

Universitat de Lleida.

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques.

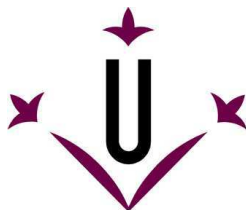
**Mecanismes de resposta adaptativa
davant estrès oxidatiu mediat per
Grx3 i Grx4 en *Saccharomyces cerevisiae*:
regulació de l'homeòstasi del ferro i
de la via d'integritat cel.lular.**

Memòria de Tesi Doctoral presentada per:

Núria Pujol Carrión

per accedir al Grau de Doctor.

Lleida, 30 de Novembre del 2009.



Universitat de Lleida.

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques.

M^a ANGELES DE LA TORRE RUIZ, Professora Agregada de Microbiologia
i Parasitologia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida,

CERTIFICA:

que **NÚRIA PUJOL CARRIÓN** ha realitzat en el Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina de Lleida, sota la
direcció de la Dra. M^a Angeles de la Torre Ruiz, el treball que
presenta per accedir al Grau de Doctor sota el títol:

**“Mecanismes de resposta adaptativa davant estrès oxidatiu mediats
per Grx3 i Grx4: regulació de l’homeòstasi del ferro
i de la via d’integritat cel.lular”**

Per a que així consti, signo el present certificat:

Lleida, 5 de Novembre del 2009

M^a Angeles de la Torre Ruiz

*De vegades treballem tota una vida
per avançar només un pocs metres,
però així van créixer les grans muntanyes...
avançant metre a metre, segle a segle.*



*Everest, 8.844m.
la muntanya més alta de la Terra*



*Dedico la meva Tesi Doctoral
a totes les persones
que m'estimen...*





Agraïments

Encara no hem puc creure que per fi estigui escrivint els Agraïments de la meva Tesi!!. Encara m'enrecordo del primer dia que vaig entrar al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques preguntant per fer les pràctiques en empresa de la meva carrera...i ja han passat 6 anys!!

Aquesta Tesi la dedico especialment a la M^a Angeles de la Torre, la meva directora de Tesi desde el primer dia fins a l'últim.

Gràcies per fer possible aquest projecte que vam començar juntes. Admiro la teva empenta i la teva lluita per les coses que valen la pena. Hores i hores de treball i discussió en comú per treure el màxim profit de tot. Aprecio moltíssim tota la teva ajuda i la confiança que sempre has dipositat en mi, al explicar-me tantes coses i en dir-me la teva opinió. I el més important, quan els experiments no funcionaven i els resultats no sortien, quan semblava que no arribavem en lloc, sempre más donat ànims i has estat amb mi per tirar endavant i solucionar els problemas. Per això, aquesta Tesi també es teva i espero que mai perdem aquesta confiança que hem anat contruint durant tots aquests anys.

Als meus pares, la Cati i el Juan.

A la meva mare, perquè sempre ha procurat que mai hem faltés de res perquè jo pogués començar i acabar els meus estudis. Mai m'ha faltat la teva ajuda i la teva companyia i sé que estaràs d'acord amb les decisions que prengui en un futur.

Al meu pare... Encara hi ha gent que hem diu: “no sé si t'hagués deixat marxar a Barcelona per estudiar... et volia molt, et volia sempre al seu costat, a la seva Nurieta...”. M'enrecordo molt d'ell, i sí...si hem vegués ara, segur que estaria molt content i aniria explicant a tothom que ja tinc el Doctorat!

Els dos sempre han estat amb al meu costat i per mi, això es el més important.

Als meus germans, l'Ani i el Juan José. Per ells, jo soc “la estudianta de la Família”. Al Miquel i a la Marta i als meus nevots, la Marina, la Miriam, el David i el petit Juan Ramón. M'encanta quan ens reunim tota la Família en dinars i berenars de festes i compleanys i quan anem tots junts a fer coses. Vosaltres meu ajuda't a “desconnectar” dels problemes de la feina i a estar més tranquil·la en els mals moments.

Estic molt a gust amb tots vosaltres i espero poguer disfrutar sempre de la vostra companyia

A la Dolors, la Jara, la Natàlia i la Glòria, les meves amigues de sempre. M'agrada molt quan ens reunim i m'expliqueu amb tota confiança les vostres alegries i els vostres problemes sense amagar-vos. La veritat es que m'encanta quan hem dieu "tu explico a tu, perque sé no ho contaràs a ningú..." Això hem dona la seguretat per saber que estareu amb mi i m'ajudareu sempre que ho necessiti.

A la Elisenda i la Pilar, les meves millors amigues de la carrera.

Amb elles vaig passar una època inolvidable de la meva vida. Vam compartir moltes coses i la veritat es que encara anyoro les vegades que sortiem de Festa i feiem tantes coses juntes!!... Per mi és important saber de les vostres vides, perque amb vosaltres vaig iniciar el camí que m'ha portat fins aquí. M'alegra molt veure que els anys passen, però encara mantenim el contacte i espero que mai perdem aquesta amistat que tan aviat vam contruir!!

A la Mima, la Laia i al Hugo. Per les llargues converses que hem tingut i per animar-me a continuar endavant. Gràcies per confiar en mi quan teniu problemes. Per aquests sopars i beures que he compartit amb vosaltres i que tant bé ens han anat per desconectar i riure'ns una mica "de la vida del becari". Espero estar aprop quan llegiu les vostres Tesi i poguer disfrutar amb vosaltres de la recompensa per l'esforç que implica aquest treball...com tantes vegades hem parlat!!

A la Carme, perque amb les seves explicacions de la vida m'ha fet adonar de moltes coses. Encara que no ho sàpigues, m'has ajudat a sentir-me millor en els moments tristos.... Per ensenya'm a afrontar els problemas desde una altra perspectiva i per la tranquil·litat que sempre hem transmets en cada classe que dones.

També enviar-li molts petonets a la Meissy, la meva gossa. Hem estat juntes 18 anys!! més de mitja vida amb ella!! Per fer-me tanta companyia i pels llargs passejos que donavem, que tant bé m'anavem per descansar de la feina i de tot...

I per últim i no menys important s'ens dupte, pel Ricard del meu cor. Gràcies per ser tan bona persona. Per tots els caps de setmana que tenia feina al laboratori, tu

mai et vas enfadar. Al contrari...”tu, Núria, fes el que haguis de fer ...que la feina és el primer”. No sé com tu fas, però sempre estàs content!!. Per això m’agradaria, que passi el que passi, sempre estiguis al meu costat per compartir tot allò que és important per mi.

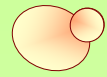
Durant aquests anys de Tesi, me preguntat més d’una vegada si valia la pena tant esforç... ara, després del que està a punt de venir, sé que SÍ.

Per això dedico la meva Tesi Doctoral
a totes les persones que m’estimen...

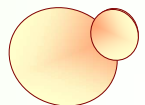
Per això dedico la meva Tesi Doctoral....

A TOTS VOSALTRES.





INDEX

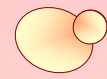


1 - RESUM	1
2 - INTRODUCCIÓ GENERAL	7
2.1- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: UN LLEVAT COM A MODEL BIOLÒGIC	9
2.2- ESTRÈS OXIDATIU	11
2.2.1- QUÈ ÉS L'ESTRÈS OXIDATIU?.....	11
2.2.2- ELS RADICALS LLIURES.....	12
2.2.3- ORIGEN DELS RADICALS LLIURES I EFECTES BIOLÒGICS SOBRE LES MACROMOLÈCULES CEL·LULARS.....	13
2.3- MECANISMES DE DEFENSA CONTRA ESTRÈS OXIDATIU EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.3.1- GENERALITATS DE LES GLUTAREDOXINES I LES TIOREDOXINES	18
2.3.1.1- TIOREDOXINES.....	19
2.3.1.2- GLUTAREDOXINES.....	19
2.3.1.2.1- GLUTAREDOXINES DITIÒLIQUES.....	20
2.3.1.2.2- GLUTAREDOXINES MONOTIÒLIQUES.....	21
2.3.2- RELACIÓ FUNCIONAL ENTRE TIOREDOXINES I GLUTAREDOXINES	23
2.3.3- DOMINIS ESTRUCTURALS DE LES GLUTAREDOXINES MONOTIÒLIQUES <i>GRX3</i> I <i>GRX4</i>	24
2.3.3.1- DOMINI <i>GRX</i> DE LES GLUTAREDOXINES <i>GRX3</i> I <i>GRX4</i>	24
2.3.3.2- DOMINI <i>TRX</i> DE LES GLUTAREDOXINES <i>GRX3</i> I <i>GRX4</i>	25
2.3.4- GLUTAREDOXINES MONOTIÒLIQUES EN CÈL·LULES SUPERIORS: HOMOLOGIA ENTRE <i>GRX3</i>, <i>GRX4</i> I PICOT HUMANA	26
2.3.4.1- DOMINI <i>GRX</i> DE LA GLUTAREDOXINA MONOTIÒLICA HUMANA PICOT.....	28
2.3.4.2- DOMINI <i>TRX</i> DE LA GLUTAREDOXINA MONOTIÒLICA HUMANA PICOT.....	28
2.3.5- RELACIÓ FUNCIONAL ENTRE PROTEÏNES OXIDOREDUCTORES I PROTEÏNES QUINASA INTEGRANTS DE VIES D'INTEGRITAT CEL·LULAR EN CÈL·LULES SUPERIORS	29

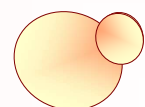
3-CAPÍTOL 1	31
3.1-INTRODUCCIÓ	35
3.1.1- HOMEÒSTASI DEL FERRO EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
3.1.2- ASSIMILACIÓ DEL FERRO PER <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
3.1.2.1- SISTEMA DE BAIXA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO	39
3.1.2.1.1- REGULACIÓ DE L'ASSIMILACIÓ I EL TRANSPORT DE FERRO EN EL SISTEMA DE BAIXA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO.....	39
3.1.2.2- SISTEMA D'ALTA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO	39
3.1.2.2.1- COMPONENTS DEL SISTEMA D'ALTA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO.....	40
3.1.2.2.1.1- METALLOREDUCTASES: <i>FRE1</i> I <i>FRE2</i>	40
3.1.2.2.1.2- COMPLEX TRANSPORTADOR: <i>FET3</i> I <i>FTR1</i>	41
3.1.3- REGULACIÓ DE L'ASSIMILACIÓ I EL TRANSPORT DE FERRO EN EL SISTEMA D'ALTA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO	41
3.1.3.1- <i>AFT1</i>	42
3.1.3.1.1- DESCRIPCIÓ MOLECULAR.....	42
3.1.3.1.2- ACTIVITAT COM A FACTOR TRANSCRIPCIONAL.....	43
3.1.3.1.3- LOCALITZACIÓ CEL·LULAR D' <i>AFT1</i>	44
3.1.3.1.3.1- IMPORTACIÓ NUCLEAR D' <i>AFT1</i>	45
3.1.3.1.3.2- EXPORTACIÓ A CITOPLASMA D' <i>AFT1</i>	46
3.1.3.2- <i>AFT2</i>	48
3.1.3.2.1- DESCRIPCIÓ MOLECULAR.....	49
3.1.3.2.2- ACTIVITAT COM A FACTOR TRANSCRIPCIONAL.....	50
3.1.3.3- SEQÜÈNCIA CONCENS EN ELS PROMOTORS	51
3.1.3.4- DIFERÈNCIES EN LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DELS GENS SOTA CONTROL DELS FACTORS TRANSCRIPCIONALS <i>AFT1</i> I <i>AFT2</i>	52
3.2-ANTECEDENTS I OBJECTIUS	55
3.2.1- ANTECEDENTS.....	57
3.2.2- OBJECTIUS.....	58
3.3-ARTICLE 1	59
3.4-CONCLUSIONS	75

