que se estima que con sólo una activación de un 5% de las moléculas de Ras es suficiente para inducir la activación completa de ERK1/2 (Hallberg y col., 1994). Una vez activas, las ERKs se dimerizan y pueden translocar al núcleo, donde fosforilan factores de transcripción como los de la familia Ets, c-Fos y c-Myc o permanecer en el citosol donde catalizan la fosforilación de sustratos como proteínas del citoesqueleto y factores involucrados en

proliferación y diferenciación en múltiples compartimientos subcelulares (Roux y Blenis, 2004). Además, fosforilan a proteín-quinasas activadas por MAPKs (MKs), que conforman un paso más de amplificación en la cascada. Estas proteínas comprenden a las kinasas ribosomales S6, (RSKs), a las kinasas activadas por mitógenos y stress (MSKs), las kinasas que interactúan con MAPKs (MNKs), las kinasas activadas por MAPK 2, 3 y 5 (MAPKAPK 2, 3 y 5) (Roux y Blenis, 2004).

ERK1 y ERK2 presentan entre sí un 83% de homología en la secuencia aminoacídica, y se expresan en todos los tejidos (Chen y col., 2001). Tras la estimulación, una proporción significativa de la población de ERK se acumula en el núcleo (Chen y col., 1992; Lenormand y col., 1993). La localización nuclear de ERK es necesaria para que esta molécula ejerza su efecto; Brunet y colaboradores (1999) observaron que al impedir la entrada de ERK al núcleo a través de la sobreexpresión de una fosfatasa citoplasmática específica (MKP3) inactiva, no se iniciaba la transcripción de genes específicos, y las células no replicaban el ADN en respuesta a factores de crecimiento. Los mecanismos de translocación y retención nuclear, han sido ampliamente estudiados. Se propuso que una prolongada activación de ERK, llevaba a una prolongada permanencia de la kinasa en el núcleo (Khokhlatchev y col., 1998). Estos investigadores, utilizaron una variante de ERK con el fosfato fusionado por una unión tioéster, el cual no era sustrato de las fosfatasas, y vieron que esta molécula era capaz de permanecer en el núcleo por muchísimo más tiempo que la kinasa salvaje, que era rápidamente desfosforilada por las fosfatasas endógenas. Asimismo, estos autores observaron asimismo que la fosforilación de ERK promueve su homodimerización y subsiguiente entrada al núcleo. Para dicha entrada al núcleo era necesaria tanto la fosforilación como la dimerización de la molécula pues las mutantes de ERK, que presentaban la tiofosforilación pero que eran incapaces de formar dímeros, permanecían en el citoplasma (Khokhlatchev y col., 1998). En el núcleo existen fosfatasas específicas que concluyen con la actividad de la MAPK. Estas fosfatasas, junto con MEK, tienen en su secuencia aminoacídica una señal de exclusión nuclear (NES), que favorece tras la unión, el retorno de la MAPK al citoplasma (Pouysségur y Lenormand, 2003).



**Figura 20.** La vía MEK/ERK. Los factores de crecimiento como EGF, PDGF y NGF, inducen el intercambio GDP por GTP sobre Ras, activándola. GTP-Ras activa a Raf kinasa que luego fosforila a sus blancos río abajo como MEK1 y MEK2. De esta forma, MEK1/2 fosforila ERK1 y ERK2, que son capaces de activar sustratos citosólicos, nucleares y mitocondriales, catalizando su fosforilación.

### Motivos de anclaje en la vía de MAPKs

Dominios D. La eficiencia y especificidad de las vías de señalización de MAPKs se llevan a cabo a través de motivos de anclaje especializados presentes en proteínas de andamiaje, MAPKKs, MAPKs y sus sustratos. Los dominios de *docking* o dominios D están involucrados en el aumento de la fosforilación de los sustratos por las MAPKs. Están caracterizados por un *cluster* de residuos con cargas positivas rodeados por residuos hidrofóbicos (Enslin y Davis, 2001) y pueden encontrarse río arriba o abajo del sitio fosfoaceptor (Tanoue y Nishida, 2003).

Motivos CD y ED. Dos grupos de investigación han identificado independientemente un motivo común de *docking* C-terminal o CD por fuera del dominio catalítico de ERK (Rubinfeld y col., 1999; Tanoue y col., 2000). El motivo CD contiene residuos ácidos e hidrofóbicos que son necesarios para establecer interacciones hidrofóbicas y electrostáticas con las cargas positivas y residuos hidrofóbicos de los dominios D,

respectivamente (Enslin y Davis, 2001; Tanoue y col., 2000). Estos motivos median las interacciones de las MAPKs con sus activadores río arriba y sustratos río abajo, sugiriendo que ejercen un control fino durante la cascada de activación de MAPKs. De forma similar al motivo CD, el motivo *docking* de ERK (ED) está localizado de forma opuesta al centro activo y se piensa que regula la especificidad en la interacción (Tanoue y Nishida, 2003). El intercambio de solo dos residuos dentro del sitio ED de ERK2 logra alterar su especificidad de *binding* asemejándola a la de p38 (otro miembro de la familia MAPK) y por lo tanto, ERK2 es capaz de unirse a MKK3 (la kinasa activadora de p38; Tanoue y col., 2001).

### **MAPK y oncogenes**

El rol de los componentes de la vía de señalización de MAPKs en cáncer ha sido objeto de intensa investigación. Las mutantes de Ras identificadas son proteínas que se encuentran constitutivamente unidas a GTP y por lo tanto siempre activas. De esta forma, Ras constituye el oncogen mutado más común en las neoplasias de los humanos y aproximadamente el 30% de todos los cánceres albergan una mutación de Ras (Mor y Philips, 2006).

En adición a Ras, otras proteínas de la cascada de MAPK contribuyen a la carcinogénesis. La mutación V600E en B-Raf ha sido identificada en cerca del 60% de los pacientes con melanoma (Gray-Schopfer y col., 2007). Esta mutación resulta en una B-Raf altamente activa, que se vuelve independiente del estado de unión de Ras a GDP/GTP y de esta forma, la vía se encuentra hiperactiva. Se ha observado un aumento en la fosforilación de MEK1/2 en cáncer de colon (Lee y col., 2004) y en leucemias mielogénicas (Milella y col., 2005). Por otra parte, un aumento en la fosforilación de ERK1/2 se ha evidenciado en el cáncer pancreático y en el de mama (Tan y col., 2004; Santen y col., 2002) y el grado de fosforilación se correlaciona con la progresión tumoral en cáncer de próstata (Gioeli y col., 1999).

Es importante destacar, que proteínas que alteran la localización subcelular de ERK1/2 tienen la capacidad de impactar en la patogénesis del cáncer. Por ejemplo, la retención citoplasmática de ERK1/2 se observa en una fracción de pacientes con cáncer de mama y favorece la supervivencia a largo plazo de estos pacientes (Nakopoulou y col., 2005).

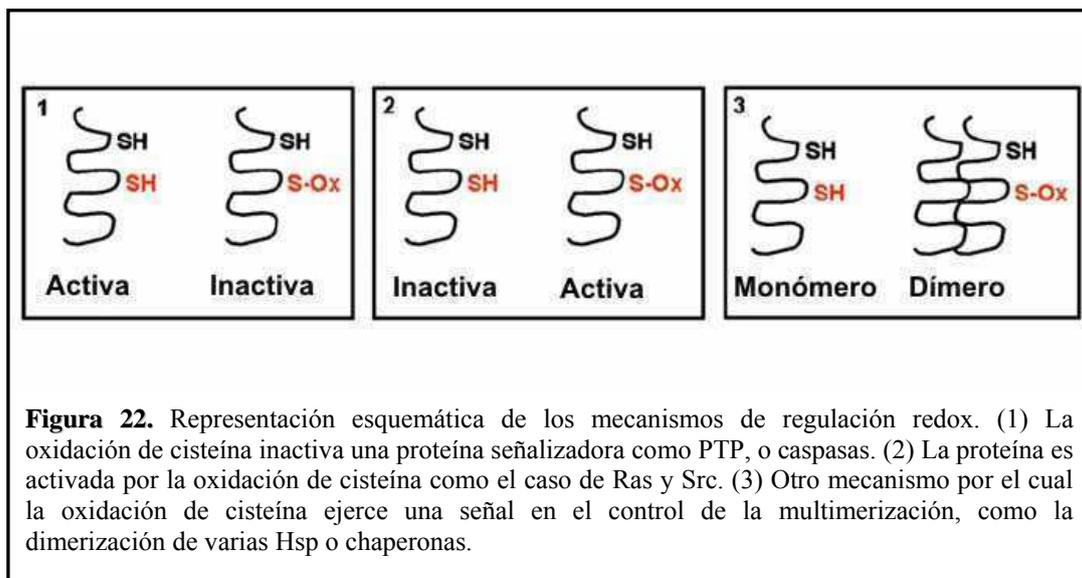
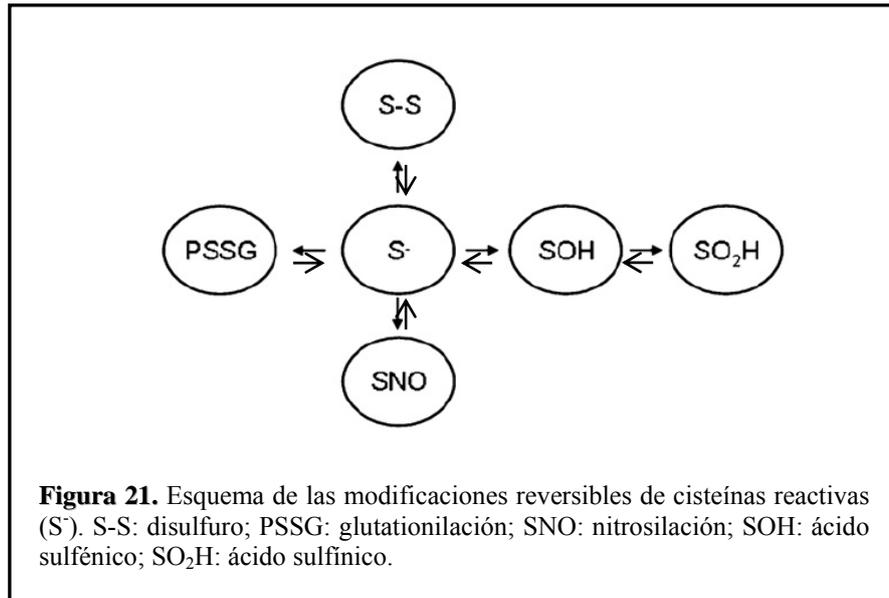
## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la señalización celular

---

Existe mucha evidencia que sugiere que la producción transitoria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un evento muy importante de señalización disparado a través de la activación de numerosos receptores de superficie (Rhee, 2006) así como también determinado por el estado metabólico mitocondrial (Cadenas y Davies, 2000). Como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula pequeña, difusible y ubicua que puede ser sintetizada y degradada rápidamente en respuesta a estímulos externos, cumple con todos los requisitos para ser un mensajero intracelular. Diferentes estudios han demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cumple un rol crucial en la señalización celular modulando el grado de fosforilación de determinadas proteínas en residuos serina-treonina o tirosina (Bae y col., 1997; Fetrow y col., 1999). La importancia de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la señalización por factores de crecimiento ha sido demostrada bloqueando su acumulación. La introducción exógena de catalasa inhibe completamente la fosforilación en tirosina inducida por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) así como también la activación de MAPKs en células musculares lisas de rata (Sundaresan y col., 1995). Resultados similares se obtuvieron con células A431 tratadas con catalasa y estimuladas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF; Bae y col., 1997). Como el grado de fosforilación de proteínas en una célula refleja el balance entre acciones opuestas de proteín-kinasas y fosfatasas, se esperaría que la activación de kinasas o la inhibición de fosfatasas modificaran el equilibrio hacia la fosforilación.

En contraposición al AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclica), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula estructuralmente muy simple para ser reconocida específicamente por una proteína. Es por eso que resulta improbable que la modulación de la fosforilación de proteínas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sea mediada por la unión reversible de esta molécula a proteín-kinasas o fosfatasas. Por otra parte, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un oxidante suave que puede oxidar residuos cisteína de proteínas a ácido sulfénico, sulfínico o disulfuro (Figura 21), y pueden ser reducidos nuevamente a residuos cisteína por varios agentes reductores celulares promoviendo consecuencias funcionales únicas (Figura 22). Como el  $pK_a$  (donde  $k_a$  es la constante del ácido) del grupo sulfhidrilo de la mayoría de los residuos cisteína (Cys-SH) es alrededor de 8.5 y como este grupo se oxida más lentamente por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que el anión tiolato (Cys-S<sup>-</sup>), se espera que pocas proteínas posean un grupo Cys-

SH que sea vulnerable a la oxidación por  $H_2O_2$  en la célula. Sin embargo, ciertos residuos cisteína de proteínas sí existen en la forma de anión tiolato a un pH neutro como resultado de una disminución en los valores de su  $pK_a$  por interacciones de cargas, particularmente entre la carga negativa del tiolato y cargas positivas de residuos aminoacídicos vecinos como arginina. Lo expuesto significa que una proteína puede tener varias cisteínas pero muy pocas reactivas (típicamente en la forma de tiolato) porque el  $pK_a$  de la cisteína depende de la carga de los aminoácidos adyacentes dentro de la conformación tridimensional o la estructura cuaternaria. Si bien, los aminoácidos metionina, triptofano y tirosina también son susceptibles a oxidación, el impacto funcional de estos eventos en la fisiología de la transducción de señales no ha sido bien establecido. Algunas de las proteínas con residuos cisteínas que poseen un bajo  $pK_a$  son las proteína-tirosín-fosfatasas (PTPs). Todas las PTPs contienen un residuo cisteína esencial (con un  $pK_a$  de 4.7 a 5.4) en el motivo **His-Cys-X-X-Gly-X-X-Arg-Ser/Thr** del sitio activo, que existe como tiolato a pH neutro (Denu y Dixon, 1998). El anión tiolato contribuye a la formación de un intermediario tiol-fosfato en el mecanismo catalítico de las PTPs. La cisteína del sitio activo de las PTPs es blanco de oxidaciones específicas por varios oxidantes incluyendo al  $H_2O_2$  y esta modificación puede ser revertida por incubación con compuestos como el ditioneitol (DTT) y glutatión reducido (Lee y col., 1998; Denu y Tanner, 1998). Estas observaciones sugieren que las PTPs pueden sufrir inactivación dependiente de  $H_2O_2$  resultando en un desplazamiento en el equilibrio hacia la fosforilación de proteínas. Dado que las PTPs purificadas son constitutivamente activas, y que no se han detectado inhibidores proteicos o subunidades regulatorias de estas enzimas, la regulación de las PTPs por la oxidación de cisteínas representa un mecanismo de regulación negativa muy importante. En ausencia de este mecanismo, la activación de receptores tirosín-kinasa (RTKs) resultaría en un ciclo fútil de fosforilación y desfosforilación (Figura 23).

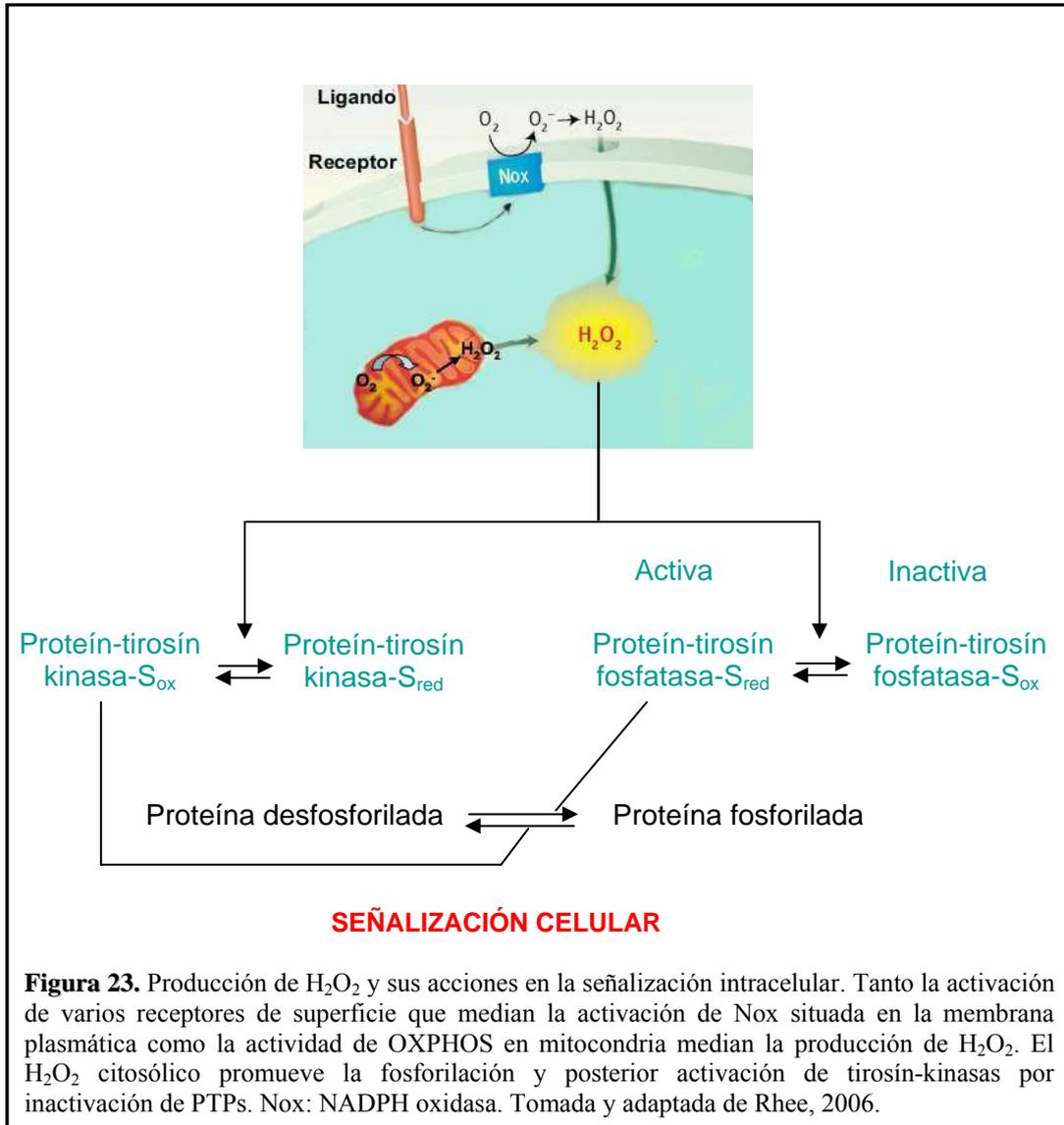


Las proteín-serín fosfatasa son moduladas por subunidades regulatorias específicas, y el residuo del sitio activo que forma un intermediario fosforilado en estas enzimas es la histidina. Sin embargo, estas fosfatasa también están sujetas a regulación redox. La familia de proteín-serín fosfatasa está dividida en 4 subfamilias: PP1, PP2A, PP2B y PP2C. Los miembros del grupo PP2B son inactivados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en forma dependiente de la concentración (Bogumil y col., 2000). Dos a tres de los residuos cisteína de PP2B son modificados durante esta inactivación, la cual es revertida por la exposición de la enzima a DTT o tiorredoxina (Trx). La inactivación de PP2B por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ha atribuido a la formación de puentes disulfuro entre las Cys<sup>228</sup> y Cys<sup>256</sup> (Bogumil y

col., 2000), un par de residuos cisteína que está conservado entre los miembros de la subfamilia de PP2B. PP1 y PP2A también contienen residuos cisteína redox sensibles (RSD o *redox-sensitive domains*; Fetrow y col., 1999). Los análisis estructurales han permitido identificar un potencial sitio activo oxidoreductasa disulfuro (**Cys-X-X-Cys**) en miembros de la subfamilia PP1 (Fetrow y col., 1999). La misma secuencia se encuentra presente en el sitio activo de las Trx, glutarredoxinas e isomerasas proteín-disulfuro y rápidamente forma un puente disulfuro a partir de su oxidación.

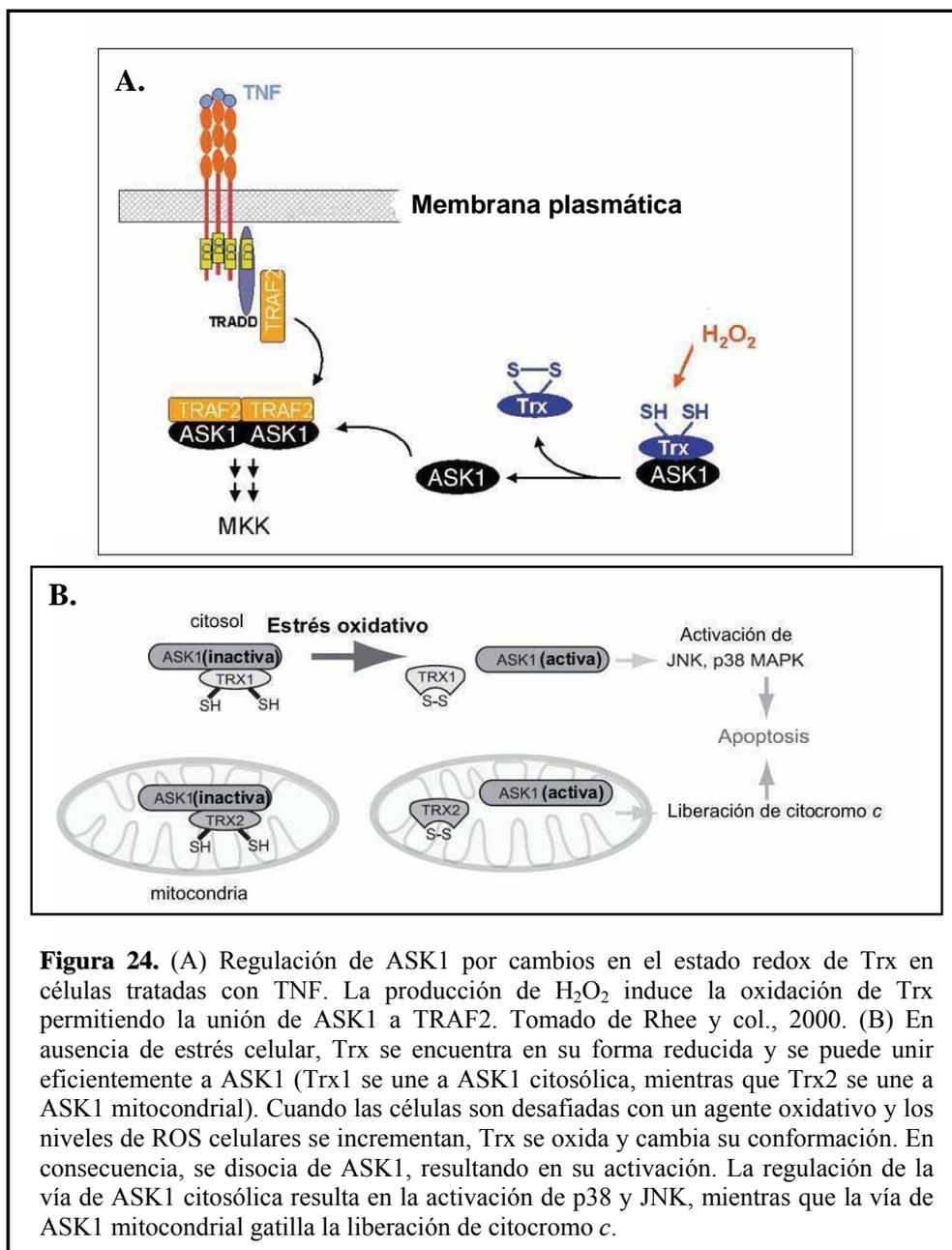
La regulación de las proteín-quinasas está basada en la fosforilación y en la interacción con proteínas reguladoras. Sin embargo, tanto las serín-treonín kinasas como las proteín-tirosín kinasas (PTKs) también se encuentran bajo el control redox. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> media la activación del receptor de EFG (EGFR) y de MAPKs en células HeLa tratadas con ácido lisofosfatídico (LPA) (Cunnick y col., 1998), la activación de JAK (Janus kinasa) en células Rat-1 tratadas con PDGF (Simon y col., 1998), la activación de PKB en células musculares lisas incubadas con angiotensina II (Ushio-Fukai y col., 1999) y la activación de MAPKs en células mesangiales renales de rata tratadas con serotonina (Greene y col., 2000). El rol activador de kinasas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue demostrado previniendo su acumulación con *N*-acetilcisteína (NAC) o catalasa o bien, por la incorporación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno (Ushio-Fukai y col., 1999; Greene y col., 2000).

La oxidación de cisteínas contribuye notablemente a la activación de muchas de estas proteín-quinasas. c-Ret es un receptor tirosín-kinasa (RTK) con un dominio tipo caderina en su región extracelular. La producción de ROS inducida por la radiación UV resulta en la dimerización de una gran proporción de moléculas de c-Ret (Kato y col., 2000), y dicha dimerización está mediada por la formación de puentes disulfuro entre los residuos Cys<sup>720</sup> de cada monómero, y los receptores dimerizados son preferencialmente autofosforilados, resultando en su activación. Este residuo cisteína está altamente conservado en varias PTKs, incluyendo Abl, Src y Lck, sugiriendo que también podrían jugar un rol clave en la activación de estas enzimas. Consistentemente con esta hipótesis, los residuos Cys<sup>475</sup> de Lck y Cys<sup>498</sup> de Src, que son equivalentes al Cys<sup>720</sup> de c-Ret, son cruciales tanto para la actividad catalítica como transformante de estas kinasas (Kato y col., 2000).



Algunas proteínas-kinasas son activadas por  $H_2O_2$  como resultado de la oxidación de residuos de cisteína de sus reguladores río arriba. Un ejemplo de dicho mecanismo es la activación de ASK1 (kinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis) en células tratadas con TNF (factor de necrosis tumoral; Figura 24A). ASK1 es una MAPKKK que activa dos miembros de la familia de MAPKs: JNK a través de la activación de SEK (proteína-kinasa activada por estrés) y p38 a través de la activación de MKK3 y 6. El receptor de TNF (TNFR) se une a una proteína de anclaje conocida como TRADD (proteína que contiene un dominio de muerte asociado a TNFR). Asimismo, TRADD se une a una variedad de adaptadores, incluyendo TRAF2 (factor 2 asociado a TNFR). TRAF2 activa a ASK1 a través de interacción directa y por otra parte, ASK1 se une con

gran afinidad a la forma reducida de Trx1 (Liu y col., 2000). Como los sitios de interacción para Trx1 y TRAF2 sobre ASK1 se superponen, la unión a Trx1 previene la asociación de ASK1 con TRAF2. La oxidación del motivo **Cys-X-X-Cys** de Trx1 induce la disociación del complejo Trx1-ASK1, permitiendo a ASK1 interactuar con TRAF2. Esta interacción dispara la activación de ASK1 dependiente de la oligomerización. De esta forma, el  $H_2O_2$  promueve la disociación entre Trx1 y ASK1 y la consecuente activación de esta kinasa por TRAF2 (Liu y col., 2000). Asimismo, la relevancia de la vía mitocondrial se pone de manifiesto, cuando las células son sometidas a estrés oxidativo. De esta forma, Trx2 cambia de conformación, se separa de ASK1 y gatilla la liberación de citocromo *c* al citosol (Figura 24B).



**Figura 24.** (A) Regulación de ASK1 por cambios en el estado redox de Trx en células tratadas con TNF. La producción de  $H_2O_2$  induce la oxidación de Trx permitiendo la unión de ASK1 a TRAF2. Tomado de Rhee y col., 2000. (B) En ausencia de estrés celular, Trx se encuentra en su forma reducida y se puede unir eficientemente a ASK1 (Trx1 se une a ASK1 citosólica, mientras que Trx2 se une a ASK1 mitocondrial). Cuando las células son desafiadas con un agente oxidativo y los niveles de ROS celulares se incrementan, Trx se oxida y cambia su conformación. En consecuencia, se disocia de ASK1, resultando en su activación. La regulación de la vía de ASK1 citosólica resulta en la activación de p38 y JNK, mientras que la vía de ASK1 mitocondrial gatilla la liberación de citocromo *c*.

La oxidación de un residuo cisteína específico de Ras también resulta en la activación de proteín-quinasas río abajo. La Cys<sup>118</sup> de Ras es sensible a agentes oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el ·NO (Lander y col., 1996). Esta oxidación activa Ras *in vitro* como resultado de un aumento en el intercambio GDP/GTP. La oxidación de H-Ras en varias líneas celulares por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ·NO resulta en la activación de ERK1/2, PI3K, PTEN y PKB (Deora y col., 1998; Teng y col., 1999, Kwon y col., 2004).

La adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido usualmente explorada para evaluar los efectos de la producción de este oxidante inducido por activación de receptores y se ha demostrado la activación de varias proteín-quinasas, incluyendo miembros de la familia Src, Abl, JAK y PKC, promoviendo la fosforilación en tirosina de estas enzimas (Konishi y col., 1997; Yoshizumi y col., 2000). Miembros de la familia de Src son activados por fosforilación de un residuo tirosina conservado (Tyr<sup>394</sup> en Lck y Tyr<sup>416</sup> en Src) en el *loop* de activación del dominio kinasa cuando las células son expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> probablemente por inhibición de PTPs (Chiang y col., 2000). La exposición de células a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la fosforilación en tirosina de varias isoformas de PKC (Konishi y col., 1997), en ausencia de la estimulación de fosfolipasa C mediada por receptores. La proteín-tirosín kinasa responsable de esta fosforilación en PKCδ ha sido identificada como Abl (Sun y col., 2000). El tratamiento de las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve la asociación de Abl con PKCδ y la fosforilación mutua de estas proteínas. Sin embargo, la activación de Abl por esta vía resulta de la inhibición de la actividad de las PTPs.

Algunas proteasas, como caspasas y metaloproteinasas de la matriz (MMPs) constituyen otro ejemplo de regulación enzimática por eventos oxidativos. Las caspasas contienen en su sitio activo cisteínas y se ha demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a altas concentraciones es capaz de inhibir la activación, aunque no la actividad de la caspasa-3 *in vivo* (Lee y Shacter, 2000). Los miembros de la familia de las MMPs contienen un residuo cisteína invariante en su región prodominio, que mantiene la latencia quelando el centro de zinc (Zn) del sitio activo, y la activación de estas proteasas requiere la disrupción de esta interacción Cys-Zn. Por lo tanto, varios estudios han sugerido que las MMPs pueden ser activadas por oxidantes involucrando el mecanismo de oxidación del residuo cisteína del prodominio (Gu y col., 2002).

Los sistemas sofisticados de chaperonas a lo largo de la evolución han sido capaces de asegurar el plegamiento correcto de las nuevas proteínas sintetizadas y prevenir la agregación. Estos sistemas de proteínas incluyen la familia de las Hsp y PDI (proteín-disulfuro isomerasa), que son operativamente funcionales en citoplasma y

retículo endoplasmático (RE) respectivamente. Ambas familias juegan un papel importante en la transducción de señales ya que por ejemplo, Hsp90 es esencial para la activación de NF- $\kappa$ B (Broemer y col., 2004). Como las acciones moleculares de Hsp y PDI residen en cisteínas reactivas, están emergiendo como reguladoras potenciales de la señalización redox. El citoplasma y el RE constituyen compartimientos iónicos y redox únicos (el citoplasma es reductor y el RE más oxidante), que requieren distintas redes de chaperonas (Paget y Buttner, 2003). Varias oxidaciones de cisteínas se han relacionado con la activación de Hsp, incluyendo nitrosilación, glutationilación y formación de puentes disulfuro (Figura 25; Nardai y col., 2000). PDI es un miembro multifuncional de la superfamilia de las tiorredoxinas que contiene dos sitios catalíticos. La forma oxidada de PDI, con cisteínas de su sitio activo en forma de disulfuro, puede actuar como aceptora de electrones para formar puentes disulfuro en proteínas sustrato que contienen grupos sulfhidrilos, actuando de esta forma como una chaperona condicionada por el estado redox (Gruber y col., 2006).

Además del control redox a través de la oxidación de kinasas y fosfatasas, adaptadores moleculares o chaperonas, que pueden regular en consecuencia la actividad de factores de transcripción, estos factores de transcripción en sí mismos pueden ser blancos directos de la modulación redox (Na y Surh, 2006). Existen múltiples familias de factores de transcripción en células de mamíferos, que incluyen NF- $\kappa$ B, AP-1, HIF-1 $\alpha$  y p53 que son modulados directamente a través de cambios oxidativos. En muchos casos, las cisteínas reactivas luego de su oxidación ejercen un cambio funcional manifestado como un aumento en la transactivación o en la inhibición. Ejemplos de factores de transcripción que son inhibidos luego de la oxidación de cisteínas incluyen las subunidades p50 y p65 de NF- $\kappa$ B y el miembro de la familia de AP-1, c-Jun. Estos cambios producen un impedimento en la unión de los factores al ADN (Klatt y col., 1999). En el caso de p53, la S-glutationilación de las Cys<sup>83</sup> también provoca una disminución de la unión al ADN con la formación de monómeros y oligómeros de alto peso molecular (Sun y col., 2003).

Existe numerosa evidencia que sugiere que las alteraciones en las actividades de los factores de transcripción pueden no estar limitadas a su modificación oxidativa directa. De hecho, factores remodeladores de la cromatina, como histonas acil transferasas (HAT) o histonas desacetilasas (HDAC), pueden sentir cambios redox y en consecuencia provocar cambios en la transcripción. La familia de sirtuinas (Sirt) perteneciente al grupo de HDAC ejerce un rol fundamental en el envejecimiento y

regulación metabólica a través del control de la familia de factores de transcripción FOXO (Brunet y col., 2004). En respuesta al estrés oxidativo, Sirt1 forma un complejo con FOXO3, que lleva a la desacetilación de FOXO3, el cual media el arresto del ciclo celular y la inhibición de la muerte celular (Brunet y col., 2004).

El reconocimiento de nuevos sistemas enzimáticos regulatorios que operan junto con las defensas antioxidantes clásicas evidencia la existencia de modos independientes de regulación redox dentro de los distintos compartimientos subcelulares.