4-CAPÍTOL 2.....	79
4.1-INTRODUCCIÓ.....	83
4.1.1- LA PARET CEL·LULAR DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: COMPONENTS I FUNCIONS.....	85
4.1.2- LA VIA D'INTEGRITAT CEL·LULAR O VIA <i>PKC1</i>-MAP QUINASA.....	87
4.1.3- COMPONENTS DE LA VIA D'INTEGRITAT CEL·LULAR EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	87
4.1.3.1- ELS SENSORS DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR: <i>WSC1-WSC4</i> , <i>MID2</i> I <i>MTL1</i>	88
4.1.3.2- ELS INTERCANVIADORS GEF: <i>ROM2</i>	90
4.1.3.3- LA PROTEÏNA G <i>RHO1</i>	90
4.1.3.4- LA PROTEÏNA QUINASA C: <i>PKC1</i>	91
4.1.3.5- EL MÒDUL MAP QUINASA: <i>BCK1</i> , <i>MKK1/MKK2</i> , <i>SLT2</i>	91
4.1.3.5.1- DIANES D'ACCIÓ DE LA MAP QUINASA <i>SLT2</i>	93
4.1.4- PROTEÏNES REGULADORES DE LA VIA DE INTEGRITAT CEL·LULAR.....	95
4.1.5- FUNCIONS GENERALS DE LA VIA D'INTEGRITAT CEL·LULAR.....	98
4.1.5.1- RESPOSTA A L'ESTRÈS CAUSAT PER AGENTS QUE DANYEN LA PARET CEL·LULAR.....	98
4.1.5.2- DESPOLARITZACIÓ DEL CITOESQUELET D'ACTINA EN RESPOSTA A ESTRÈS SOBRE L'ENVOLTA CEL·LULAR.....	99
4.1.5.3- RESPOSTA A ESTRÈS TÈRMIC.....	101
4.1.5.4- RESPOSTA AL ESTRÈS OXIDATIU.....	101
4.1.5.5- RESPOSTA A ESTRÈS HIPOOSMÒTIC.....	102
4.1.5.6- RESPOSTA A CANVIS EN EL pH DEL MEDI.....	102
4.1.5.7- REGULACIÓ DELS PROCESSOS DE SECRECIÓ I D'EXOCITOSI.....	103
4.1.5.8- RESPOSTA A DÈFICIT DE NUTRIENTS.....	104
4.1.5.9- RESPOSTA A FEROMONES.....	104
4.2-ANTECEDENTS I OBJECTIUS.....	107
4.2.1- ANTECEDENTS.....	109
4.2.2- OBJECTIUS.....	109
4.3-MATERIALS I MÈTODES.....	111
4.3.1-SOQUES DE LLEVAT I OBTENCIÓ DE MUTANTS.....	113
4.3.2-MANIPULACIÓ DEL DNA I PLÀSMIDS UTILITZATS.....	116
4.3.3-MEDIS DE CULTIU I CONDICIONS DE CREIXEMENT.....	119
4.3.4-MÈTODE D'OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTÈICS I ANÀLISI D'IMMUNODETECCIÓ PER WESTERN BLOT.....	120
4.3.5-CONDICIONS D'ÚS DELS ANTICOSSOS.....	120

4.3.6-MÈTODE D'OBTENCIÓ DE RNA TOTAL DE LLEVAT I ANÀLISI TRANSCRIPCIONAL PER NORTHERN BLOT.....	121
4.3.7-ASSAIG DE DOBLE HÍBRID.....	122
4.3.8-ASSAIG DE PULL-DOWN.....	122
4.3.9-TINCIÓ D'ACTINA AMB RODAMINA FALOIDÏNA.....	123
4.3.10-TINCIÓ DE LA MEMBRANA VACUOLAR AMB EL COLORANT FM4-64.....	123
4.3.11-ASSAIG D'INTERNALITZACIÓ DEL COLORANT LUCIFER YELLOW...	124
4.3.12-ASSAIG DE DETECCIÓ D'ANIÓ SUPERÒXID.....	124
4.3.13-MICROSCOPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ.....	125
4.4-RESULTATS.....	127
4.5-DISCUSSIÓ.....	231
4.6-CONCLUSIONS.....	251
5- ANNEX.....	255
5.1-INTRODUCCIÓ.....	257
5.2-ANTECEDENTS I OBJECTIUS.....	257
5.2.1-ANTECEDENTS.....	257
5.2.2-OBJECTIUS.....	258
5.3-CONCLUSIONS.....	258
5.4-ARTICLE 2.....	259
6-BIBLIOGRAFIA.....	B-1



1- RESUM



RESUM

El llevat *S.cerevisiae* és un dels models eucariotes més adequats per l'estudi dels diversos mecanismes implicats en la supervivència cel.lular en resposta a estrès oxidatiu. Les espècies reactives d'oxigen (ROS) com els radicals hidroxil, l'anió superòxid o el peròxid d'hidrogen generen estrès oxidatiu, causant important danys intracel.lulars davant els quals la cèl.lula a desenvolupat una sèrie de mecanisme per fer-hi front.

Grx3 i Grx4 són dues glutaredoxines monotioliques de *S.cerevisiae* que formen part dels sistemes enzimàtics que regulen l'estat redox de les proteïnes en resposta a estrès oxidatiu. No obstant, fins ara es desconeixen els mecanismes amb els quals Grx3 i Grx4 participen en la detoxificació d'aquestes ROS i en l'adaptació cel.lular en condicions oxidatives.

En el primer Capítol es caracteritza el paper funcional de Grx3 i Grx4 en la regulació de l'homeòstasi del ferro intracel.lular mitjançant la regulació del factor transcripcional Aft1, encarregat de regular la transcripció de gens que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro. A més a més, es caracteritza el paper funcional dels dominis glutaredoxina (*GRX*) de Grx3 i Grx4 en l'exportació nuclear d'Aft1, com a mecanisme regulador de l'estrès oxidatiu generat per un augment en els nivells de ferro intracel.lulars.

En el segon Capítol hem aconseguit donar una funció específica per Grx3 i Grx4 en la regulació de la via d'integritat cel.lular o la via *PKC1*- MAP quinasa en resposta a estrès oxidatiu. A més a més, demostrem que són els dominis tioredoxina (*TRX*) de Grx3 i Grx4 qui dessarrollen el paper protagonista en l'activació de la quinasa Slt2 en resposta a estrès oxidatiu i en la repolarització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu. També demostrem que Grx3, Grx4 i Slt2 estan relacionades genètica i funcionalment amb els processos implicats en l'organització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu i en la biogènesi vacuolar en condicions normals.

RESUMEM

La levadura *S.cerevisiae* es uno de los modelos eucariotas más adecuados para el estudio de los diferentes mecanismos implicados en la supervivencia celular en respuesta a estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) como los radicales hidroxilo, el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno generan estrés oxidativo, induciendo importantes daños intracelulares frente a los cuales la célula tiene que desarrollar una serie de mecanismos para hacerles frente.

Grx3 i Grx4 son dos glutaredoxinas monotiólicas de *S.cerevisiae* que forman parte de los sistemas enzimáticos que regulan el estado redox de las proteínas en respuesta a estrés oxidativo. No obstante, hasta hoy se desconocen los mecanismos mediante los cuales Grx3 i Grx4 participan en la detoxificación de estos ROS y en la adaptación celular frente a condiciones oxidativas.

En el primer Capítulo se caracteriza el papel funcional para Grx3 y Grx4 en la regulación de la homeóstasis del hierro intracelular mediante el factor transcripcional Aft1, el cual se encarga de regular la transcripción de genes que forman parte del sistema de alta afinidad de captación de hierro. Además, se caracteriza el papel funcional de los dominios *GRX* de Grx3 y Grx4 en la exportación nuclear de Aft1, como mecanismo regulador del estrés oxidativo generado por un aumento en los niveles de hierro intracelulares.

En el segundo Capítulo hemos logrado dar una función específica a Grx3 y Grx4 en la regulación de la vía de integridad celular o vía *PKCI*-MAP quinasa en respuesta a estrés oxidativo. Además, tras diseccionar los dominios glutaredoxina (*GRX*) y tioredoxina (*TRX*) de Grx3 y Grx4, hemos concluido que son los dominios *TRX* de ambas glutaredoxinas quienes poseen un papel protagonista en la activación de la quinasa Slt2 en respuesta a estrés oxidativo y en la reorganización del citoesqueleto de actina en condiciones normales y oxidantes. También se demuestra que Grx3, Grx4 y Slt2 están relacionados genética y funcionalmente en los procesos implicados en la organización del citoesqueleto d'actina en respuesta a estrés oxidativo y en la biogénesis vacuolar en condiciones normales.

SUMMARY

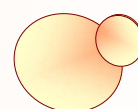
The yeast *S.cerevisiae* is one of the most suitable eukaryotic models to study several mechanisms involved in cell survival in the response to oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radicals, superoxide anions or hydrogen peroxide provoke oxidative stress and cause important cell damage. As a consequence of that, cells need to develop a series of mechanisms in order to repair their structures.

Grx3 and Grx4 are two monothiol glutaredoxins of *S.cerevisiae* potentially involved in enzymatic systems to regulate the redox state of proteins in front of oxidative stress. Nevertheless, actually is unknown the mechanisms where Grx3 and Grx4 participate in ROS detoxification and in the cellular adaptation to oxidative conditions.

In the first chapter, we characterize a functional role for both Grx3 and Grx4 in the maintenance of iron homeostasis through the regulation of Aft1, a transcription factor involved in the transcriptional regulation of a subset of genes which integrate the high affinity iron uptake system. In addition, we have characterized the functional role for both *GRX* domains of Grx3 and Grx4 in the nuclear export of Aft1 as a mechanism that regulates the oxidative stress generated by high levels of intracellular iron.

In the second chapter, it is characterized a specific function for Grx3 and Grx4 in the regulation of the cell integrity pathway or *PKC1*-MAP kinase pathway in response to oxidative stress. Moreover, we described the functional role for both *TRX* domains of Grx3 and Grx4 in the Slr2 activation in response to oxidative stress and in the reorganization of the actin cytoskeleton in normal and oxidant conditions. We also demonstrated the genetic and the functional relationship between Grx3, Grx4 and Slr2 in the mechanisms involved in the actin cytoskeleton organization in response to oxidative stress and in the vacuolar biogenesis in normal conditions.

2- INTRODUCCIÓ GENERAL



2.1- *Saccharomyces cerevisiae*: UN LLEVAT COM A MODEL BIOLÒGIC.

Saccharomyces espècie *cerevisiae* (llevat de la cervesa) és un dels llevats més coneguts i estudiats actualment. En 1897, els germans Hans i Edward Buchner van obtenir extractes lliures de cèl.lules molent llevat per a fer pa amb grans de sorra, sobre els quals van afegir grans quantitats de sucre de canya per evitar la possible contaminació. Sorprenentment van observar que el sucre es fermentava ràpidament. Per primera vegada s'havia descobert un model per a l'estudi de la fermentació alcohòlica.

Saccharomyces cerevisiae és un fong unicel.lular que presenta la capacitat de créixer de forma anaeròbica en un medi ric en sucres (com la D-glucosa) realitzant la fermentació alcohòlica, procés on es genera diòxid de carboni i etanol. Per aquesta raó s'utilitza en molts processos de fermentació industrial de manera semblant al llevat químic. Per exemple en la producció de cervesa, vi, hidromel, pa, producció d'antibiòtics, etc... No obstant, en condicions d'escassetat de nutrients, el llevat és capaç d'utilitzar altres rutes metabòliques que li permeten obtenir un major rendiment energètic i per tant no realitzar el procés fermentatiu.

Aquesta cèl.lula eucariota es divideix per gemmació i a diferència d'altres microorganismes, presenta dues fases biològiques estables: haploide (reproducció asexual) i diploide (reproducció sexual). Un llevat haploide conté 16 cromosomes variant el seu tamany d'entre 200 i 2200 Kb. Ambdues fases permeten generar, aïllar i caracteritzar mutants amb gran facilitat, així com realitzar estudis de complementació.

Desde el punt de vista científic, *Saccharomyces cerevisiae* és un dels models més adequats per a l'estudi de problemes biològics gràcies a les seves amplies avantatges:

-És un **sistema unicel.lular eucariota**, amb una complexitat lleugerament superior a la del bacteri però compartint amb ell moltes de les seves avantatges tècniques. A més a més, és un excel.lent model per a l'estudi de les vies de senyalització en resposta a estrès donat la gran conservació evolutiva que mantenen aquests mecanismes entre les diverses cèl.lules eucariotes.

-Presenta una **taxa de creixement ràpida**, que permet obtenir amb facilitat grans quantitat d'aquest microorganisme.

-Posseeix un **cicle de vida** sexual i asexual. Aquest fet permet que *S.cerevisiae* sigui un model idoni per realitzar estudis genètics. A més a més, *S. cerevisiae* és destacat pel seu

senzill i versàtil sistema de transformació de DNA i la seva facilitat en l'obtenció de mutants.

-D'altra banda, **l'absència de patogenicitat** permet la seva manipulació amb les mínimes precaucions i ofereix així una gran facilitat d'ús d'aquest fong en condicions de laboratori.

-Una altra avantatge addicional de gran importància és el coneixement de la **seqüència completa del seu genoma** mantenint-se en constant revisió i accessible en <http://www.yeastgenome.org/>. Aquest fet ha permès la manipulació genètica dels gairebé 6600 gens que codifiquen el genoma de llevat, l'ús extensiu de micromatrius de DNA per investigar el transcriptoma i estudis a escala genòmica de la resposta cel.lular davant estrès oxidatiu, entre altres molts aspectes.

En al **Figura 1** es mostra la classificació científica i les imatges realitzades en el microscopi òptic i electrònic de transmissió del llevat *Saccharomyces cerevisiae* utilitzat durant tot aquest estudi.



Figura 1- Imatges en el microscopi òptic (A) i en el microscopi electrònic de transmissió (B) del llevat de gemmació *Sacchromyces cerevisiae*.

2.2- ESTRÈS OXIDATIU.

2.2.1- QUÈ ÉS L'ESTRÈS OXIDATIU?.

La supervivència de les cèl·lules depèn de la seva capacitat per detectar alteracions en el medi i respondre davant d'elles. Canvis físics i químics del medi poden provocar efectes negatius en la cèl·lula. Per aquest motiu, la supervivència d'aquesta cel·lular exigeix una resposta ràpida als esmenats canvis.

L'oxigen (O₂) es conegut per ser un element essencial en el metabolisme aeròbic dels éssers vius, No obstant, un desequilibri en les concentracions intracel·lulars de dita molècula cap a un excés d'aquesta, podrien resultar perjudicials per a la cèl·lula.

El desequilibri entre la producció d'oxigen reactiu en excés dins la cèl·lula i la capacitat d'un sistema biològic de detoxificar ràpidament els reactius intermitjos o reparar el dany generat per aquests, dona lloc a una alteració en la homeòstasi d'oxido-reducció intracel·lular, més conegut com **estrès oxidatiu**.

Davant aquest estrès, la cèl·lula respon amb multitud de processos cel·lulars que tenen com a objectiu controlar les concentracions intracel·lulars de les molècules derivades de l'oxigen que es generen, restablint l'equilibri redox intracel·lular òptim.

L'estrès oxidatiu és important desde el punt de vista biomèdic i biotecnològic desde que s'ha relacionat amb multitud de processos cel·lulars que desemboquen en nombroses malalties humanes com els processos neurodegeneratius (Alzheimer, Parkinson, esclerosi lateral amiotròfica i altres demències), els processos inflamatoris (artritis reumatoide), problemes cardiovasculars (distrofia muscular), així com en malalties autoimmunes i inflamatories cròniques, la diabetes, el càncer o els processos biològics d'envelliment (Auroma i Halliwell, 1998; Mc Cord *et al.*,2003).

Afortunadament els llevats, com *Saccharomyces cerevisiae*, a resultat ser un bon model d'organisme eucariota per l'estudi exhaustiu de l'estrès oxidatiu i de la resposta cel·lular davant aquest estrès. Actualment, *S.cerevisiae* ens segueix aportant una gran informació pel que fa als processos oxidatius que són de vital importància per entendre els mecanismes de defensa cel·lular davant estrès oxidatiu en eucariotes superiors.

2.2.2- ELS RADICALS LLIURES.

L'Oxigen és una molècula altament reactiva que pot ser reduïda parcialment per generar les anomenades **espècies reactives derivades de l'oxigen (ROS)** o més conegudes actualment com a **radicals lliures**.

El dany que els radicals lliures provoquin en les cèl.lules dependrà de l'equilibri entre les ROS i les defenses antioxidants de les quals disposin aquestes. L'estrès oxidatiu apareix quan es perd l'equilibri entre la producció de radicals lliures i la producció i/o acció dels antioxidants.

In vivo, la majoria de les ROS es produeixen com a conseqüència de la reducció incompleta del O₂ durant el metabolisme respiratori aeròbic realitzat a la membrana interna de la mitocondria, la qual és la principal font de radicals lliures derivats de l'oxigen dins la cèl.lula (Brand *et al.*, 2004). Substàncies químiques exògenes, com els compostos químics oxidants o agents físics externs com la radiació ionitzant o ultravioleta, també produeixen indirectament danys importants, generant estrès oxidatiu, fototoxicitat i fotosensibilitat (Zagarese *et al.*, 2001).

Les ROS representen els diversos estats d'oxidació de O₂:

- l'**anió superòxid (O₂⁻)**
- el **peròxid d'hidrògen (H₂O₂)**
- i el **radical hidroxil (OH[•])**, el qual és la ROS més reactiva de totes, generant ràpidament dany cel.lular.

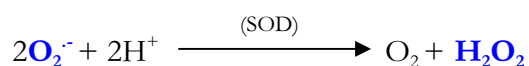
No obstant, altres ROS presents en la cèl.lula i generades com a conseqüència de les anteriors durant altres processos biològics són: l'oxigen singlet (O), generat en absència d'oxigen o bé en els sistemes fotosintètics (Briviba *et al.*, 1997), l'òxid nítric (NO) i el peròxid nítric (ONOO), precursors d'altres espècies oxidants que reben el nom d'espècies reactives del nitrogen, i l'àcid hipoclorós (HOCL) (Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.2.3- ORIGEN DELS RADICALS LLIURES I EFECTES BIOLÒGICS SOBRE LES MACROMOLÈCULES CEL·LULARS.

In vivo, la major part de l'anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$) que es genera en les cèl·lules prové de l'oxidació que sofreix la cadena de transport d'electrons de la mitocondria durant la respiració aeròbica mitocondrial (Imlay y Fridovich, 1991).

L'anió superòxid actua sobre enzims que contenen centres Fe/S en la seva estructura, fet que provoca la desestructuració d'aquests i com a conseqüència la pèrdua de funcionalitat en l'enzim (Flint, *et al.*, 1993).

A partir de l'anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$), la reacció catalitzada per la superòxid dismutasa (SOD) genera un altre ROS, el **peròxid d'hidrògen (H_2O_2)**:



Seguidament, el **peròxid d'hidrogen** que es genera a partir d'aquesta reacció, és descomposat per l'enzim catalasa en molècules d'aigua (H_2O) i oxigen (O_2).



Són diversos els efectes que produeix el peròxid d'hidrogen sobre les biomolècules:

- Inactivar alguns enzims, normalment per oxidació dels grups tiol de l'aminoàcid cisteïna, generant-se ponts disulfur intra i interprotèics (Grant *et al.*, 1998; Imlay *et al.*, 2003).
- Danyar les cadenes laterals dels aminoàcids i provocar la formació de grups carbonil (Stadtman y Levine, 2003).
- Oxidar directament enzims amb centres Fe/S, provocant la desestructuració i la pèrdua de la funcionalitat de la proteïna (Flint *et al.*, 1993).

No obstant, el peròxid d'hidrògen no és un radical lliure perquè no conté cap electró desaparellat, però pot travessar fàcilment la membrana i donar lloc al **radical hidroxil (OH^{\cdot})** a través de la reacció de Fenton. Per a que es dugui a terme aquesta reacció

és necessària la presència d'un metall com el ferro o el coure (Fe^{2+} o Cu^+) (Halliwell i Gutteridge, 1984).



El **radical hidroxil** generat en la reacció de Fenton, és altament tòxic per a les cèl.lules donat que pot danyar directament moltes biomolècules (Imlay, 2003).

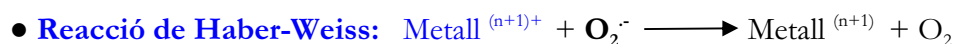
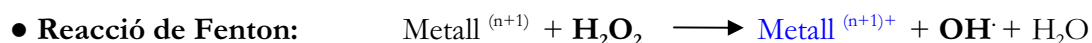
In vitro, principalment genera modificacions químiques que indueixen importants canvis en la carga de les proteïnes. Aquestes modificacions, combinades amb unions intra i intermoleculars, condueixen a una agregació entre proteïnes (Flint *et al.*, 1993).

A nivell d'aminoàcids, el radical hidroxil també actua hidroxilant fenilalanines, tirosines i arginines. A més a més, promou la formació de dímers de tirosina (Halliwell i Gutteridge, 1999).

A nivell lipídic, és capaç d'iniciar la reacció de peroxidació lipídica les cadenes poliinsaturades dels lípids presents en la membrana cel.lular. Aquest procés genera canvis en la estructura i la funció de la bicapa lipídica dels sistemes membranosos, provocant la pèrdua en la permeabilitat i l'integritat de dites membranes cel.lulars (Coyle y Puttfarcken, 1993).

D'altra banda, han estat descrites més de cinquanta modificacions en el DNA produïdes pel radical hidroxil: modificacions i delecions en les bases nitrogenades púriques i pirimidíniques, canvis en l'esquelet de carboni per la pèrdua de les molècules d'hidrògen, unions intramoleculars dins la mateixa hèlix de DNA i trencaments de les cadenes simples i dobles de DNA, entre altres (Cadet *et al.*, 1997; Girard i Boiteux, 1997).