### **Vías de señalización mitocondriales**

La translocación de proteínas señalizadoras activadas desde la membrana celular hasta el núcleo, donde la tasa de transcripción de genes se ve modificada, es la forma más familiar de entender la transducción de señales. Sin embargo, ésta no es la única ruta que las moléculas señalizadoras pueden tomar. La localización de proteín-quinasas activadas en otros compartimientos subcelulares media procesos muy importantes como motilidad celular, bioenergética y muerte celular (Glading y col., 2001; Holley y St Clair, 2009; Petit y col., 2009). Además de las cascadas clásicas iniciadas por hormonas o factores de crecimiento, investigaciones recientes en la regulación redox de vías de señalización suman complejidad a las señales que deben ser integradas para producir una respuesta final. Las mitocondrias constituyen un punto ideal de integración para estas cascadas de señalización debido a su rol en la articulación del metabolismo celular, la bioquímica redox y las decisiones de supervivencia y muerte celular. En los últimos años, numerosos estudios han demostrado consistentemente que las kinasas son específicamente dirigidas a mitocondrias (Bijur y Jope, 2003; Galli y col., 2008), donde modulan diferentes actividades como la fosforilación de las proteínas de la cadena respiratoria (Lee y col., 2002; Chen y col., 2004) y la liberación de productos mitocondriales que afectan en última instancia a la célula en su totalidad.

En el marco descripto, Akt es capaz de reclutar a Raf-1 a la mitocondria (Majewski y col., 1999) e influenciar la expresión de proteínas involucradas en la transición de permeabilidad mitocondrial (Nebigil y col., 2003), mecanismo que precede a la muerte celular (Lemasters y col., 1998). En células de neuroblastoma y embrionarias de riñón humanas, IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina 1) resulta en una rápida translocación de P-Akt a la mitocondria (Bijur y Jope, 2003) y una vez en la organela, Akt fosforila la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa y de GSK3 $\beta$  (Bijur y Jope,

2003). GSK3 $\beta$  fosforila e inhibe a la piruvato deshidrogenasa (PDH) mitocondrial (Hoshi y col., 1996) y promueve apoptosis (Hetman y col., 2000). Un mecanismo por el cual Akt inhibe la apoptosis iniciada por la vía mitocondrial es la estimulación de la translocación de la hexokinasa a mitocondria, que es la enzima responsable de catalizar el paso inicial en el metabolismo intracelular de la glucosa (Majewski y col., 2004). Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado recientemente que la insulina es capaz de aumentar P-Akt2 y su translocación a mitocondria promoviendo de esta forma, la fosforilación *in situ* y activación cooperativa de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) y generando de esta forma, un aumento en los niveles de NO y una disminución del consumo de oxígeno mitocondrial. De esta forma, la señalización por insulina activa Akt2, que no solo estimula el camino de reciclaje de GLUT4 (transportadores de glucosa) sino que además aumenta la actividad de NOS en las organelas regulando la actividad mitocondrial, y favoreciendo el reemplazo de glucógeno y el almacenamiento de energía en forma de grasa (Finocchietto y col., 2008).

Muchos estudios han demostrado que ERK puede modular las funciones mitocondriales, particularmente aquellas asociadas con la muerte celular. Por ejemplo, la vía de señalización de ERK promueve la función de la ATP sintasa mitocondrial en astrocitos deprivados de glucosa (Yung y col., 2004), mantiene el potencial de membrana y previene la liberación de citocromo *c* (Lee y col., 2004), y es capaz de inactivar a BAD (Wang y col., 1996). Fracciones mitocondriales de muestras de cerebro de rata normales exhiben una disminución de 10 veces en los niveles de ERK1/2 respecto de los homogenatos crudos (Jin y col., 2002). Sin embargo, la presencia de un *pool* mitocondrial de ERK1/2 tanto en tejidos normales como estresados sugiere un rol potencial de la kinasa en la regulación mitocondrial. Nuestro grupo ha establecido previamente la presencia de ERK1/2, p38 y JNK1/2 dentro de la mitocondria (Alonso y col., 2004; Galli y col., 2008). La translocación de ERK1/2 a mitocondrias de cerebro sigue un patrón de desarrollo el cual es máximo entre los estadios E19-P2 (embrionario19 a postnatal2) y luego declina hacia el estadio P3, justo antes de la translocación máxima al núcleo. Estos resultados sugieren que la cascada de activación mitocondrial de ERK1/2 en el desarrollo contribuye a sus efectos en la translocación nuclear, proveyendo información acerca del estado energético y redox a los caminos de señalización nucleares involucrados en la proliferación y diferenciación (Alonso y col., 2004). De acuerdo con los propósitos de esta Tesis, es destacable que estudios

ultraestructurales y bioquímicos demostraron que ERK está localizado dentro de la mitocondria en asociación con la membrana externa y el espacio intermembrana (Galli y col., 2008). Consecuentemente, se hace evidente que esta localización es propicia para la modulación de los mediadores de muerte mitocondriales y procesos metabólicos o respiratorios.

Múltiples estudios resaltan el rol de p38 en la regulación de los eventos de muerte celular, incluyendo la translocación de Bax desde el compartimiento citosólico al mitocondrial (Park y col., 2003), la salida de potasio independiente de caspasas (Bossy-Wetzel y col., 2004) y la regulación transcripcional de TR3 (receptor de hormona tiroidea 3), que transloca del núcleo hacia la mitocondria para iniciar la vía intrínseca de la apoptosis (Holmes y col., 2003). La participación de MAPKs en la regulación de los caminos de muerte mitocondrial está particularmente bien establecido para JNK, no solo a través de intermediarios como Bax (Yu y col., 2003) sino también por muchos estudios de fraccionamiento subcelular que muestran la localización de JNK activada en la mitocondria. Además, la detección reciente de proteínas de andamiaje dirigidas a mitocondrias provee evidencia convincente para la relevancia biológica de JNK mitocondrial. Por ejemplo, Sab (SH3BP5), que es una proteína de unión a JNK colocaliza en mitocondria (Wiltshire y col., 2002) y actúa como análogo funcional de ciertas AKAPs. El tratamiento de mitocondrias aisladas de cerebro de rata con JNK activa causa la inhibición de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, promoviendo la liberación de citocromo *c* (Schroeter y col., 2003).

Numerosos estudios han demostrado que, las cascadas de señalización no sólo son iniciadas por hormonas o factores de crecimiento, sino que las ROS están involucradas en caminos de señalización fisiológicos que regulan muchas funciones celulares. El  $H_2O_2$  constituye un mensajero intracelular clave ya que se trata de una molécula pequeña, difusible y ubicua que puede ser sintetizada y degradada rápidamente en respuesta a estímulos externos logrando modular el grado de fosforilación de determinadas proteínas en residuos serina-treonina o tirosina. Además, el  $H_2O_2$  es un oxidante suave que puede oxidar residuos cisteína de proteínas a ácido sulfénico, sulfinico o disulfuro. Éstos, a su vez, pueden ser reducidos nuevamente a residuos cisteína por varios agentes reductores celulares promoviendo consecuencias funcionales únicas. Nuestro laboratorio ha demostrado que niveles bajos de  $[H_2O_2]_{ss}$  se asocian con fenotipos proliferativos tanto embrionarios como tumorales y que un aumento en la concentración de  $[H_2O_2]_{ss}$  se correlaciona con un arresto del ciclo celular. Las mitocondrias constituyen un punto apropiado de integración para estas señales debido a su rol crítico en el metabolismo y balance celular redox y a su participación en las vías de supervivencia y muerte celular.

Las vías de señalización de Akt1/PKB $\alpha$  y ERK1/2 constituyen ejes cruciales para desencadenar el fenotipo proliferativo. Ambas proteín-kinasas deben ser activadas por fosforilación y sus consecuencias en la progresión del ciclo celular son bien conocidas a nivel nuclear. Sin embargo, poco se conoce acerca del rol que ejercen las mitocondrias como integradoras de estas vías. Este hecho es llamativo dado que las mitocondrias constituyen la mayor fuente de energía celular y la principal provisión de ROS, y por lo tanto las convierten en finas moduladoras de la actividad de las kinasas ya sea por fosforilación u oxidación, dos modificaciones post-traduccionales fundamentales que afectan la funcionalidad de estas proteínas señalizadoras.

## Hipótesis

---

En este contexto, los estudios estuvieron dirigidos a investigar la siguiente hipótesis general: *“El estado redox produce efectos celulares diferenciales de acuerdo a la activación o inactivación de Akt y ERK. La activación diferencial de estas*

*kinasas depende del tráfico a mitocondrias donde la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y determina cambios conformacionales que favorecen la fosforilación y posterior translocación nuclear de las mismas. Cambios en el estado redox celular por aumento o disminución de la síntesis de Trx son capaces de revertir el destino celular a través de la regulación en los niveles de fosforilación de dichas kinasas.”*

## Objetivos

---

La hipótesis general se estudió por medio de los siguientes objetivos parciales:

1. Investigar la modulación que ejerce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la progresión del ciclo celular en dos líneas celulares, una normal y otra tumoral.
2. Analizar el efecto redox sobre los mecanismos proliferativos y las vías apoptóticas involucradas, y su relación con el tráfico intracelular y la translocación mitocondrial de Akt1 y ERK1/2.
3. Vincular la activación de Akt1 y ERK1/2 con el nivel de interacción con sus kinasas río arriba.
4. Estudiar el mecanismo de translocación de Akt1 a mitocondria según el grado de fosforilación de la misma.
5. Analizar las cisteínas involucradas en el mecanismo de oxidación de las kinasas estudiadas.
6. Determinar la modulación que ejerce Trx sobre el destino celular en términos de proliferación y nivel de oxidantes. Analizar el efecto provocado sobre el eje de las kinasas evaluadas a través de estudios *in vitro* y utilizando un modelo *in vivo* para el análisis de tumores en ratones Balb/c.

## Materiales y Métodos

---

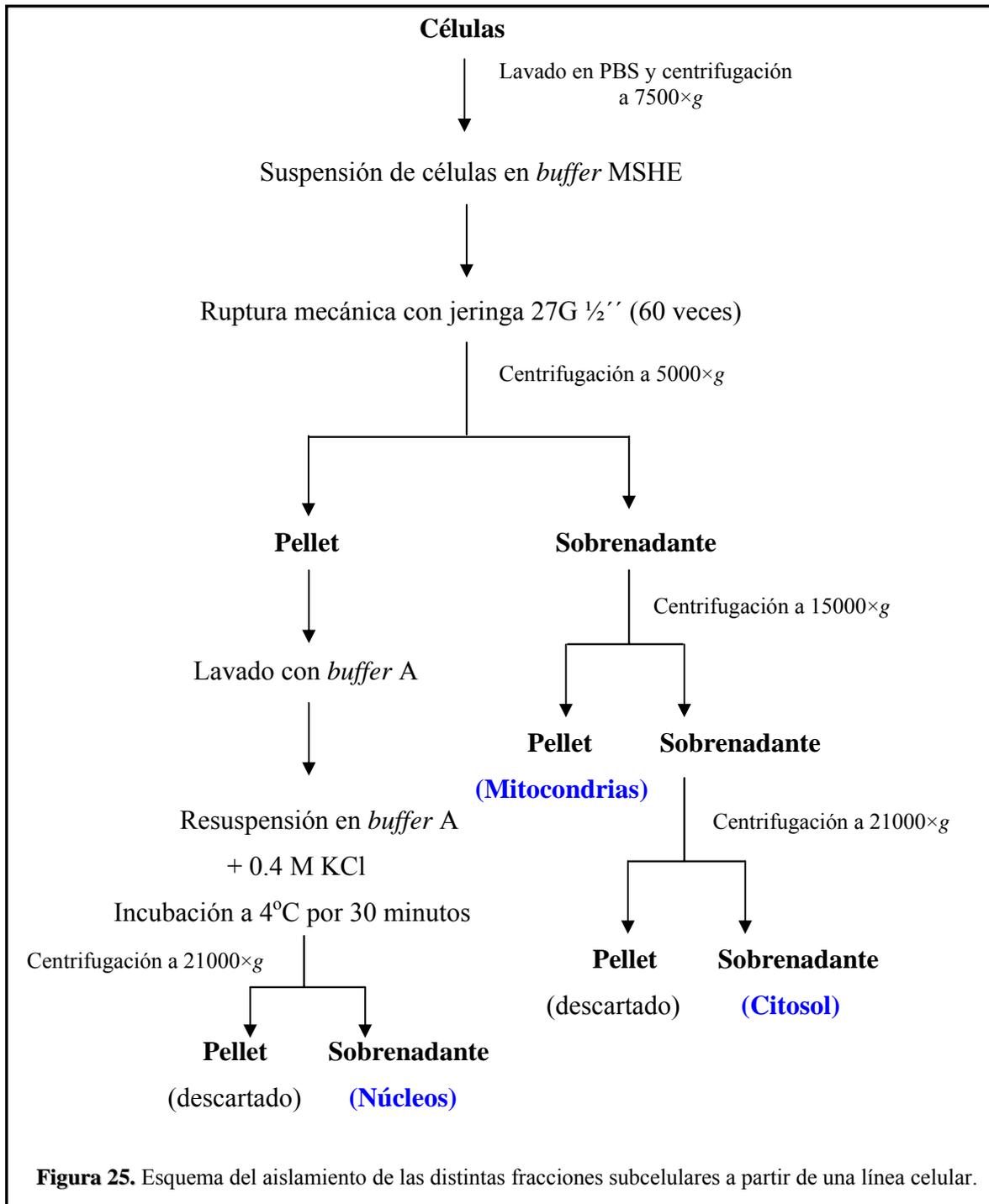
### Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular NIH/3T3 (ATCC #CRL-1658) fue mantenida en medio DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12) (Gibco) suplementado con 10% suero de ternera, 2 mM L-glutamina, 4.5 mg/ml glucosa, 80 µg/ml gentamicina y 10 ml/l solución antibiótica-antimicótica (Gibco), definido como medio completo (MC), en frascos plásticos (Corning) a 37° C en 5% CO<sub>2</sub>. La línea celular LP07, obtenida a partir del tumor P07 desarrollado espontáneamente en ratones BALB/c (adenocarcinoma murino de pulmón; Urtreger y col., 2001), fue mantenida en medio MEM (minimal essential médium) (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina y 80 µg/ml gentamicina y 10 ml/l solución antibiótica-antimicótica (Gibco), definido como medio completo (MC), en frascos plásticos (Corning) a 37° C en 5% CO<sub>2</sub>. Los sucesivos pasajes de ambas líneas se hicieron levantando las células con tripsina (0.25 % tripsina, 0.02 % EDTA en PBS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, 80 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 100 mM NaCl). Los estudios de tráfico de Akt, y su efecto sobre la proliferación y la apoptosis, tras estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fueron realizados manteniendo la línea NIH/3T3 en MC sin suero.

### Obtención de las fracciones nuclear, mitocondrial y citosólica de células en cultivo

Las células se sembraron en placas de Petri, se privaron de suero 24 hs, se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se lavaron con PBS y recolectaron. Se lisaron en *buffer* MSHE (0.22 M manitol, 0.07 M sacarosa, 0.5 mM EGTA, 2 mM HEPES/KOH, pH 7.4) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa (1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina, 5 µg/ml aprotinina, 25 mM NaF y 1 mM NaVO<sub>4</sub>). El homogenato se pasó por jeringa 60 veces para romper las células. Se centrifugó a 5000×g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo y se centrifugó 20 minutos a 15000×g a 4°C. El **pellet** resuspendido en *buffer* MSHE corresponde a la **fracción mitocondrial**. El sobrenadante se centrifugó por 30 minutos a 21000×g a 4°C. El **sobrenadante** de

esta nueva centrifugación corresponde a la **fracción citosólica**. El pellet obtenido tras la centrifugación a partir de la ruptura de las células corresponde al extracto nuclear crudo. Este extracto fue lavado con *buffer* A (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina, 5 µg/ml aprotinina, 25 mM NaF, y 1 mM NaVO<sub>4</sub>, pH 7.4) conteniendo 0.01% NP-40, luego resuspendido en *buffer* A suplementado con 0.4 M KCl, e incubado 30 minutos a 4°C. La suspensión fue centrifugada 30 minutos a 15000×g. El **sobrenadante** de esta centrifugación corresponde a la **fracción nuclear** y fue diluída con *buffer* A para reducir la concentración salina (Figura 29). Las muestras se conservaron a -70°C hasta su utilización. La concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante la técnica de Bradford en microplaca. La pureza de las fracciones fue determinada por western blot con anticuerpos anti-complejo I (mitocondria), β-actina (citosol), y RNA POL RPB6 (núcleo).



**Figura 25.** Esquema del aislamiento de las distintas fracciones subcelulares a partir de una línea celular.

### Fraccionamiento submitocondrial

Las mitocondrias se rompieron por estrés osmótico por el agregado de 4 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada, y luego se centrifugaron a 12000×g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante A corresponde a la fracción de **membrana externa** más **espacio intermembrana** y el pellet a los **mitoplastos**. El pellet se resuspendió en *buffer* MSHE y ambas fracciones se centrifugaron nuevamente 10 minutos a 15000×g a 4°C; el pellet se resuspendió en *buffer* MSHE.

- Mitoplastos: fueron resuspendidos en *buffer* MSHE y sonicados 3 veces a 40W por diez segundos con intervalos de 10 segundos en hielo, con un sonicador Cole-Parmer. Las muestras fueron luego centrifugadas por 10 minutos a 8000×g a 4°C para precipitar los mitoplastos intactos y el sobrenadante de esta centrifugación fue posteriormente ultracentrifugado durante 30 minutos a 100000×g a 4°C. El nuevo sobrenadante (fracción correspondiente a la **matriz mitocondrial**) fue separado del pellet (**membrana interna**), y este último fue resuspendido en *buffer* MSHE. Ambas fracciones fueron centrifugadas nuevamente durante 30 minutos a 100000×g a 4°C; el pellet se resuspendió en *buffer* MSHE.

- Sobrenadante A: fue ultracentrifugado durante 30 minutos a 100000×g a 4°C. El nuevo sobrenadante (fracción correspondiente al **espacio intermembrana**) fue separado del pellet (**membrana externa**), y este último fue resuspendido en *buffer* MSHE. Ambas fracciones fueron centrifugadas nuevamente durante 30 minutos a 100000×g a 4°C; el pellet se resuspendió en *buffer* MSHE (Alonso y col., 2004).

Todas las fracciones fueron guardadas a -70°C hasta el momento de su uso.

### Medición de proteínas por el método de Bradford

Este método se utilizó para medir muestras con rango de proteínas entre 0.1 a 2.0 µg.

- Preparación del reactivo: Se pesaron en papel de aluminio 25 mg de Coomassie Brilliant Blue G-25, al que se agregaron 12.5 ml de etanol 95%, 25 ml de ácido ortofosfórico 85% y agua ultrafiltrada (MilliQ) hasta un volumen final de 250 ml. Se agitó en oscuridad toda la noche, luego se filtró y se guardó en frasco color caramelo hasta su uso.

La técnica se desarrolló en microplaca de 96 pocillos con base plana.

- Curva de calibración: se utilizó una solución madre de seroalbúmina bovina 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se hicieron las siguientes diluciones: 2 - 1 - 0.5 - 0.25 - 0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

- Ensayo de muestras, controles y muestra patrón: cada determinación se realizó por duplicado. Se colocaron 5  $\mu\text{l}$  de muestra en cada pocillo y luego se agregaron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford (Bradford y col., 1976). Se incubó durante 15 minutos, se leyó la absorbancia a 595 nm y se calculó la concentración de proteínas interpolando en la curva de calibración.

### **Medición de la actividad de Lactato dehidrogenasa**

La actividad de esta enzima fue medida espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de NADH a 340 nm ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Veinticinco microgramos de proteínas fueron agregados a *buffer* KPi 100 mM, pH 7, en presencia de 1 mM de ácido pirúvico, 0.1% de tritón X-100 y 0.22 mM de NADH. Se utilizó la actividad de esta enzima de localización citosólica como parámetro para la evaluación de la pureza de la fracción mitocondrial purificada.

### **Medición de la actividad de Citocromo *c* oxidasa (Complejo IV)**

La actividad de citocromo oxidasa fue monitoreada espectrofotométricamente por la oxidación de 50  $\mu\text{M}$  de citocromo *c* reducido en un espectrofotómetro Hitachi U-3000 a 550 nm ( $\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La reacción se llevó a cabo con 50  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondial en *buffer* KPi 100 mM pH 7.2 a 30°C. La velocidad de la reacción fue determinada como la pseudoconstante de primer orden  $k'$  y expresada como  $k' \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de prot}^{-1}$ .

### **Preparación de citocromo *c* reducido**

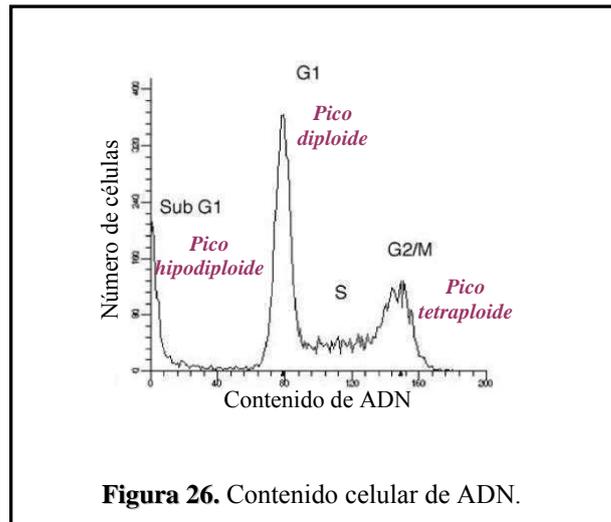
Se disolvieron 24,8 mg de citocromo *c* en 2 ml de *buffer* KPi 10 mM, pH 7.2 y se añadieron 10 mg de ácido ascórbico (reductor). Luego se pasó por una columna de Sephadex G25 para eliminar el ácido ascórbico en exceso, eluyendo con KPi 10 mM. Se tituló espectrofotométricamente a 550 nm haciendo una dilución previa 1:20 en *buffer* KPi 10 mM, pH 7.2.  $\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **Ensayo de proliferación**

Las células NIH/3T3 se sembraron en placas de 96 hoyos a baja densidad ( $5 \times 10^3$  células/hoyo) en 0.2 ml MC y se dejaron 24 hs para que se adhirieran al plástico. Al segundo día se cambió el MC por DMEM sin suero para sincronizar las células. En el tercer día las células se trataron con concentraciones crecientes de  $H_2O_2$  (1  $\mu$ M - 1 mM) en DMEM sin suero. Tras 24 hs de incubación, la proliferación se determinó por un ensayo radioactivo siguiendo la incorporación de [ $^3H$ ] timidina (0.8  $\mu$ Ci/hoyo, actividad específica: 70 a 90 Ci/ mmol; NEN/Dupont, Boston, Mass). Las células se levantaron con tripsina, el contenido celular fue adsorbido en una plancha de fibra de vidrio y la radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido (Wallac 1414, Turku, Finlandia). El inhibidor de la vía PI3K/Akt (LY294002) (Sigma) fue colocado 1 h previa al estímulo con  $H_2O_2$ . En los casos en los que se analizó el efecto de la sobreexpresión de tioredoxina 1 ó 2, las células fueron transfectadas al tercer día (pcDNA3.1 Trx1 wild type, Trx1 dominante negativo, Trx2 wild type, dominante negativo o vector vacío) y el ensayo continuó de la manera descrita anteriormente 24 hs post-transfección. En todos los casos, los tratamientos se realizaron por octuplicado.

### **Determinación del contenido de ADN por citometría de flujo**

La evaluación del ciclo celular se llevó a cabo determinando el nivel de ploidía de las células por tinción con yoduro de propidio (Figura 26). Las células NIH/3T3 se sembraron en placas de 6 hoyos ( $2 \times 10^6$  células/hoyo), se estimularon con  $H_2O_2$  durante 24 y 48 hs, se levantaron, se lavaron con PBS y se incubaron en 1 ml de solución de hipodiploidía (100  $\mu$ g/ml yoduro de propidio en 0.1% citrato de sodio, 0.1% Triton X-100) a 4°C, durante toda la noche en oscuridad (Nicoletti y col., 1991). La lectura se realizó en un citómetro de flujo FAC Scalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) en FL-2 (yoduro de propidio); para el análisis se utilizó el software WinMDI. Para cada análisis se adquirieron 20000 eventos totales.



### Detección de apoptosis por citometría de flujo

La fracción de células apoptóticas NIH/3T3 fue cuantificada determinando el porcentaje de células positivas para la doble marcación FITC-Anexina V (BD Biosciences)-ioduro de propidio. Las células fueron levantadas y lavadas con PBS. Posteriormente se resuspendieron en 300  $\mu$ l de *buffer* Anexina 1x (dilución 1/10 de la solución madre) y se agregaron 2  $\mu$ l de Anexina en frío. Se incubaron durante 10 minutos a 4°C, se centrifugaron y lavaron con PBS. Finalmente, se resuspendieron en 300  $\mu$ l de PBS y el ioduro de propidio (5  $\mu$ l de una solución stock 1 mg/ml) fue añadido inmediatamente antes de la adquisición de las muestras en el citómetro. La lectura se realizó en un equipo FAC Scalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) en FL-1 (FITC) y FL-2 (ioduro de propidio) con posterior análisis en el software WinMDI. Para cada análisis se adquirieron 20000 eventos totales.

### Análisis de muerte celular por microscopía de fluorescencia (doble tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina)

La viabilidad de las células NIH/3T3 sometidas a los distintos tratamientos fue analizada mediante el análisis citomorfológico luego de la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio y posterior observación al microscopio de fluorescencia. Para realizar el ensayo de viabilidad, las células fueron levantadas, lavadas con PBS, resuspendidas en 25  $\mu$ l de PBS y teñidas con 1  $\mu$ l de la mezcla naranja de acridina (100  $\mu$ g/ml) (Sigma) y bromuro de etidio (100  $\mu$ g/ml) (Sigma). Se tomaron 10  $\mu$ l de la

suspensión y se colocaron en portaobjeto con cubreobjeto. Las células fueron contabilizadas como viables (núcleos verdes normales), apoptóticas (núcleos verdes irregulares o naranjas con fragmentación o condensación de la cromatina) o necróticas (tinción naranja uniforme sin condensación cromatínica) según la coloración nuclear adquirida y la morfología observada al microscopio de fluorescencia (10x y 40x).

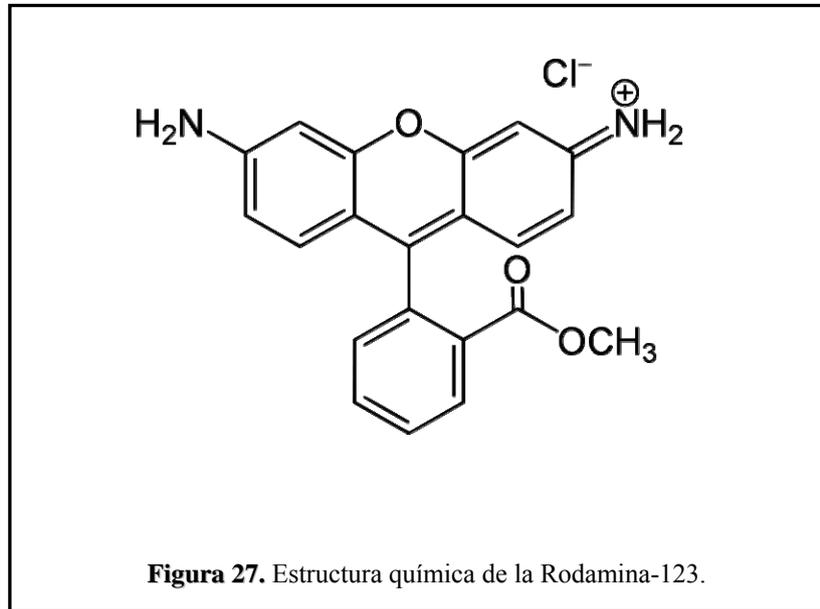
### **Determinación espectrofluorométrica del potencial de membrana mitocondrial**

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_{mit}$ ) fue determinado utilizando una sonda catiónica fluorescente, la Rodamina-123 (R-123) o cloruro de 3,6-diamino-9-(2-(metoxi-carbonil) fenil) xantina, cuya estructura química se observa en la Figura 31. Esta técnica se fundamenta en la distribución electroforética de la R-123 hacia la matriz mitocondrial a causa del potencial eléctrico que existe a través de la membrana interna mitocondrial. Debido a que la R-123 posee carga positiva y la matriz mitocondrial tiene carga negativa, se produce una acumulación y concentración de dicha sonda en la matriz. El  $\Delta\psi_{mit}$  fue determinado en mitocondrias aisladas midiendo la fluorescencia de la R-123 a 503 nm  $\rightarrow$  527 nm con un espectrofluorómetro Hitachi F-3010 a 37°C. Antes de adicionar las mitocondrias se determinó la fluorescencia del medio (150 mM sacarosa, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM fosfato de potasio, 30 mM KOH-HEPES pH 7.4) conteniendo 0.1  $\mu$ M R-123. Esta medición fue utilizada como indicadora de la concentración total de colorante ( $[R-123]_{total}$ , en nmol/ $\mu$ l). Posteriormente, las mitocondrias de células NIH/3T3 (0.2 mg/ml) fueron adicionadas al medio en presencia de 8 mM malato y 8 mM glutamato. Luego de alcanzar el equilibrio, se determinó la fluorescencia de la suspensión y el contenido de la cubeta fue centrifugado a 15000 $\times$ g para bajar las mitocondrias. La concentración de R-123 remanente en el medio ( $[R-123]_{out}$ , en nmol/ $\mu$ l) se calculó a partir de la fluorescencia del sobrenadante. Con estos datos, la cantidad total inicial de R-123 en la cubeta ( $[R-123]_{total}$ ) y la remanente en el medio ( $[R-123]_{out}$ ) fueron utilizadas para calcular por sustracción la cantidad total de R-123 tomada por las mitocondrias ( $[R-123]_{mit}$ , en nmol/mg protein). La concentración de R-123 libre en la matriz ( $[R-123]_{in}$ , en nmol/ $\mu$ l) fue calculada usando la siguiente ecuación, y los coeficientes de partición en los componentes internos y externos de la membrana interna a 37°C ( $K_i=26 \mu$ l/mg,  $K_o=120 \mu$ l/mg):

$$[Rho123]_{mit} = K_i [Rho123]_{in} + K_o [Rho123]_{out}$$

El potencial de membrana mitocondrial (negativo adentro) fue estimado con la ecuación electroquímica de Nernst-Guggenheim:

$$\Delta\psi = 59 \log ([\text{Rho123}]_{\text{in}}/[\text{Rho123}]_{\text{out}})$$



### Medición del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_{\text{mit}}$ ) fue además monitoreado por citometría de flujo. Las células se crecieron en placas de 6 hoyos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por hoyo. Luego de la incubación con  $250 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 12 y 24 h, las células control y tratadas se recolectaron y se lavaron con PBS tres veces. Posteriormente, se resuspendieron en 1 ml de PBS y se tiñeron con  $1 \mu\text{M R-123}$  durante 15 min en oscuridad a  $37^\circ\text{C}$ . Las células se centrifugaron, lavaron con PBS y se resuspendieron en 0.5 ml de PBS. La fluorescencia emitida por la R-123 se detectó utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) y los resultados fueron analizados utilizando el software WinMDI para Windows.

### Western blot

Las proteínas se separaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida según la descripción de Laemmli, y se transfirieron a membranas de PVDF (polivinildenofluoruro) (GE Healthcare). Las membranas se lavaron en 20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0.1%, Tween-20, pH 7.4 (TTBS), se bloquearon en

TTBS con 5% leche en polvo descremada, y luego se incubaron con los primeros anticuerpos, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y ajustando las diluciones de los mismos para cada sistema. Posteriormente, se lavaron e incubaron con segundos anticuerpos para ratón, conejo o cabra conjugados con peroxidasa de alfalfa. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia usando el sistema de revelado ECL (GE Healthcare).

Tabla de anticuerpos:

Anticuerpo	Marca	Peso molecular (kDa)	Tipo de anticuerpo secundario	Dilución del anticuerpo primario	Dilución del anticuerpo secundario
Akt1	Cell Signaling	60	anti-ratón	1:1000	1:4000
P-Akt Ser <sup>473</sup>	Cell Signaling	60	anti-conejo	1:1000	1:4000
P-Akt Thr <sup>308</sup>	Cell Signaling	60	anti-conejo	1:1000	1:4000
Ciclina D1	Santa Cruz	36	anti-ratón	1:1000	1:4000
Caspasa 3	Sigma	32	anti-conejo	1:1000	1:4000
$\beta$ -actina	Santa Cruz	42	anti-cabra	1:1000	1:4000
Bcl-x <sub>L</sub>	Santa Cruz	30	anti-ratón	1:500	1:4000
Citocromo <i>c</i>	Santa Cruz	11	anti-ratón	1:1000	1:4000
Complejo I	Molecular Probes	39	anti-ratón	1:5000	1:10000
VDAC1	Santa Cruz	30-35	anti-cabra	1:5000	1:10000
Mn-SOD	Stressgen	25	anti-conejo	1:1000	1:5000
P-PDK1	Cell Signaling	63	anti-conejo	1:1000	1:4000
P-GSK-3 $\alpha/\beta$	Cell Signaling	46, 51	anti-conejo	1:1000	1:4000
HA-tag	Cell Signaling	---	anti- ratón	1:1000	1:4000
His-tag	R&D Systems	---	anti- ratón	1:1000	1:4000
Flag-tag	Sigma	---	anti-ratón	1:1000	1:4000
mTOR	Cell Signaling	289	anti-conejo	1:1000	1:5000
ARN POL RPB6	Santa Cruz	250	anti-ratón	1:1000	1:4000
ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> sub. $\alpha$	Abcam	112	anti-ratón	1:1000	1:5000
Trx1	Cell Signaling	12	anti-conejo	1:1000	1:4000
Trx2	Santa Cruz	12	anti-ratón	1:1000	1:4000

**Tabla 1.** Diluciones de anticuerpos utilizados.

### Transfección transiente

Las células fueron cultivadas en placas de 12 pocillos a una densidad inicial de  $5 \times 10^4$  células por pocillo en 1 ml de MC como se describió anteriormente. Una vez alcanzada una confluencia celular de 60-70 %, se retiró el medio y se reemplazó por 800  $\mu$ l del mismo medio sin antibiótico, luego de un lavado con PBS. Se agregaron 200  $\mu$ l de medio Optimem (Gibco, Invitrogen) por pocillo en el cual se incubaron previamente 1.5  $\mu$ l de Lipofectamina (Invitrogen) y 1  $\mu$ g del vector con la secuencia de interés (detallados en la Tabla 2) o vector vacío (*mock*) por 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas se incubaron durante 24 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Para los ensayos de microscopía confocal, las células se incubaron en placas de 6 hoyos sobre un cubreobjetos en MC. Una vez alcanzada una confluencia celular de 60-70 %, se retiró el medio y se reemplazó por 1600  $\mu$ l del mismo medio sin antibiótico, luego de un lavado con PBS. Se agregaron 400  $\mu$ l de medio Optimem (Gibco, Invitrogen) por pocillo en el cual se incubaron previamente 3  $\mu$ l de Lipofectamina (Invitrogen) y 2  $\mu$ g del vector con la secuencia de interés (detallados en la Tabla 2) por 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas se incubaron durante 24 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, las células se marcaron como se describe en el párrafo de microscopía confocal.