Finalment, les formes oxidades de Fe^{3+} o Cu^{2+} generades en la reacció de Fenton poden reaccionar amb l'anió superòxid (O_2^-) a través de la reacció de Haber-Weiss. Aquesta reacció genera noves formes reduïdes dels metalls, els quals podran tornar a interaccionar amb el H_2O_2 via reacció de Fenton, generant altre cop radicals hidroxil ($\text{OH}\cdot$), començant doncs un nou cicle de reaccions:



En la **Figura 2** és mostra un esquema de la reactivitat de les ROS sobre les diverses macromolècules cel.lulars.

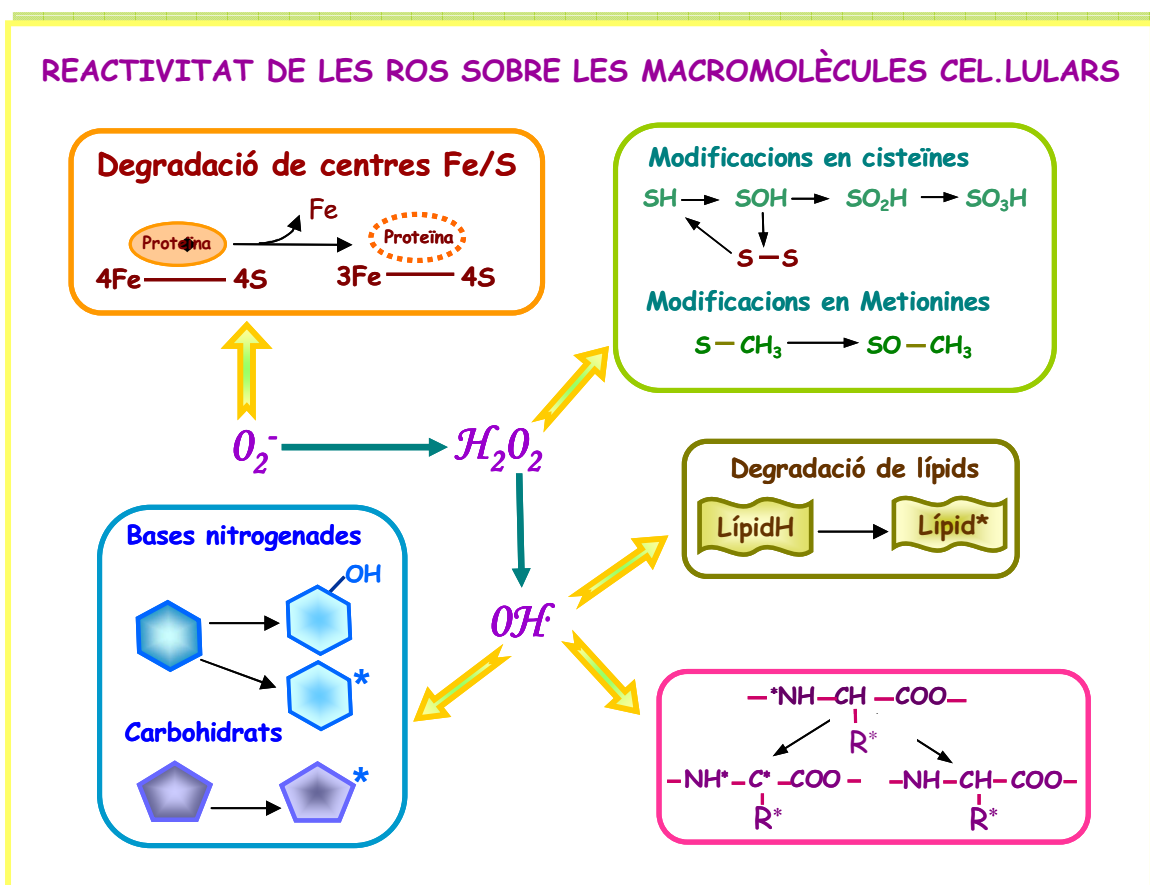


Figura 2- Esquema de la reactivitat de les ROS sobre diferents molècules biològiques. L'estrès oxidatiu pot provocar danys en tot tipus de biomolècules: sobre el DNA, les proteïnes i els lípids, essent el radical hidroxil l'agent que produeix major dany sobre aquestes macromolècules. En general els efectes nocius de les ROS actuen a diferents nivells depenent de la cèl.lula, les característiques de l'estrès i de l'intens que sigui aquest (Halliwell i Gutteridge, 1984; Auroma *et al.*, 2001) (Esquema adaptat de Toledano *et al.*, 2003).

En resum, tant el propi metabolisme cel.lular com les substàncies químiques externes alienes a la cèl.lula, són capaces de generar espècies reactives derivades de l'oxigen (ROS) que, en concentracions molt elevats dins la cèl.lula, arriben a ser tòxics ja que produeixen lesions irreversible, que pot desembocar a la mort cel.lular, si que aquestes lesions esdevenen molt amplies.

Les conseqüències d'aquest estrès oxidatiu són les importants alteracions produïdes en les proteïnes, els lípids i el DNA. En l'actualitat, aquestes alteracions s'han associat cada cop més a malalties humanes com són els processos inflamatoris, cardiovasculars o

neurodegeneratives, càncers, envelliment cel.lular i moltes altres malalties lligades al dany cel.lular causat per l'estrès oxidatiu.

Els organismes vius estan preparats per detectar i reparar tots els defectes tòxics que amenacin l'integritat cel.lular. En concret, *Saccharomyces cerevisiae* presenta uns mecanismes de defensa contra estrès oxidatiu molt amplis i de gran interès, els quals seran descrits a continuació. A més a més, l'estudi de tots aquests processos ens permetrà entendre molt millor com funcionen els mecanismes de defensa contra estrès oxidatiu presents en organismes superiors.

2.3- MECANISMES DE DEFENSA CONTRA ESTRÈS OXIDATIU EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Per palir els danys provocats durant l'estrès oxidatiu, *Saccharomyces cerevisiae* ha desenvolupat mecanismes de defensa enzimàtics i no enzimàtics per acabar mantenint un equilibri en l'estat redox dins la cèl.lula (Santoro i Thiele, 1997; Jamieson, 1998; Carmel-Harel i Storz, 2000).

En els **sistemes de defensa no enzimàtics** hi participen molècules que són capaços d'actuar davant l'estrès oxidatiu. En *S.cerevisiae*, són diversos els antioxidants no enzimàtics coneguts: metalotioneïnes, poliaminas, l'àcid eritroascòrbic, l'homeòstasi d'ions metàlics, els antioxidants solubles en lípids i el glutatió, entre altres.

Els **sistemes de defensa enzimàtics** es subdividiexen en dos grups:

- Els sistemes enzimàtics que detoxifiquen directament les ROS
- Els sistemes enzimàtics que regulen l'estat redox de les proteïnes.

Dins els **sistemes enzimàtics que detoxifiquen directament les ROS** tenim:

-L'enzim **Catalasa**. Aquest enzim protegeix les cèl.lules dels efectes nocius que pot generar el H_2O_2 , donat que s'encarrega de catalitzar la descomposició d'aquest en molècules d' aigua i oxigen (vegeu pàg.13). *S.cerevisiae* conté dues catalases: la Catalasa A (*atypical peroxisomal catalase*) codificada pel gen *CTA1* y la Catalasa T (*typical cytosolic catalase*), codificada per *CTT1* (Hartig i Rius, 1986).

-La **superòxid dismutasa**. Aquesta proteïna exerceixen un paper protector en contra les ROS al catalitzar la reacció química on dues molècules d'anió superòxid (O_2^-) donen lloc al peròxid d'hidrogen i l'aigua (vegeu pàg.13). Els organismes aeròbics catalitzen aquesta reacció en la matriu i en l'espai intermembranal de la mitocondria. *S.cerevisiae*, com altres cèl.lules eucariotes, presenta dues SODs intracel.lulars: la SOD dependent de cobre i zinc (CuZnSOD), codificada per gen *SOD1*, que també juga un paper important en la homeòstasi del cobre i la SOD dependent de magnesi (MnSOD), codificada pel gen *SOD2* (Culotta *et al.*, 1995).

Dins els **sistemes enzimàtics que regulen l'estat redox de les proteïnes** destacarem especialment les tioredoxines i les glutaredoxines.

El treball experimental descrit en aquesta memòria es centra en la caracterització funcional de les glutaredoxines Grx3 i Grx4 de *S.cerevisiae* en defensa contra estrès oxidatiu:

-En el primer capítol de la present Tesi doctoral, es detalla l'estudi del paper que desenvolupen les glutaredoxines Grx3 i Grx4 en el control de la homeòstasi del ferro a través de regular la localització subcel.lular del factor transcripcional Aft1 en resposta a estrès oxidatiu.

-En el segon capítol de la present Tesi doctoral es detalla l'estudi del paper que juguen les glutaredoxines Grx3 i Grx4 en la regulació de la via d'integritat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu.

Per aquest motiu, en el següent apartat s'aprofundirà primerament en les generalitats d'aquest dos tipus de sistemes enzimàtics detoxificadors per acabar parlant, amb més detall, de les glutaredoxines.

2.3.1- GENERALITATS DE LES GLUTAREDOXINES I LES TIOREDOXINES.

Les **glutaredoxines** i les **tioiredoxines** són enzims implicats en la resposta contra estrès oxidatiu, concretament en la regulació de l'estat redox de les proteïnes de la cèl.lula (Demple,1998; Rietsch i Beckwith, 1998).

Una de les moltes conseqüències de l'estrès oxidatiu és l'oxidació dels residus cisteïna de les proteïnes (Creighton, 1992). Les glutaredoxines i les tioiredoxines s'encarreguen de reduir aquests ponts disulfur restaurant així l'estructura i la funció protèica.

Glutaredoxines i tioiredoxines són estructuralment similars i contenen típicament dos residus cisteïna en el seu centre actiu, els quals han estat altament conservats al llarg de l'evolució. Les tioiredoxines presenten en el seu centre actiu la seqüència Trp-Cys-Gly-Pro-Cys, mentre que en les glutaredoxines la seqüència del seu centre actiu és Cys-Pro-Tyr-Cys. Malgrat que els seus centres catalítics són pràcticament iguals, cada enzim duu a terme la seva funció de manera diferent (Holmgren, 1990; Holmgren i Aslund, 1995).

Com s'observa en la **Figura 3**, es diferencien dos sistemes que utilitzen el NADPH, directa o indirectament, per a duu a terme la reducció del ponts disulfur de les proteïnes:

- el **Sistema Tioiredoxina**, que consta de la tioiredoxina reductasa i de la tioiredoxina. Aquest sistema utilitza el NADPH de manera directa.
- el **Sistema Glutaredoxina**, format per la glutatió reductasa, el glutatió i les glutaredoxines. Aquest sistema utilitza el NADPH de manera indirecta.