Vector	Tag	Secuencia del tag
pcDNA3.1-Akt1	GFP	MSKGEELFTGVVPLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTNFICTTGKLPVP WPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFYKDDGNYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNSHNVYIMGDKPKNGIKVNFKI RHNIKDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMILLEF VTAARITHGMDELYK
pcDNA3.1-Akt1 S473A	GFP	MSKGEELFTGVVPLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTNFICTTGKLPVP WPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFYKDDGNYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNSHNVYIMGDKPKNGIKVNFKI RHNIKDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMILLEF VTAARITHGMDELYK
pcDNA3.1-Akt1 T308A	GFP	MSKGEELFTGVVPLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTNFICTTGKLPVP WPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFYKDDGNYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNSHNVYIMGDKPKNGIKVNFKI RHNIKDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMILLEF VTAARITHGMDELYK

pcDNA3.1-Akt1	HA	YPYDVPDYA
pcDNA3.1-Akt1 T308A	HA	YPYDVPDYA
pcDNA3.1-ERK2	3xFlag	DYKDDDDK DYKDDDDK DYKDDDDK
pcDNA3.1-ERK2 H230R	3xFlag	DYKDDDDK DYKDDDDK DYKDDDDK
pcDNA3.1-ERK2 Y261N	3xFlag	DYKDDDDK DYKDDDDK DYKDDDDK
pcDNA3.1-ERK2 C38A	3xFlag	DYKDDDDK DYKDDDDK DYKDDDDK
pcDNA3.1-ERK2 C214A	3xFlag	DYKDDDDK DYKDDDDK DYKDDDDK
pcDNA3.1-ERK2 C214E	3xFlag	DYKDDDDK DYKDDDDK DYKDDDDK
pcDNA3.1-Trx1	Flag	DYKDDDDK
pcDNA3.1-Trx1 dominante negativo (C32S)	Flag	DYKDDDDK
pcDNA3.1-Trx2	Flag	DYKDDDDK
pcDNA3.1-Trx2 C90S	Flag	DYKDDDDK
pcDNA3.1-Trx2 dominante negativo (C90/95S)	Flag	DYKDDDDK

**Tabla 2.** Vectores utilizados en los ensayos de transfección.

### Ensayo de actividad de Akt

Se inmunoprecipitó Akt1 en *buffer* de lisis (20 mM Tris, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, 1% NP- 40, 0.1% SDS, 40 mM β-glicerofosfato, 2 mM NaVO<sub>4</sub>, en presencia de inhibidores de proteasas, pH 7.5) utilizando 20 μl de un anticuerpo inmovilizado anti P-Akt1 Ser<sup>473</sup> (Cell Signaling) a partir de las fracciones nuclear, citosólica y mitocondrial (durante toda la noche a 4°C). Las muestras se centrifugaron a 14000×g por 30 segundos a 4°C y el pellet fue lavado dos veces con 500 μl de *buffer* de lisis. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en 50 μl de *buffer* kinasa (25 mM Tris, 5 mM

$\beta$ -glicerofosfato, 2 mM DTT, 0.1 mM  $\text{NaVO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$  en presencia de inhibidores de proteasas, pH 7.5) suplementado con 1  $\mu\text{l}$  de 10 mM ATP y 1  $\mu\text{g}$  de la proteína de fusión GSK-3 e incubado a 30°C durante 30 minutos. La reacción fue finalizada con el agregado de 25  $\mu\text{l}$  de *buffer* de siembra 3x y las muestras fueron preparadas para correr en un SDS-PAGE. Las membranas fueron reveladas utilizando un anticuerpo anti P-GSK-3 $\alpha/\beta$  (Ser<sup>21/9</sup>) (Cell Signaling) y de esta forma evidenciando la actividad kinasa de Akt1 sobre uno de sus sustratos (GSK-3).

### **Ensayo de interacción Akt1-P-PDK1**

Para estudiar la interacción entre Akt1 y PDK1, la fracción mitocondrial (300  $\mu\text{g}$ ) se incubó en presencia de la proteína recombinante humana Akt1-GST fusionada a agarosa (Cell Signaling) en el *buffer* de lisis descrito anteriormente, durante toda la noche a 4° C. Akt1 se oxidó con  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuando correspondía, por 15 minutos. Tras la incubación, las partículas de agarosa con los complejos proteicos, fueron precipitadas, lavadas 3 veces en *buffer* de lisis y luego hervidas en *buffer* de siembra. Finalmente las muestras se corrieron en SDS-PAGE, y se revelaron las membranas con P-PDK1 y Akt1.

### **Ensayo de fosforilación y translocación de Akt1 a mitocondria *in vitro***

Se incubaron 0.3  $\mu\text{g}$  de Akt1 inactiva (Prospec) y 0.8  $\mu\text{g}$  de mTOR (Calbiochem) en *buffer* kinasa (Calbiochem) suplementado con 20 mM ATP y 100 mM DTT durante 30 minutos para permitir la fosforilación. Las mitocondrias purificadas de la línea celular NIH/3T3 (100  $\mu\text{g}$  de proteínas mitocondriales) fueron coincubadas con la mezcla de fosforilación en *buffer* importe (250 mM sacarosa, 10 mM MOPS-KOH, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 80 mM KCl y 2.5 mM KPi, pH 7.2) suplementado con 2 mM ATP, 2 mM NADH y 20 mM succinato a 25°C. La reacción fue detenida por la adición de 0.25  $\mu\text{l}$  del desacoplante carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (10 mM FCCP) durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 $\times$ g durante 20 minutos. El sobrenadante conteniendo las proteínas no asociadas a las mitocondrias se reservó como control de la reacción de importe y el pellet de mitocondrias se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de *buffer* MSHE. Ambas fracciones fueron preparadas para correrse en un SDS-PAGE.

### **Purificación de vesículas de membrana plasmática**

Las células fueron lisadas en *buffer* MSHE como se describió anteriormente. El homogenato se centrifugó durante 10 minutos a  $1000\times g$ ; los mitoplastos fueron aislados a partir del sobrenadante y el pellet fue resuspendido en *buffer* de aislamiento (250 mM sacarosa, 5 mM K-Hepes, 1 mM EGTA, pH 7.4). La suspensión fue pasada por una jeringa de tuberculina 4 veces y luego se le agregó Percoll (GE Healthcare) en una relación 1.4 ml de Percoll por cada 10.4 ml de resuspensión. La muestra fue centrifugada a  $34500\times g$  durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se colectó la banda superior conteniendo las vesículas de membrana plasmática, se diluyó 1:5 con *buffer* de incubación (250 mM sacarosa, 50 mM Tris, pH 8.0) y se centrifugó a  $34500\times g$  durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Cefaratti y col., 2000). El pellet obtenido fue resuspendido en *buffer* de importe.

### **Ensayo de fosforilación de Akt1 en presencia de mitoplastos y vesículas**

Las vesículas purificadas por gradiente de Percoll y los mitoplastos (marcados con  $5\ \mu\text{M}$  MitoTracker Deep Red durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ ) fueron incubados en *buffer* de importe (100  $\mu\text{l}$  de volumen final) en presencia de  $0.3\ \mu\text{g}$  de Akt1 inactiva (Prospec), 20 mM ATP y 100 mM  $\text{MgCl}_2$  durante 30 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, la mezcla de reacción fue centrifugada a  $1000\times g$  durante 20 minutos y el pellet fue resuspendido en 50 mM Tris, 0.3% Triton X-100 y 1% seroalbúmina bovina (BSA).

### **Microscopía confocal**

Para evaluar la redistribución de Akt1-GFP y sus mutantes en los compartimientos subcelulares, las células crecidas sobre cubreobjetos y transfectadas con Akt1-GFP y sus mutantes fueron teñidas con un colorante mitocondrial específico, MitoTracker Deep Red (Invitrogen, 100 nM, 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ ). Al momento de la adquisición de las imágenes, las células fueron estimuladas con  $50\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  y registradas cada 1-2 minutos por un período de 20-30 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal (Olympus FV1000) con un objetivo 60x 1.35 NA. Para GFP los filtros utilizados fueron: 488 nm (excitación) y 500-530 nm (emisión); en el caso de MitoTracker los filtros fueron: 633 nm (excitación) y 655-755 nm (emisión). Las imágenes se adquirieron en modo secuencial. Se evaluaron

de 3-7 planos equidistantes (0.5  $\mu\text{m}$ ) para cada célula o grupo celular. La intensidad de fluorescencia para Akt1-GFP fue cuantificada en cada compartimiento y normalizada con la media de intensidad de fluorescencia de la célula entera o del grupo celular registrado en simultáneo. Se delimitó el compartimiento celular a través de una máscara obtenida cuando la intensidad de fluorescencia de la imagen del canal verde (GFP) era el doble de la media de intensidad de la imagen entera. Para definir el compartimiento mitocondrial se seleccionó una máscara determinada por la intensidad de fluorescencia del MitoTracker por encima del doble de la media de intensidad de la imagen completa, combinada con la máscara celular para evaluar solamente las células transfectadas (Galli y col., 2009), o utilizando un algoritmo para detectar y cuantificar colocalización (Villalta y col., en preparación). Las máscaras nucleares fueron realizadas manualmente. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Matlab (Mathworks) y las herramientas de DIPimage. Los niveles de background se obtuvieron midiendo la intensidad media de cada fluoróforo fuera de las células y se sustrajeron en cada caso. Los valores negativos se redefinieron como cero.

Para el estudio de colocalización se determinaron el coeficiente de solapamiento de Manders (R) y el coeficiente de correlación de Pearson (r) según:

$$R = \frac{\sum S1i \times S2i}{\sqrt{\sum (S1i)^2 \times \sum (S2i)^2}}; \text{Ecuación 1}$$

$$r = \frac{\sum (S1i - S1media) \times (S2i - S2media)}{\sqrt{\sum (S1i - S1media)^2 \times \sum (S2i - S2media)^2}}; \text{Ecuación 2}$$

donde  $S1i$  representa la intensidad de señal de los píxeles en el canal verde y  $S2i$  en el canal rojo;  $S1media$  y  $S2media$  reflejan el promedio de las intensidades de sus respectivos canales. Se determinaron asimismo los mapas de solapamiento de Manders y de correlación de Pearson de la siguiente manera: cada valor de píxel corresponde al valor que se genera de acuerdo a la ecuación 1 o 2, respectivamente, dividido por el denominador completo de la ecuación. De esta forma, si se considera una imagen como un arreglo de  $n \times m$  píxeles, entonces los mapas se generan del siguiente modo:

**Mapa R**

$$\left[ \begin{array}{c} \frac{S_{11,1} \times S_{21,1}}{\sqrt{\sum (S_{1i})^2 \times \sum (S_{2i})^2}}; \dots \frac{S_{11,n} \times S_{22,n}}{\sqrt{\sum (S_{1i})^2 \times \sum (S_{2i})^2}} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \frac{S_{1m,1} \times S_{2m,1}}{\sqrt{\sum (S_{1i})^2 \times \sum (S_{2i})^2}}; \dots \frac{S_{1m,n} \times S_{2m,n}}{\sqrt{\sum (S_{1i})^2 \times \sum (S_{2i})^2}} \end{array} \right]$$

**Mapa r**

$$\left[ \begin{array}{c} \frac{(S_{11,1} - S_{1media}) \times (S_{21,1} - S_{2media})}{\sqrt{\sum (S_{1i,j} - S_{1media})^2 \times \sum (S_{2i,j} - S_{2media})^2}}; \dots \frac{(S_{11,n} - S_{1media}) \times (S_{22,n} - S_{2media})}{\sqrt{\sum (S_{1i,j} - S_{1media})^2 \times \sum (S_{2i,j} - S_{2media})^2}} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \frac{(S_{1m,1} - S_{1media}) \times (S_{2m,1} - S_{2media})}{\sqrt{\sum (S_{1i,j} - S_{1media})^2 \times \sum (S_{2i,j} - S_{2media})^2}}; \dots \frac{(S_{1m,n} - S_{1media}) \times (S_{2m,n} - S_{2media})}{\sqrt{\sum (S_{1i,j} - S_{1media})^2 \times \sum (S_{2i,j} - S_{2media})^2}} \end{array} \right]$$

Para el análisis de fosforilación, los mitoplastos fueron teñidos con 5  $\mu$ M MitoTracker Deep Red e incubados con las vesículas en presencia de 0.3  $\mu$ g de Akt1 recombinante (Prospec) como fue descrito anteriormente. Las preparaciones se lavaron, fijaron en 4% paraformaldehído, fueron resuspendidas en 50 mM Tris, 0.3% Triton X-100, 1% BSA y posteriormente coincubadas con los anticuerpos primarios (P-Thr<sup>308</sup> o P-Ser<sup>473</sup> y ATPasa) y secundarios (anti-rabbit conjugado a Cy2 o anti-mouse conjugado a Cy3). Para los lavados, las muestras fueron centrifugadas a 10000 $\times$ g durante 20 minutos Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en PBS y montadas en cubreobjetos con Fluorsave (Calbiochem). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Olympus FV1000 con un objetivo 60x 1.35 NA. Para Cy2 los filtros utilizados fueron: 488 nm (excitación) y 500-530 nm (emisión); en el caso de Cy3 los filtros fueron: 543 nm (excitación) y 555-655 nm (emisión). Para el análisis de

las imágenes se realizó una máscara sobre la intensidad de fluorescencia de Cy3 (marcador de vesículas) o de MitoTracker Deep Red (marcador de mitoplastos). La máscara se delimitó cuando la intensidad de fluorescencia de cada canal fue de 50 veces mayor la intensidad de la media del canal respectivo y se combinaron luego ambas máscaras. La máscara final contenía grupos de píxeles (partículas) que mostraban fluorescencia en el canal de Cy3 (vesículas) y en el canal de MitoTracker Deep Red (mitoplastos) o en ambos canales (mitoplastos engolfados por vesículas). Las intensidades de fluorescencia de Cy2 (P-Ser473 o P-Thr308), Cy3 (ATPasa) y MitoTracker Deep Red fueron evaluadas en estas máscaras para cada partícula. Se analizó un total de 20 imágenes para la cuantificación de P-Ser y 15 imágenes para la de P-Thr (~900 partículas para cada caso). Finalmente, se obtuvo una matriz final de datos de tres valores de intensidad de fluorescencia por partícula, para cada sitio de fosforilación de Akt. Estas matrices fueron analizadas por el método de clustering *k*-mean, un método de análisis que particiona *n* observaciones en *k* clusters en el cual cada observación pertenece al cluster con la media mas cercana. El algoritmo de clustering para *k*-means está integrado como una función de Matlab. Los puntos fueron separados en 6 poblaciones. De estas poblaciones seleccionamos 3 grupos representativos de acuerdo a su marca predominante: principalmente vesículas (tinción predominante de ATPasa-Cy3), principalmente mitoplastos (MitoTracker Deep Red) o ambos, y comparadas con la fluorescencia correspondiente a P-Akt Ser<sup>473</sup>-Cy2 o a P-Akt1 Thr<sup>308</sup>-Cy2. Se observó siempre una población con tinción de MitoTracker Deep Red sin señal para Cy2, presumiblemente correspondiente a aquellas partículas que no habrían importado Akt1.

### **Espectrometría de masa**

La banda correspondiente a la proteína Akt1 o ERK2 pura fue escindida de un gel del poliacrilamida teñido con azul de Coomassie y sujeta a digestión triptica (Shevchenko y col., 2006). La digestión se realizó en presencia de surfactante para garantizar una secuenciación aumentada y los pasos de reducción fueron evitados usando DTT. Las muestras fueron alquiladas con 10  $\mu$ M acrilamida (+71 Da) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los péptidos extraídos fueron secados y reconstituídos hasta 8  $\mu$ l en 0.1% ácido fórmico, 2% acetonitrilo y 97.9% agua. Se

utilizó un espectrómetro de masa LCQ Deca XP Plus (Termo Scientific) fijado en el modo de adquisición dependiente para realizar MS/MS sobre los 3 iones más intensos.

### **Producción intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La producción intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue determinada mediante citometría de flujo. Brevemente, 10<sup>6</sup> células transfectadas con 1 µg del vector pcDNA3.1 Trx1 wild type, Trx2 wild type o con el vector vacío y tratadas a las 24 hs con 0.2 y 2 µM antimicina A durante 3 horas fueron levantadas de los hoyos, resuspendidas en PBS e incubadas con 5 µM 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato (DHCF-DA) por 30 minutos a 37°C en oscuridad. Luego de la incubación las células fueron lavadas y resuspendidas finalmente en PBS. Se utilizó ioduro de propidio (0.005%) para detectar las células muertas que fue colocado al momento previo de la adquisición de los datos. La lectura se realizó en un equipo FAC Scalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) en FL-1 (DHCF-DA) y FL-2 (ioduro de propidio) con posterior análisis en el software WinMDI. Para cada análisis se adquirieron 20000 eventos totales.

### **Animales**

Para los experimentos se utilizaron ratones machos BALB/c de 60 días de edad procedentes del Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica y se siguieron los criterios de cuidado y uso de animales de laboratorio para investigación. En todos los casos los animales fueron mantenidos bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs:12 hs y alimentados *ad libitum*.

Los ratones se dividieron al azar en los siguientes grupos (n = 4 animales/grupo):

- **T + vector vacío:** ratones inoculados subcutáneamente con células de la línea LP07 y electroporados en el tumor al cabo de 4 semanas con el vector pRNA-U6.1/Neo (GenScript).
- **T + siRNA Trx1:** ratones inoculados subcutáneamente con células de la línea LP07 y electroporados en el tumor al cabo de 4 semanas con el vector pRNA-U6.1/Neo (GenScript) conteniendo la secuencia GGATCCCGCTGATCGAGAGCAAGGA ATTGATATCCGTTCTTGCTCTCGATCAGCTTTTTTCCAAAAGCTT (siRNA Trx1 *Mus musculus*).

- **T + siRNA Trx2:** ratones inoculados subcutáneamente con células de la línea LP07 y electroporados en el tumor al cabo de 4 semanas con el vector pRNA-U6.1/Neo (GenScript) conteniendo la secuencia GGATCCCGATCCTAGGACCGCGGCTATT GATATCCGTAGCCGCGGTCCTAGGATCTTTTTTCCAAAAGCTT (siRNA Trx2 *Mus musculus*).

Los ratones se anestesiaron con éter etílico y se les extrajo inmediatamente el tumor con el fin de obtener homogenatos y purificar las fracciones mitocondrial y nuclear.

### **Generación de los tumores**

Las células LP07 se levantaron por tripsinización y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, se resuspendieron en MC sin suero hasta obtener una suspensión celular homogénea a una concentración de  $2 \times 10^6$  cél/ml. Los ratones BALB/c fueron inoculados con 0.1 ml de la suspensión ( $2 \times 10^5$  células) subcutáneamente en el flanco izquierdo utilizando una jeringa de 1 cm<sup>3</sup> y aguja de 27 G $\times$ ½''. La evolución de los tumores fue analizada tomando tres diámetros con un calibre estableciendo así el volumen del mismo.

### **Electroporación *in vivo* de los tumores**

El ADN plasmídico (20 µg de vector pRNA-U6.1/Neo vacío o conteniendo el siRNA Trx1 o siRNA Trx2) fue inyectado percutáneamente en los tumores de ratones anestesiados con tiopental sódico (40 mg/kg intraperitoneal). Se utilizaron 2 jeringas Hamilton con agujas de 22 G colocadas a 2 cm de profundidad y 0.9 cm de distancia; luego de 30 segundos de la inyección, las agujas fueron utilizadas como electrodos conectadas a un electroporador Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) Los tumores fueron sujetos a 3 pulsos de corriente de polaridad inversa con una frecuencia de 1 seg<sup>-1</sup>, duración de 50 mseg y el voltaje establecido a 120 V/cm.

### **Aislamiento y purificación de mitocondrias a partir de tumores**

Los animales fueron anestesiados con éter etílico. Se les extrajo el tumor que fue inmediatamente colocado en 40 ml de *buffer* MSHE a 4°C. El tumor fue cortado en pequeños trozos y homogeneizado en un Potter Evelheim. El homogenato resultante fue

filtrado con gasa y centrifugado a  $600\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. El pellet conteniendo los núcleos fue procesado análogamente según la descripción para la purificación de la fracción nuclear a partir de células. Parte del sobrenadante se fraccionó en alícuotas (corresponde a la fracción homogenato), y el resto fue recentrifugado a  $7000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min para precipitar las mitocondrias. El pellet fue resuspendido en 2 ml de MSHE con 0.1% BSA más un colchón de 8 ml de *buffer* Percoll (30% Percoll, 0.23 M manitol, 0.07 M sacarosa, 0.5 mM EGTA, 2 mM HEPES, pH 7.4) y fue ultracentrifugado a  $100.000\times g$  durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego de la centrifugación se observó un anillo marrón más denso en la interfase, correspondiente a la fracción mitocondrial que fue colectada, resuspendida en 40 ml de MSHE con 0.1% BSA y centrifugada a  $7000\times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , dos veces consecutivas (lavados). Posteriormente, se lavó 2 veces con 0.15 M KCl y luego otras dos veces con MSHE sin BSA. El pellet final se resuspendió en 2 ml de MSHE sin BSA (corresponde a la fracción: mitocondrial). Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford. Las muestras fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **Materiales**

Tris, NADH, sacarosa, glucosa, HEPES, EDTA, EGTA, succinato, glicerol, leupeptina, aprotinina, PMSF, pepstatina, Percoll, L-glutamina, manitol, BSA, Tween 20, Triton X-100, diclorofluoresceína diacetato (DHCF-DA), antimicina A, yoduro de propidio, bromuro de etidio, naranja de acridina, FCCP, 4-vinilpiridinio, Rodamina-123 y  $\text{H}_2\text{O}_2$  son de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). La tripsina es de Gibco BRL. [ $\text{H}^3$ ] timidina es de NEN (Boston, MA, USA). La solución de acrilamida, las membranas de PVDF, y el ECL son de GE Health Care Biosciences. Los kits de midi y minipreps son de Promega (San Luis, CA, USA). El medio Optimem, DMEM-F12, MEM y Lipofectamina son de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Los elementos plásticos para cultivo celular son de Corning Life Sciences (Lowell, MA, USA). Los vectores pcDNA3.1 ERK2 C38A, C214A y C214E fueron construidos y secuenciados por Genscript Corporation (Piscataway, NJ, USA). Los plásmidos pcDNA3.1 Trx2, C90S y C90/95S fueron gentilmente cedidos por el Dr. Wan, Yale University. Los plásmidos pcDNA3.1 Trx1 y C32S fueron donados por el Dr. Sadoshima, University of New Jersey y el Dr. Gelpi, Universidad de Buenos Aires.

### **Análisis de los datos**

Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, y por método de Scheffé de comparaciones *a posteriori*. Se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedacia. Se aceptó significación estadística cuando  $p < 0.05$ .

---

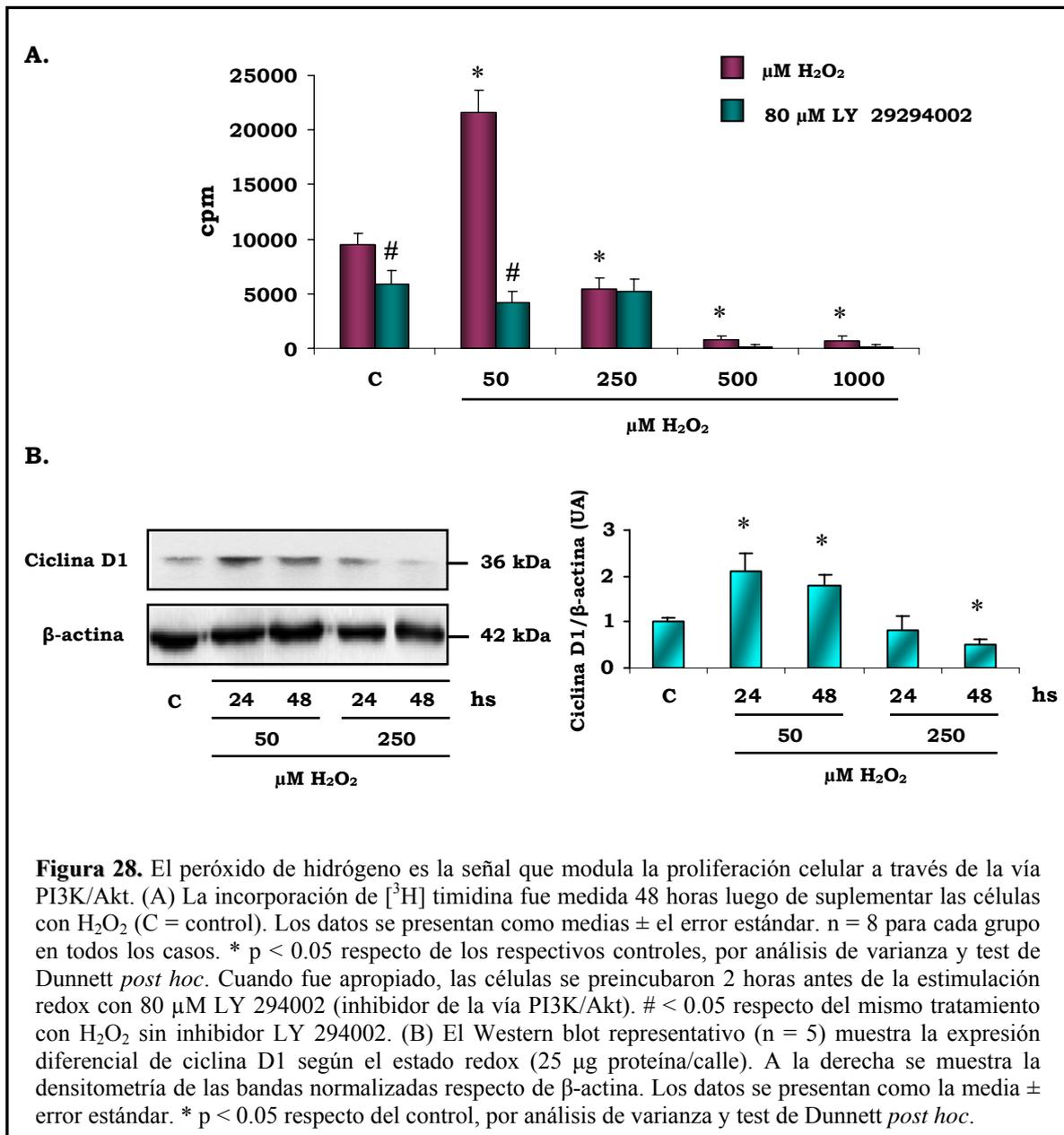
## Resultados

---

### Primera Parte

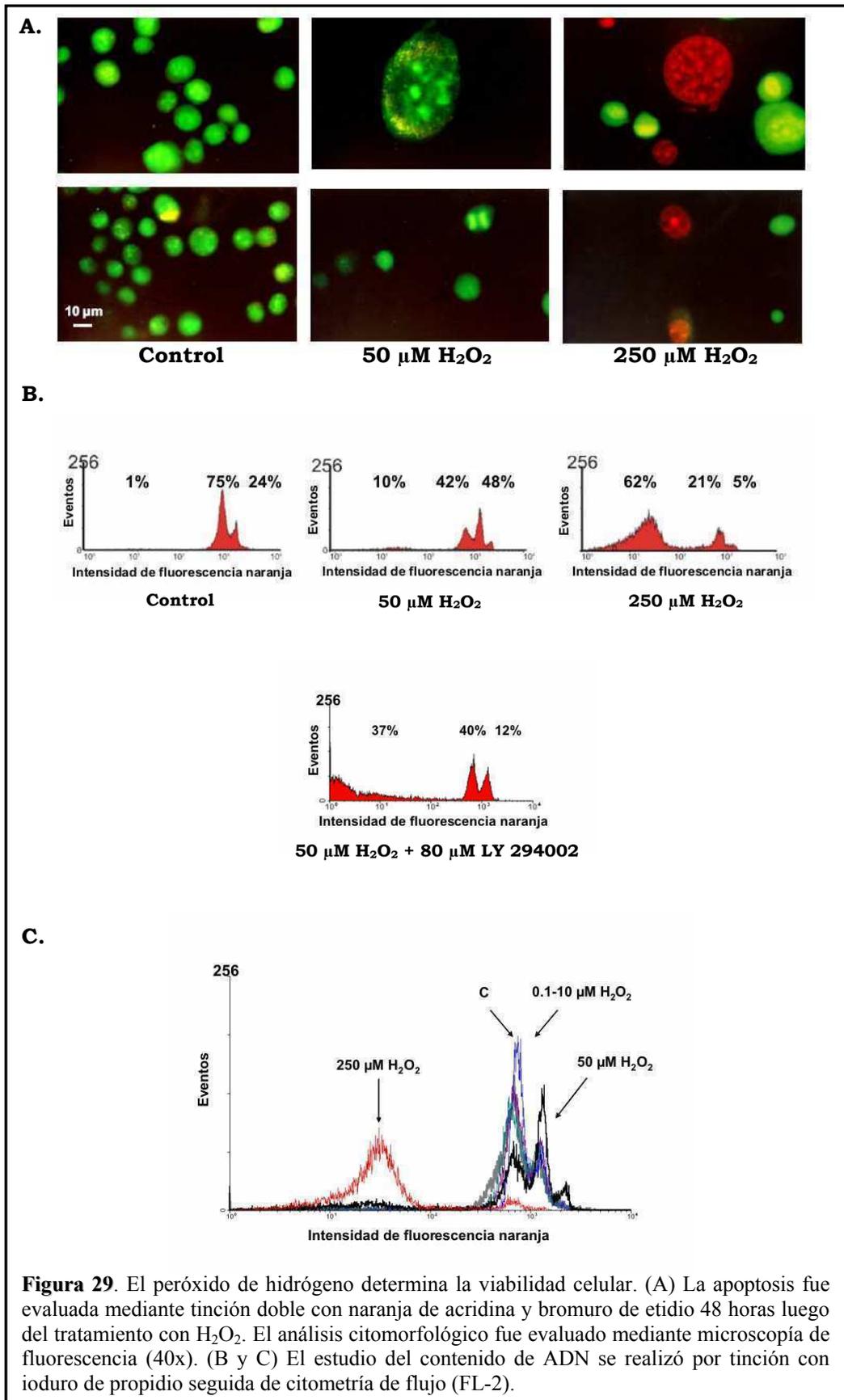
#### El destino celular depende del estado redox

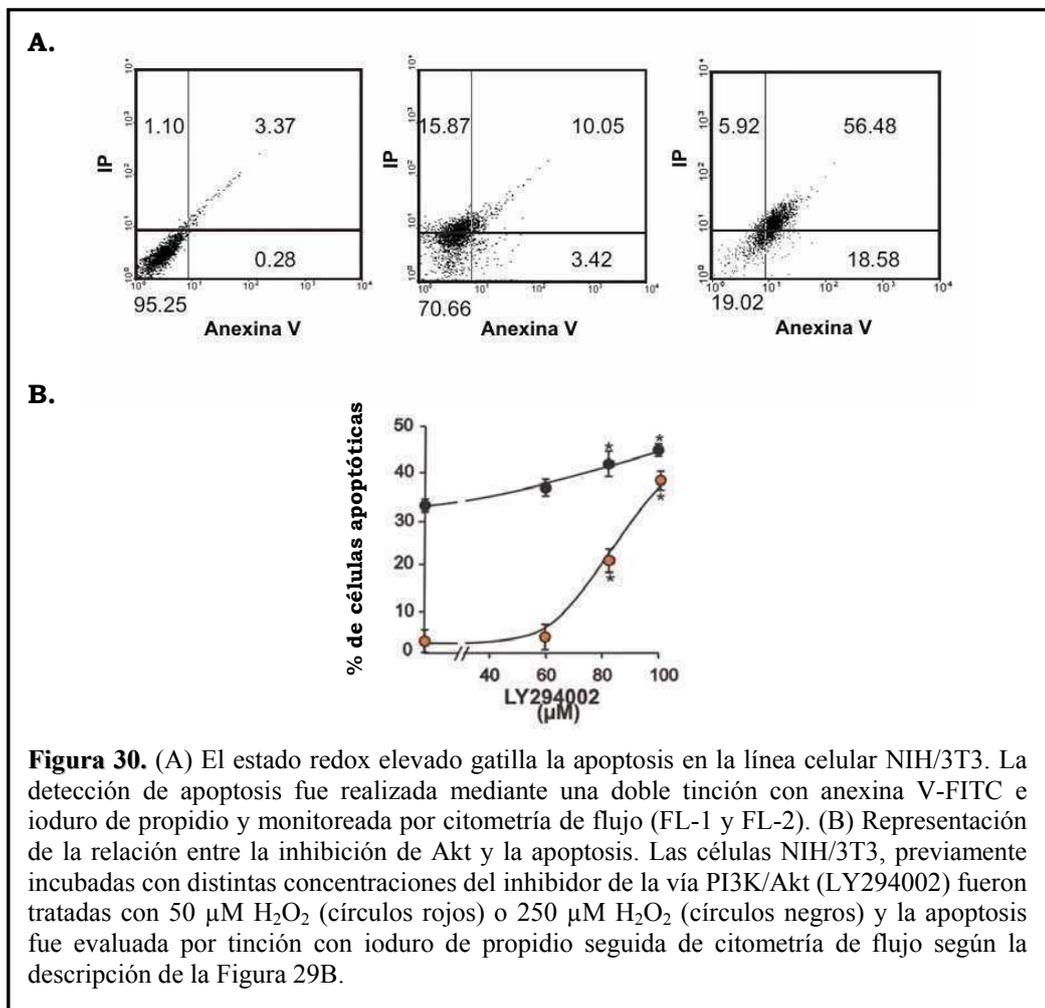
La progresión del ciclo celular en la línea NIH/3T3 bajo la influencia de distintos estados redox fue evaluada mediante la incubación de dichas células con 50-1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de [ $^3\text{H}$ ]-timidina durante 24 horas. Las concentraciones crecientes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ejercieron una fina modulación en la tasa de proliferación desde un fenotipo altamente proliferante a una marcada disminución en la tasa de división celular. A 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  la tasa de proliferación se duplicó (Figura 28A) y este aumento fue acompañado por un incremento en la expresión de ciclina D1 (Figura 28B). El aumento en la tasa proliferativa fue abolido preincubando a las células con 80  $\mu\text{M}$  LY294002 (el inhibidor de la vía PI3K), indicando que esta vía está ampliamente comprometida en la progresión del fenotipo proliferativo (Figura 28A). Por el contrario, 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  causó una disminución del 45% en la tasa de proliferación que fue acompañada por un descenso en los niveles de ciclina D1 (Figuras 28A y B). Asimismo, la proliferación fue completamente abolida al incubar las células con 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Para discriminar si el efecto de alta concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  provocaba arresto del crecimiento celular o apoptosis, la progresión del ciclo celular fue analizada tiñendo el ADN con naranja de acridina/bromuro de etidio y observando las células al microscopio de fluorescencia. El tratamiento con 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  resultó en cambios en el patrón de