Ambdós sistemes es troben presents tant en bacteris com en llevats i en eucariotes superiors (Holmgren, 1990)

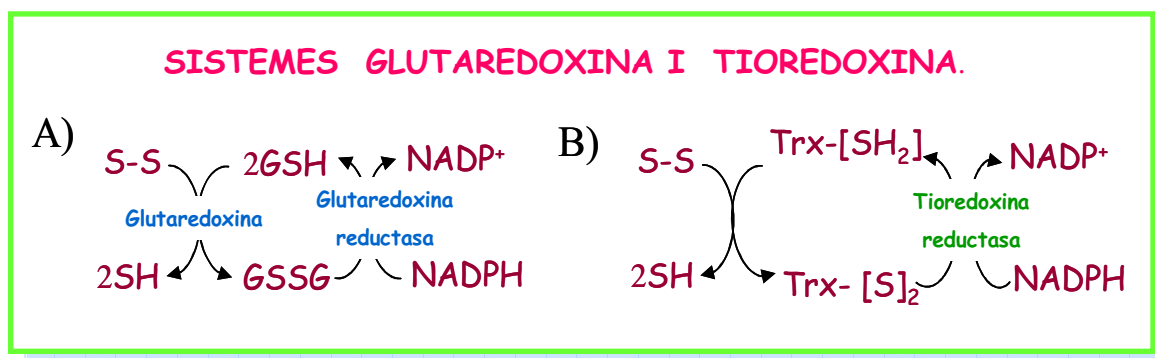


Figura 3- Sistemes glutaredoxina (A) i tioredoxina (B) en *Saccharomyces cerevisiae*. **A)** S-S: grups disulfur. SH: grups sulfhidril en les proteïnes. El sistema glutaredoxina està format per la proteïna glutaredoxina, el glutatió (GSH) i l'enzim glutaredoxina reductasa. **B)** En el sistema tioredoxina, l'enzim tioredoxina reductasa (TrxR) s'encarrega de transferir electrons procedents de la flavoenzima NADPH per reduir les dues cisteïnes presents en el centre actiu de les tioredoxines (Esquema adaptat de Holmgren, 1990).

2.3.1.1- TIOREDOXINES.

Les **tioredoxines (TRXs)** són tiol disulfid reductases dimèriques de petit tamany (entre 11 i 14 Daltons) que posseeixen dues cisteïnes en el seu centre actiu. La seqüència del centre actiu és Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (TCGPC) i es troba força conservat en les diferents espècies, desde els arqueobacteries fins als humans (Holmgren, 1985).

S.cerevisiae posseeix dos sistemes tioredoxina. Un **sistema citosòlic de tioredoxines** que conté dues isoformes **Trx1 i Trx2** (Gan, 1991; Muller, 1991) i una tioredoxina reductasa **Trr1** (Chae *et al.*,1994) i el **sistema tioredoxina mitocondrial** compost per l'enzim **Trx3** i la tioredoxina reductasa **Trr2** (Pedrajas *et al.*; 1999).

2.3.1.2- GLUTAREDOXINES.

Les **glutaredoxines (GRXs)** són tiol disulfid oxidoreductases d'entre 12-32 KDa que van ser caracteritzades inicialment en *E.coli* com a donadores d'hidrogen dependents de GSH per a la ribonucleòtid reductasa (Holmgren, 1976).

Es troben presents al llarg de la escala evolutiva desde procariotes fins a eucariotes i en tots el organismes que contenen Glutatió (GSH), a excepció de la arqueobacteria *Methanobacterium thermoautotrophicum*, la qual conté glutaredoxines però no GSH. (McFarlan *et al.*, 1992). Les glutaredoxines són capaces de reduir tan els ponts disulfur generats entre grups tiol de les proteïnes com els ponts disulfur mixtes entre grups tiol de les proteïnes i la molècula de GSH.

Com es mostra en la **Figura 4**, aquests enzims formen part del anomenat **sistema de glutaredoxines**, juntament amb el NADPH, el GSH i la glutatió reductasa.

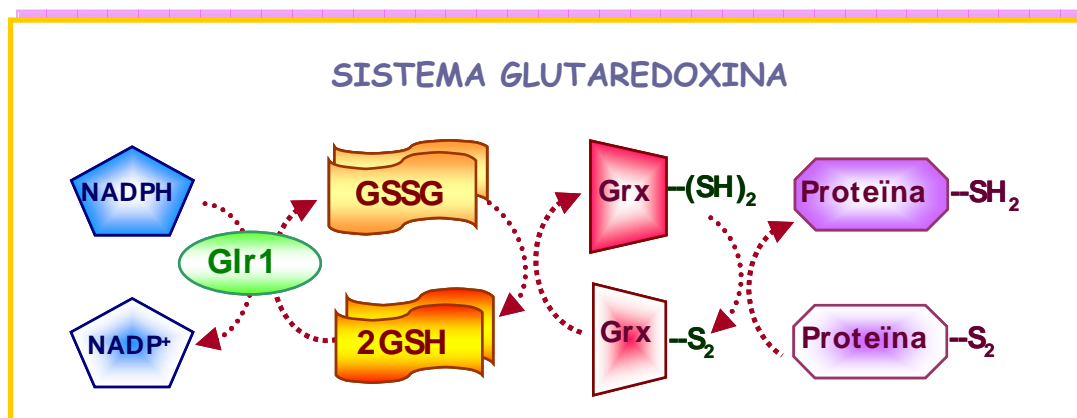


Figura 4- Sistema glutaredoxina en *S.cerevisiae*. En aquest sistema enzimàtic, en primer lloc els electrons es transfereixen desde el NADPH a la glutaredoxina (Grx) a través del GSH. Seguidament, la glutatió reductasa (Glr1) s'encarrega, de restablir el GSH en la seva forma oxidada. Tot aquest procés permet que la glutaredoxina pugui restablir l'estat reduït d'aquelles proteïnes que prèviament han estat oxidades (Esquema adaptat de Fernandes i Holmgren, 2004).

S.cerevisiae presenta dos tipus de glutaredoxines en funció de l'estructura del seu centre actiu, donant lloc a la subdivisió d'aquestes oxidoreductases en :

2.3.1.2.1- GLUTAREDOXINES DITIÒLIQUES.

Aquest grup de oxidoreductases també observades en bacteris, virus i eucariotes (Herrero i de la Torre, 2007) presenten el **mecanisme ditiòlic**. Aquest mecanisme permet la reducció dels ponts disulfur generats per l'efecte de l'oxidació a través del domini glutaredoxina. Aquest domini glutaredoxina està format per 4-5 fulles β flanquejades per 3 o més fulles α -hèlix (Martin,1995; Fernandes i Holmgren, 2004; Herrero i de la Torre, 2007).

Dins les glutaredoxines ditiòliques trobem **Grx1** i **Grx2**.

La seqüència dels centres actius és Cys-Pro-Tyr-Cys (**CPYC**) molt conservada entre les diverses espècies i on la presència de les dues cisteïnes dona lloc al nom de ditiòliques. Grx1 i Grx2 presenten localitzacions diferents dins la cèl.lula: Grx1 es localitza en el citosol (Luikenhuis *et al.*, 1997; Pedrajas *et al.*, 2002) i Grx2 es troba en citosol i en menor part en la mitocondria. (Porras *et al.*, 2006).

2.3.1.2.2- GLUTAREDOXINES MONOTIÒLIQUES.

Aquestes oxidoreductases presenten el **mecanisme monotiolic** (procés de desglutacionilació). Aquest mecanisme permet reduir els ponts disulfur formats entre el GSH (glutatió) i les proteïnes. Les glutaredoxines monotioliques, comparteixen un motiu estructural bàsic i un mecanisme bioquímic d'acció que els hi confereix la funció de proteïnes reguladores de l'estat redox protèic (Herrero i de la Torre, 2007).

En aquest mecanisme, la glutaredoxina només utilitza l'única cisteïna del seu centre actiu per formar un pont disulfur amb el GSH, alliberant així la proteïna reduïda. Finalment, la glutaredoxina glutacionilada serà reduïda per una altra molècula de GSH (vegeu **Figura 5**).

En la següent **Figura 5** es detalla el mecanisme general d'acció de les glutaredoxines monotioliques.

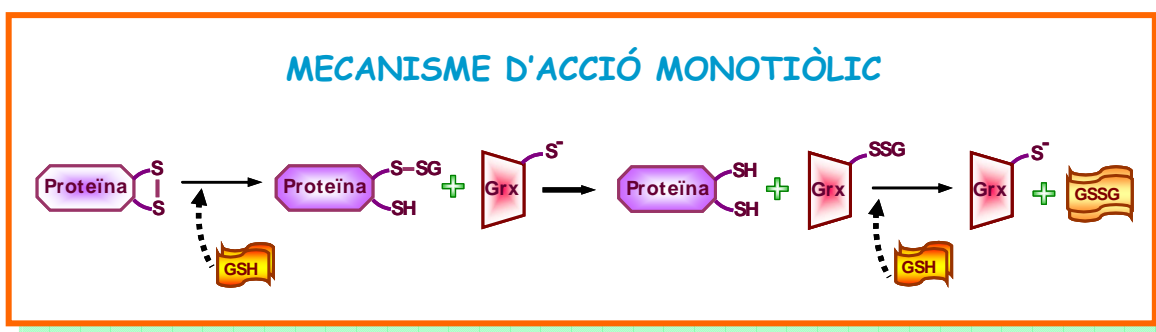


Figura 5- Mecanisme d'acció monotiolic de les glutaredoxines Grx3, Grx4, Grx5, Grx6 i Grx7 en *S. cerevisiae*. En aquest mecanisme, la glutaredoxina (Grx) només utilitza l'única cisteïna del seu centre actiu per formar un pont disulfur amb el GSH, alliberant així la proteïna reduïda. Finalment, la glutaredoxina glutacionilada serà reduïda per una altra molècula de GSH (Esquema adaptat de Fernandes i Holmgren, 2004).

Dins les glutaredoxines monotioliques trobem les proteïnes **Grx3, Grx4, Grx5, Grx6 i Grx7**.

Grx3 i **Grx4** són petites glutaredoxines de 32,48 i 27,49 KDa respectivament que es localitzen majoritàriament en el nucli independentment de la presència d'estrès o no en el medi (Lopreiato *et al.*,2004; Molina *et al.*, 2004).

La caracterització funcional de Grx3 i Grx4 en la defensa cel.lular contra l'estrès oxidatiu, és el principal objectiu del primer capítol presentat en aquesta Tesi Doctoral.

Grx5 es troba en la matriu mitocondria. Principalment, implicada en la biosíntesis i reparació dels centres Fe/S de les proteïnes mitocondrials (Rodríguez-Manzanaque *et al.*, 2002; Mühlenhoff *et al.*, 2003; Lill *et al.*, 2006).

Grx3, Grx4 i Grx5 estan incloses dins la superfamília que conserva el domini estructural PICOT (*PKC-interacting-cousin of tioredoxin*). Aquest domini PICOT va ser descobert per primera vegada en la glutaredoxina monotiolica humana PICOT (Isakov *et al.*, 2000) (per obtenir informació més detallada de la proteïna PICOT vegeu l'apartat 3.3.4 d'aquesta Introducció General).

Grx6 i Grx7, caracteritzades recentment (Lee *et al.*, 2007; Meseke *et al.*, 2008; Izquierdo *et al.*, 2008), són les primeres glutaredoxines monotioliques relacionades amb compartiments de la via de secreció. Grx6 és localitza en el reticle endoplasmàtic i en la zona cis-golgi de l'aparell de golgi i Grx7 es localitza en la zona cis-golgi .