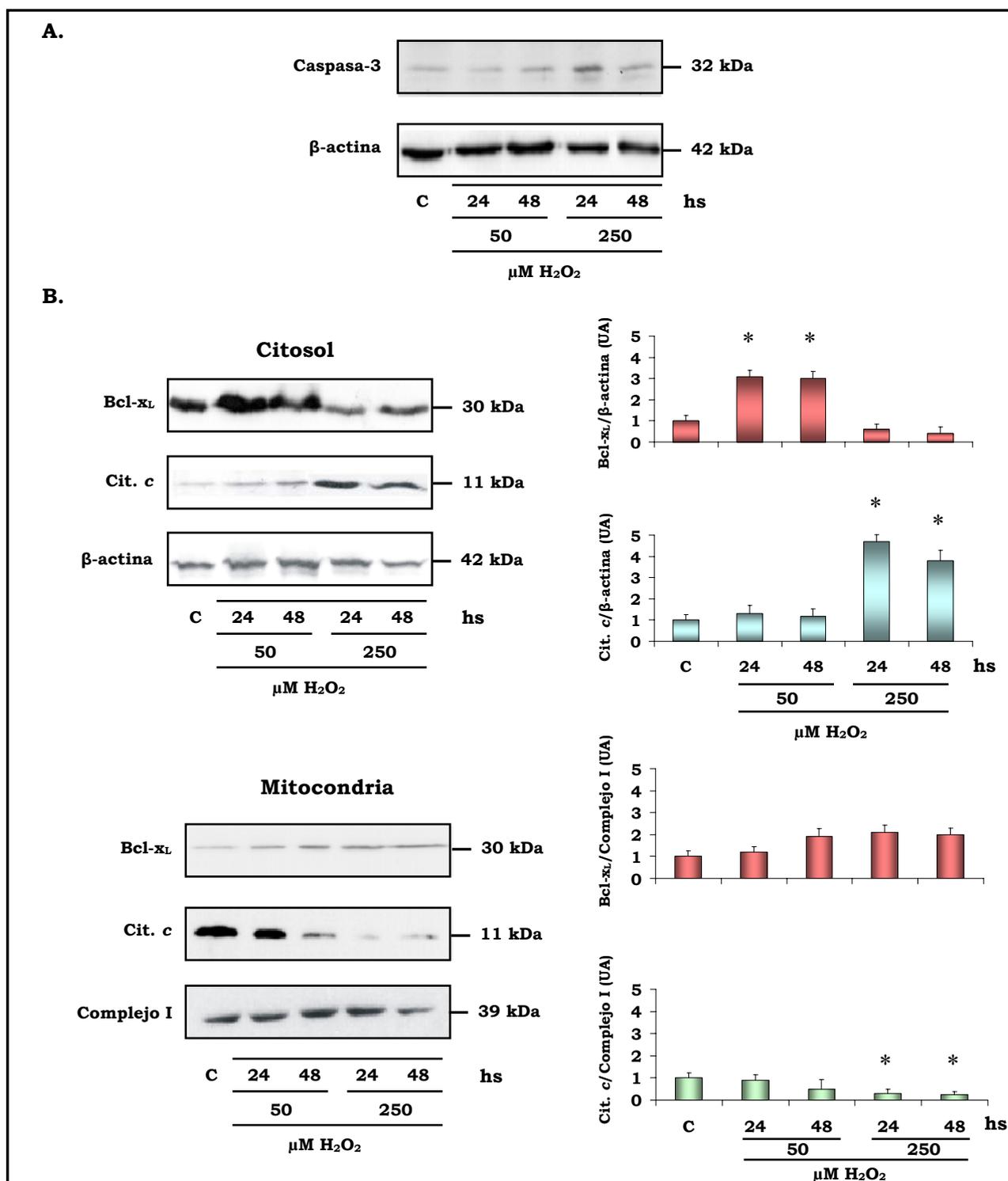
tinción nuclear dado que se observó una alta actividad transcripcional. Por el contrario, a 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  se observaron núcleos correspondientes a células apoptóticas tempranas y tardías con pérdida de la integridad de la membrana celular (Figura 29A). Dichos resultados fueron confirmados por tinción con ioduro de propidio seguido por citometría de flujo donde M1 representa el porcentaje de núcleos diploides, M2 el de núcleos tetraploides y M3 el de núcleos hipodiploides. El tratamiento con 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  produjo un cambio en la distribución de la población celular con un aumento del pico tetraploide sugiriendo una progresión de la población celular hacia la fase S del ciclo celular. Por el contrario, 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  condujo al 62% de la población celular hacia la apoptosis, lo que fue reflejado por la presencia de un pico hipodiploide en detrimento de la población celular con contenido diploide y tetraploide (Figura 29B panel superior y 29C) (C: M1: 75%, M2: 24%, M3: 1%; 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ : M1: 42%, M2: 48%, M3: 10%; 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ : M1: 21%, M2: 5%, M3: 62%). Asimismo, la preincubación de las células con 80  $\mu\text{M}$  LY294002 en aquellas tratadas con 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  resultó en una disminución de la población tetraploide con la consecuente aparición del pico hipodiploide, resultados que apoyan la evidencia del ensayo de proliferación (M1: 40%, M2: 12%, M3: 37%) (Figura 29B panel inferior y 29C). En este sentido, resultados similares fueron obtenidos realizando una tinción con anexina V/ioduro de propidio seguida por citometría de flujo. Los resultados del dot blot (anexina V vs ioduro de propidio) indicaron que a las 12 horas de incubación con 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , un 56% de la población celular había iniciado el proceso de apoptosis (anexina V +/ioduro de propidio +) (Figura 30A). Independientemente de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el porcentaje de apoptosis se incrementó con la inhibición de la vía PI3K/Akt (Figura 30B).





Dado que el mecanismo de apoptosis puede gatillarse por la vía extrínseca (receptores de membrana de tipo FAS/FASL) o por la vía intrínseca (mitocondrial) se estudió la participación de esta organela en el proceso de muerte celular. Se observó la activación de la vía de caspasa-3 dependiente de la mitocondria (Figura 31A) con liberación de citocromo *c* al citosol luego de someter las células a 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 24 y 48 horas (Figura 31B). Además, los cambios redox provocaron variaciones en la redistribución de la proteína antiapoptótica Bcl- $x_L$ , observándose una retención de la misma en la organela luego de la estimulación con 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 31B). Asimismo, la participación de la vía mitocondrial en el proceso de apoptosis fue determinada por la evidencia de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial evaluada utilizando la sonda catiónica Rodamina-123 por espectrofluorometría (Tabla 3) y por citometría de flujo (Figura 32). Estos resultados indican que: a) a bajas

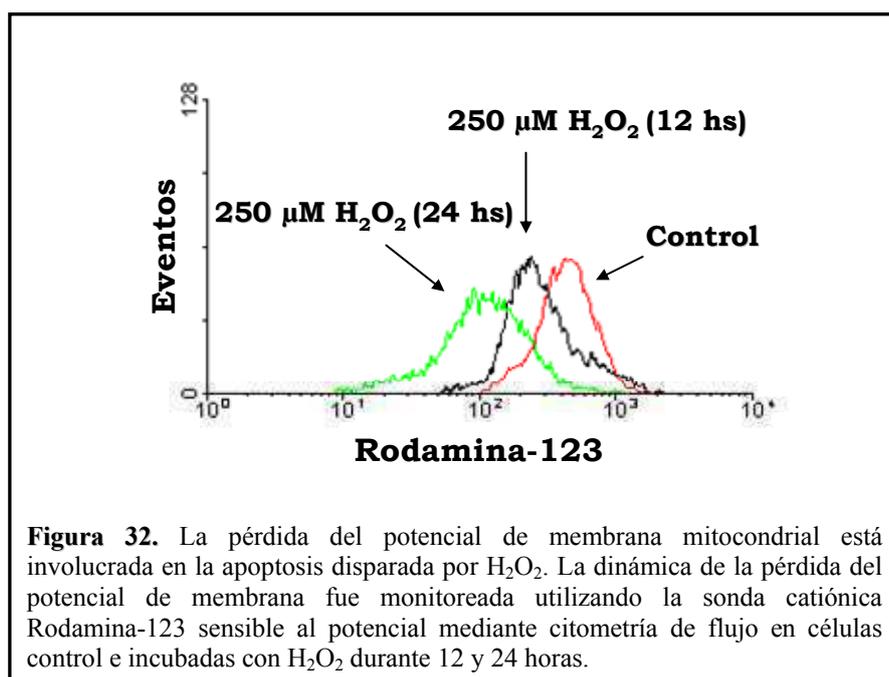
concentraciones de  $H_2O_2$  se estimula la proliferación por la vía de Akt y b) altos niveles de oxidantes causan una activación de la vía apoptótica mitocondrial.



**Figura 31.** El peróxido de hidrógeno gatilla la apoptosis a través de la vía mitocondrial. (A) El Western blot representativo ( $n = 4$ ) muestra la expresión diferencial de caspasa-3 según el estado redox ( $25 \mu\text{g}$  proteína/calle). (B) La translocación de Bcl-x<sub>L</sub> y citocromo *c* de la mitocondria (panel inferior) al citosol (panel superior) fue analizada como marcadora de la vía apoptótica mitocondrial. En los Western blots representativos ( $n = 4$ ) ( $25 \mu\text{g}$  proteína/calle) se muestran las diferencias observadas luego de incubar las células con  $H_2O_2$  durante 24 y 48 hs. A la derecha se exhiben las densitometrías de las bandas normalizadas respecto de  $\beta$ -actina o citocromo *c* según la fracción subcelular analizada. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  respecto del control, por análisis de varianza y test de Dunnett *post hoc*.

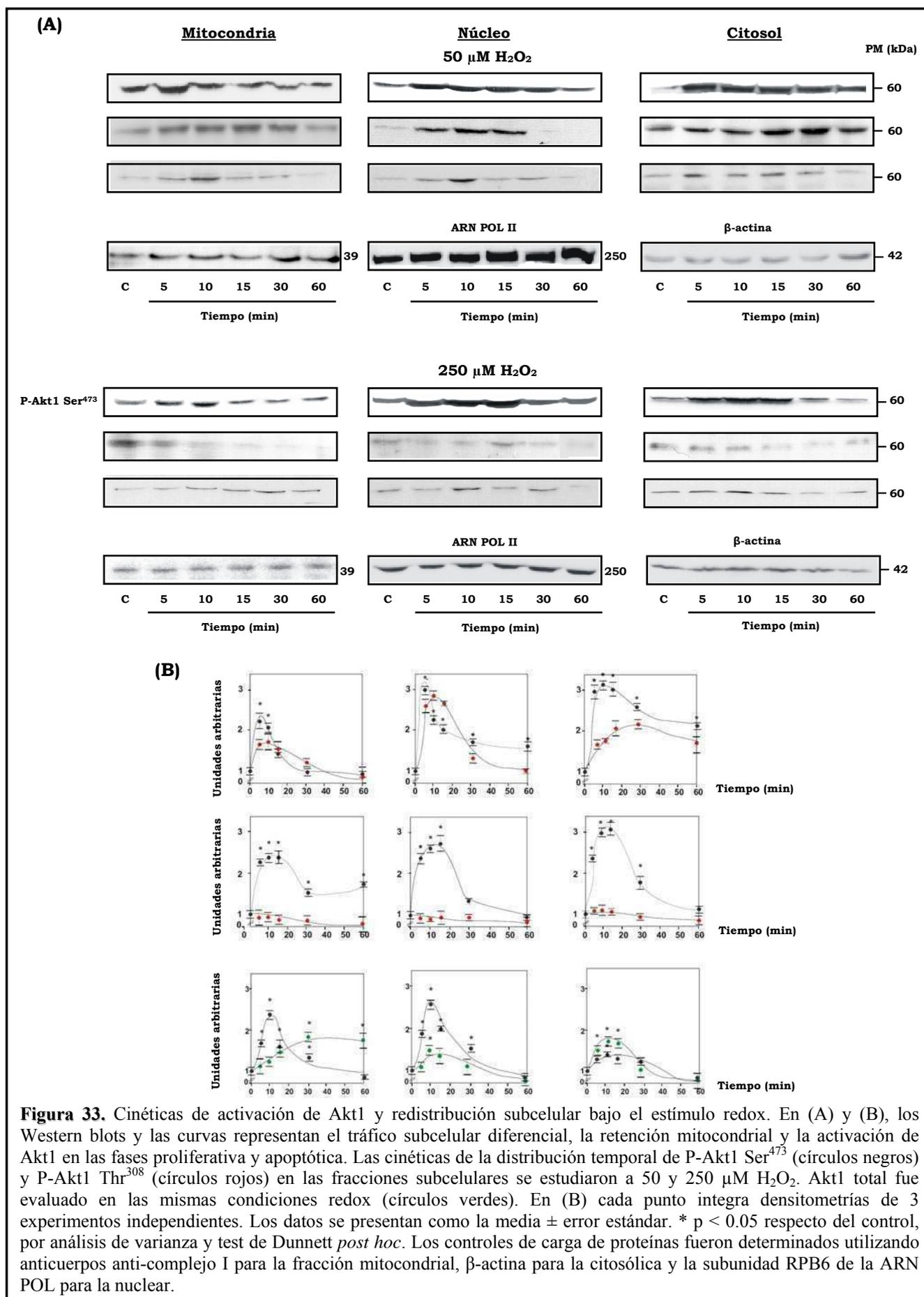
Condición experimental	Potencial de membrana (mV)
Mitocondrias de células control + mal-glu (estado 4)	-185.58±7.32
Mitocondrias de células tratadas con 250 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ + mal-glu (estado 4)	-151.07±5.24

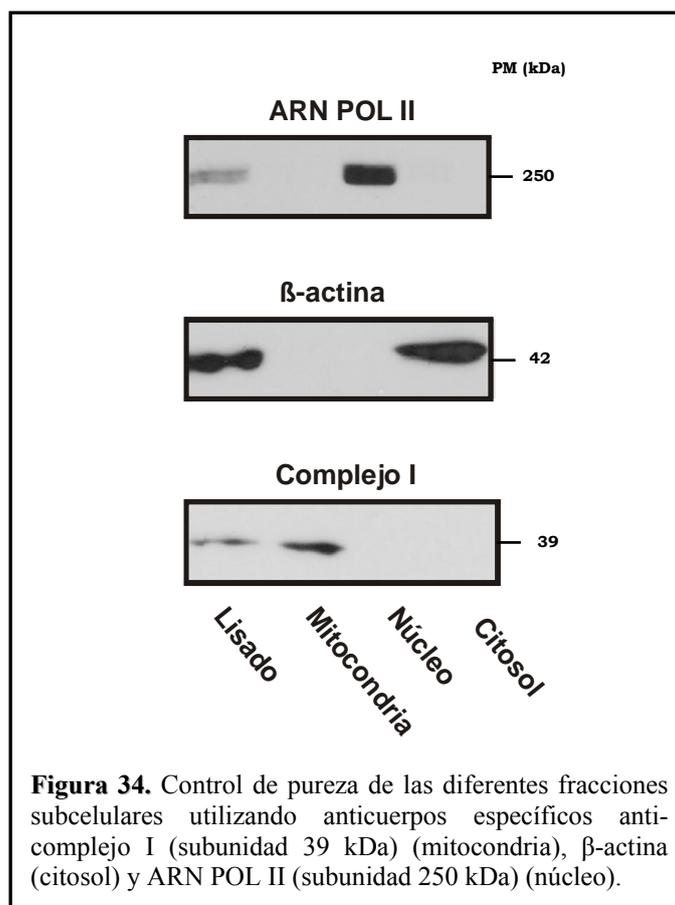
**Tabla 3.** Potencial de membrana mitocondrial de células NIH/3T3 en el estado 4 en condiciones basales y alto estado redox (250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_{\text{mit}}$ ) fue determinado por duplicado determinando la fluorescencia de la R-123 a 503 nm→527 nm espectrofluorométricamente a 37°C y utilizando la ecuación de Nernst-Guggenheim según descrita en Materiales y Métodos. Adiciones: 8 mM malato (mal); 8 mM glutamato (glu).



### **Cinéticas de activación y redistribución de Akt1 ante diferentes estados redox**

Considerando que Akt1 influye críticamente en la supervivencia celular y que la vía mitocondrial se encuentra comprometida, se evaluó la distribución de esta kinasa en los distintos compartimientos subcelulares mediante Western blot. La exposición de las células a una baja concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causó una rápida aparición de Akt1 en la mitocondria, el núcleo y el citosol (Figura 33A y B). Sin embargo, una alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó una retención de la kinasa en la mitocondria, en detrimento del aumento en el núcleo (Figura 33A y B). Dado que una acumulación de Akt1 en la mitocondria y una translocación deficiente al núcleo podrían deberse a la activación incompleta de esta kinasa, primero se evaluaron y luego se compararon las cinéticas para los dos sitios de fosforilación en los diferentes estados redox. De esta forma, se demostró que ante una baja concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la cinética de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> y P-Akt1 Thr<sup>308</sup> se asemejan a la de redistribución de Akt1 total; el pequeño retraso en el pico de P-Akt1 Thr<sup>308</sup> indica la secuencia reportada para los dos eventos de fosforilación (Sarbasov y col., 2005) (Figura 33A y B). Por el contrario, ante una alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la fosforilación en Thr<sup>308</sup> fue casi indetectable tanto en la mitocondria como en el núcleo. Más aún, la fosforilación en Ser<sup>473</sup> no fue esencialmente modificada aunque P-Akt1 Ser<sup>473</sup> fue retenida por un período más prolongado en la mitocondria (Figura 33A y B). Estos resultados ponen de manifiesto que las condiciones redox elevadas provocan una deficiencia en la segunda fosforilación de Akt1 y por lo tanto inducen la transición de un estado de proliferación al de apoptosis (Figura 30B). No se detectó contaminación de las diferentes fracciones evaluada por Western blot y medición de actividades enzimáticas de lactato dehidrogenasa y citocromo *c* oxidasa (Figura 34 y Tabla 4).





	Mitochondria	Citosol	Núcleo
<b>Complejo IV</b> ( $k'/\text{min mg prot}$ )	19.2±3.8	1.8±1.2	1.5±1.3
<b>Lactato dehidrogenasa</b> (nmol NADH/mg prot)	14±6.3	156±10.9	18±7.3

**Tabla 4.** Medición de actividades enzimáticas en las diferentes fracciones subcelulares. La actividad de complejo IV fue determinada monitoreando la oxidación del citocromo *c* reducido a 550 nm en la mitochondria y el citosol. La actividad de lactato dehidrogenasa fue monitoreada espectrofotométricamente a través de la oxidación de NADH a 340 nm en dichas fracciones subcelulares.

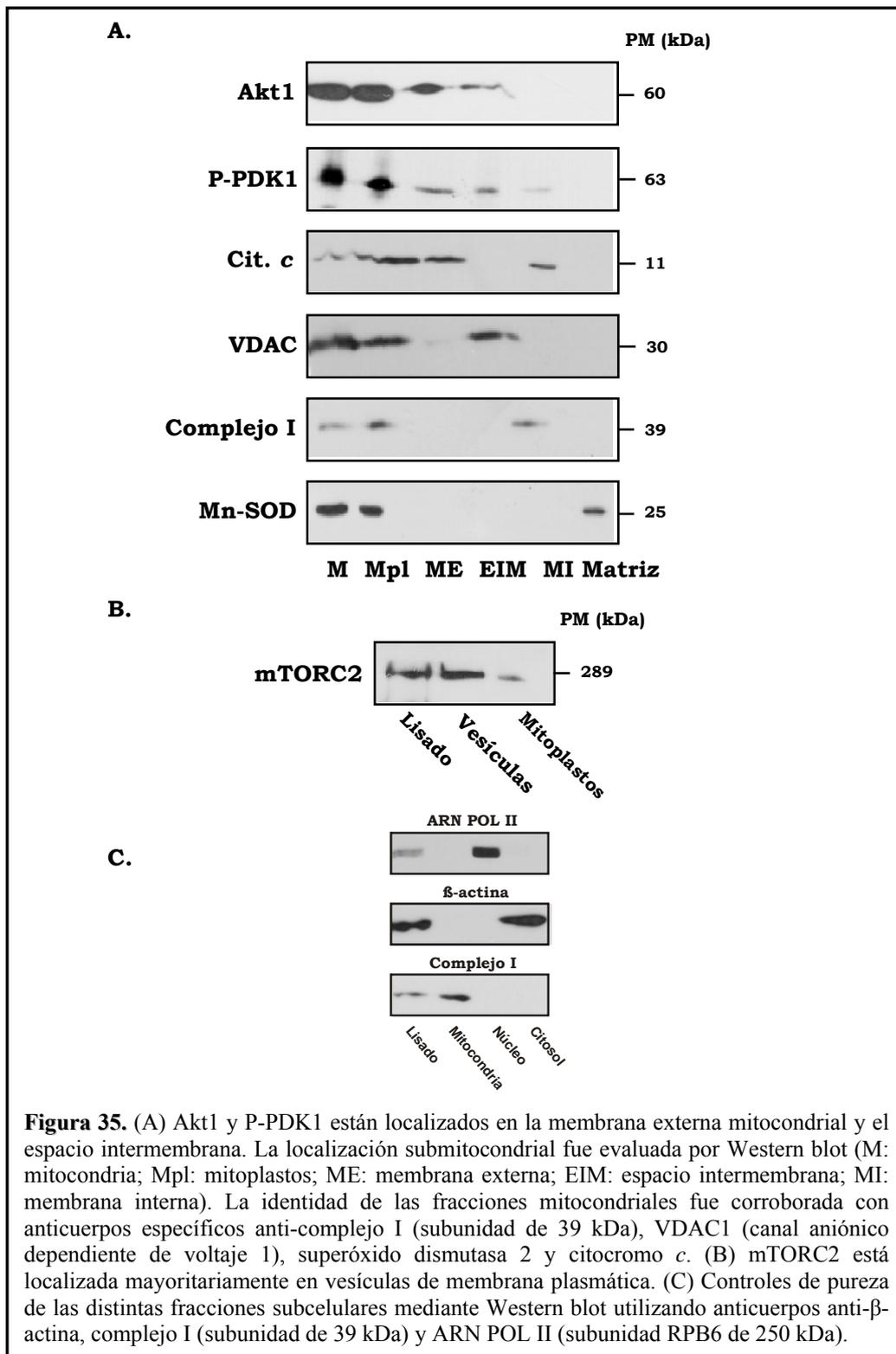
## **El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modula la interacción Akt1-P-PDK1 y por lo tanto su completa activación en la mitocondria**

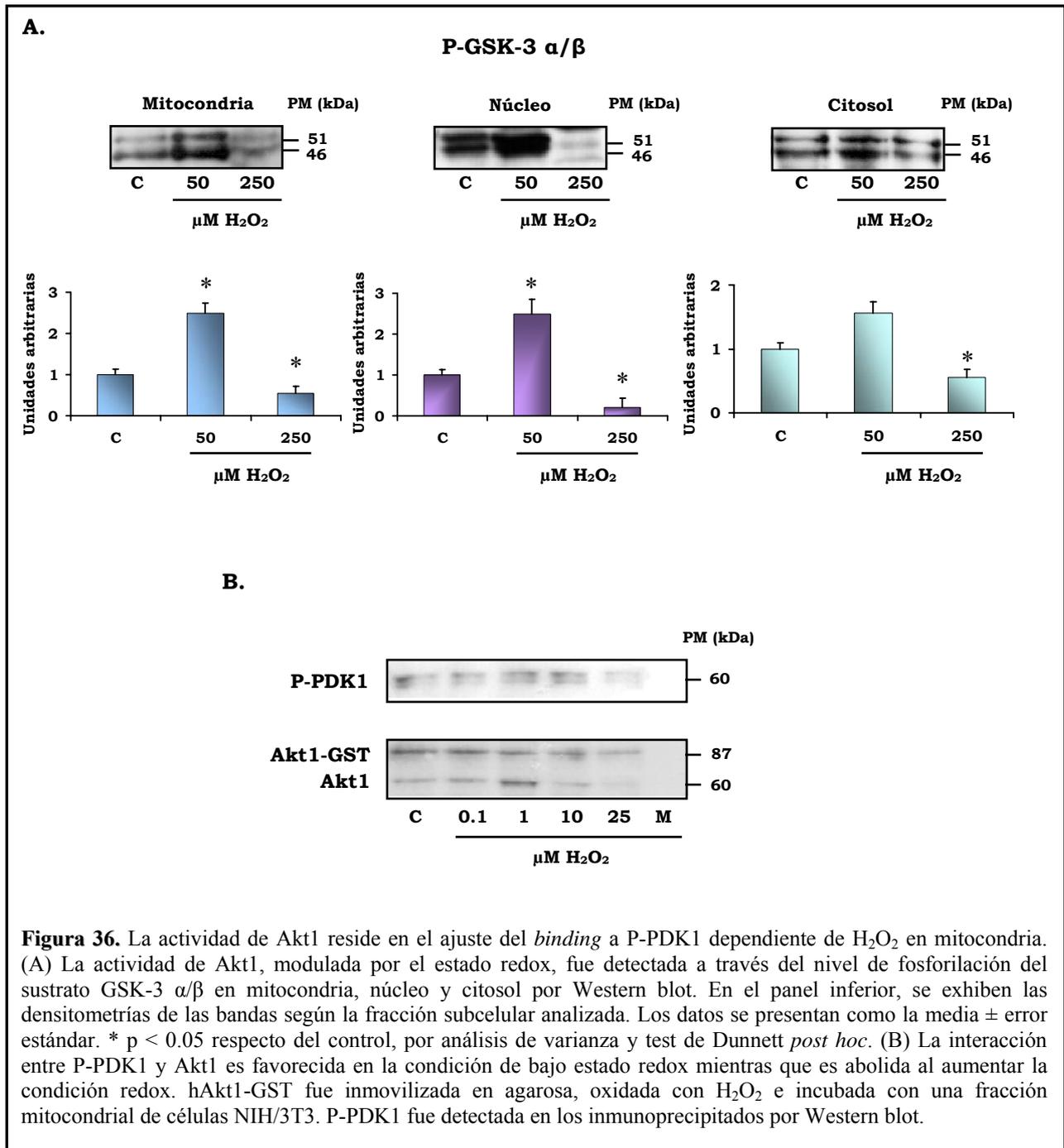
Estudios recientes demostraron que la fosforilación en Ser<sup>473</sup> de Akt1 es catalizada por el complejo mTORC2 (Alessi y col., 2009), mientras que la fosforilación en Thr<sup>308</sup> ocurre a través de P-PDK1 (Alessi y col., 1997). En ambos casos las fosforilaciones ocurrían a nivel de la membrana plasmática y eran favorecidas por la interacción de los dominios PH en la fase hidrofóbica según las descripciones originales. Sin embargo, luego de realizar un fraccionamiento submitocondrial se encontró que ambas kinasas, Akt1 y P-PDK1 también están presentes en la membrana externa y el espacio intermembrana (Figura 35A); P-PDK1 también se encontró presente en la membrana interna (Figura 35A). Por el contrario, mTORC2 solo se encontró expresado en la membrana plasmática y en el citosol pero escasamente en la mitocondria (Figura 35B). En todos los casos, los controles de pureza de las fracciones se realizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-β-actina, complejo I (subunidad de 39 kDa) y ARN POL II (subunidad RPB6 de 250 kDa) (Figura 35C). En 2005, Connor y colaboradores realizaron un análisis de la distribución de fosfatidilinositoles utilizando proteínas quiméricas fluorescentes de los dominios Akt-PH y PLC-PH. En estos estudios demostraron que YFP-Akt-PH permanecía en el citosol debido a la falta de acumulación de PtIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, en ausencia de activación de receptores. La sobreexpresión de SOD2-GFP provocaba una localización abundante de PtIns en compartimientos perinucleares y además colocalizaban con la SOD2 indicando su distribución mitocondrial. Es decir, que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por sobreexpresión de SOD2 e independientemente del compromiso de receptores, contribuye a un cambio en la producción y subsecuente movilización de PtIns (Connor y col., 2005).

Para evaluar los efectos redox sobre la actividad de Akt1 en las mismas condiciones, se inmunoprecipitó Akt1 proveniente de extractos mitocondriales, nucleares y citosólicos de células NIH/3T3 estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se determinó la fosforilación de GSK-3 α/β en un ensayo *in vitro*. En estas condiciones fue posible demostrar que la actividad tanto en las mitocondrias como en los núcleos aumentó en un 150% y en el citosol en un 55% cuando las células habían sido incubadas con la condición redox proliferante (Figura 36A). Por el contrario, al incubar las células con

---

250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , la actividad de Akt1 disminuyó en un 45% en las fracciones mitocondrial y citosólica, pero más marcadamente aún (78%) en el extracto nuclear (Figura 36A). Para investigar el mecanismo por el cual el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de modular la completa activación de Akt1 y por lo tanto su actividad, se realizaron ensayos de *pull down* con el fin de analizar la interacción entre Akt1 y PDK1. Se utilizó hAkt1-GST unida a agarosa, previamente oxidada con 0.1-25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  y subsecuentemente incubada con una fracción mitocondrial. Luego del análisis por Western blot se observó que el *binding* Akt1 - P-PDK1 aumentó entre 1-10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que disminuyó marcadamente al preincubar Akt1 con 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 36B).