En la **Figura 6** es resumeix els centres actius i les localitzacions subcel.lulars de totes les glutaredoxines monotioliques i ditioliques descrites prèviament .

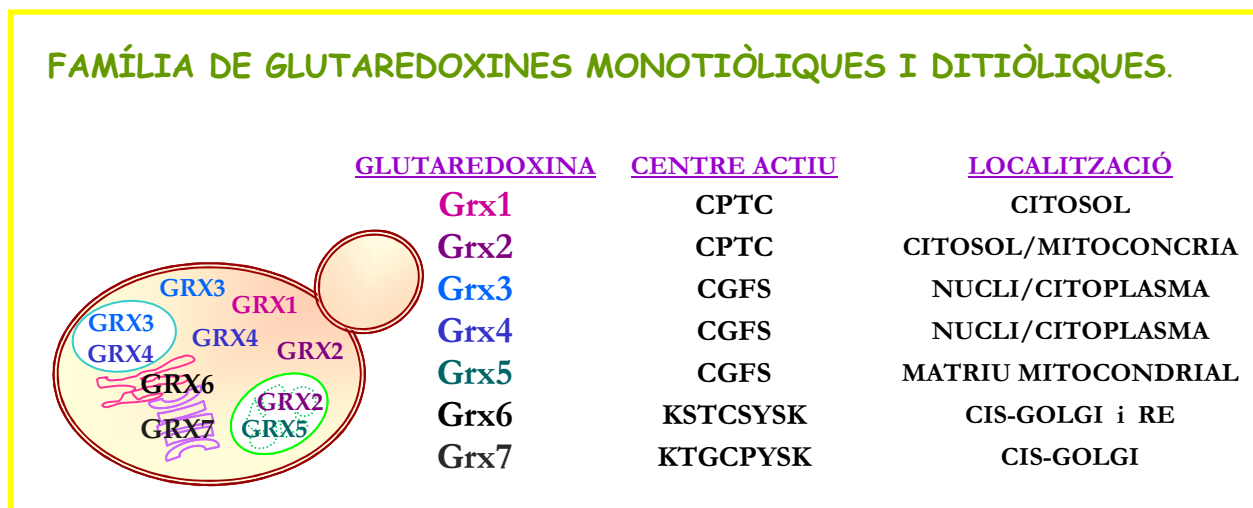


Figura 6- Família de glutaredoxines monotioliques i ditioliques en *S.cerevisiae*. En aquest esquema es resumeixen les localitzacions subcel.lulars i les seqüències dels centres actius de les respectives glutaredoxines monotioliques i ditioliques de *S.cerevisiae*. Ambdós grups de glutaredoxines coexistixen en organismes desde bacteries fins a humans. RE: reticle endoplasmàtic.

3.3.2- RELACIÓ FUNCIONAL ENTRE TIOREDIXINES I GLUTAREDOXINES.

Podem afirmar que en *S. cerevisiae* existeix una relació funcional entre el sistema de tioredoxines i el sistema de glutaredoxines (principalment les glutaredoxines ditiòliques) basant-nos en un seguit d'evidències:

- Mutants simples *glr1* (glutatió reductasa) necessiten una de les dues tioredoxines citosòliques per ser viables i al contrari, mutants simples *trx1* o *trx2* necessiten la glutatió reductasa funcional per a créixer en condicions aeròbiques (Muller, 1996).

- En el mutant simple *glr1* l'estat redox de les tioredoxines no es veu alterat i al contrari, l'estat redox de les glutaredoxines no es veu afectat en els mutants *trx*. Aquest fet indica que no sembla existir una relació recíproca entre ambdós sistemes (Trotter i Grant, 2003)

- El doble mutant *trr2glr1* és viable, però és hipersensible a H_2O_2 i presenta un creixement lent en condicions respiratòries. Així doncs, ambdues proteïnes presenten una funció additiva pel que fa a la reducció de la tioredoxina Trx3 (Trotter i Grant, 2005).

- El triple mutant *trx1trx2glr1* provoca una augment en els nivells de GSSG, amb els quals les tioredoxines podrien funcionar, juntament amb Glr1, en el manteniment d'una relació elevada de GSH-GSSG dins la cèl.lula, sobretot en condicions on la capacitat reductora de la Glr1 sigui insuficient per mantindre nivells reduïts de GSH. D'aquesta manera, qualsevol condició que oxidi els dos grups tiol del centre actiu de les tioredoxines, afectarà també al estat redox del GSH i per tant al sistema glutaredoxina (Grant, 2001).

- S'ha observat que mutants en les tioredoxines presenten nivells elevats de GSH i GSSG. Aquest fet posava de manifest un possible vincle entre el sistema tioredoxina i el estat redox de GSH en la cèl.lula (Trotter i Grant, 2003).

- Soques sense el sistema tioredoxina (triple mutant *trx1trx2trr1*) o el sistema glutaredoxina (doble mutant *gsb1glr1*) són viables. No obstant, si es delecten simultàneament components de ambdós sistemes, els mutants obtinguts són inviables com per exemple el triple mutant *gsb1trx1trx2* o el doble mutant *glr1trr1* (Trotter i Grant, 2003).

3.3.3- DOMINIS ESTRUCTURALS DE LES GLUTAREDOXINES MONOTIÒLIQUES *GRX3* I *GRX4*.

Les glutaredoxines Grx3 i Grx4 de *S.cerevisiae*, motius d'aquest treball investigador, presenten en la seva estructura proteïca dos dominis molt conservats entre diferents espècies desde procariotes fins a eucariotes: un **domini TRX** i un **domini GRX**, separades per una seqüència no conservada. La tercera glutaredoxina monotiolica, Grx5, careix del domini TRX (Herrero i de la Torre, 2007)

En la **Figura 7** es mostra un esquema dels dominis TRX i GRX de Grx3, Grx4 i Grx5.

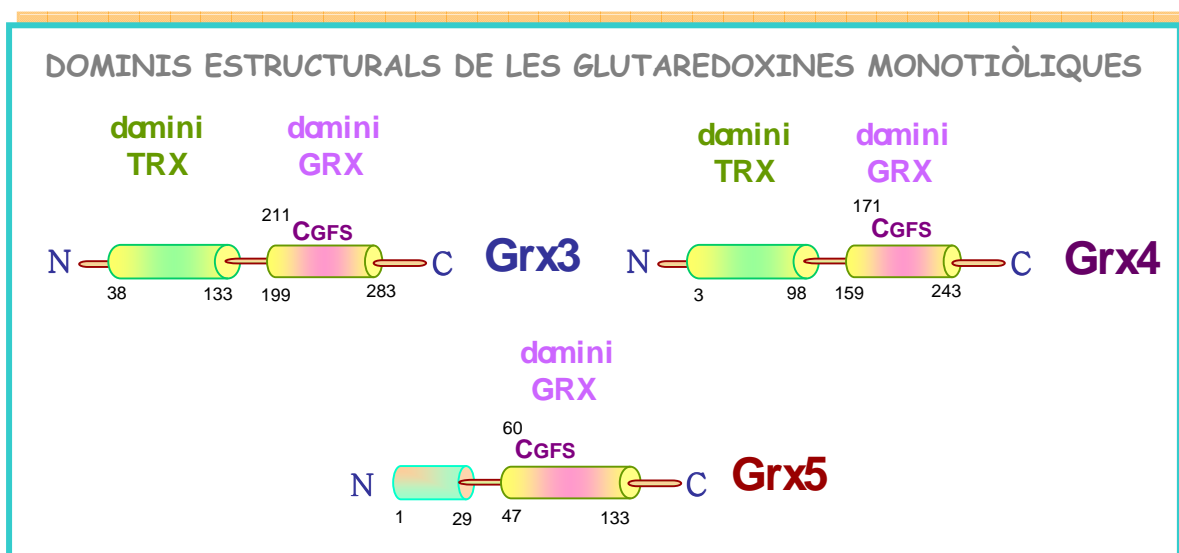


Figura 7- Dominis estructurals de les glutaredoxines monotioliques Posicions i tamany de cadascun dels dominis TRX i GRX de les glutaredoxines monotioliques. **GFS**: seqüència del centre actiu del domini GRX. **C numerada**: posició de l'aminoàcid cisteïna catalític del centre actiu del domini GRX. **WAD/EPCK**: seqüència del centre actiu del domini TRX (Esquema adaptat de Herrero i de la Torre, 2007).

3.3.3.1- DOMINI GRX DE LES GLUTAREDOXINES *GRX3* I *GRX4*.

El domini GRX es troba en l'extrem C-terminal i en ell es situa el centre actiu de la proteïna. Aquest centre actiu conté la seqüència **Cys-Gl-Phe-Ser**, on aquesta única cisteïna és la que permet duu a terme, en les glutaredoxines monotioliques la seva funció enzimàtica de **reducció dels ponts disulfur** generats entre el GSH i les proteïnes.

Fins ara, només estava descrita aquesta funció pel domini GRX. No obstant, en el primer capítol de la present Tesi Doctoral es descriu per primera vegada la funció dels dominis GRX de Grx3 i Grx4 en la regulació de l'homeòstasi del ferro a través de regular l'exportació nuclear del factor transcripcional Aft1 (vegeu Capítol 1, pàg.31).

3.3.3.2- DOMINI TRX DE LES GLUTAREDOXINES GRX3 I GRX4.

El domini TRX es troba en l'extrem N-terminal de la proteïna i comparteix gran homologia amb les seqüències de les tres tioredoxines descrites en *S.cerevisiae*: Trx1, Trx2, Trx3 (Vilella *et al.*, 2004).

En el seu centre actiu, la seqüència WAE/DPCK recorda la seqüència del centre actiu de les tioredoxines: WCGPCK (Powis i Montfort, 2001) (vegeu **Figura 7 i 8**).

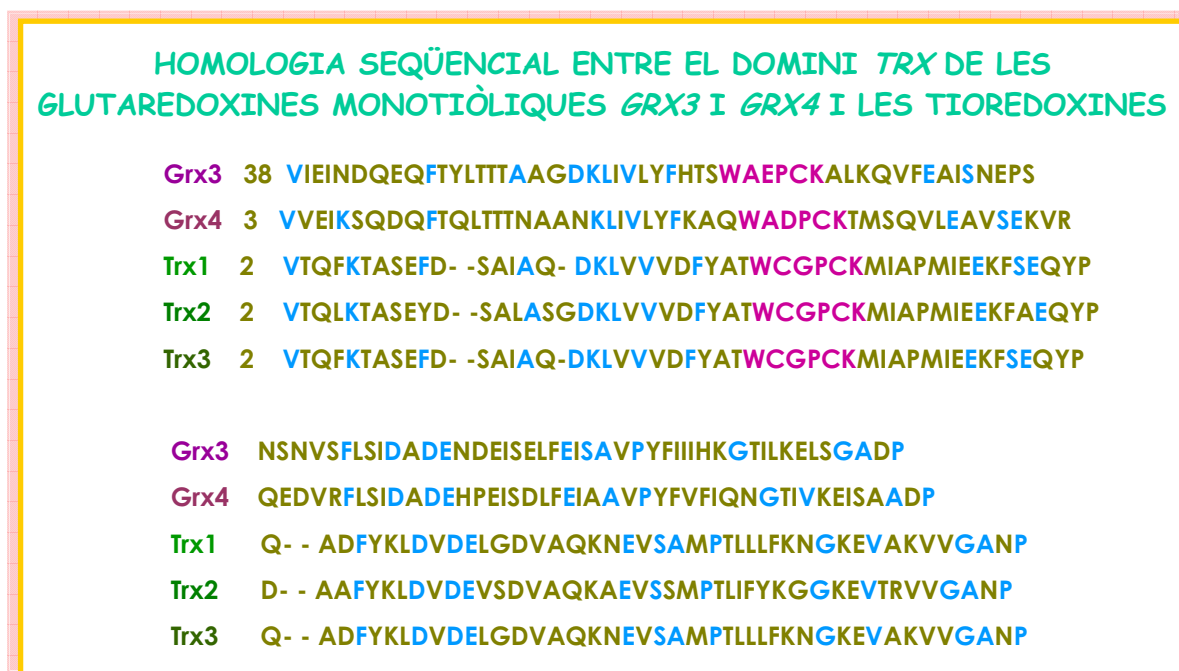


Figura 8- Homologia entre el domini TRX de les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 i les tioredoxines Trx1, Trx2 i Trx3. Alineaments ClustalW2 entre els dominis TRX de Grx3 i Grx4 i les tres tioredoxines Trx1, Trx2, Trx3 de *S.cerevisiae*. Els residus conservats estan remarcats en color blau. Els centres actius dels dominis TRXs de Grx3 i Grx4 i de Trx1, Trx2 i Trx3 estan remarcats en color rosa.