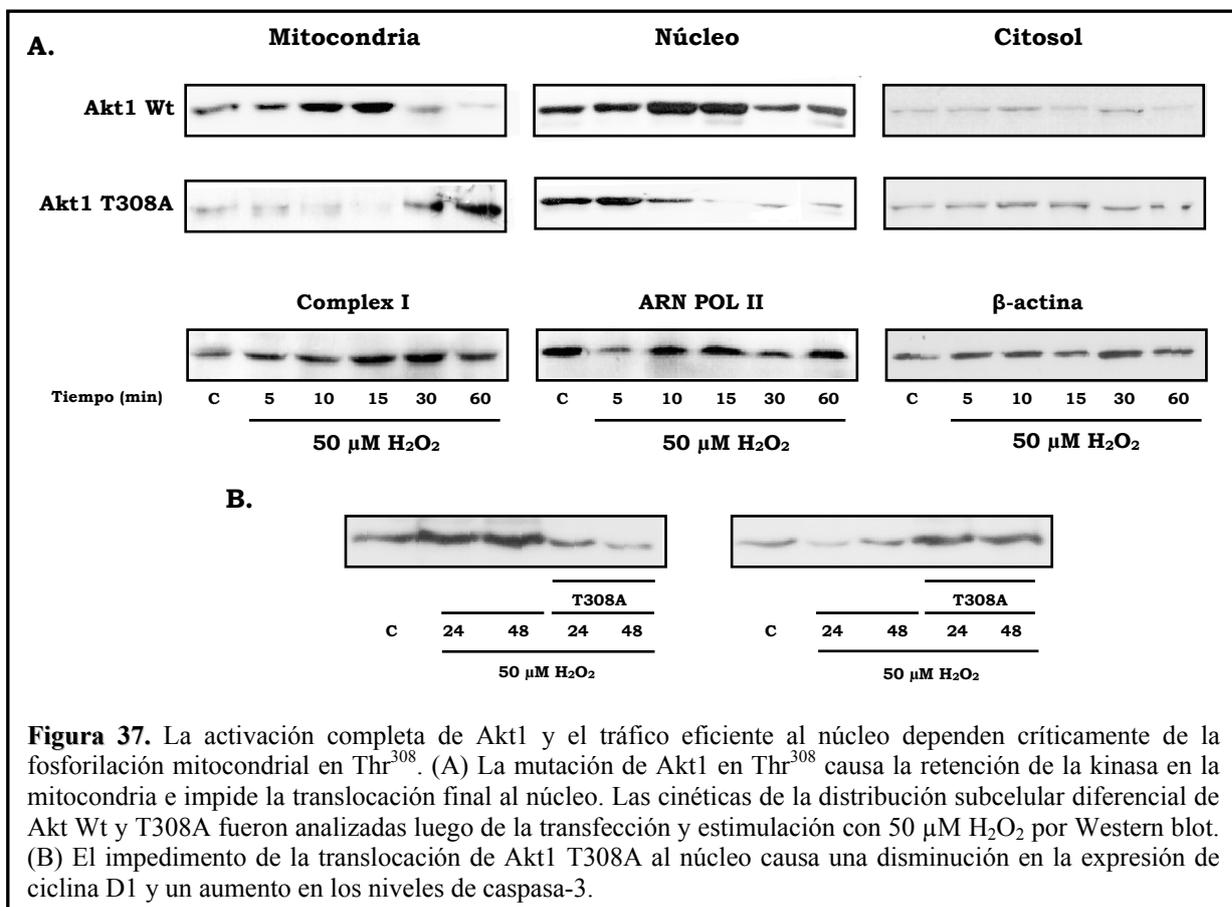




### El tráfico de Akt1 al núcleo requiere la fosforilación en Thr<sup>308</sup> en la mitocondria

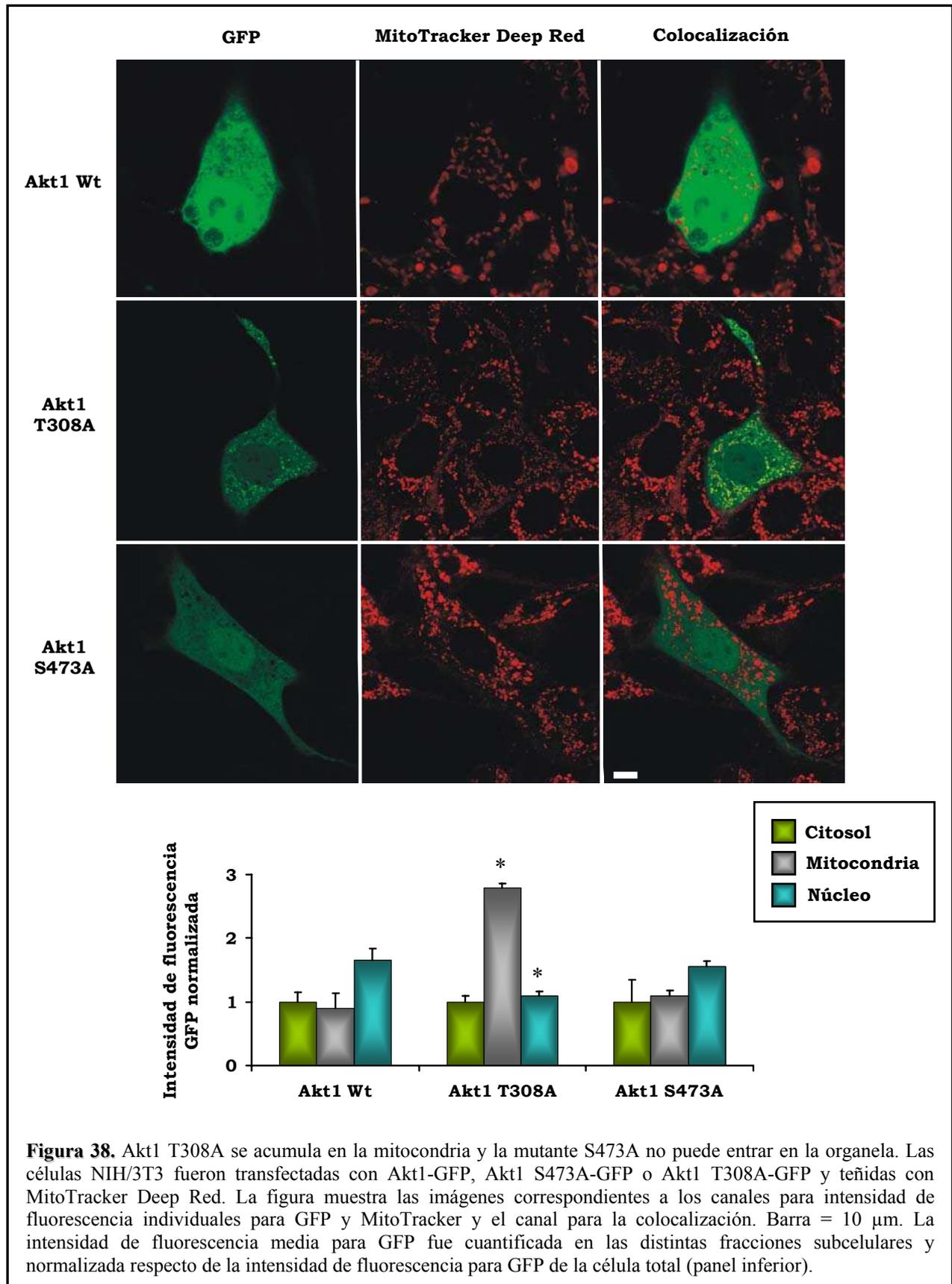
Para evaluar la conexión funcional entre la mitocondria y el núcleo y la relevancia de la fosforilación intramitocondrial de Akt1 por PDK1, se obtuvo una mutante de Akt1, la Akt1 T308A mediante mutagénesis dirigida, resultando en una

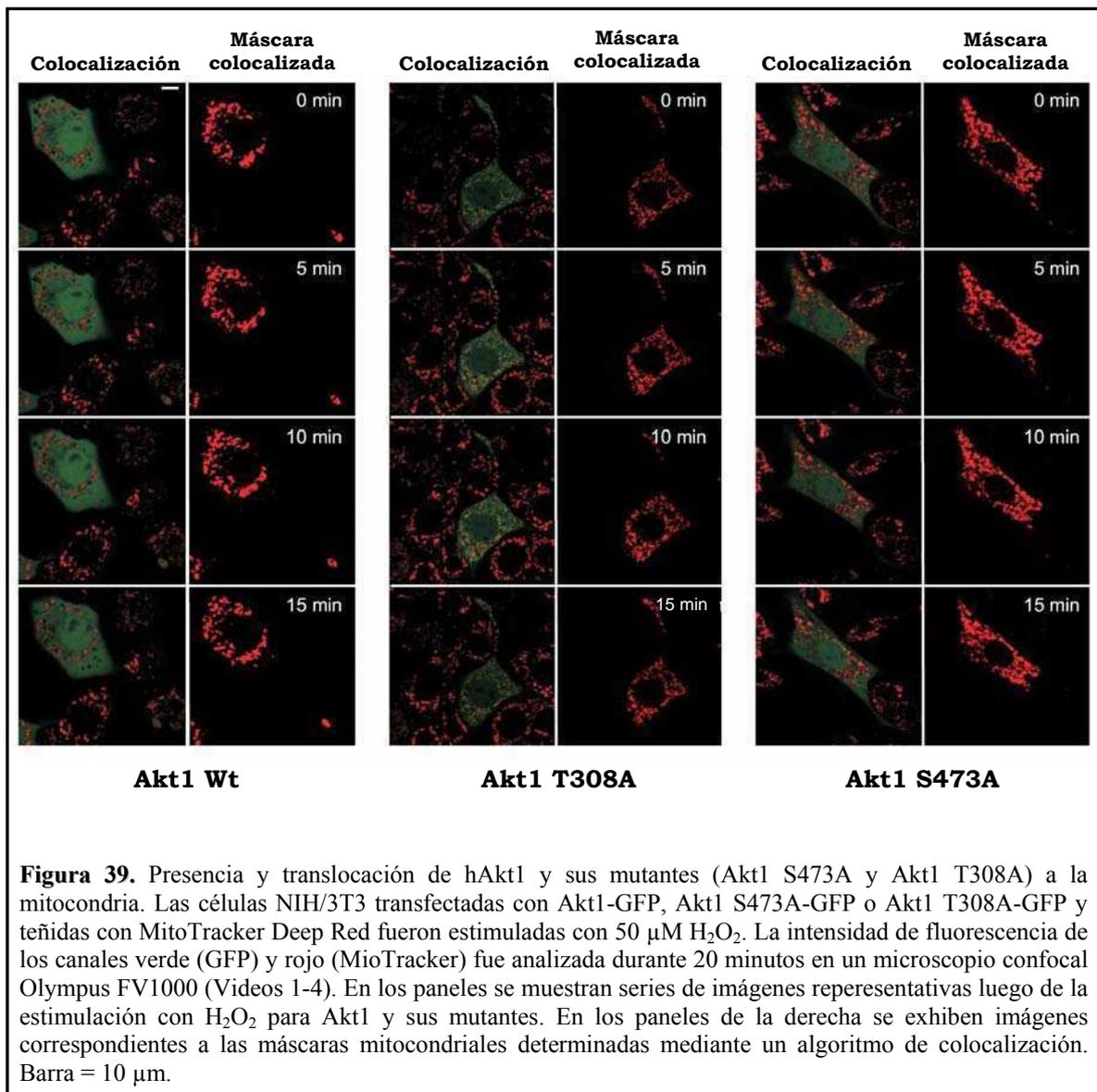
variante no fosforilable en Thr<sup>308</sup>. Las células fueron transfectadas con el vector conteniendo la variante mutante o la salvaje (Wt: *wild type*) y 24 horas después fueron estimuladas con 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma, se observó que las células transfectadas con la variante Wt se comportaron de manera similar a la determinada con la cinética de la kinasa endógena (Figura 33A y B). La translocación de Akt1 a la mitocondria fue máxima a los 5-10 minutos y luego aumentó en el núcleo como puede observarse al analizar la expresión de la proteína transfectada utilizando un anticuerpo anti el tag de hemaglutinina (Figura 37A). Por el contrario, Akt1 T308A se acumuló en la mitocondria y no sólo no translocó al núcleo sino que además disminuyó en este compartimiento sugiriendo que la completa activación de Akt1 y posterior pasaje al núcleo depende de la fosforilación en Thr<sup>308</sup> por PDK1 mitocondrial (Figura 37A). En concordancia con estos resultados, se observó que las células transfectadas con Akt1 T308A no evidenciaban un aumento en la expresión de ciclina D1 y que la maquinaria apoptótica a través de la vía caspasa-3 era activada (Figura 37B).

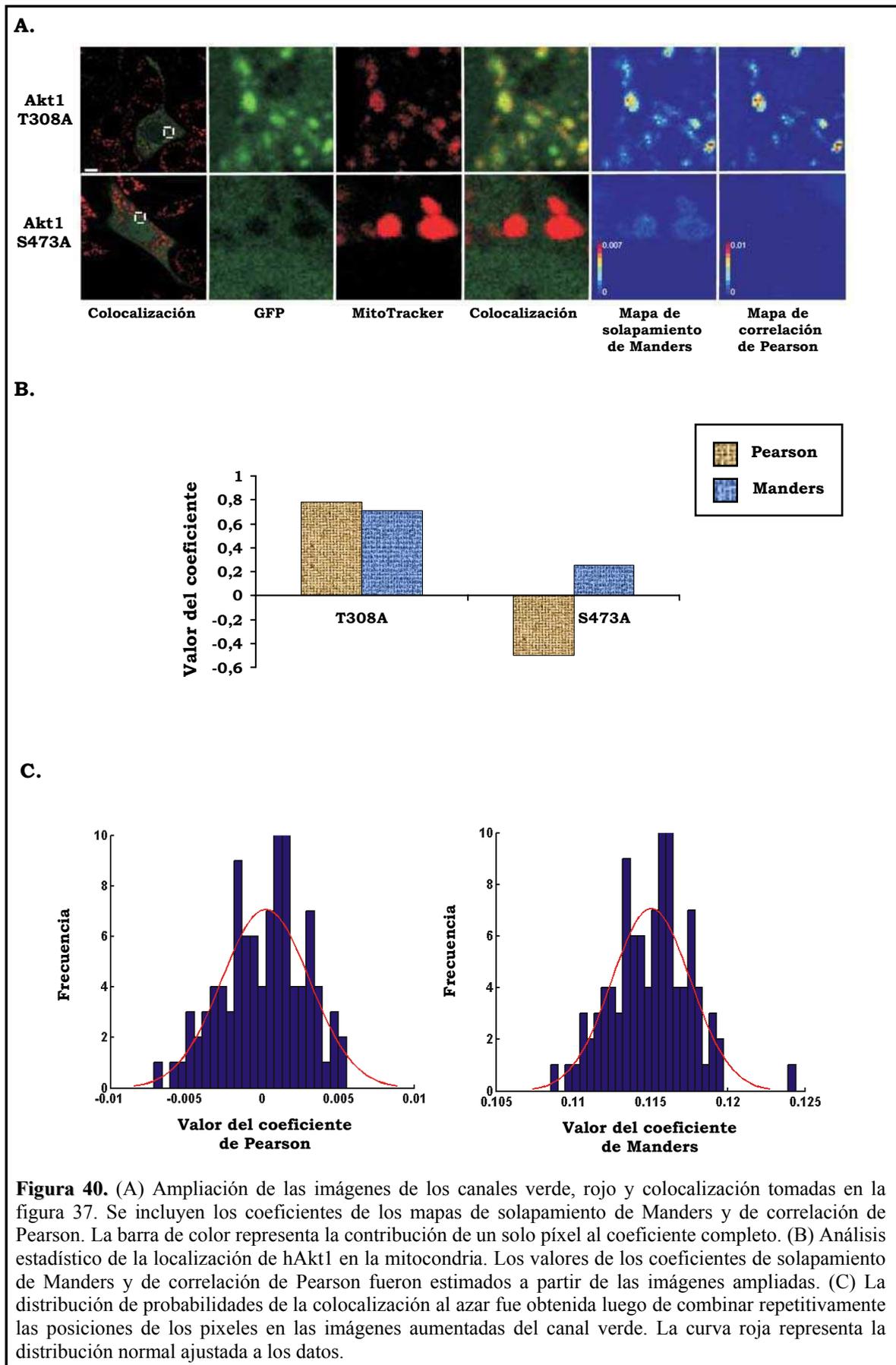


La obtención de imágenes (*imaging*) mediante video en tiempo real confirmó el patrón de distribución de Akt1 luego del estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 38, 39 y Videos 1-4). En estos experimentos, las células se transfectaron con Akt1-GFP wild type o con las respectivas mutantes para los distintos sitios de fosforilación, Akt1 T308A-GFP y Akt1 S473A-GFP, luego se tiñeron con un marcador mitocondrial específico, MitoTracker Deep Red, y las muestras se analizaron por microscopía confocal. En estas condiciones, la estimulación con 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó una redistribución diferencial de las tres variantes de la kinasa entre los distintos compartimientos subcelulares (Figura 38, 39 y Videos 1-4). Akt1 Wt-GFP fue capaz de entrar a la mitocondria rápidamente y luego se localizó predominantemente en el núcleo (núcleos verdes intensos), mientras que la presencia de Akt1 S473A-GFP en la organela fue casi nula. Sin embargo, Akt T308A-GFP se acumuló marcadamente en la mitocondria durante los primeros 15 minutos, en detrimento de su translocación nuclear. La retención preferencial de Akt1 T308A-GFP y la limitada aparición de Akt1 S473A-GFP en la mitocondria se pueden apreciar en vistas con aumento de las imágenes (Figura 40A). Además, el coeficiente de correlación de Pearson y de solapamiento de Manders muestran claramente una contribución superior a la colocalización de los píxeles contenidos en la región mitocondrial (color rojo intenso), lo cual indica que aquellos píxeles evidencian una alta intensidad de fluorescencia verde (GFP) y roja (MitoTracker). Los valores de coeficientes fueron determinados para las imágenes en la figura 40A). Para la mutante Akt1 T308A-GFP ambos valores de coeficientes fueron positivos, altos y significativamente superiores que aquellos esperados para las imágenes obtenidas al azar (Figura 39A y B), lo cual avala una superposición no fortuita de los fluoróforos distribuidos al azar. Por el contrario, estos coeficientes resultaron cercanos a cero (superposición de Manders) o negativos (correlación de Pearson) para Akt1 S473A-GFP, lo cual indica la ausencia de colocalización (Figura 40A y B); la distribución de probabilidades de la colocalización al azar fue obtenida luego de combinar repetitivamente las posiciones de los píxeles en las imágenes aumentadas del canal verde en relación a la distribución normal ajustada a los datos (Figura 44 C). Estos resultados avalan el concepto de la necesidad de una fosforilación secuencial en Akt1 para la regulación de su redistribución entre los compartimientos subcelulares: la fosforilación en Ser<sup>473</sup> es central para la regulación de

la translocación de la kinasa a la mitocondria y la fosforilación mitocondrial en Thr<sup>308</sup> es crucial para el tráfico de Akt1 al núcleo.



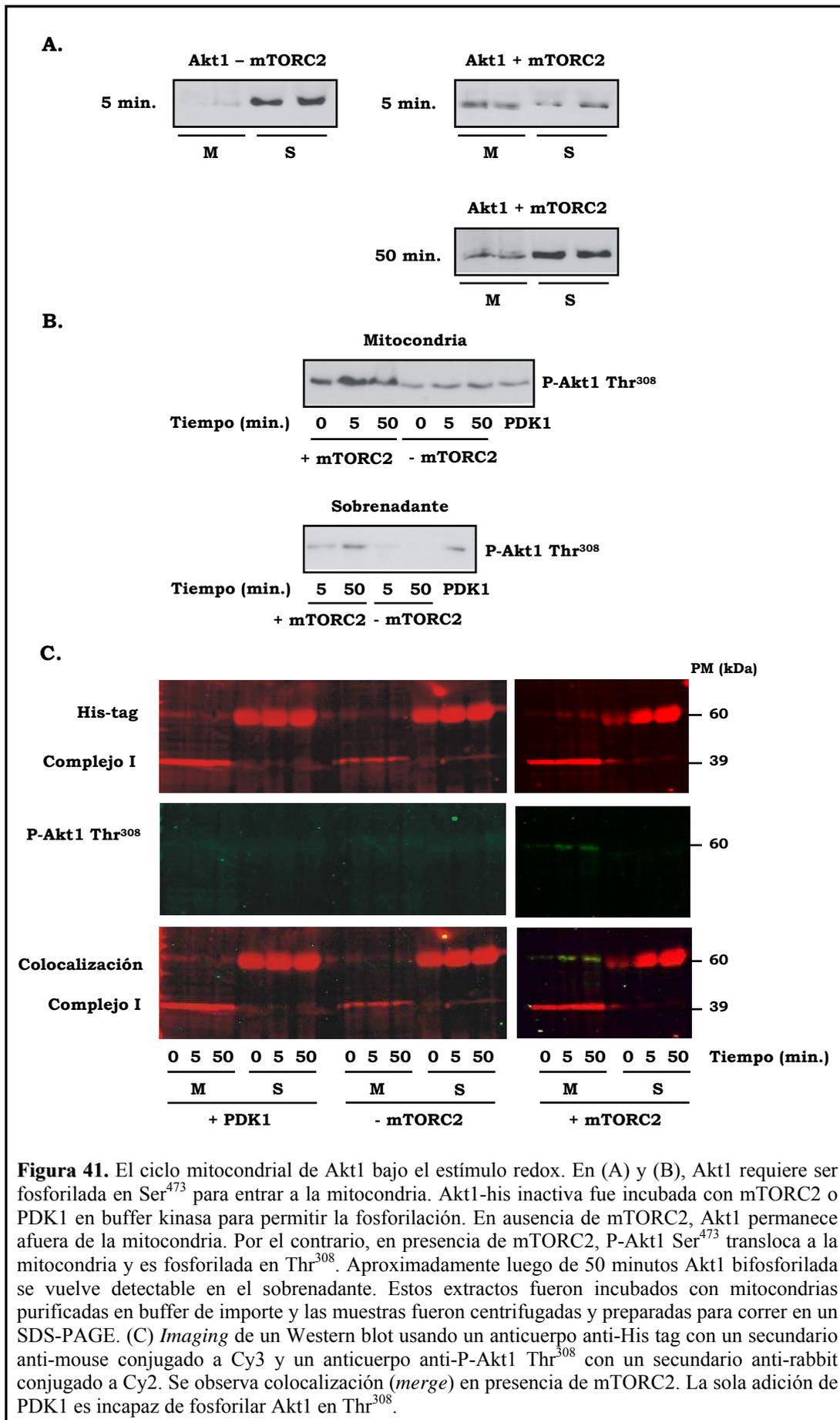




---

**Akt1 requiere ser fosforilada en Ser<sup>473</sup> para translocar a la mitocondria “*ex vivo*”**

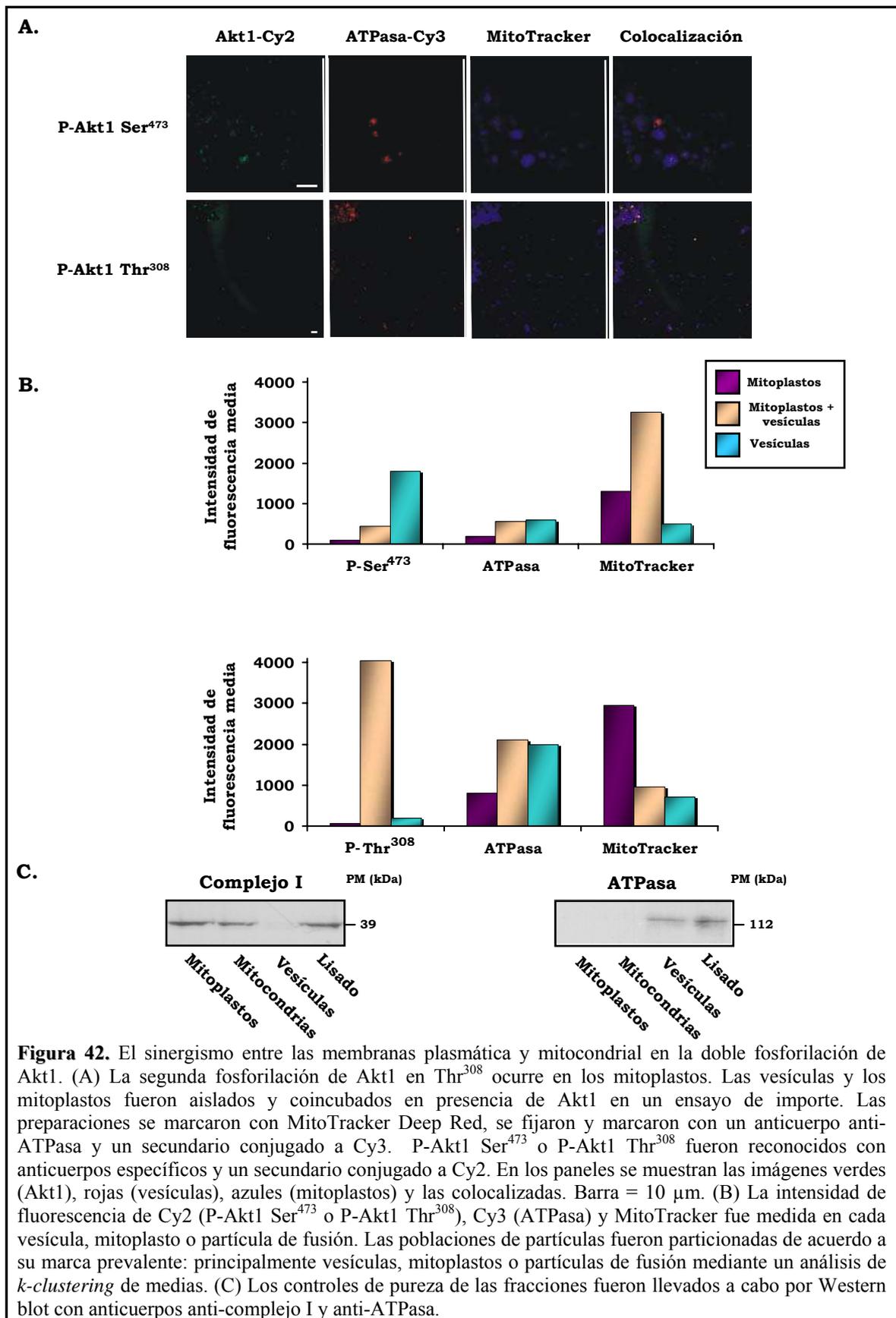
Para dilucidar el ciclo completo de fosforilación de Akt1, se incubó hAkt1 fusionada a un tag de histidina con mitocondrias aisladas de las células NIH/3T3 antes y después de haber sido monofosforilada con mTORC2 *in vitro*. Estos resultados demuestran que Akt1 inactiva no puede translocar a mitocondrias aisladas y energizadas (Figura 41A y C). Por el contrario, P-Akt1 Ser<sup>473</sup> entró muy rápido a la organela a una tasa relativa de 1.2 pg/min.µg proteína. A los 50 minutos se observó un completo decaimiento de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> en las organelas aisladas. En ese momento, la concentración de Akt1 aumentó significativamente en el sobrenadante indicando un flujo reverso de la kinasa entre los dos compartimientos. Asimismo, al analizar si P-Akt1 Ser<sup>473</sup> había sido modificada luego de entrar en las mitocondrias aisladas, se comprobó que la kinasa monofosforilada había adquirido la segunda fosforilación en Thr<sup>308</sup>, y de esta forma, se convertía en la variante completamente activa de la kinasa (Figura 41B y C).

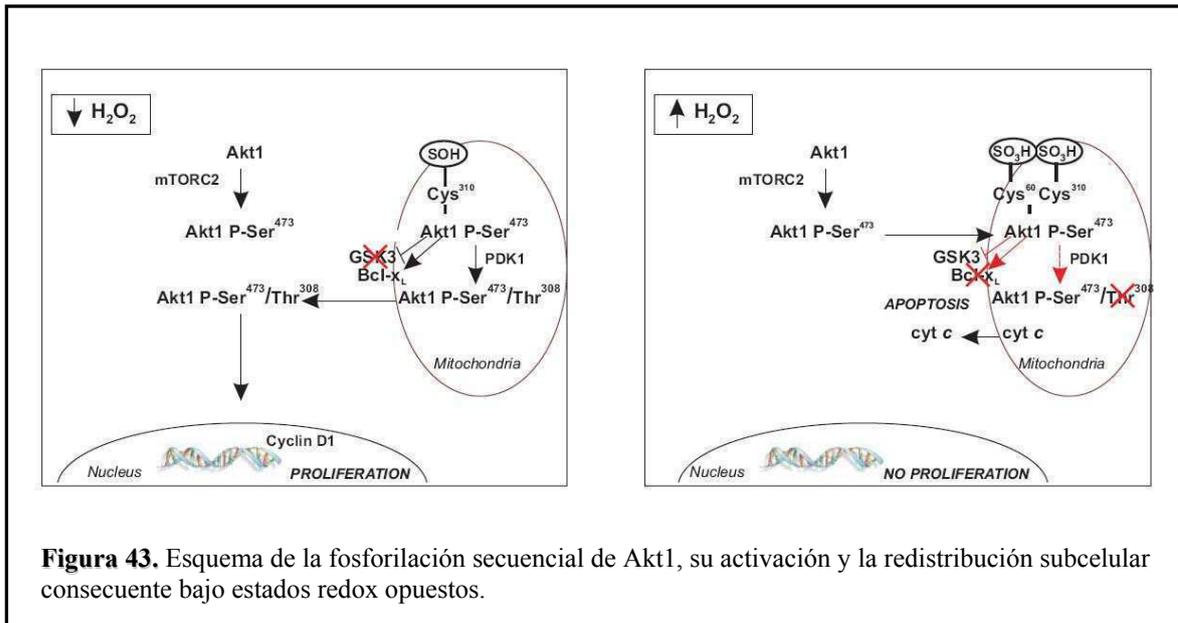


### **La mitocondria y la membrana plasmática cooperan para la activación completa de Akt1 *in vitro* en vesículas reconstituidas**

Con el objeto de confirmar que la mitocondria y la membrana plasmática son esenciales para la activación completa de Akt1, la proteína inactiva hAkt1 fue sujeta a oxidación con 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada con vesículas de membrana plasmática purificadas de células NIH/3T3 solas o con vesículas que habían incluido una preparación de mitoplastos en una proporción de 10-100 mitoplastos por vesícula. Las vesículas se marcaron específicamente con un anticuerpo anti-ATPasa de membrana y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3. Los mitoplastos fueron teñidos con MitoTracker Deep Red. Las partículas también fueron incubadas con anticuerpos anti-P-Akt1 Ser<sup>473</sup> o P-Akt1 Thr<sup>308</sup> y un anticuerpo secundario conjugado a Cy2. De acuerdo a la metodología implementada, en las imágenes tomadas con el microscopio confocal, las partículas rojas representan vesículas, las azules mitoplastos y las partículas fusionadas se muestran en color magenta (Figura 42A). La marca para P-Akt1 Ser<sup>473</sup>-Cy2 fue observada predominantemente en las vesículas que no contenían marca para mitoplastos (Figura 42B) pero poseían mTORC2 (Figura 36B). Por el contrario, estas vesículas no promovieron la fosforilación en Thr<sup>308</sup> (ausencia de marca para P-Akt1 Thr<sup>308</sup>-Cy2). Este hecho indica que a) la primera fosforilación de Akt1 depende de la presencia de membrana plasmática; b) en ausencia de mitocondrias, que participan en la fosforilación de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> en Thr<sup>308</sup>, la kinasa se acumula en las vesículas. Por el contrario, se observó una alta intensidad de fluorescencia para P-Akt1 Thr<sup>308</sup>-Cy2 y una muy baja intensidad en el caso de P-Akt1 Ser<sup>473</sup>-Cy2 en aquellas vesículas que contenían predominantemente marca de mitoplastos (Figura 42B). Como la primera fosforilación no ocurrió en ausencia de vesículas, los mitoplastos por sí mismos no fueron capaces de llevar a cabo la fosforilación en Thr<sup>308</sup>. Estos resultados demuestran que las membranas plasmática y mitocondrial cooperan para la activación completa de Akt1 en las células NIH/3T3 y confirman que la fosforilación en Ser<sup>473</sup> es un prerrequisito para que la fosforilación en Thr<sup>308</sup> ocurra en los mitoplastos. La identidad de las distintas fracciones fue corroborada utilizando anticuerpos anti-complejo I (mitocondrias y mitoplastos) y anti-ATPasa (vesículas de membrana plasmática)

(Figura 42C). En la Figura 43 se muestra un esquema de la doble fosforilación de Akt1 en las diferentes localizaciones subcelulares.





### Las Cys<sup>60</sup> y Cys<sup>310</sup> son los blancos principales para la oxidación de Akt1 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El análisis por espectrometría de masa de Akt1 recombinante incubada *in vitro* ante diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (representativas de aquellas utilizadas en los ensayos *in vivo*) se muestran en la Tabla 5. En ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente la Cys<sup>310</sup> (que se encuentra adyacente a Thr<sup>308</sup> a solo 5 Å) fue oxidada a ácido sulfénico (Cys-SOH). Al utilizar concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la Cys<sup>310</sup> permaneció en parte como ácido sulfénico (Cys-SOH) y parte oxidado más aún a ácido sulfónico o cisteico (Cys-SO<sub>3</sub>H). A 1 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la Cys<sup>310</sup> se vió siempre modificada a ácido sulfónico. Además, la Cys<sup>60</sup>, perteneciente al dominio PH y que no había sido modificada a muy bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultó siempre oxidada a ácido cisteico de 0.1 a 20 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	Péptido tríptico	Residuo	Prob.	MSc*	Modificación	$\Delta$ cn**	Carga péptido
—	EAPLNNFSVAQCQLMK	Cys <sup>60</sup>	95%	75.5	—	0.55	2
	TFC <sup>+16</sup> GTPEYLAPEVLEDNDYGR	Cys <sup>310</sup>	71%	34.2	Ácido sulfénico (+16)	-0.40	2
0.001	EAPLNNFSVAQCQLMK	Cys <sup>60</sup>	95%	75.5	—	0.55	2
	EAPLNNFSVAQCQLMK	Cys <sup>60</sup>	95%	66.6	—	0.038	2
	EAPLNNFSVAQCQLMK	Cys <sup>60</sup>	95%	66.3	—	0.33	2
0.01	EAPLNNFSVAQCQLMK	Cys <sup>60</sup>	95%	75.51	—	-0.79	2
	TFC <sup>+16</sup> GTPEYLAPEVLEDNDYGR	Cys <sup>310</sup>	94%	41.25	Ácido sulfénico (+16)	-0.58	2
	TFC <sup>+48</sup> GTPEYLAPEVLEDNDYGR	Cys <sup>310</sup>	95%	57.2	Ácido sulfénico (+16)	0.43	2
	TFC <sup>+48</sup> GTPEYLAPEVLEDNDYGR	Cys <sup>310</sup>	88%	39.06	Ácido sulfónico (+48)	0.066	2
0.1	EAPLNNFSVAQCQLMK	Cys <sup>60</sup>	95%	77.4	—	-0.17	2
	EAPLNNFSVAQC <sup>+48</sup> QLMK	Cys <sup>310</sup>	95%	65.8	Ácido sulfónico (+48)	0.79	2
	TFC <sup>+48</sup> GTPEYLAPEVLEDNDYGR	Cys <sup>310</sup>	88%	45.4	Ácido sulfónico (+48)	-0.33	2
1	TFC <sup>+48</sup> GTPEYLAPEVLEDNDYGR	Cys <sup>310</sup>	95%	62.9	Ácido sulfónico (+48)	0.76	2

**Tabla 5.** Resultados de la espectrometría de masa de Akt1 oxidada. hAkt1 (1  $\mu$ g/50  $\mu$ l) fue oxidada durante 15 minutos en buffer kinasa 1x. \*MSc: Índice de Mascot Ion; \*\* $\Delta$ cn representa la diferencia en el valor de correlación cruzada entre los dos péptidos candidatos para un dato dado.

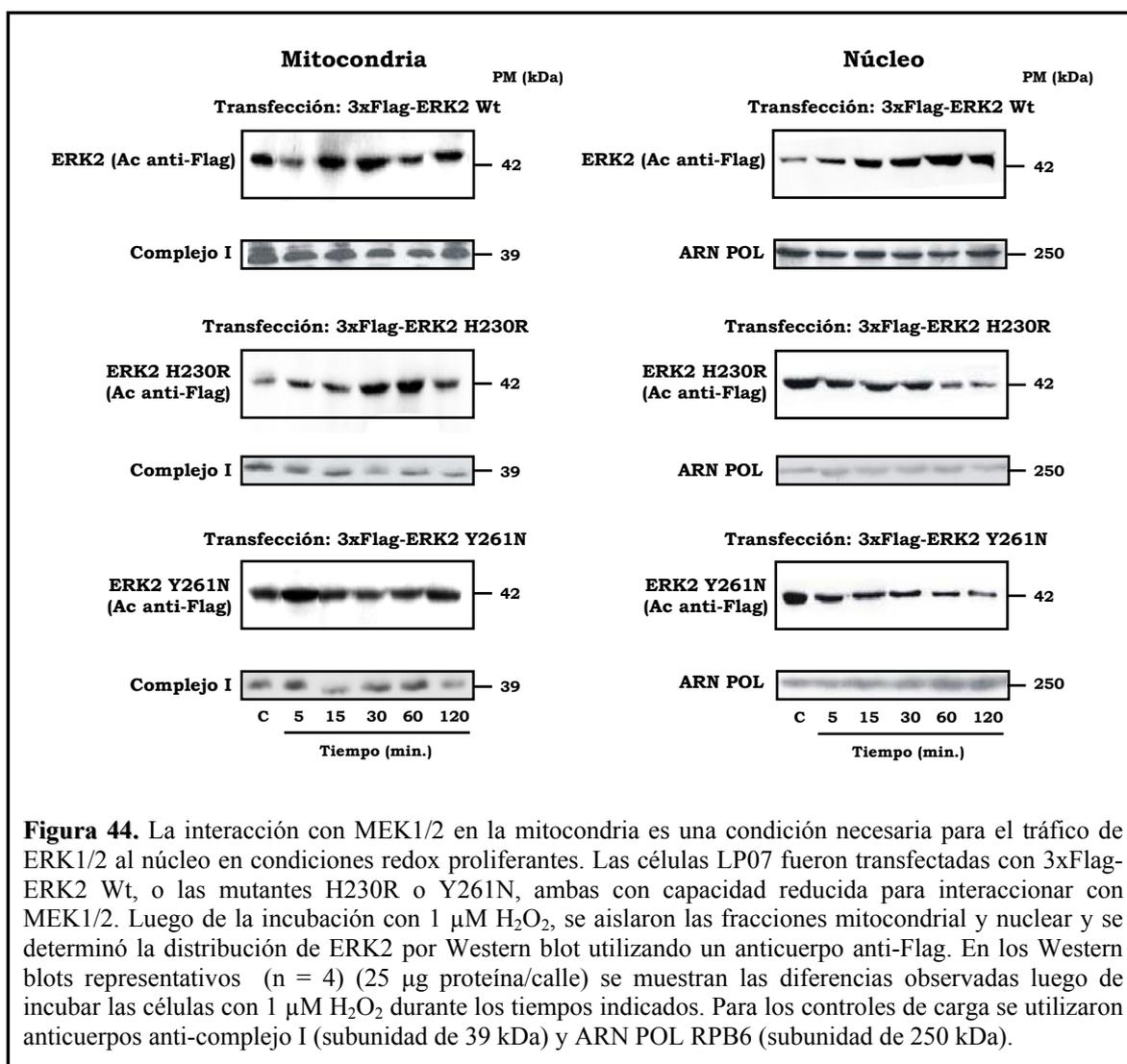
## Segunda Parte

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que un aumento en la  $[H_2O_2]_{ss}$  es capaz de controlar la transición del fenotipo proliferante al quiescente o apoptótico, determinando el fin de la proliferación (Carreras y col., 2004a). Asimismo, en las células tumorales la baja concentración de  $H_2O_2$  debido a alteraciones en el metabolismo mitocondrial puede contribuir a un estado de proliferación sostenida (Galli y col., 2003). Dado que las MAPKs también orquestan numerosas vías de transducción de señales y se ha demostrado su presencia en la mitocondria (Galli y col., 2008), se investigó la conexión mecánica entre la disfunción mitocondrial en células tumorales y el efecto del  $H_2O_2$  en la activación de las MAPKs. Estudios previos habían demostrado que bajas concentraciones de  $H_2O_2$  (1  $\mu M$  para esta línea tumoral) provocaban un aumento en la proliferación de manera ERK1/2-dependiente, mientras que altas concentraciones (50  $\mu M$ ) provocaban un arresto del ciclo celular con activación de p38 y JNK1/2. Considerando las condiciones experimentales como un modelo tri-compartimental (mitocondria, citosol y núcleo) se observó que las diferentes respuestas frente al estado redox respondían a un tráfico preferencial de MAPKs a la mitocondria, en donde una activación selectiva de ERK1/2 o p38-JNK1/2 (colocalizadas con sus kinasas río arriba) facilitaba su pasaje al núcleo (Galli y col., 2008).

### El $H_2O_2$ modula la interacción MEK1/2-ERK1/2 y la translocación al núcleo

Para investigar si la modulación de la interacción MEK-ERK en la mitocondria afecta la translocación al núcleo, las células tumorales LP07 fueron transfectadas con 3xFlag-ERK2 Wt y sus mutantes, H230R o Y261N, ambas con *docking* a MEK1/2 restringido (Adachi y col., 2000) y estimuladas con 1  $\mu M$   $H_2O_2$  (condición proliferante). En estas condiciones se observó que ERK2 Wt seguía una secuencia típica de translocación a la mitocondria y al núcleo, es decir, un rápido pasaje a la mitocondria hasta los 30 minutos y una consecuente translocación al núcleo (Figura 44). Contrariamente, las mutantes de ERK2 con *binding* pobre a MEK1/2 fueron retenidas en las organelas, en detrimento de su translocación al núcleo (Figura 44). Estudios

previos habían demostrado que en condiciones de bajo estado redox la interacción ERK1/2-MEK1/2 se encontraba favorecida y la misma era interrumpida por el aumento de  $H_2O_2$  (Galli y col., 2008). Todos estos resultados sugieren que el tráfico de ERK1/2 al núcleo y en consecuencia, el comportamiento celular, dependen de los cambios en su *loop* de activación inducidos por  $H_2O_2$  y la interacción con MEK1/2 en la mitocondria.



**Figura 44.** La interacción con MEK1/2 en la mitocondria es una condición necesaria para el tráfico de ERK1/2 al núcleo en condiciones redox proliferantes. Las células LP07 fueron transfectadas con 3xFlag-ERK2 Wt, o las mutantes H230R o Y261N, ambas con capacidad reducida para interaccionar con MEK1/2. Luego de la incubación con 1  $\mu M$   $H_2O_2$ , se aislaron las fracciones mitocondrial y nuclear y se determinó la distribución de ERK2 por Western blot utilizando un anticuerpo anti-Flag. En los Western blots representativos (n = 4) (25  $\mu g$  proteína/calle) se muestran las diferencias observadas luego de incubar las células con 1  $\mu M$   $H_2O_2$  durante los tiempos indicados. Para los controles de carga se utilizaron anticuerpos anti-complejo I (subunidad de 39 kDa) y ARN POL RPB6 (subunidad de 250 kDa).

## Los tioles de las cisteínas de ERK2, p38 y JNK2 son oxidados específicamente por $H_2O_2$

Considerando la susceptibilidad a la oxidación de los tioles de las cisteínas presentes en ciertos grupos de proteínas, se investigó la relevancia de estos aminoácidos

en la regulación de las vías de MAPKs. ERK2-GST inmovilizado en agarosa fue expuesto al bloqueante de tioles 4-vinilpiridina (4-VP) y luego incubado con una fracción mitocondrial. De esta forma, fue posible confirmar que la suave oxidación de ERK2 promueve el *binding* con MEK1/2 y demostrar que el tratamiento con 4-VP produce una marcada reducción de la interacción ERK2-MEK1/2 (Figura 45A).

Las cisteínas oxidadas responsables del *binding* diferencial de las MAPKs fueron identificadas por espectrometría de masa. Luego del tratamiento con concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 μM), los grupos tioles de las Cys<sup>38</sup> y Cys<sup>214</sup> de ERK2 fueron oxidados a ácido sulfinico (Cys-SO<sub>2</sub>H) y sulfónico (Cys-SO<sub>3</sub>H). Por el contrario, no se observó oxidación de ninguna cisteína luego del tratamiento con concentraciones más altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, ninguna cisteína de JNK2 fue oxidada bajo condiciones suaves de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 μM) mientras que a 1 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se oxidaron los tioles de las Cys<sup>41</sup>, Cys<sup>137</sup>, Cys<sup>177</sup> y Cys<sup>222</sup> a Cys-SO<sub>2</sub>H y el de la Cys<sup>116</sup> a Cys-SO<sub>3</sub>H (Tabla 6). Resulta interesante que la Cys<sup>41</sup> de JNK2, homóloga de la Cys<sup>38</sup> de ERK2 fue sensible a la oxidación, mientras que la Cys<sup>213</sup> de JNK2, homóloga de la Cys<sup>214</sup> de ERK2, no resultó oxidada bajo ningún concepto. En contraste, la Cys<sup>162</sup> de p38, perteneciente a un dominio homólogo de *docking* de ERK1/2 de rata, fue oxidada a Cys-SO<sub>3</sub>H sólo luego de una incubación con 20 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 6). No se detectó oxidación de metionina, histidina, triptofano o tirosina ni nitrosilación de triptofano.

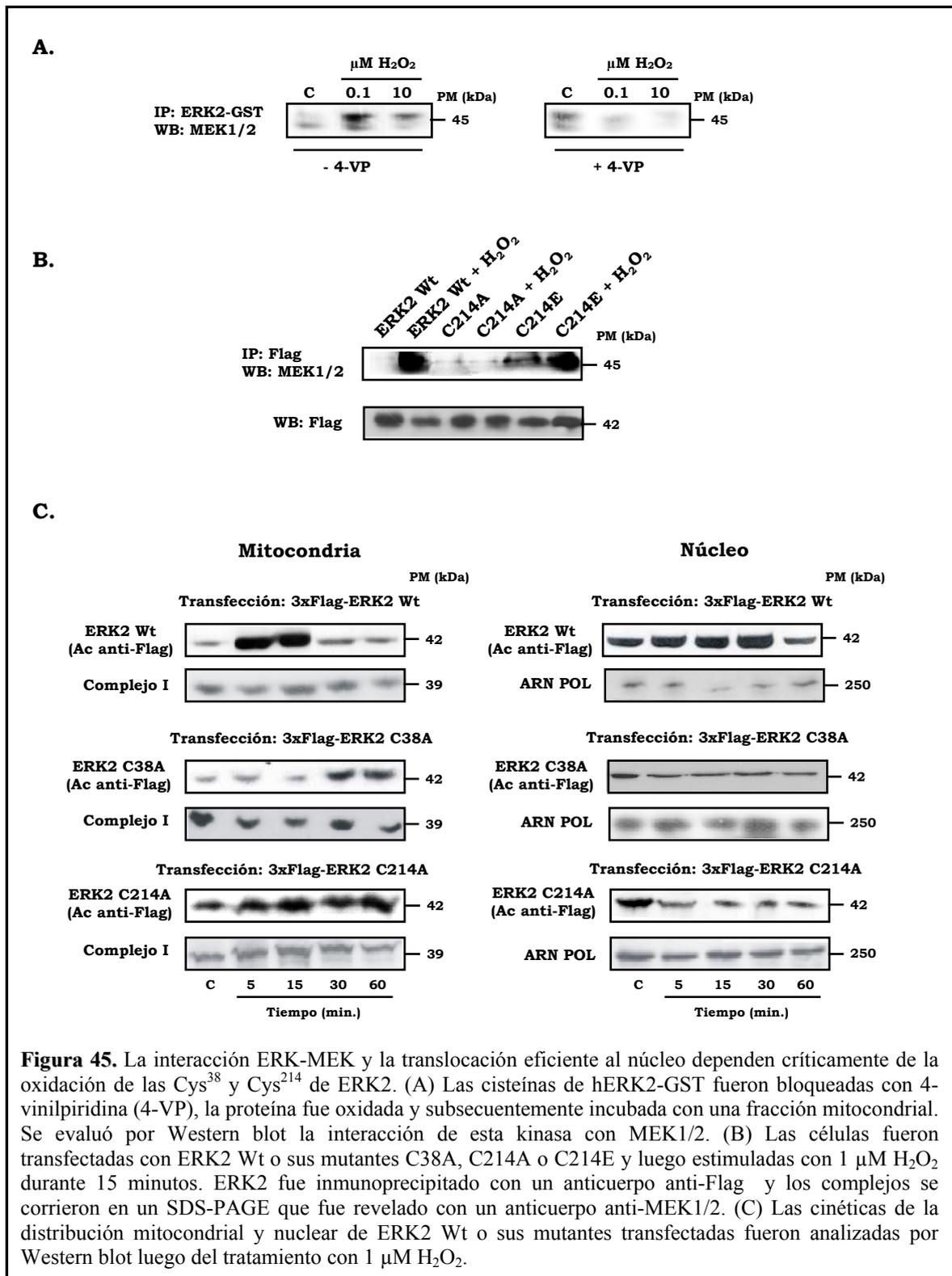
### **La interacción ERK-MEK y la transferencia de ERK1/2 al núcleo dependen de la oxidación mitocondrial de las cisteínas redox sensibles**

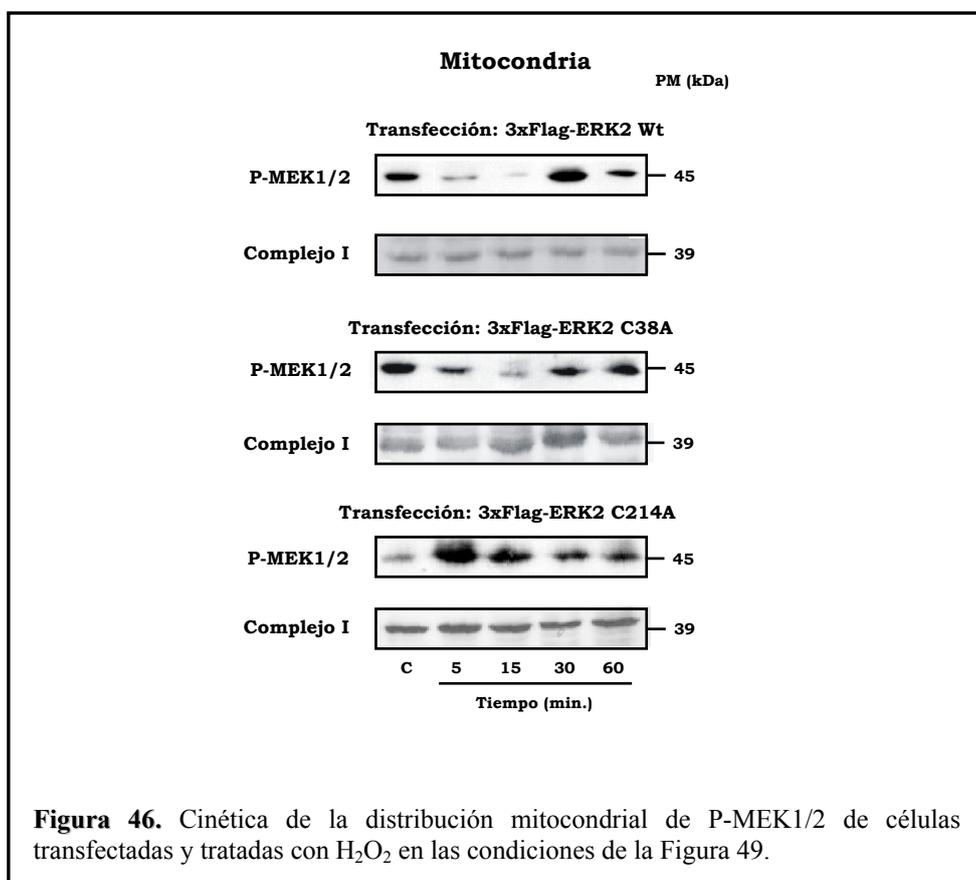
Con el objeto de evaluar el rol de las cisteínas oxidables sobre la activación de ERK y su redistribución, las mutantes de ERK2 C38A, C214A y C214E fueron transfectadas en las células LP07 para poder analizar su interacción con MEK. La oxidación con 0.1 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favoreció la interacción de MEK1/2 con ERK2 Wt (Figura 45B), tal como había sido observado previamente en la Figura 49A. Sin embargo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no provocó ningún efecto sobre la interacción de MEK1/2 con ERK2 cuando la Cys<sup>214</sup> fue sustituida por una alanina (C214A) (Figura 45B). Por el contrario, la interacción ERK2-MEK1/2 se vió favorecida por el remplazo de la Cys<sup>214</sup> por ácido glutámico (C214E), aún en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 45B). ERK2 Wt translocó a la

mitocondria y posteriormente fue retenida en el núcleo luego de la estimulación con 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 45C), tal como había sido descrito para ERK1/2 endógena (Galli y col., 2008). En forma opuesta, las mutantes C38A y C214A fueron retenidas en la mitocondria en detrimento de la entrada al núcleo (Figura 45C). Del mismo modo, P-MEK1/2 también fue retenida en la organela en perjuicio de su ingreso al núcleo luego de la transfección con las mutantes de ERK2, C38A y C214A, lo cual indica que una oxidación defectuosa impide el egreso del complejo MEK-ERK de la mitocondria (Figura 46). Una idea atractiva surge al proponer que las cisteínas cargadas guían a MEK o a otros ligandos mientras se dirigen a través de las argininas hacia el Asp<sup>316</sup> y el Asp<sup>319</sup> (Figura 47A y B). Éstos constituyen los dos residuos acídicos esenciales de ERK2 que integran el dominio D para la unión a los ligandos. Tal como puede observarse, los dominios redox sensibles de ERK2 están muy conservados en todas las MAPKs, así como también en otras quinasas (Tabla 7). Es remarcable el hecho que ambas cisteínas oxidables, Cys<sup>38</sup> en ERK2 y Cys<sup>41</sup> en JNK2 se encuentren en el mismo dominio y sean oxidadas a  $-\text{SO}_3\text{H}$ , pero a niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diferentes. Sin embargo, las Cys<sup>213</sup> de JNK2 y las Cys<sup>48</sup> y Cys<sup>231</sup> de p38 presentes en estos dominios no fueron oxidadas.

MAPK	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	Péptido tríptico	Residuo	Carga	MSc	XC	$\Delta\text{cn}$
ERK2	0.1	YTNL <sup>38</sup> SYIGEGAYGMVC(O <sub>3</sub> )SAYDNLNK	Cys <sup>38</sup>	2	34	3.4	0.2
		YTNL <sup>38</sup> SYIGEGAYGMVC(O <sub>3</sub> )SAYDNLNK	Cys <sup>38</sup>	3	NA	5.3	0.13
		SIDIWSVGC(O <sub>3</sub> )ILAEMLSNRPIFP GK	Cys <sup>214</sup>	2	NA	2.9	0.26
p38	20	DLKPSNLAVNEDC(O <sub>3</sub> )ELK	Cys <sup>162</sup>	3	63	3.2	0.27
JNK2	1	YQQLKPIGSGAQGIVC(O <sub>3</sub> )AAFDTVLGINVAVK	Cys <sup>41</sup>	2	98	5.1	0.67
		TLEEFQDVYLVME <sup>41</sup> LDANLC(O <sub>3</sub> )QVIHMELDHER	Cys <sup>116</sup>	3	54	NA	NA
		MSYLLYQMLC(O <sub>3</sub> )GIK	Cys <sup>137</sup>	2	31	1.4	0.2
		TAC(O <sub>3</sub> )TNFMMPYV <sup>41</sup> VTR	Cys <sup>177</sup>	2	35	2.8	0.41
		GC(O <sub>3</sub> )VIFQGDHIDQW <sup>41</sup> NK	Cys <sup>222</sup>	2	37	2.7	0.06

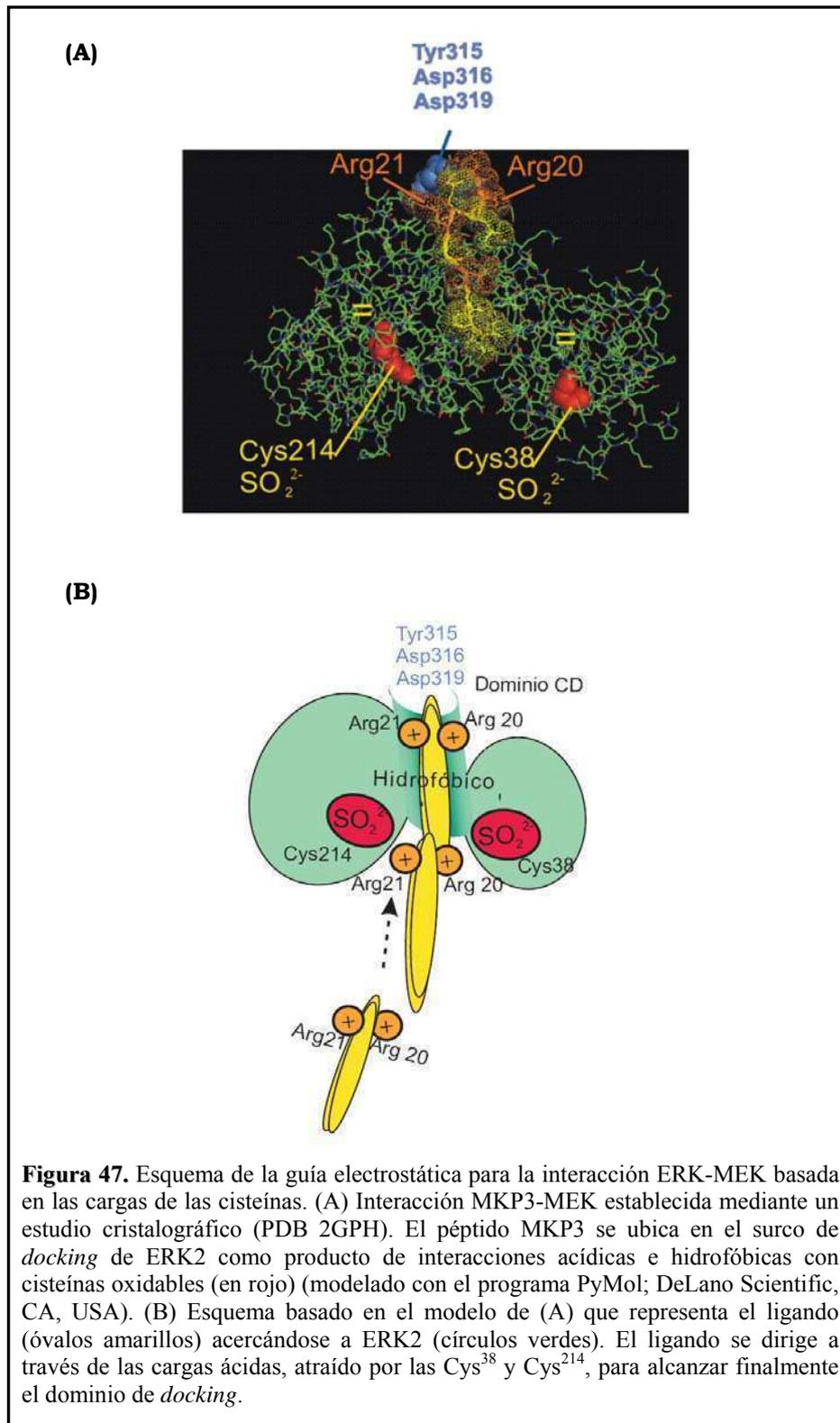
**Tabla 6.** Análisis por espectrometría de masa de las modificaciones de las cisteínas de ERK2, p38 y JNK2 por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las MAPKs fueron oxidadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la tabla se muestra la secuencia de los fragmentos trípticos, la carga de los péptidos, el valor de Mascot Ion (MSc), Sequest XC y  $\Delta\text{cn}$  (diferencia en el valor de correlación cruzada entre los dos péptidos candidatos). NA: no asignado. No se observó oxidación de ERK2 a 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , de JNK2 a 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ni de p38 a 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .





<b>Dominios cisteína redox sensibles (RSD)</b>					
JNK1	61	IGSGAQGIVCAAYD	JNK1	273	VDIWSVGCIMGEMV
JNK2	32	IGSGAQGIVCAA FD	JNK2	207	VDIWSVGCIMGGLV
ERK2	31	EGAYGMVCAAYD	ERK2	207	IDIWSVGCIMGEMV
ERK1	51	EGAYGMVSAAYD	ERK1	227	VDIWSVGCILAEML
p38	40	GSGAYGSVCAAYD	p38	224	VDIWSVGCIMGEMV
1PME	91	GEGAYGIVCSAYD	1PME	229	IDIWSVGCIMGEMV
MMK1	51	IGHGAIGI VCSAHN	MMK1	185	IDIWSVGCIMGEMV
MPK1	20	GEGAYGIVCSAYD	MPK1	162	DVWSVGCIMGEMV
1TKIA	4	LGREFGIVCAAYD	1TKIA	193	TDIWSTGVIMGEMV
PHKA	3	LGRGVSVCIIH	PHKA	215	DVWSVGCIMGEMV

**Tabla 7.** Alineamiento de secuencias homólogas correspondientes a las regiones vecinas de Cys38 y Cys214 de ERK2 de diferentes kinasas. El alineamiento fue realizado con el Servidor Expasy Proteomics ([www.ca.expasy.org](http://www.ca.expasy.org)). 1PME (penta mutant ERK2); MMK1 (mitogen-activated protein kinase homolog); MPK1 (mitogen-activated protein kinase); 1TKIA (human titin kinasa); PHKA (human phosphorylase kinase subunit alpha).



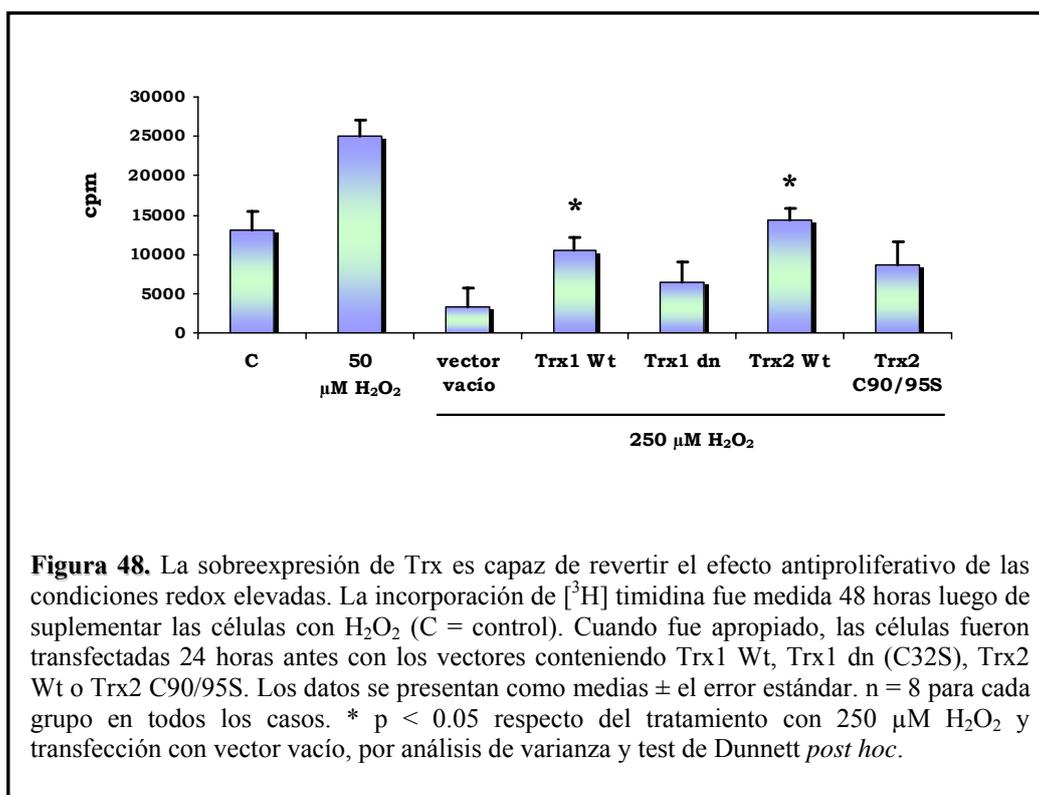
## Tercera Parte

El sistema de tiorredoxinas es uno de los sistemas clave en el control del balance redox celular, y por lo tanto, del destino celular. Los daños a nivel celular provocados por el desbalance redox han sido asociados con enfermedades vinculadas a la senescencia y patologías neurodegenerativas (Andersen, 2004). Más allá de su rol protector, el sistema Trx interviene en varios procesos celulares como la comunicación célula-célula, la regulación transcripcional, la señalización celular y la síntesis de ADN (Lillig y Holmgren, 2007). La inactivación de la Trx1 se asocia con graves defectos en la proliferación del macizo celular interno y aún con la muerte del embrión en el estadio de blastocisto (Matsui y col., 1996). Los ratones deficientes en la isoforma mitocondrial (Trx2) muestran una apoptosis marcada, defectos en el tubo neural anterior y letalidad embrionaria (Nonn y col., 2003). Dado que hemos demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está implicado en el destino final de las células normales y tumorales a través de la activación de Akt1 y de las MAPKs y que además, el *binding* eficiente con sus quinasas río arriba está regulado a través de la oxidación de cisteínas conservadas, decidimos explorar la vía de Trx postulándola como una fina moduladora del estado redox celular.

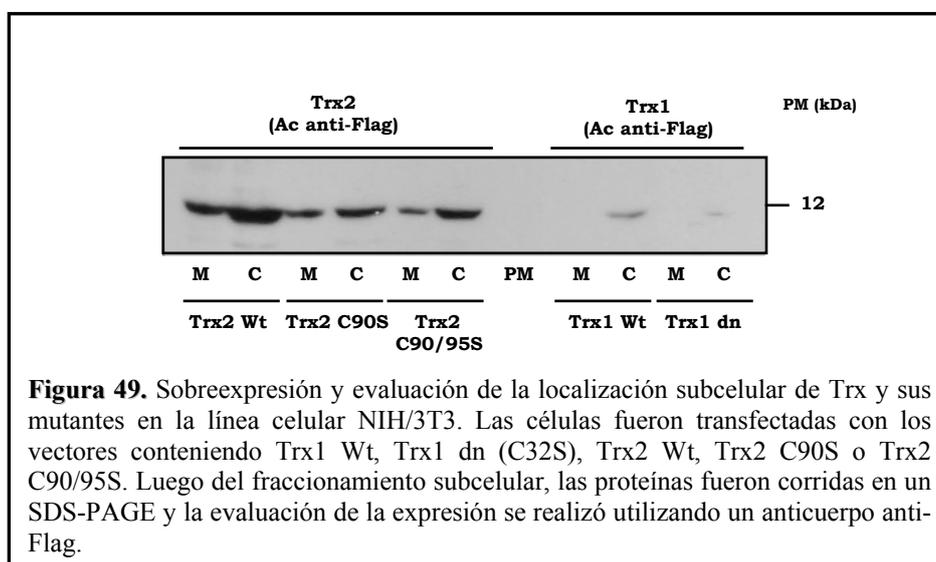
### **El sistema de Trx modula el destino celular a través de la regulación del nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Con los propósitos mencionados anteriormente estudiamos la evolución de la tasa proliferativa en las células NIH/3T3 bajo las condiciones redox estudiadas anteriormente pero habiéndolas transfectado previamente con un vector pcDNA3-Flag que contenía la secuencia de Trx1, Trx1 dominante negativa (dn, C35S), Trx2 o Trx2 C90/95S. Los resultados obtenidos indican que tanto Trx1 Wt como Trx2 Wt son capaces de revertir el efecto antiproliferativo causado por altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta valores cercanos al control (Figura 48). Además, es notable remarcar que la isoforma mitocondrial (Trx2) revierte en forma más eficiente que el fenotipo causado por la incubación de las células con 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por el contrario, las variantes menos activas de las tiorredoxinas (Trx1 dn y Trx2 C90/95S) no lograron revertir en forma

significativa la disminución de la tasa proliferativa provocada por el estado redox elevado (Figura 48).

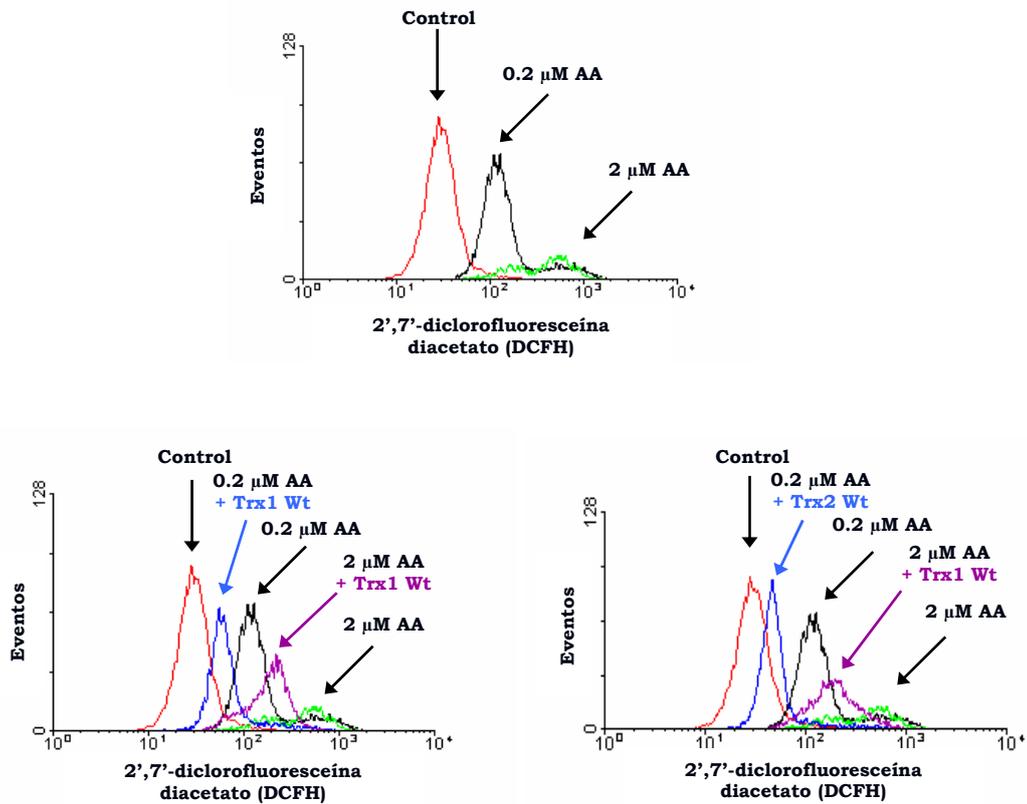


La localización subcelular de las dos isoformas de Trx fue evaluada mediante Western blot en las fracciones mitocondrial y citosólica luego de la transfección de las células NIH/3T3 utilizando un anticuerpo anti-Flag. Mientras Trx2 se encontró localizada en citosol y mitocondria, la variante Trx1 sólo se halló presente en la fracción citosólica (Figura 49).