La principal funció del domini TRX seria la de regular la localització nuclear de Grx3 i Grx4. El domini TRX de Grx3 conté una senyal de localització nuclear (Molina, *et*

al, 2004). No obstant, malgrat que Grx4 també es localitza dins del nucli, es desconeix si presenta dita seqüència de localització nuclear en el domini TRX (Molina, *et al*, 2004).

En aquest treball investigador però, es demostra una nova funció fins ara desconeguda pels dominis TRX de Grx3 i Grx4 com a reguladors de la via PKC1 en resposta a estrès oxidatiu i de l'organització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu (vegeu Capítol 2, pàg.79).

3.3.4- GLUTAREDOXINES MONOTIÒLIQUES EN CÈL.LULES SUPERIORS: HOMOLOGIA ENTRE GRX3, GRX4 I LA PICOT HUMANA.

Proteïnes homòlogues a les glutaredoxines monotioliques de llevat existien en tots tipus de organismes, desde bacteris fins als humans (Rodríguez-Manzanaque *et al*, 1999; Isakov *et al*, 2000; Witte *et al*, 2000).

En cèl.lules de mamífer s'ha descrit que la proteïna anomenada **PICOT** (*PKC-interacting-cousin of thioredoxin*), correspondria a la glutaredoxina monotiolica homòloga en humans.

La glutaredoxina monotiolica humana PICOT s'expressa en diversos teixits. Es localitza en el citosol, sota la membrana plasmàtica de les cèl.lules limfocitàries T del sistema immunitari cel.lular. En resposta a estrès es translocat a nucli on colocalitza amb la isoforma θ de la proteïna quinasa C amb la qual interacciona (Babichev i Isakov, 2001).

La PICOT s'enacrrrega de regular l'estat redox de les proteïna PKC humana, regulant negativament la seva funció. La sobreexpressió de PICOT en les cèl.lules limfocitàries T, provoca diferents efectes com la inactivació de la via que controla la ruta C-Jun N-terminal quinasa (JNK), la inactivació dels factors de transcripció nuclears AP1 i NF- κ B i també la inactivació d'interleuquines 2 (Witte *et al*, 2000).

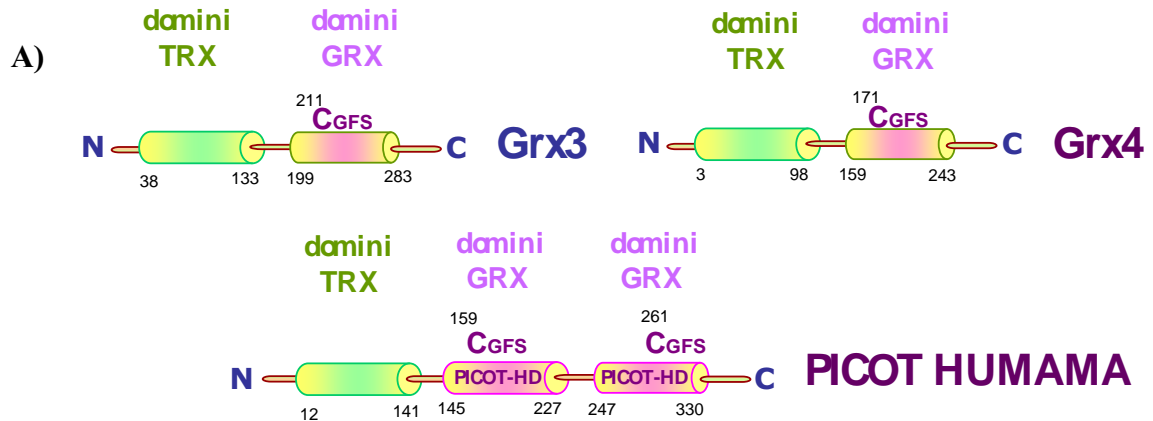
Així doncs, la glutaredoxina humana PICOT juga un paper molt important com a regulador negatiu en la via de transducció de senyal (control de la funció i de l'activitat de la PKC- θ humana) en resposta a estrès (Witte *et al*, 2000).

La importància de PICOT en relació Grx3 i Grx4 radica en la seva estructura (vegeu **Figura 9**).

La proteïna PICOT de 37,5KDa, presenta una elevada homologia seqüencial entre els seus dominis TRX i GRX i els dominis TRX i GRX de Grx3 i Grx4. La PICOT presenta estructurat un domini homòleg tioredoxina (domini **TRX**) en l'extrem N-terminal

de la proteïna seguit de dos repeticions en tandem del domini **GRX (PICOT-HD)** (vegeu Figura 9).

ALINEAMENTS ENTRE ELS DOMINIS *GRX* I *TRX* DE LES GLUTAREDOXINES MONOTIÒLIQUES *GRX3* I *GRX4* de *S.cerevisiae* I ELS DOMINIS *GRX* I *TRX* DE LA GLUTAREDOXINA MONOTIÒLICA HUMANA



B)

DomTRX(Grx3) MCSFQVPSAFSFNYSYCYKRHQARYTTAAKLFQEMPVIEINDQEQFYLT TTTAAGDKLI 60
DomTRX(PICOT) -----SEKY-----EISSYPTFLFFKNSQKIDR-- 23
.*****:::**

DomTRX(Grx3) VLYFHTSWEPCKALKQVFEAISNEPNSNSNVSFLSIDADE-NSEISELFEISAVPYFIIH 119
DomTRX(PICOT) --LDGAHAP----ECTKKVQRHASSG--SFLSSANEHLKEDLNRLKKLT----- 64
: : *:: : : : *:* * * * *:: : : : *:

DomTRX(Grx3) KGTILKELSG 129
DomTRX(PICOT) -----

DomGRX(Grx3) --MLFMKGGPSEPKCGFSRQLVILR--EHQVRFGGFDILRDESVRQNLKKFSEWPTFPQ 56
PICOT-HD 1 PCMLFMKGTQPQEPKCGFSKQMYEILMKHKHNIQFSSFDIFSDEEVRQGLKAYSSWPTYP- 89
*****.*.***.*.***:::****.**** * * **** * * * ** * * * *

DomGRX(Grx3) LYINGEFQGGLDIIKESLEEDPDFLQHALQS 87
PICOT-HD 1 LYVSGELIGGLDIIKE-LEASELDTI---- 85
.*.*****::

DomGRX(Grx3) --MLFMKGGPSEPKCGFSRQLVILRHHQVRFGGFDILRDESVRQNLKKFSEWPTFPQLY 58
PICOT-HD 2 SVMLFMKGKGN-KEAKCGFSKQILEILNSTGYEYETFIL--EEVRQGLKAYSNWPTYPQLY 57
***********:**:* * * * *:* * * * **** * * * ** * * * *

DomGRX(Grx3) INGFEQGGLDIIKESLEEDPDFLQHALQS 87
PICOT-HD 2 VKGELVGGLDIVKE-LKENGELLPI---- 81
: : * .****** .:* .

C)

DomTRX(Grx4) MTVVEIKSQDQFTQLTTTNAANKLIVLYFKAQWADPCKTMSQVLEAVSEKVRQEDVRFLS 60
DomTRX(PICOT) -AVEEVGSAGKPELLRLK--AKSLLVKFWAPWAPQCAQMNEVMAFLAKELPQ--VSFVK 55
.**** : *** : *** : *** : *** : **

DomTRX(Grx4) IDADEHPEISDLFEIAAVPYFVIQNGTIVKEISAADPKFVKSLSEILSN----- 110
DomTRX(PICOT) LEAEGVPEVSEKYEISSYPTFLFFKNSQKIDRLDGAHAPECTKKVQRHASSGSFLSSANE 115
: .** .* : ** * * .:* : *** : **

DomTRX(Grx4) -----
DomTRX(PICOT) HLKEDLNRLKKLT 128

DomGRX(Grx4) --MLFMKGGPSEPKCGFSRQLVILR--EHQVRFGGFDILRDESVRQSLKKFSDWPTFPQ 56
PICOT-HD 1 PCMLFMKGTQPQEPKCGFSKQMYEILMKHKHNIQFSSFDIFSDEEVRQGLKAYSSWPTYP- 89
*****.*.***.*.***:::****.**** * * **** * * * ** * * * *

DomGRX(Grx4) LYINGEFQGGLDIIKESIEEDPEYFQHALQ 86
PICOT-HD 1 LYVSGELIGGLDIIKE--LEASELDTI-- 85
.*.*****::

DomGRX(Grx4) --MLFMKGGPSEPKCGFSRQLVILRHHQVRFGGFDILRDESVRQSLKKFSDWPTFPQLY 58
PICOT-HD 2 SVMLFMKGKGN-KEAKCGFSKQILEILNSTGYEYETFIL--EEVRQGLKAYSNWPTYPQLY 57
***********:**:* * * * *:* * * * **** * * * ** * * * *

DomGRX(Grx4) INGFEQGGLDIIKESIEEDPEYFQHALQ 86
PICOT-HD 2 VKGELVGGLDIVKE-LKENGELLPI--- 81
: : * .****** .:* .

Figura 9- Alineaments entre els dominis GRX i TRX de les glutaredoxines monotiòliques Grx3 i Grx4 de *S.cerevisiae* i la glutaredoxina monotiòlica humana PICOT. A) Posicions i tamanys dels dominis TRX i GRX de les glutaredoxines monotiòliques de *S.cerevisiae* Grx3 i Grx4 i de la glutaredoxina monotiòlica humana PICOT. **CGFS:** seqüència del centre actiu del domini GRX. **C numerada:** posició de l'aminoàcid cisteïna catalític del centre actiu del domini GRX (Esquema adaptat de Vilella *et al.*, 2004). **B)** Alineaments Clustal W2 dels dominis TRX i GRX de Grx3 i els dominis TRX i GRX de PICOT. **C)** Alineaments Clustal W2 dels dominis TRX i GRX de Grx4 i els dominis TRX i GRX de PICOT. **PICOT-HD1** (*PICOT homology domain 1*) i **PICOT-HD2** (*PICOT homology domain 2*) corresponen al primer i al segon domini GRX de la proteïna PICOT.