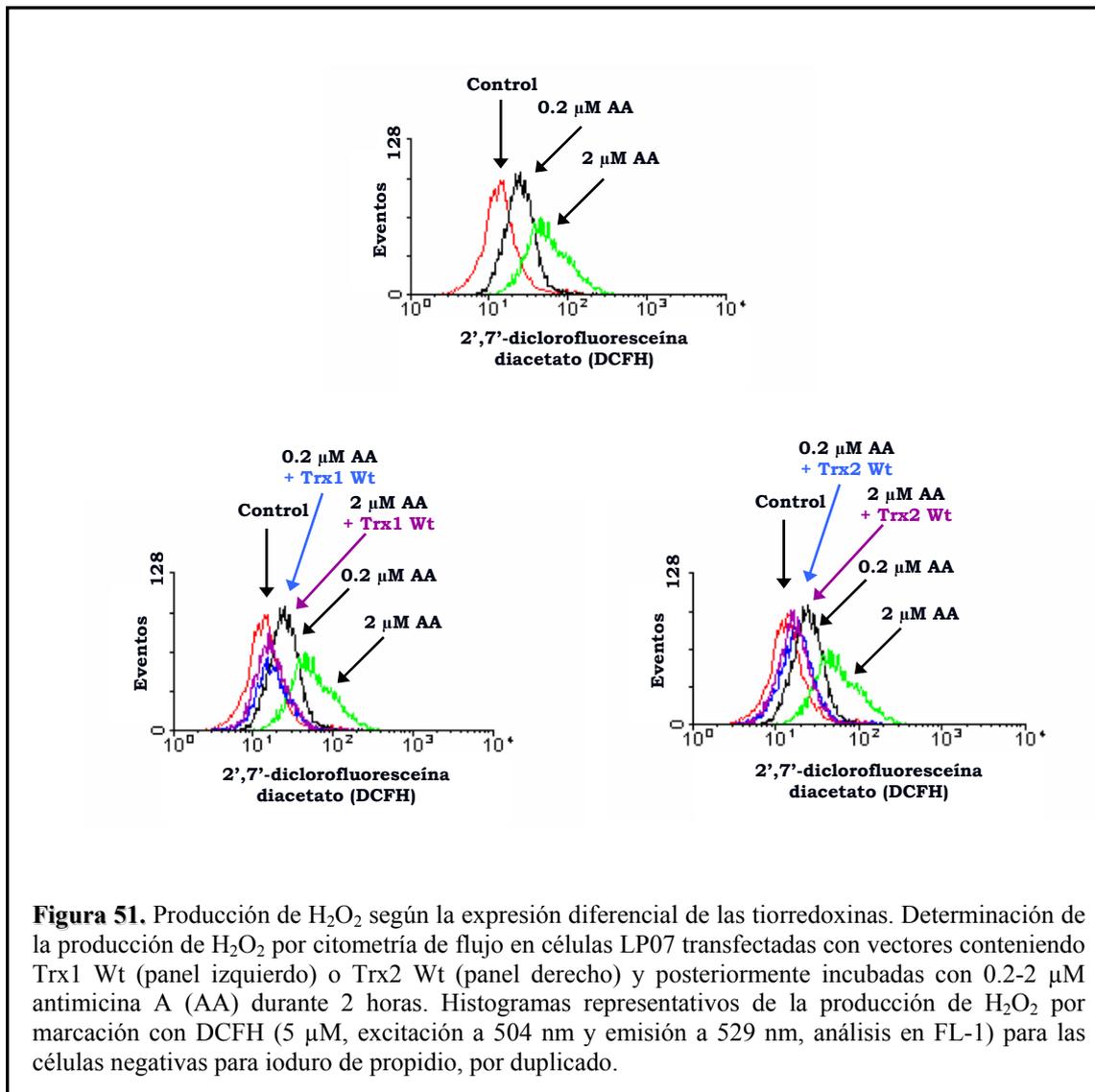


---

Para confirmar el mecanismo de acción de las Trx sobre el sistema celular y sus consecuencias sobre el destino celular, las células NIH/3T3 y LP07 fueron transfectadas con las distintas variantes de Trx y 24 horas después fueron incubadas con 0.2 y 2  $\mu\text{M}$  antimicina A. De esta forma, las variaciones en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron determinadas luego de incubar las células con 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH) y analizarlas por citometría de flujo. Además, se realizó una marcación en simultáneo con yoduro de propidio (0.005%) para determinar las poblaciones de células viables. Los histogramas revelan que tanto en las células NIH/3T3 como en las LP07 el tratamiento con 0.2  $\mu\text{M}$  antimicina A (AA) provoca un aumento de un orden de magnitud en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que la incubación de las células con 2  $\mu\text{M}$  AA causa un incremento de dos órdenes en la producción de este oxidante y una marcada disminución de la cantidad de células viables (Figuras 50 y 51). En cambio, la transfección previa con Trx1 Wt y Trx2 Wt favorece francamente la reversión en la producción final del oxidante ante las dos concentraciones de AA evaluadas y un aumento en el número de células viables, para las dos líneas celulares (Figuras 50 y 51). Resulta interesante observar que en el caso de la línea no tumoral, la reversión de las dos condiciones redox causadas por la incubación con AA es mayor en el caso de las células previamente transfectadas con la isoforma mitocondrial de Trx (Trx2) respecto de aquellas que sobreexpresaban la isoforma citosólica (Trx1) (Figura 50).



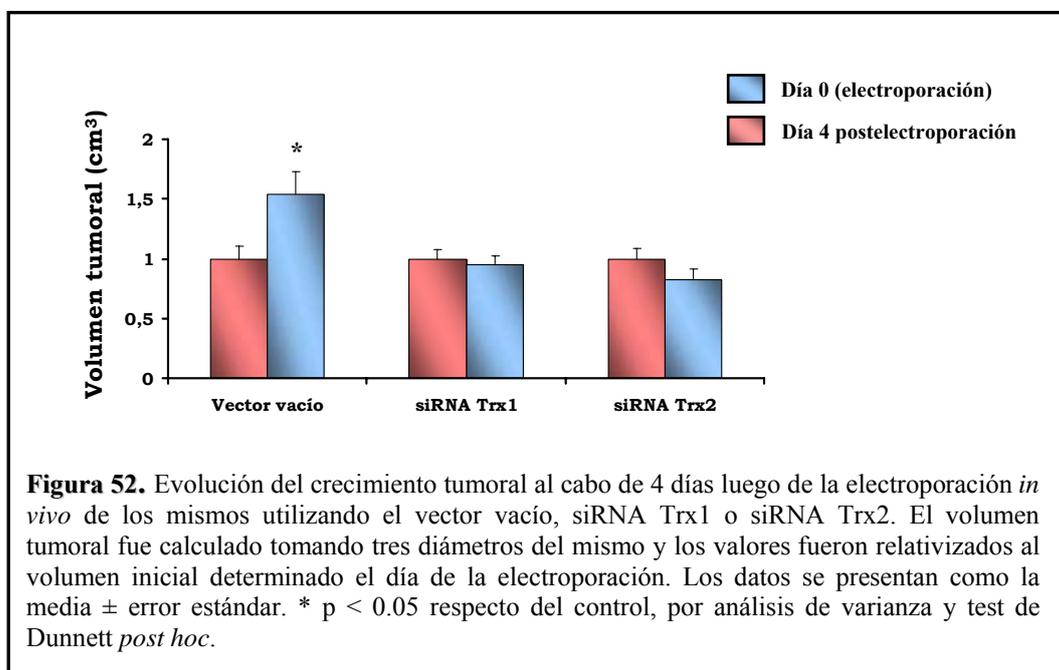
**Figura 50.** Producción de  $H_2O_2$  según la expresión diferencial de las tiorredoxinas. Determinación de la producción de  $H_2O_2$  por citometría de flujo en células NIH/3T3 transfectadas con vectores conteniendo Trx1 Wt (panel izquierdo) o Trx2 Wt (panel derecho) y posteriormente incubadas con 0.2-2  $\mu$ M antimicina A (AA) durante 2 horas. Histogramas representativos de la producción de  $H_2O_2$  por marcación con DCFH (5  $\mu$ M, excitación a 504 nm y emisión a 529 nm, análisis en FL-1) para las células negativas para yoduro de propidio, por duplicado.



### El sistema de Trx provoca una activación selectiva en el eje central de Akt1 en el modelo tumoral *in vivo*

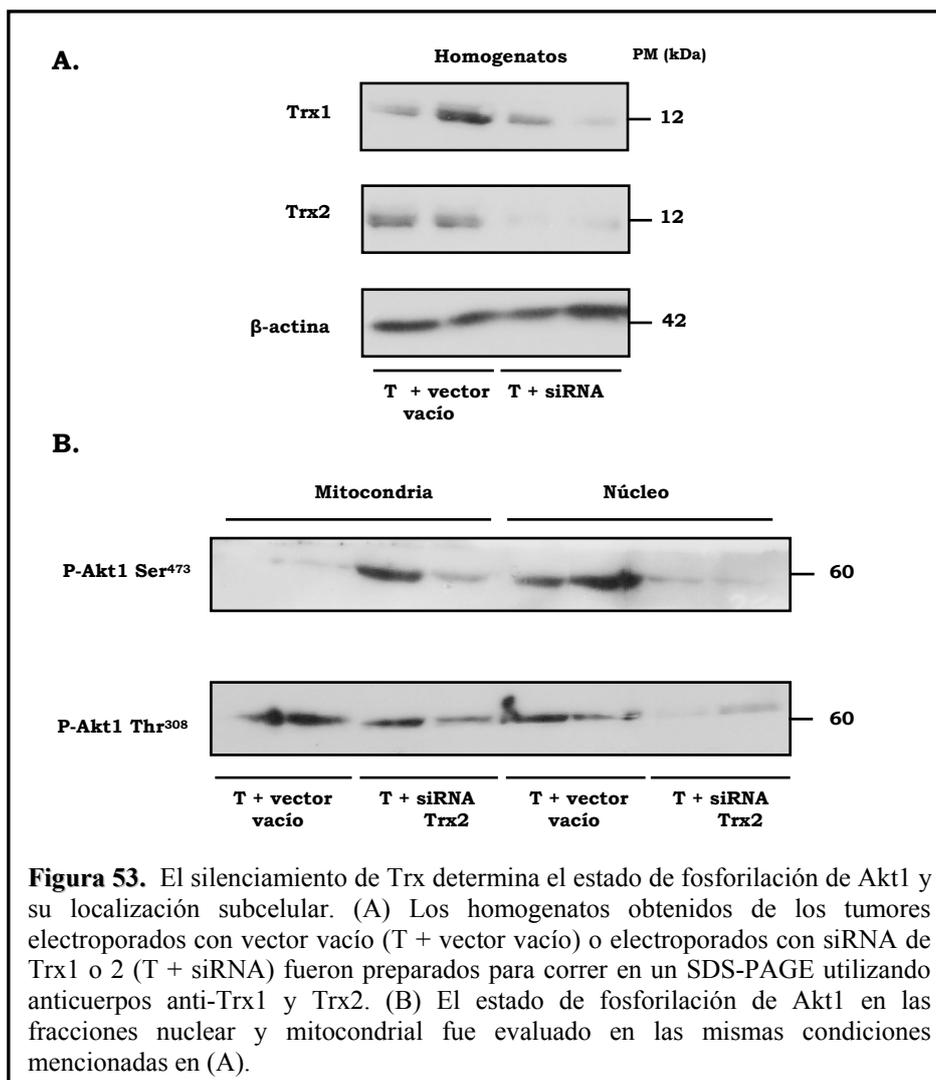
Dado que se observó que el sistema de Trx modula la tasa proliferativa celular y se encuentra estrechamente relacionado con el nivel de oxidantes, se analizó el efecto de dicho sistema en un modelo *in vivo* utilizando tumores generados en ratones de la cepa BALB/c. Para ello, los ratones fueron inoculados subcutáneamente en el flanco izquierdo con células de la línea LP07 y se analizó el crecimiento y evolución de los tumores durante cuatro semanas. Al cabo de este tiempo, los tumores fueron electroporados *in vivo* con los vectores pRNA-U6.1/Neo conteniendo el siRNA para

Trx1, Trx2 o con el vector vacío siguiendo el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos. El volumen tumoral fue calculado periódicamente tomando tres diámetros del mismo y la tasa de crecimiento fue comparada 4 días posteriores a la electroporación *in vivo* respecto de los valores iniciales. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 52 en la que puede observarse un aumento de la masa tumoral significativo en los ratones que fueron electroporados con el vector vacío mientras que la tasa de crecimiento no parece haber aumentado en aquellos animales que habían sido electroporados con los vectores conteniendo el siRNA para Trx1 y Trx2.



Al cuarto día luego de la electroporación, los animales fueron anestesiados y se procedió a la extracción de los tumores para la obtención de los homogenatos y las fracciones mitocondrial y nuclear. Como puede observarse en la Figura 53A, los niveles en la expresión de Trx1 y 2 disminuyeron en los homogenatos de tumores que habían sido electroporados con los vectores conteniendo el siRNA de Trx1 y 2 respectivamente. Para evaluar la influencia del estado redox *in vivo* en los tumores sobre la activación de Akt1, se analizó el nivel de fosforilación de la kinasa en los compartimientos nuclear y mitocondrial en las condiciones determinadas anteriormente.

De esta forma, se observó que al disminuir los niveles de Trx2 en los tumores, P-Akt1 Ser<sup>473</sup> aumentó en la mitocondria en detrimento de la translocación al núcleo (Figura 53B) mientras que en los tumores cuyo estado redox era bajo (T + vector vacío) P-Akt1 Ser<sup>473</sup> se encontró predominantemente en el núcleo. Por otro lado, según puede observarse en el panel inferior de la Figura 52B, P-Akt1 Thr<sup>308</sup> se encontró aumentado en los tumores sin siRNA Trx2 de la fracción mitocondrial respecto de aquellos electroporados con dicha construcción, indicando la completa activación de la kinasa y su posterior translocación al núcleo. Estos resultados preliminares indican que el estado redox produce efectos celulares diferenciales de acuerdo a la completa activación de Akt1 y que cambios en el estado redox por una disminución en la síntesis de Trx son capaces de revertir el destino celular a través de la regulación en los niveles de fosforilación de Akt1.



## Discusión

---

---

Numerosos estudios filogenéticos han demostrado que la evolución de las mitocondrias ha ocurrido en paralelo con la maduración de las kinasas implicadas en el crecimiento y en el tamaño final de los organismos superiores. En los últimos años, diferentes reportes confirmaron que las MAPKs, Akt, PKA y PKC están presentes en la mitocondria, particularmente en el espacio intermembrana, donde son capaces de unirse a sus kinasas activadoras (Bijur y Jope, 2003; Galli y col., 2008; Antico Arciuch y col., 2009). Alrededor de dos billones de años atrás, luego de la incorporación de las eubacterias y el establecimiento de una relación endosimbionte, las células adquirieron la capacidad de sobrevivir en un nuevo ambiente aeróbico (Green y Reed, 1998). Las mitocondrias proveen la mayor cantidad de energía a las células, como centros clave en el metabolismo oxidativo de eucariotas, sosteniendo la viabilidad y funciones celulares. Está ampliamente establecido que las mitocondrias no son exclusivamente productoras de ATP sino que además participan en eventos regulatorios y de señalización, respondiendo a las múltiples contribuciones fisiológicas y regulando la proliferación y muerte celular. Dichas organelas sensan e integran señales de proteínas translocadas así como también flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Goldenthal y Marín-García, 2004). Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que la mitocondria integra un ciclo tricompartmental que permite a Akt1 y ERK1/2 ser oxidadas como mecanismo postraduccional y modular, de esta forma, su grado de fosforilación y como consecuencia su redistribución subcelular, mediando así el destino final de la célula.

La modulación redox del destino celular en la línea NIH/3T3 involucra la translocación de Akt1 a la mitocondria. Este hecho define una dinámica celular de Akt1 mediada por caminos de señalización definidos por tres compartimientos: mitocondria ↔ citosol ↔ núcleo, con efectos adicionales sobre la progresión del ciclo celular y la apoptosis. El grupo de Nogueira y colaboradores describió una conexión entre Akt1 y la mitocondria en células MEFs donde la transfección con la variante miristoilada de Akt1 (Akt1myr) incrementaba la tasa respiratoria y provocaba un aumento en la fluorescencia de DCFH-DA debido a un aumento en la producción de oxidantes (Nogueira y col.,

2008). En estas condiciones, la inhibición de Akt1 con la asociación de rapamicina-PEITC (fenetil isotiocianato) reveló un cambio celular que gatillaba la apoptosis.

Las bases para la activación de Akt1 ante bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se sustentan en la bifosforilación eficiente y secuencial en Ser<sup>473</sup> y Thr<sup>308</sup>. El estímulo redox bajo actúa incrementando la disponibilidad mitocondrial de la variante monofosforilada, P-Akt1 Ser<sup>473</sup>, la cual depende de la activación extramitocondrial de mTORC2 por PI3K (Ikenoue y col., 2008). La expresión de mTORC2 es bastante rara en la mitocondria y de esta forma, Akt Ser<sup>473</sup> es fosforilada principalmente fuera de las organelas. Recientemente, Alessi y colaboradores han reportado una fosforilación adicional por mTORC2 en Akt Thr<sup>450</sup> que protege al dominio hidrofóbico de la desfosforilación y aumenta la estabilidad de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> (Alessi y col., 2009). La actividad de mTORC2 se encuentra asociada en este trabajo a una rápida entrada de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> a la mitocondria con una posterior salida de la variante bifosforilada P-Akt1 Ser<sup>473</sup>/Thr<sup>308</sup> hacia el núcleo. Más aún, Akt1 no fosforilada no es capaz de entrar a las mitocondrias aisladas (Figura 41A y C) y por el contrario, P-Akt1 Ser<sup>473</sup> monofosforilada es translocada fácilmente a las organelas *ex vivo* y se encuentra al cabo de unos pocos minutos en el sobrenadante con la adquisición de la segunda fosforilación (Figura 41A, B y C). En las células normales, la disponibilidad mitocondrial de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> está modulada también por la actividad de la fosfatasa de PI3K, PTEN. Cabe destacar, que PTEN es inactivada reversiblemente en las células NIH/3T3 a 50-100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a través de la oxidación de la Cys<sup>124</sup> (Kwon y col., 2004).

Bajo la estimulación hormonal, Bijur y Jope describieron cinéticas similares para la distribución subcelular de Akt al reportar una rápida translocación inducida por insulina de P-Akt Ser<sup>473</sup> a mitocondrias energizadas de células SKYH. Los autores identificaron varias proteínas blanco que eran fosforiladas por Akt, incluyendo GSK-3 α/β y una de las subunidades de la ATP sintasa (Bijur y Jope, 2003). Nuestro grupo ha reportado una translocación similar de Akt2 a la mitocondria por la estimulación con insulina cuyo efecto final provocaba la fosforilación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) y GSK-3 α/β, con cambios significativos en el metabolismo de la glucosa (Finocchietto y col., 2008).

Contrariamente, concentraciones altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultaron en la disrupción de la segunda fosforilación de Akt1 en Thr<sup>308</sup> en la mitocondria y la acumulación consecuente

de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> monofosforilada con baja actividad en las organelas. La respuesta apoptótica en condiciones redox elevadas es compleja e involucra tanto la activación de caminos proapoptóticos (pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación de citocromo *c*, Figura 31B, 32 y Tabla 3) como la pérdida de la represión de la apoptosis (señales de supervivencia) debido a la acción de Akt1 (activación o inhibición de Bcl-x<sub>L</sub> en los diferentes estados redox, Figura 31B). Está claro que la multiplicidad de mecanismos redox que disparan la apoptosis por la vía mitocondrial está centrada en los efectos inhibitorios débiles de Akt monofosforilada en las organelas; independientemente de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el porcentaje de apoptosis se incrementó con la inhibición de la vía PI3K/Akt (Figura 30B). Consecuentemente, un incremento marcado en la actividad de GSK-3  $\alpha/\beta$  debido a la pobre activación de Akt1 (Figura 36A) contribuyó a la apoptosis en las células NIH/3T3 (Figuras 31A, B y 32); la actividad proapoptótica de GSK-3  $\alpha/\beta$  es abolida por la fosforilación en la Ser<sup>23</sup> y Ser<sup>9</sup>, principalmente catalizadas por Akt en la mitocondria (Ohori y col., 2008). Por otra parte, la prevención de la apoptosis inducida por staurosporina y mediada por Akt constituye un mecanismo protector que involucra la activación de Bcl-x<sub>L</sub> y recíprocamente, esta proteína promueve o restaura la actividad de Akt1 (Wang y col., 2008). Los efectos antitumorales de la rapamicina se deben a la disrupción de Akt y a la disminución de Bcl-x<sub>L</sub>. La inhibición de la vía de mTOR-p70S6 y de Akt1 por rapamicina impide dramáticamente la transformación de las células NIH/3T3 que sobreexpresan constitutivamente la variante constitutivamente activa Akt1-myr (células 3T3-Akt1) o Akt2-myr (células 3T3-Akt2, Liu y col., 2004).

La segunda fosforilación de Akt1 en Thr<sup>308</sup> es requerida para sostener un tráfico significativo de Akt1 mitocondrial al núcleo. La mutante Akt1 T308A está muy limitada en su entrada al núcleo y la variante precursora monofosforilada P-Akt1 Ser<sup>473</sup> se acumula en la mitocondria simulando de esta forma los efectos de la alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La fosforilación en Thr<sup>308</sup> es dependiente de PDK1 (Toker y Newton, 2000) y completa los efectos iniciales de mTORC2. La fosforilación secuencial de Ser<sup>473</sup> y Thr<sup>308</sup> ha sido previamente reportada *in vivo* (Sarbasov y col., 2005); la disrupción de PDK1 reduce la fosforilación de Thr<sup>308</sup> *in vivo*, y los ratones deficientes en PDK1 son considerablemente más pequeños que los animales Wt (Bayascas y col., 2008).

Nosotros demostramos en esta Tesis que PDK1 se une a P-Akt1 Ser<sup>473</sup> en la membrana mitocondrial externa y en el espacio intermembrana y que PDK1 está constitutivamente activa (P-PDK1) en esta localización. Estudios previos en las células NIH/3T3 proponen que PDK1 está permanentemente acompañado con Akt por el dominio PH en un estado conformacional inactivo que puede ser convertido a un estado activo por factores de crecimiento o, hipotéticamente, por el estado redox (Calleja y col., 2007). Adicionalmente, y guiado por los dominios PH, Akt1 y PDK1 migran a la membrana plasmática donde la actividad de PDK1 se incrementa marcadamente por los fosfatidilinositoles; Filippa y colaboradores postularon que P-PDK1 es la proteína encargada de reclutar a Akt1 hacia la membrana plasmática (Filippa y col., 2000). Resulta interesante destacar que el grupo de Connor y colaboradores ha demostrado que la membrana mitocondrial contiene fosfatidilinositoles así como también que las alteraciones en el estado estacionario en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulan el estado redox de PTEN (Connor y col., 2005). La cantidad alternativa de Akt1 o de Akt1-PDK1 migrando hacia las membranas mitocondrial o plasmática debería depender del estímulo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en la mitocondria o factores de crecimiento actuando sobre los receptores tirosín-kinasas de la membrana plasmática) y bajo ciertas circunstancias, el complejo Akt1-PDK1 podría ser particionado entre las dos membranas para lograr efectos cooperativos. Sin embargo, en este trabajo, las preparaciones de membrana plasmática obtenidas de células NIH/3T3 que carecen de mitocondrias contienen P-PDK1 pero son incapaces de fosforilar eficientemente a Akt1 en Thr<sup>308</sup> (Figura 42A y B).

La modulación del *binding* de Akt1 a PDK1 depende de la oxidación de tioles de cisteínas específicas (Tabla 5). En ausencia del estímulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la Cys<sup>310</sup> (adyacente a la Thr<sup>310</sup> en el *loop* catalítico) fue oxidada basalmente a ácido sulfénico (-SO<sup>•</sup>), una modificación que fue también observada a concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muy bajas. En este contexto, nosotros hipotetizamos que un puente disulfuro podría estabilizar la interacción Akt1-PDK1 favoreciendo de esta forma, la fosforilación en Thr<sup>308</sup> a bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, como ocurre en las peroxirredoxinas, una reacción de ATP con Cys-SO<sup>•</sup> formaría un fosforiltiol que podría finalmente transferir el grupo fosfato a la Thr<sup>308</sup> (Aran y col., 2008). Por el contrario, niveles moderados a altos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causaron una oxidación fuerte de la Cys<sup>60</sup> y Cys<sup>310</sup> a ácido sulfónico (-SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>).

En este caso, las cargas negativas provocaron una disrupción del acercamiento de PDK1 al dominio PH de Akt1 y el avance del ATP<sup>3-</sup> cargado negativamente hacia la Thr<sup>308</sup>. En concordancia, la mutación C310A en Akt1 inhibe su actividad catalítica, un efecto obtenido también por la suplementación con lactoquinomicina, que actúa sobre el grupo Cys<sup>310</sup>-S<sup>-</sup> (Toral-Barza y col., 2007).

La contribución mitocondrial a la proliferación y la apoptosis ha sido revelada en la última década. Como hemos demostrado aquí, la modulación redox del destino celular involucra la señalización intramitocondrial de Akt1. Este aporte es comprendido sobre las siguientes bases: a) las mitocondrias son las organelas que utilizan más oxígeno y las que producen más oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; b) la doble fosforilación de las kinasas puede representar un control cooperativo de la activación en la modulación redox del metabolismo. De esta forma, se puede concluir que la fosforilación de Akt en la mitocondria no es sólo un simple paso en la activación de la kinasa, sino que constituye una modalidad en la cual las células seleccionan predominantemente la vía mitocondrial apoptótica o el camino nuclear proliferativo (Figura 43).

Asimismo, en esta Tesis hemos explorado los mecanismos que subyacen la proliferación y el arresto celular en la línea LP07 por la regulación redox de ERK1/2 en la mitocondria, otra de las principales kinasas involucradas en la progresión del ciclo celular junto con Akt1. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado la conexión mecanística entre la disfunción mitocondrial en células tumorales y el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asimismo, estos estudios han demostrado que bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µM) provocan un aumento en la proliferación de manera ERK1/2-dependiente, mientras que altas concentraciones (50 µM) provocan un arresto del ciclo celular con activación de p38 y JNK1/2 (Galli y col., 2008). En este modelo demostramos por primera vez que la modulación de la interacción de las MAPKs con sus kinasas río arriba reside en la oxidación de cisteínas inmersas en dominios conservados de MAPKs (Tabla 6 y 7).

Un hallazgo remarcable es que la activación selectiva de ERK1/2 está basada en la sensibilidad diferencial a los oxidantes, particularmente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, un *binding* eficiente de ERK2 a MEK1/2 es llevado a cabo por la oxidación de dos de los cinco tioles de cisteínas de ERK2, Cys<sup>38</sup> y Cys<sup>214</sup>, a ácido sulfinico (-SO<sub>2</sub>H) y sulfónico (-SO<sub>3</sub>H) a muy bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resulta interesante destacar que las Cys<sup>38</sup>

y Cys<sup>214</sup> no son oxidadas a alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es notable que la Cys<sup>41</sup> de JNK2, homóloga a la Cys<sup>38</sup> de ERK2, fue sensible a la oxidación, mientras que la Cys<sup>213</sup> de JNK2, homóloga a la Cys<sup>214</sup> de ERK2 no fue oxidada a ningún nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, la Cys<sup>162</sup> de p38, homóloga a la perteneciente a un dominio *docking* alternativo de ERK1/2 de rata, fue oxidada a -SO<sub>3</sub>H solo a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 μM). La oxidación de las cisteínas de ERK2 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocurre fuera de su sitio catalítico, incrementa la interacción con MEK1/2 de tres a cuatro veces, modula su actividad (Galli y col., 2008) y muy importante, no ocurre a cualquier concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sino que sólo puede llevarse a cabo a un bajo nivel de oxidante (Tabla 6). Las modificaciones postraduccionales en cisteínas parecen ser críticas para la vía de activación de ERK y la redistribución de la kinasa, y eventualmente, para el destino celular. La mutación de la Cys<sup>214</sup> por Ala provocó la acumulación de ERK2 y MEK1/2 en la mitocondria, también observada a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 45). La modulación de la actividad enzimática por la oxidación de cisteínas a ácido sulfénico ha sido reportada por Yang y colaboradores que han demostrado que la oxidación de tioles participa en el mecanismo catalítico de las isoformas I-VI de peroxirredoxinas, que reducen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando disulfuro (Yang y col., 2002) y ácido sulfénico (en la Cys<sup>51</sup> de la isoforma de mamíferos, Jacob y col., 2006). Las peroxirredoxinas son además oxidadas a ácido sulfínico e inactivadas (Woo y col., 2003), al igual que la MAPK fosfatasa-3 (Seth y Rudolph, 2006) y la fosfatasa-1B (Van Montfort y col., 2003). La oxidación a ácido sulfínico de la cisteína de las peroxirredoxinas puede ser reducida nuevamente por las sulfirredoxinas dependientes de ATP (Biteau y col., 2003) o por las sestrinas-Hi95 o sestrina2 (Budanov y col., 2004). Todos estos datos en conjunto apoyan la noción de la oxidación de cisteínas como un mecanismo regulatorio de la actividad de proteínas por la oxidación reversible de cisteínas.

Los dominios que rodean las cisteínas susceptibles a la oxidación en las enzimas mencionadas anteriormente comparten un residuo Arg (Cys<sup>+6</sup> a Cys<sup>+11</sup>, Jeong y col., 2006) también presente en las MAPKs. La oxidación de tioles requiere un p*k*<sub>a</sub> bajo para el grupo cisteína (Kim y col., 2000). Cuando la Arg se posiciona sobre el sitio Cys<sup>+10</sup> o Cys<sup>+9</sup>, este aminoácido colabora con la disminución del p*k*<sub>a</sub> por debajo de 5.8 (el p*k*<sub>a</sub> normal de la Cys es 8.5), para disociar Cys-SH hacia el tiolato (Cys-S<sup>-</sup>) a un pH fisiológico, y para estabilizar la oxidación a ácido sulfínico. Como la mutación de la

Cys<sup>214</sup> a ácido glutámico favorece la interacción ERK-MEK (Figura 45B), las cargas negativas deben estar involucradas en dicha interacción y por lo tanto, postulamos que la oxidación de la cisteína introduce cargas negativas con un  $pK_a$  muy bajo ( $<2$ ) que permite que la interacción ocurra. Una idea atractiva es que las cisteínas cargadas guían a MEK u otros ligandos mientras “caminan” a través de las argininas hacia el Asp<sup>316</sup> y Asp<sup>319</sup> (Figura 51A y B), los dos residuos acídicos esenciales de ERK2 que integran el dominio D para la unión con sus ligandos (Adachi y col., 2000). Las cargas negativas de la Cys<sup>162</sup> de p38 pueden ser atraídas hacia las argininas de los ligandos río arriba, como la Arg<sup>104</sup> de MKK3 (Heo y col., 2004). Con respecto a JNK, el mecanismo probable de *binding* redox es controversial, ya que la oxidación procede en varios dominios cisteína. Este hecho discute la posibilidad que la oxidación de múltiples cisteínas puedan estabilizar las interacciones hidrofóbicas involucradas en la capacidad de unión a proteínas y además sugiere que existiría más de un modelo de regulación por oxidación para los distintos sistemas biológicos y vías de señalización.

Nuestro grupo ha demostrado que la disfunción mitocondrial está asociada con un rendimiento bajo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y un estado de proliferación persistente en células embrionarias y transformadas (Galli y col., 2003). Estos efectos implican que la disrupción de la señalización intramitocondrial en la activación de las kinasas podría conducir a la proliferación persistente y el cáncer o a la muerte celular prematura. Nosotros concluimos que la proliferación, tanto en las células NIH/3T3 (normales) como en las LP07 (tumoraes), depende de la oxidación sostenida de tioles de cisteínas específicas de Akt1 y ERK2 respectivamente en niveles bajos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Si las mitocondrias disfuncionales son incapaces de incrementar el nivel oxidativo en la célula (Galli y col., 2003), no pueden contribuir al arresto del ciclo celular o gatillar la apoptosis ya sea por la oxidación de la Cys<sup>162</sup> en p38 o por el impedimento de la oxidación de Cys<sup>38</sup> y Cys<sup>214</sup> en ERK2 en las células LP07 o por la oxidación de la Cys<sup>60</sup> y Cys<sup>310</sup> de Akt1 en las células NIH/3T3, y de esta forma, conducir a una división celular descontrolada y en última instancia, al cáncer.

En los últimos estudios se determinó la modulación que ejerce Trx sobre el destino celular en términos de proliferación y nivel de oxidantes. Según se pudo demostrar, la sobreexpresión de Trx1 y 2 es capaz de revertir el efecto antiproliferativo de las condiciones redox elevadas. Al analizar el efecto provocado sobre el eje de las

---

quinasas evaluado mediante estudios *in vivo* utilizando tumores desarrollados en ratones Balb/c, se manifestó una activación diferencial de Akt1 (Figura 52B). Los resultados obtenidos indican que al revertir la baja condición redox proliferante utilizando siRNA para Trx2, P-Akt1 Ser<sup>473</sup> aumenta en la mitocondria en detrimento de la translocación al núcleo, mientras que en los tumores que exhiben bajo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> P-Akt1 Ser<sup>473</sup> se encuentra predominantemente en el núcleo. Por otra parte, la fosforilación en Thr<sup>308</sup> se encuentra aumentada en los tumores sin siRNA Trx2 en la fracción mitocondrial respecto de aquellos electroporados con dicha construcción, sugiriendo la completa activación de la kinasa y su posterior translocación al núcleo.

De esta forma en este trabajo de Tesis se desarrolla notablemente el concepto de evolución de transducción de señales a partir de la noción lineal original en la cual un único estímulo evocaba una simple respuesta vía la acción de un solo transductor. Por el contrario, se ha demostrado que en los sistemas celulares existe un elevado nivel de integración de señales a través de proteínas que son reguladas por medio de cambios conformacionales, eventos de translocación (a la mitocondria) y modificaciones postraduccionales anexas a la fosforilación (como la oxidación) que subyacen las respuestas de señalización estímulo-específicas.

La contribución mitocondrial a la activación de las kinasas abre un nuevo campo en el balance entre proliferación celular y apoptosis. Como la disrupción entre la proliferación y muerte celular constituye un tema central de la tumorigénesis, el conocimiento de este mecanismo aporta puntos claves para la comprensión y la terapéutica del cáncer.

## Conclusiones

---

---

1. Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que la mitocondria integra un ciclo tricompartmental que permite a Akt1 y ERK1/2 ser oxidadas como mecanismo postraduccional y modular de esta forma su grado de fosforilación y como consecuencia su redistribución subcelular, mediando de esta manera el destino final de la célula.

2. La contribución mitocondrial a la activación de las kinasas abre un nuevo campo en el balance entre proliferación celular y apoptosis. Como la disrupción entre la proliferación y muerte celular constituye un tema central de la tumorigénesis, el conocimiento de este mecanismo aporta puntos claves para la comprensión y la terapéutica del cáncer.

3. La modulación redox del destino celular en la línea NIH/3T3 involucra la translocación de Akt1 a la mitocondria. Este hecho define una dinámica celular de Akt1 mediada por caminos de señalización definidos por tres compartimientos: mitocondria ↔ citosol ↔ núcleo, con efectos adicionales sobre la progresión del ciclo celular y la apoptosis.

4. Los resultados de la presente Tesis demuestran que Akt1 inactiva no puede translocar a mitocondrias aisladas y energizadas (Figura 41A y C). Por el contrario, P-Akt1 Ser<sup>473</sup> transloca muy rápido a la organela a una tasa relativa de 1.2 pg/min.µg proteína. A los 50 minutos se observó un completo decaimiento de P-Akt1 Ser<sup>473</sup> en las organelas aisladas indicando un flujo reverso de la kinasa entre los dos compartimientos. Asimismo, al analizar si P-Akt1 Ser<sup>473</sup> había sido modificada luego de entrar en las mitocondrias aisladas, se comprobó que la kinasa monofosforilada había adquirido la segunda fosforilación en Thr<sup>308</sup>, y de esta forma, se convertía en la variante completamente activa de la kinasa.

5. Estos resultados demuestran que las membranas plasmática y mitocondrial cooperan para la activación completa de Akt1 en las células NIH/3T3 y confirman que la fosforilación en Ser<sup>473</sup> catalizada por mTORC2 en la membrana plasmática es un prerequisite para que la fosforilación en Thr<sup>308</sup> ocurra en las mitocondrias.

6. Considerando las condiciones experimentales como un modelo tri-compartmental (mitocondria, citosol y núcleo) se observó en la línea celular LP07 que las diferentes respuestas frente al estado redox respondían a un tráfico preferencial de MAPKs a la mitocondria, en donde una activación selectiva de ERK1/2 o p38-JNK1/2 (colocalizadas con sus kinasas río arriba) facilitaba su pasaje al núcleo

7. El mecanismo mitocondrial de activación de kinasas se realiza en el espacio intermembrana, un órgano efectivo en el “sensing” de cambios redox subsecuentes a la limitación de la transferencia de electrones en los complejos I y III.

8. Estos mecanismos implican la oxidación de cisteínas específicas que producen cambios conformacionales o efectos electrostáticos que favorecen o retardan las interacciones con las kinasas río arriba que son constitutivas en las mitocondrias.

9. En el caso de Akt1 y en concentraciones limitadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente la Cys<sup>310</sup> (que se encuentra adyacente a Thr<sup>308</sup> a solo 5 Å) es oxidada a ácido sulfénico (Cys-SOH). Al utilizar concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la Cys<sup>310</sup> permaneció en parte como ácido sulfénico (Cys-SOH) y parte oxidada más aún a ácido sulfónico o cisteico (Cys-SO<sub>3</sub>H). A 1 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la Cys<sup>310</sup> se vió siempre modificada a ácido cisteico. En el caso de ERK2 luego del tratamiento con concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 μM), los grupos tioles de las Cys<sup>38</sup> y Cys<sup>214</sup> fueron oxidados a ácido sulfinico (Cys-SO<sub>2</sub>H) y sulfónico (Cys-SO<sub>3</sub>H). Por el contrario, no se observó oxidación de ninguna cisteína luego del tratamiento con concentraciones más altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

10. El aumento del potencial redox en el espacio intermembrana promueve en cambio respuestas diferentes para Akt1 y ERK2. Akt1 es completamente oxidado a ácido sulfónico y se inhibe la asociación a P-PDK1 y en cambio, ERK1/2 pierde la oxidación de Cys<sup>214</sup> y deja de ser reconocido por MEK1/2. Ambos efectos resultan en acumulación intramitocondrial de kinasas y en efectos intramitocondriales que conducen al arresto celular y/o a la apoptosis. Por ejemplo, Akt1 no puede fosforilar a BAD o Bcl-x<sub>L</sub> y la vía intrínseca de apoptosis es activada.

11. Considerando que las mitocondrias tumorales son disfuncionales, el déficit de actividad junto con el daño al ADNmt impiden la producción de suficiente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial para arrestar el ciclo e iniciar la muerte celular programada y en entonces, en reciprocidad con los tejidos embrionarios se mantiene una tasa de elevada proliferación celular.

12. La disminución o aumento de la actividad antioxidante puede condicionar el mecanismo redox de señalización mitocondrial. En el presente trabajo, la sobreexpresión de Trx1 y 2, disminuye  $H_2O_2$  y se mantiene el nivel más bajo de oxidación de kinasas, que así se tornan activadas en forma muy prologada.

13. Este proceso de señalización mitocondrial se ve afectado *in vivo* por la modulación del estado redox usando siRNA para Trx1 y 2 en tumores desarrollados en ratones de la cepa BALB/c.

14. Los datos presentados tienen potencial significación en la modulación del ciclo celular con especial referencia a la reparación tisular y la expresión y proliferación de tumores.

## Direcciones futuras

---

Esta Tesis presenta la contribución mitocondrial en la activación de las kinasas como un nuevo concepto en el balance entre proliferación celular y apoptosis. Como la disrupción entre la proliferación y muerte celular constituye un tema central de la tumorigénesis, el conocimiento de este mecanismo aporta puntos claves para el conocimiento y el tratamiento del cáncer. Por otro lado, la translocación de las kinasas a la mitocondria no sólo representa un mecanismo de regulación en la disponibilidad celular de dichas enzimas sino que podrían estar implicadas en la modulación de numerosos sustratos mitocondriales en diversas situaciones fisiológicas y patológicas.

El estudio del proceso de translocación es esencial para comprender y desarrollar modelos más precisos de los procesos moleculares involucrados. Para ello se prevee: 1) estudiar el mecanismo de translocación de Akt1 y ERK1/2 en relación a transportadores específicos; 2) estudiar los cambios conformacionales determinados por la oxidación de las cisteínas por cristalografía o espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR); 3) estudiar la participación mitocondrial en la bifosforilación de ERK1/2; y 4) estudiar el mecanismo tricompartmental en concentración persistentemente reducida de  $H_2O_2$  en la condición de sobreexpresión de Trx (utilizando ratones *knock in* para Trx).

---

**Parte de los resultados presentados en esta Tesis fueron publicados en PLoS One en 2009 y 2008.**

ANTICO ARCIUCH VG, GALLI S, FRANCO MC, LAM PY, CADENAS E, CARRERAS MC, PODEROSO JJ. Akt1 intramitochondrial cycling is a crucial step in the redox modulation of cell cycle progression. *PLoS One*. 2009 Oct.

GALLI S\*, ANTICO ARCIUCH VG\*, PODEROSO C, CONVERSO DP, ZHOU Q, BAL DE KIER JOFFÉ E, CADENAS E, BOCZKOWSKI J, CARRERAS MC, PODEROSO JJ. Tumor cell phenotype is sustained by selective MAPK oxidation in mitochondria. *PLoS ONE*. 3: e2379, 2008.

**Parte de los resultados presentados en esta Tesis fueron publicados en Advanced Drug Delivery Reviews en 2009.**

ANTICO ARCIUCH VG, ALIPPE Y, CARRERAS MC, PODEROSO JJ. Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Sept.

**Algunos de los resultados presentados en esta Tesis merecieron los siguientes premios:**

**“Young Investigator Award” en el IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Águas de Lindóia, SP, Brazil, en 2005.**

“Role of Akt in proliferation mechanism dependent on redox state.” *Antico Arciuch VG, Galli S, Franco MC, Carreras MC, Poderoso JJ.*

**“Young Investigator Award” en el 15<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Indianapolis, USA, en 2008.**

“The redox modulation of Akt1 activation in mitochondria.” *Antico Arciuch VG, Galli S, Carreras MC, Poderoso JJ.*

**“Young Investigator Award” en el Annual Meeting of the Society for Free Radicals Research Europe, Rome, Italy, en 2009.**

“Cell cycle progression depends on redox modulation of Akt1 activation in mitochondria.” *Antico Arciuch VG, Galli S, Franco MC, Carreras MC, Poderoso JJ.*



## Referencias

---

Abe Y, Shodai T, Muto T, Mihara K, Torii H, Nishikawa S, Endo T, Kohda D. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*. 100: 551-560, 2000.

Adachi M, Fukuda M, Nishida E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol*. 148: 849-856, 2000.

Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 3627-3632, 1997.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 15: 6541-6551, 1996.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. 7: 261-269, 1997.

Alessi DR, Pearce LR, García-Martínez JM. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal*. 2: pe27, 2009.

Alonso M, Melani M, Converso DP, Jaitovich A, Paz C, Carreras MC, Medina JH, Poderoso JJ. Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development. *J Neurochem*. 89: 248-256, 2004.

Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med*. 28: 463-499, 2000.

---

Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 10 Suppl: S18-25, 2004.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier HP, Smith AJH, Stader R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290. 427-465, 1981.

Antico Arciuch VG, Alippe Y, Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Sep 4.

Aran M, Caporaletti D, Senn AM, Tellez de Iñon MT, Girotti M., Llera AS, Wolosiuk RA. ATP-dependent modulation and autophosphorylation of rapeseed 2-Cys peroxiredoxin. *FEBS J.* 275: 1450-1463, 2008.

Arnér ES, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol.* 16: 420-426, 2006.

Arranz E, Robledo M, Martínez B, Gallego J, Román A, Rivas C, Benítez J. Incidence of homogeneously staining regions in non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 87: 1-3, 1996.

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 272: 217-221, 1997.

Bauer MF, Sirrenberg C, Neupert W, Brunner M. Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell.* 87: 33-41, 1996.

---

Barthel A, Kohn AD, Luo Y, Roth RA. A constitutively active version of the Ser/Thr kinase Akt induces production of the ob gene product, leptin, in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*. 138: 3559-3562, 1997.

Bayascas JR, Wullschleger S, Sakamoto K, García-Martínez JM, Clacher C, Komander D, van Aalten DMF, Boina KM, Lang F, Lipina C. Mutation of the PDK1 PH Domain Inhibits Protein Kinase B/Akt, Leading to Small Size and Insulin Resistance. *Mol Cell Biol*. 28: 3258-3272, 2008.

Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*. 254: 274-277, 1991.

Benard G, Rossignol R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal*. 10: 1313-1342, 2008.

Bijur GN, Jope RS. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem*. 87: 1427-1435, 2003.

Biteau B, Labarre J, Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteinesulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 425: 980-984, 2003.

Bogumil R, Namgaladze D, Schaarschmidt D, Schmachtel T, Hellstern S, Mutzel R, Ullrich V. Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide. Evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation. *Eur J Biochem*. 267: 1407-1415, 2000.

Bossy-Wetzel E, Talantova MV, Lee WD, Scholzke MN, Harrop A, Mathews E, Gotz T, Han J, Ellisman MH, Perkins GA, Lipton SA. Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K<sup>+</sup> channels. *Neuron*. 41: 351-365, 2004.

---

Böttcher B, Schwarz L, Gräber P. Direct indication for the existence of a double stalk in CF0F1. *J Mol Biol.* 281: 757-762, 1998.

Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal.* 3: 293-311, 2001.

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 128: 617-630, 1972.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134: 707-716, 1973.

Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* 54: 311-314, 1975.

Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. Regulation of mitochondrial respiration by ADP, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol.* 301: 188-198, 1999.

Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci.* 26:657-664, 2001.

Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem.* 387: 1329-1335, 2006.

Broemer M, Krappmann D, Scheidereit C. Requirement of Hsp90 activity for I $\kappa$ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- $\kappa$ B activation. *Oncogene.* 23: 5378-5386, 2004.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 303: 2011-2015, 2004.

---

Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakoz PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science*. 304: 596-600, 2004.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 29: 222-230, 2000.

Calhoun MW, Thomas JW, Gennis RB. The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochem Sci*. 19: 325-330, 1994.

Calleja V, Alcor D, Laguerre M, Park J, Vojnovic B, Hemmings BA, Downward J, Parker PJ, Larijani B. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol*. 4, e95, 2007.

Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*. 8: 187-198, 2008.

Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 448: 439-444, 2007.

Carreras MC, Converso DP, Lorenti AS, Barbich M, Levisman DM, Jaitovich A, Antico Arciuch VG, Galli S, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide synthase drives redox signals for proliferation and quiescence in rat liver development. *Hepatology*. 40: 157-166, 2004a.

---

Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso J.J. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med* 25: 125-139, 2004b.

Cha MK, Suh KH, Kim IH. Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 28: 93, 2009.

Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuán-Szklarz LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* 23: 3735-3746, 2004.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59: 527-605, 1979.

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 160: 189-200, 2003.

Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol. Chem.* 280: 26185-26192, 2005.

Chen R, Fearnley IM, Peak-Chew SY, Walker JE. The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 279: 26036-26045, 2004.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.* 12: 915-927, 1992.

Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 15: 2203-2208, 2001.

---

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. MAP kinases. *Chem Rev.* 101: 2449-2476, 2001.

Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 3636-3641, 1996.

Chiang GG, Sefton BM. Phosphorylation of a Src kinase at the autophosphorylation site in the absence of Src kinase activity. *J Biol Chem.* 275: 6055-6058, 2000.

Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 292: 1728-1731, 2001.

Coffer PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem.* 201: 475-481, 1991.

Connor KM, Subbaram S, Regan KJ, Nelson KK, Mazurkiewicz JE, Bartholomew PJ, Aplin AE, Tai YT, Aguirre-Ghiso J, Flores SC, Melendez JA. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation. *J Biol Chem.* 280: 16916-16924, 2005.

Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 358: 502-511, 2008.

Cunnick JM, Dorsey JF, Standley T, Turkson J, Kraker AJ, Fry DW, Jove R, Wu J. Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 273: 14468-14475, 1998.

---

Curran SP, Leuenberger D, Oppliger W, Koehler CM. The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* 21: 942-953, 2002.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13: 2905-2927, 1999.

Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 3566-3571, 1998.

Denu JM, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol.* 2: 633-641, 1998.

Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry.* 37: 5633-5642, 1998.

Deora AA, Win T, Vanhaesebroeck B, Lander HM. A redox-triggered ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 3'-kinase to Ras by redox stress. *J Biol Chem.* 273: 29923-29928, 1998.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12: 3499-3511, 1998.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 399: 601-605, 1999.

Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science.* 313: 314-318 (2006).

---

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82: 47-95, 2002.

Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science.* 304: 253-257, 2004.

Dyson HJ, Jeng MF, Tennant LL, Slaby I, Lindell M, Cui DS, Kprin S, Holmgren A. Effects of buried charged groups on ysteine thiol ionization and reactivity in *Escherichia coli* thioredoxin: tructural and functional characterization of mutants of Asp 6 and Lys 57. *Biochemistry.*36: 2622-236, 1997.

Enslin H, Davis RJ. Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol Cell.* 93: 5-14, 2001.

Ephrussi B, Hottinguer H, Tavlitzki J. Action de l'acriflavine sur les levures. II. Etude génétique du mutant "petite colonie". *Ann Ins Pasteur.* 76: 351-367, 1949.

Fan AC, Bhangoo MK, Young JC. Hsp90 functions in the targeting and outer membrane translocation steps of Tom70-mediated mitochondrial import. *J Biol Chem.* 281: 33313-33324, 2006.

Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 1367-1373, 2004.

Fetrow JS, Siew N, Skolnick J. Structure-based functional motif identifies a potential disulfide oxidoreductase active site in the serine/threonine protein phosphatase-1 subfamily. *FASEB J.* 13:1866-1874, 1999.

Filippa N, Sable CL, Hemmings BA, Van Obberghen E. Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol Cell Biol.* 20: 5712-5721, 2000.

---

Finocchietto P, Barreyro F, Holod S, Peralta J, Franco MC, Méndez C, Converso DP, Estévez A, Carreras MC, Poderoso JJ. Control of muscle mitochondria by insulin entails activation of Akt2-mtNOS pathway: implications for the metabolic syndrome. *PLoS One*. 3: e1749, 2008.

Frey T, Manella C. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 25: 319-324, 2000.

Friedman DL, Larner J. Studies on udpg-alpha-glucan transglucosylase. Interconversion of two forms of muscle udpg-alpha-glucan transglucosylase by a phosphorylation-dephosphorylation reaction sequence. *Biochemistry*. 2: 669-675, 1963.

Frödin M, Antal TL, Dümmler BA, Jensen CJ, Deak M, Gammeltoft S, Biondi RM. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J*. 21: 5396-5407, 2002.

Funato Y, Miki H. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxid Redox Signal*. 9: 1035-1057, 2007.

Galli S, Labato MI, Bal de Kier Joffé E, Carreras MC, Poderoso JJ. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Res*. 63: 6370-6377, 2003.

Galli S, Antico Arciuch VG, Poderoso C, Converso DP, Zhou Q, Bal de Kier Joffé E, Cadenas E, Boczkowski J, Carreras MC, Poderoso JJ. Tumor cell phenotype is sustained by selective MAPK oxidation in mitochondria. *PLoS ONE*. 3: e2379, 2008.

Galli S, Jahn O, Hitt R, Hesse D, Opitz L, Plessman U, Urlaub H, Poderoso JJ, Jares-Erijman E, Jovin T. A New Paradigm for MAPK: Structural Interactions of hERK1 with Mitochondria in HeLa Cells. *PLoS ONE*. In press, 2009.

---

Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, Henson PM. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem.* 279: 21085-21095, 2004.

Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Blik AM, Spelbrink JN. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell.* 14: 1583-1596, 2003.

Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* 12: 502-513, 1998.

Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF, Weber MJ. Activation of mitogen activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59: 279-284, 1999.

Glading A, Uberall F, Keyse SM, Lauffenburger DA, Wells A. Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem.* 276: 23341-23348, 2001.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281: 1309-1312, 1998.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsihchlis PN, Larue L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.* 63: 2172-2178, 2003.

Goldenthal MJ, Marín-García J. Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem.* 262: 1-16, 2004.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 445: 851-857, 2007.

Greene EL, Houghton O, Collinsworth G, Garnovskaya MN, Nagai T, Sajjad T, Bheemanathini V, Grewal JS, Paul RV, Raymond JR. 5-HT(2A) receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278: F650-F658, 2000.

Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci.* 31: 455-464, 2006.

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 297: 1186-1190, 2002.

Hajdуч E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes.* 47: 1006-1013, 1998.

Hallberg B, Rayter SI, Downward J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem.* 269: 3913-3916, 1994.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70, 2000.

Herrmann JM, Köhl R. Catch me if you can! Oxidative protein trapping in the intermembrane space of mitochondria. *J Cell Biol.* 176: 559-563, 2007.

Hartl FU, Ostermann J, Guiard B, Neupert W. Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell.* 51:1027-1037, 1987.

---

Hayashi T, Ueno Y, Okamoto T. Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J Biol Chem.* 268: 11380-11388, 1993.

Heo YS, Kim SK, Seo CI, Kim YK, Sung BJ, Lee HS, Lee JI, Park SY, Kim JH, Hwang KY, Hyun YL, Jeon YH, Ro S, Cho JM, Lee TG, Yang CH. Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *EMBO J.* 23: 2185-2195, 2004.

Herrmann JM, Hell K. Chopped, trapped or tacked-protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 30: 205-211, 2005.

Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci.* 20: 2567-2574, 2000.

Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. 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, 1997.

Holley AK, St Clair DK. Watching the watcher: regulation of p53 by mitochondria. *Future Oncol.* 5: 117-130, 2009.

Holmes WF, Soprano DR, Soprano KJ. Early events in the induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by CD437: activation of the p38 MAP kinase signal pathway. *Oncogene.* 22: 6377-6386, 2003.

Horbinski C, Chu CT. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic Biol Med.* 38: 2-11, 2005.

Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K. Regulation of mitochondrial pyruvate

---

dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 2719-2723, 1996.

Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 23: 1919-1931, 2008.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 127: 125-137, 2006.

Jacob C, Knight I, Winyard PG. Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem.* 387: 1385-1397, 2006.

Jensen PK. Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. II. Steroid effects. *Biochim Biophys Acta.* 122: 167-174, 1966.

Jeong W, Park SJ, Chang TS, Lee DY, Rhee SG. Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. *J Biol Chem.* 281: 14400-14407, 2006.

Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA. MEK and ERK protect hypoxic cortical neurons via phosphorylation of Bad. *J Neurochem.* 80: 119-125, 2002.

Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 4171-4175, 1991.

- 
- Kallis GB, Holmgren A. Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 255: 10261-10265, 1980.
- Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 11: 1-14, 1999.
- Kandasamy K, Srivastava RK. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 62: 4929-4937, 2002.
- Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem*. 274: 13085-13090, 1999.
- Kannan N, Taylor, SS, Zhai Y, Nemter, JC, Manning G. Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biology*. 5e17, 2007.
- Kato M, Iwashita T, Takeda K, Akhand AA, Liu W, Yoshihara M, Asai N, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I. Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. *Mol Biol Cell*. 11: 93-101, 2000.
- Kennedy EP, Lehninger AL. The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 185: 275-285, 1950.
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*. 93: 605-615, 1998.
- Kim AH, Yano H, Cho H, Meyer D, Monks B, Margolis B, Birnbaum MJ, Chao MV. Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron*. 35: 697-709, 2002.

---

Kim JR, Yoon HW, Kwon KS, Lee SR, Rhee SG. Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal Biochem.* 283: 214-221, 2000.

Kishida T, Asada H, Itokawa Y, Yasutomi K, Shin-Ya M, Gojo S, Cui FD, Ueda Y, Yamagishi H, Imanishi J, Mazda O. Electrochemo-gene therapy of cancer: intratumoral delivery of interleukin-12 gene and bleomycin synergistically induced therapeutic immunity and suppressed subcutaneous and metastatic melanomas in mice. *Mol Ther.* 8: 738-745, 2003.

Klatt P, Molina EP, De Lacoba MG, Padilla CA, Martinez-Galesteo E, Barcena JA, Lamas S. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J.* 13:1481-1490, 1999.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem.* 271: 31372-31378, 1996.

Kondo N, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox regulation of human thioredoxin network. *Antioxid Redox Signal.* 8: 1881-1890, 2006.

Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 11233-11237, 1997.

Kovermann P, Truscott KN, Guiard B, Rehling P, Sepuri NB, Muller H, Jensen RE, Wagner R, Pfanner N. Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell.* 9: 363-373, 2002.

---

Kupriyanova TA, Kandrор KV. Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem.* 274: 1458-1464, 1999.

Kurland CG, Andersson SG. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 786-820, 2000.

Kwon J, Lee SR, Yang KS, Ahn Y, Kim YJ, Stadtman ER, Rhee SG. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 16419-16424, 2004.

Lander HM, Milbank AJ, Tauras JM, Hajjar DP, Hempstead BL, Schwartz GD, Kraemer RT, Mirza UA, Chait BT, Burk SC, Quilliam LA. Redox regulation of cell signalling. *Nature.* 381: 380-381, 1996.

Lang BF, Gray MW, Burger G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 33: 351-397, 1999.

Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 543: 5-10, 2003.

Lee HJ, Bach JH, Chae HS, Lee SH, Joo WS, Choi SH, Kim KY, Lee WB, Kim SS. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase attenuates 3-hydroxykynurenine-induced neuronal cell death. *J Neurochem.* 88: 647-656, 2004.

Lee I, Bender E, Kadenbach B. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Moll Cell Biochem.* 235: 63-70, 2002.

Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Kim SH, Yoo NJ, Lee JY. Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS.* 112: 233-238, 2004.

---

Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 273: 15366-15372, 1998.

Lee YJ, Shacter E. Hydrogen peroxide inhibits activation, not activity, of cellular caspase-3 in vivo. *Free Radic Biol Med.* 29: 684-692, 2000.

Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci.* 117: 2653-2662, 2004.

Lehninger AL. *The Mitochondrion: Molecular Basis of Structure and Function.* W.A. Benjamin, New York, 1965.

Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1366: 177-196, 1998.

Lemire BD, Fankhauser C, Baker A, Schatz G. The mitochondrial targeting function of randomly generated peptide sequences correlates with predicted helical amphiphilicity. *J Biol Chem.* 264: 20206-20215, 1989.

Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol.* 122: 1079-1088, 1993.

Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng, M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell.* 119, 873-887, 2004.

---

Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules—from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 9: 25-47, 2007.

Liu H, Nishitoh H, Ichijo H, Kyriakis JM. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol*. 20: 2198-2208, 2000.

Liu X, Powlas J, Shi Y, Oleksijew AX, Shoemaker AR, De Jong R, Oltersdorf T, Giranda VL, Luo Y. Rapamycin inhibits Akt-mediated oncogenic transformation and tumor growth. *Anticancer Res*. 24: 2697-2704, 2004.

LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*. 11: 32-50, 2008.

Loschen G, Flohé L, Chance B. Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett*. 18: 261-264, 1971.

Lutter R, Saraste M, van Walraven HS, Runswick MJ, Finel M, Deatherage JF, Walker JE. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J*. 295: 799-806, 1993.

Majewski M, Nieborowska-Skorska M, Salomoni P, Slupianek A, Reiss K, Trotta R, Calabretta B, Skorski T. Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res*. 59: 2815-2819, 1999.

Malstrom S, Tili E, Kappes D, Ceci JD, Tsihchlis PN. Tumor induction by an Lck-MyrAkt transgene is delayed by mechanisms controlling the size of the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 14967-14972, 2001.

---

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 298: 1912-1934, 2002.

Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*. 27:514-520, 2002.

Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol*. 178: 179-185, 1996.

Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, Tohyama M. Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem*. 73: 2037-2046, 1999.

Mayer U. Comparative investigations of catalase activity in different ocular tissues of cattle and man. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 213: 261-265, 1980.

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*. 404: 782-787, 2000.

Milella M, Precupanu CM, Gregorj C, Ricciardi MR, Petrucci MT, Kornblau SM, Tafuri A, Andreeff M. Beyond single pathway inhibition: MEK inhibitors as a platform for the development of pharmacological combinations with synergistic anti-leukemic effects. *Curr Pharm Des*. 11: 2779-2795, 2005.

Milenkovic D, Müller J, Stojanovski D, Pfanner N, Chacinska A. Diverse mechanisms and machineries for import of mitochondrial precursors. *Biol Chem*. 388: 891-897, 2007.

Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213: 137-139, 1967.

---

Mor A, Philips MR. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol.* 24: 771-800, 2006.

Na HK, Surh YJ. Transcriptional regulation via cysteine thiol modification: a novel molecular strategy for chemoprevention and cytoprotection. *Mol Carcinog.* 45: 368-380, 2006.

Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* 15: 351-369, 1997.

Nakopoulou L, Mylona E, Rafailidis P, Alexandrou P, Giannopoulou I, Keramopoulos A. Effect of different ERK2 protein localizations on prognosis of patients with invasive breast carcinoma. *APMIS.* 113: 693-701, 2005.

Nardai G, Sass B, Eber J, Orosz G, Csermely P. Reactive cysteines of the 90-kDa heat shock protein, Hsp90. *Arch Biochem Biophys.* 384: 59-67, 2000.

Nass S, Nass MM. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J Cell Biol.* 19: 613-629, 1963.

Nebigil CG, Etienne N, Messaddeq N, Maroteaux L. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT<sub>2B</sub> receptor signaling. *FASEB J.* 17: 1373-1375, 2003.

Neupert W. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 66: 863-917, 1997.

Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 76: 723-749, 2007.

Nogueira V, Park Y, Chen CC, Xu PZ, Chen ML, Tonic I, Unterman T, Hay N. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell.* 14: 458-470, 2008.

---

Nonn L, Williams RR, Erickson RP, Powis G. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol.* 23: 916-922, 2003.

Ohori K, Miura T, Tanno M, Miki T, Sato T, Ishikawa S, Horio Y, Shimamoto K. Ser9-phosphorylation of mitochondrial GSK-3{beta} is a primary mechanism of cardiomyocyte protection by erythropoietin against oxidant-induced apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295: H2079-2086, 2008.

Paget MS, Buttner MJ. Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet.* 37: 91-121, 2003.

Palade GE. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec.* 114: 427-451, 1952.

Park MT, Choi JA, Kim MJ, Um HD, Bae S, Kang CM, Cho CK, Kang S, Chung HY, Lee YS, Lee SJ. Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells. *J Biol Chem.* 278: 50624-50634, 2003.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22: 153-183, (2001).

Petit E, Oliver L, Vallette FM. The mitochondrial outer membrane protein import machinery: a new player in apoptosis? *Front Biosci.* 14: 3563-3570, 2009.

Pfanner N, Geissler A. Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 339-349, 2001.

---

Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* 328: 85-92, 1996.

Poderoso JJ, Peralta JG, Lisdero CL, Carreras MC, Radisic, M, Schöpfer F, Cadenas E, Boveris A. Nitric oxide regulates oxygen uptake and promotes hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am J Physiol (Cell Physiol).* 43: C112-C119, 1998.

Poderoso JJ, Lisdero C, Schöpfer F, Riobó N, Carreras MC, Cadenas E, Boveris A. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem.* 274: 37709-37716, 1999.

Pouyssegur J, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem.* 270: 3291-3299, 2003.

Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 268: L699-L722, 1995.

Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 275: 10761-10766, 2000.

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 266: 22028-22034, 1991.

Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25: 502-508, 2000.

Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE.* 2000: PE1, 2000.

---

Rhee SG. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 312: 1882-1883, 2006.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68: 320-344, 2004.

Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R. Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem*. 274: 30349-30352, 1999.

Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol*. 14: 255-274, 1967.

Saji M, Vasko V, Kada F, Allbritton EH, Burman KD, Ringel MD. Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 332: 167-173, 2005.

Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng MH, Yue W. The role of mitogenactivated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 80: 239-256, 2002.

Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. 283: 1488-1493, 1999.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 18: 1098-1101, 2005.

Schägger H. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life*. 52: 119-282, 2001.

Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 760-768, 2001.

Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol*. 22: 6247-6260, 2002.

---

Schleyer M, Schmidt B, Neupert W. Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur J Biochem.* 125: 109-116, 1982.

Schroeter H, Boyd CS, Ahmed R, Spencer JP, Duncan RF, Rice-Evans C, Cadenas E. c-Jun N-terminal kinase (JNK)- mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochem J.* 372: 359-369, 2003.

Schuler F, Yano T, Di Bernardo S, Yagi T, Yankovskaya V, Singer TP, Casida JE. NADH-Quinone Oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 4149-4153, 1999.

Scott RA. Functional significance of cytochrome c oxidase structure. *Structure.* 3: 981-986, 1995.

Seth D, Rudolph J. Redox regulation of MAP kinase phosphatase 3. *Biochemistry.* 45: 8476-8487, 2006.

Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 441: 424-430, 2006.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360: 1-16, 2001.

Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 10: 94-99, 2000.

Shutt TE, Gray MW. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet.* 22: 90-95, 2006.

- 
- Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol.* 275: C1640-C1652, 1998.
- Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 264: 29-41, 2001.
- Sirrenberg C, Bauer MF, Guiard B, Neupert W, Brunner M. Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, 384: 582-585, 1996.
- Sjöstrand F. The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope. *Int Rev Cytol.* 5: 455-533, 1956.
- Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci.* 26, 23-29, 2001.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 12, 2245-2256, 2001.
- Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson J. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem.* 272: 2936-2941, 1997.
- Staal SP, Hartley JW, Rowe WP. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 3065-307, 1977.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 95: 29-39, 1998.

---

Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* 88: 1341-1378, 2008.

Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J., Su D, Bartlam M, Rao Z. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell.* 121: 1043-1057, 2005.

Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tschlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol.* 159: 431-437, 2001.

Sun X, Wu F, Datta R, Kharbanda S, Kufe D. Interaction between protein kinase C delta and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem.* 275: 7470-7473, 2000.

Sun XZ, Vinci C, Makmura L, Han S, Tran D, Nguyen J, Hamann M, Grazziani S, Sheppard S, Gutova M, Zhou F, Thomas J, Momand J. Formation of disulfide bond in p53 correlates with inhibition of DNA binding and tetramerization. *Antioxid Redox Signal.* 5: 655-665, 2003.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.* 270: 296-299, 1995.

Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev.* 54: 101-127, 2002.

Tan X, Egami H, Ishikawa S, Kurizaki T, Tamori Y, Takai E, Hirota M, Ogawa M. Relationship between the expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and the dissociation of pancreatic cancer cells: Involvement of ERK1/2 in the dissociation status of cancer cells. *Int J Oncol.* 24: 815-820, 2004.

---

Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol.* 2: 110-116, 2000.

Tanoue T, Maeda R, Adachi M, Nishida E. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J.* 20: 466-479, 2001.

Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.* 15: 455-462, 2003.

Teng KK, Esposito DK, Schwartz GD, Lander HM, Hempstead BL. Activation of c-Ha-Ras by nitric oxide modulates survival responsiveness in neuronal PC12 cells. *J Biol Chem.* 274: 37315-37320, 1999.

Terziyska N, Lutz T, Kozany C, Mokranjac D, Mesecke N, Neupert W, Herrmann M, Hell K. Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett.* 579: 179-184, 2005.

Thant AA, Nawa A, Kikkawa F, Ichigotani Y, Zhang Y, Sein TT, Amin AR, Hamaguchi M. Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 18: 423-428, 2000.

Thelander L. Thioredoxin reductase: characterization of a homogenous preparation from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem.* 242: 52-5, 1967.

Thompson FH, Nelson MA, Trent JM, Guan XY, Liu Y, Yang JM, Emerson J, Adair L, Wymer J, Balfour C, Massey K, Weinstein R, Alberts DS, Taetle R. Amplification of 19q13.1-q13.2 sequences in ovarian cancer. G-band, FISH, and molecular studies. *Cancer Genet Cytogenet.* 87: 55-62, 1996.

---

Toker A, Newton AC. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell*. 103: 185-188, 2000.

Toral-Barza L, Zhang WG, Huang X, McDonald LA, Salaski EJ, Barbieri LR, Ding WD, Krishnamurthy G, Hu YB, Lucas J, Bernan VS, Cai P, Levin JI, Mansour TS, Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. Discovery of lactoquinomycin and related pyranonaphthoquinones as potent and allosteric inhibitors of AKT/PKB: mechanistic involvement of AKT catalytic activation loop cysteines. *Mol Cancer Ther*. 6: 3028-3038, 2007.

Trumpower BL. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *J Biol Chem*. 265: 11409-11412, 1990.

Truscott KN, Kovermann P, Geissler A, Merlin A, Meijer M, Driessen AJ, Rassow J, Pfanner N, Wagner R. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*. 8: 1074-1082, 2001.

Truscott KN, Wiedemann N, Rehling P, Muller H, Meisinger C, Pfanner N, Guiard B. Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex. *Mol Cell Biol*. 22: 7780-7789, 2002.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 552: 335-344, 2003.

Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Burgering BM, Coffer PJ, Komuro I, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T. Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J Biol Chem*. 273: 5315-5322, 1998.

---

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griending KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 274: 22699-22704, 1999.

Yaffe MP. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science.* 283: 1493-1497, 1999.

Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, Rhee SG. 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, 2002.

Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC. Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 275: 11706-11712, 2000.

Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell.* 112: 41-50, 2003.

Yu W, Sanders BG, Kline K. RRR- $\alpha$ -tocopheryl succinate induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res.* 63: 2483-2491, 2003.

Van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature.* 423: 773-777, 2003.

Villalta JI, Galli S, Iacarusio MF, Jares-Erijman EA, Pietrasanta LI. What pixels do and do not tell about colocalization: chasing kinases in mitochondria. Manuscript in preparation.

Walker JE. The NADH-ubiquinone reductase (complex I) of the respiratory chain. *Q Rev Biophys.* 25: 253-324, 1992.

- 
- Wallace DC. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem.* 76: 781-821, 2007.
- Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40: 353-388, 2000.
- Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell.* 87: 629-638, 1996.
- Wang Y, Zhang B, Peng X, Perpetua M, Harbrecht BG. Bcl-x<sub>L</sub> prevents staurosporine-induced hepatocyte apoptosis by restoring protein kinase B/mitogen-activated protein kinase activity and mitochondria integrity. *J Cell Physiol.* 215: 676-683, 2008.
- Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem.* 248: 3582-3592, 1973.
- Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 875-885, 2004.
- Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N. The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem.* 279: 14473-14476, 2004.
- Wiltshire C, Matsushita M, Tsukada S, Gillespie DA, May GH. A new c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein, Sab (SH3BP5), associates with mitochondria. *Biochem J.* 367: 577-585, 2002.
- Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, Rhee SG. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300: 653-656, 2003.

Wu Y, Sha B. Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocator member Tom70p. *Nat Struct Mol Biol.* 13: 589-593, 2006.

Yang ZZ, Tschopp O, Hemmings-Mieszczak M, Feng J, Brodbeck D, Perentes E, Hemmings BA. Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem.* 278: 32124-32131, 2003.

Yung HW, Wyttenbach A, Tolkovsky AM. Aggravation of necrotic death of glucose-deprived cells by the MEK1 inhibitors U0126 and PD184161 through depletion of ATP. *Biochem Pharmacol.* 68: 351-360, 2004.

Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 36: 449-451, 2004.