3.3.4.1- DOMINI GRX DE LA GLUTAREDOXINA MONOTIÒLICA HUMANA PICOT.

En l'extrem C terminal, la proteïna PICOT presenta dos dominis homòlegs consecutius GRX. Els dominis GRX estan formats per 84 aminoàcids i presenten un 64% d'identitat i un 81% de similitud entre ambdues regions (Witte *et al.*, 2000).

Aquests dominis també s'anomenen **PICOT-HD** (**PICOT homology domain**) i presenten una elevada homologia amb els dominis GRX de Grx3 i Grx4.

En eucariotes inferiors com *S.cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, només es troba present un dels dominis PICOT-HD, mentre que en *Arabidopsis thaliana*, per exemple, s'han descrit fins a tres repeticions d'aquests dominis (Isakov *et al.*, 2000).

Grx3 i Grx4 presenten el domini GRX o domini PICOT en l'extrem C-terminal i conté la seqüència Cys-Gl-Phe-Ser (GCFS) que correspon al centre actiu de la proteïna. En Grx5, el domini PICOT correspondria a la majoria de la proteïna (Isakov *et al.*, 2000; Rodríguez Manzanaque *et al.*, 2000) (vegeu Figura 7). En aquest sentit Grx3, Grx4 i Grx5 han estat incloses dins la família de les PICOT-HD (Isakov *et al.*, 2000).

3.3.4.2- DOMINI TRX DE LA GLUTAREDOXINA MONOTIÒLICA HUMANA PICOT.

El domini TRX de PICOT, localitzat en l'extrem N-terminal, s'encarrega d'interaccionar amb la PKC- θ . No obstant, Witte *et al.*, (2000) van descriure que era necessària la proteïna PICOT sencera per duu a terme l'activitat inhibidora sobre la PKC- θ .

3.3.5- RELACIÓ FUNCIONAL ENTRE PROTEÏNES OXIDOREDUCTORES I PROTEÏNES QUINASA INTEGRANTS DE VIES D'INTEGRITAT CEL·LULAR EN CÈL·LULES SUPERIORS.

Mitjançant *Phage Display*, una eina molt potent per identificar interaccions proteïna-proteïna, Watson *et al.*, (1999) van demostrar *in vitro* que certs subtipus de proteïna quinasa C: PKC- α , PKC- ϵ , PKC- δ i PKC ξ s'unien físicament amb tioredoxines prèviament immobilitzades.

Tot i que les tioredoxines no són substrats directes de les PKC, aquestes oxidoreductases són capaces de bloquejar l'autofosforilació de les proteïnes PKC. Es coneix que les tioredoxines interaccionaven amb només 28 aminoàcids de la seqüència d'unió a substrat del domini catalític de PKC (Leu⁵³⁰-Val⁵⁵⁸) (Watson *et al.*, 1999). Aquesta regió es localitza molt aprop del loop actiu on es troba el residu fosforilable Thr⁵⁰⁰ de la proteïna PKC (Dutil *et al.*, 1998). La fosforilació d'aquest aminoàcid és un prerequisit per els següents passos de fosforilació i activació de la quinasa (Orr *et al.*, 1994).

Watson *et al.*, (1999) suggereixen que aquesta interacció *in vitro* entre tioredoxines i PKC podria actuar com un sistema per combatre l'aparició de potencials espècies reactives d'oxigen lligades a l'activació de PKC, mostrant un nou mecanisme protector contra l'estrès oxidatiu que es genera per l'activació d'aquesta quinasa.

D'altra banda, són molts els estudis que mostren el paper de les tioredoxines (TRX), les glutaredoxines (GRX) i les nucleoredoxines (NRX) com oxidoreductases capaces de regular l'expressió gènica a través de controlar la regulació redox de multitud de factors transcripcionals.

Hirota *et al.*, (1997) van descriure *in vitro* en cèl·lules eucariotes superiors HELA, com les tioredoxines (TRX) estaven implicades en les modificacions redox de residus cisteïna específics del factor de transcripció NF- κ B. Aquest fet provocava que NF- κ B augmentés la seva unió a DNA.

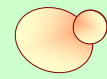
Kurooka *et al.*, (1997) van descriure en cèl·lules eucariotes superiors NIH3T3, les nucleoredoxines (NRX) com proteïnes nuclears que compartien amb les TRX estructura i funció. Les NRX també estaven implicades en la regulació transcripcional a través de l'activitat oxidoreductasa que exerceixen sobre els residus cisteïna de diverses proteïnes.

Moltes vies de transducció de senyal convergeixen en una quinasa, la qual acaba amb la regulació d'un factor transcripcional com a mecanisme de resposta davant l'estímul rebut.

Hirota *et al.*, (2000) van descriure en cèl.lules eucariotes superiors HEK293, que la sobreexpressió de GRX i NRX potenciaven l'activació del factor transcripcional NF- κ B a través de la quinasa NIK. La sobreexpressió de GRX, NRX o TRX també potenciaven l'activació del factor transcripcional AP-1 per la quinasa MEKK i la del factor transcripcional CREB per la quinasa PKA. Es desconeix però, el mecanisme exacte amb el qual aquestes oxidaoreductases actuen sobre les diferents quinases.

Més tard, Kahlos *et al.*, (2003) van estudiar en cèl.lules endotelials d'artèries pulmonar, l'efecte inhibitori de l'òxid nítric (NO) sobre l'activitat catalítica de la proteïna quinasa C. Aquest procés estava associat a la modulació redox que exercia la presència d'aquesta molècula oxidant sobre les cisteïnes del centre actiu de PKC. Aquest grup van demostrar que el NO formava ponts disulfur en la proteïna PKC inactivant-la i que les tioredoxines s'encarregaven de reduir altre cop aquest pont disulfur.

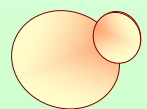
Així doncs, un cop més l'existència d'un possible complexe tioredoxina-PKC posava de manifest com les tioredoxines jugaven un paper crític en l'equilibri redox de PKC, per a que aquesta es mantingués activa i funcional per procurar la correcta integritat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu.



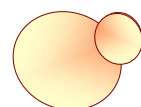
3- CAPÍTOL 1

A decorative graphic consisting of two overlapping orange circles with a gradient, located at the bottom right of the page, below the main title.

**LES GLUTAREDOXINES
MONOTIÒLIQUES Grx3 I Grx4
PARTICIPEN EN EL MANTENIMENT
DE LA CORRECTA HOMEÒSTASI
DEL FERRO INTRACEL·LULAR
MITJANÇANT LA REGULACIÓ DEL
FACTOR TRANSCRIPCIONAL Aft1
EN *Saccharomyces cerevisiae*.**



— 3.1- INTRODUCCIÓ



3.1.1- HOMEÒSTASI DEL FERRO EN *Saccharomyces cerevisiae*.

El ferro, és un dels nutrients més essencials en la cèl.lula donat que forma part com a cofactor en una gran varietat de processos cel.lulars com:

- a) l'emmagatzament i el transport d'oxigen (leghemoglobina, hemoglobina, mioglobina i hemeritrina).
- b) la transferència d'electrons dins la cadena transportadora d'electrons durant la respiració i la fotosíntesis (citocroms).
- c) el metabolisme dels àcids nuclèics (ribonucleòtid reductasa) i dels lípids.
- d) la síntesis d'intermediaris metabòlics (hidroxilases dels aminoàcids) durant el cicle dels àcids tricarboxílics.
- e) formant part de l'estructura d'un gran nombre de proteïnes que contenen centres Fe/S, (biotina, aconitasa,...) (Winkelman *et al.*, 1987; Creighton, 1992).
- f) i fins i tot, intervé en la regulació gènica (Puig, *et al.*, 2005).

Alteracions en l'homeòstasi del ferro també produeixen un gran nombre de malalties humanes com són les anèmies per dèficit de ferro, l'ataxia de Friedreich, hemocromatosis hereditària, aceruloplasminèmia, Parkinson, l'envelliment cel.lular i fins i tot càncer (Roy i Andrews, 2001; Nittis i Gitlin, 2002; Hentze *et al.*, 2004).

El ferro es troba fonamentalment en la seva forma oxidada Fe^{+3} , formant part de sals i hidròxids de molt baixa solubilitat (Massé i Arguin, 2005). En la seva forma reduïda Fe^{+2} , el ferro és molt més soluble però alhora molt inestable, passant ràpidament a Fe^{+3} en presència d'oxigen.

El ferro pot resultar tòxic en concentracions superiors a les necessàries per la cèl.lula degut a que, juntament amb l'oxigen, és un generador de radicals lliures citotòxics, com és el radical hidroxil, generat a través de la reacció de Fenton (vegeu l'apartat 2.2.3 de l'Introducció General). El radical hidroxil pot reaccionar amb diferents biomolècules (proteïnes, lípids, DNA,...) de manera inapropiada (Massé i Arguin, 2005). Per aquest motiu, el control que la cèl.lula ha d'exercir sobre aquest i altres metalls d'igual importància (com són el coure i el zinc) és bàsic per la supervivència i l'integritat cel.lular.

Per resoldre els problemes d'assimilació del Fe^{+3} del medi, els organismes procariotes i eucariotes han desenvolupat un seguit de mecanismes per permetre la correcta assimilació, transport, compartimentalització i ús d'aquest metall, mitjançant dues estratègies fonamentals:

1- La **producció i secreció al medi de sideròfors**.

Els sideròfors són petites molècules que actuen com agents quelants del Fe^{+3} . Seguidament, aquest Fe^{+3} és incorporat en la cèl.lula o bé a través de sistemes de transport específics (mecanisme dut a terme per bacteris, com *Escherichia coli*) o bé, cedint el ferro a receptors de membrana específics que s'encarreguen de transportar'l cap a l'interior de la cèl.lula (mecanisme utilitzat en fong i plantes) (Neilands, 1990; Payne i Lawlor, 1990).

2- La segona estratègia per assimilar Fe^{+3} ha implicat el desenvolupament d'una **activitat ferro reductasa** situada en la membrana citoplasmàtica que s'encarrega de reduir el Fe^{+3} a Fe^{+2} en condicions aeròbiques. En aquest estat reduït, el ferro és incorporat a l'interior cel.lular a través d'un sistema de transport d'electrons membranal, del qual en forma part una oxidasa. Aquesta oxidasa s'encarrega de transforma'l altre cop a Fe^{+3} i interioritza'l dins la cèl.lula (Dancis *et al.*, 1992). El llevat *Saccharomyces cerevisiae*, utilitza aquesta segona estratègia, per assimilar el ferro extracel.lular (Dancis *et al.*, 1990).

3.1.2- ASSIMILACIÓ DEL FERRO PER *Saccharomyces cerevisiae*.

Una acumulació excessiva de ferro dins la cèl.lula pot tenir efectes tòxics degut a la formació d'espècies reactives de l'oxigen ROS (vegeu apartat 2.2.2 de L'Introducció General). Això significa que la cèl.lula ha de desenvolupar mecanismes que permetin acumular suficients nivells de ferro per mantenir unes reaccions bioquímiques normals, sense que això signifiqui afavorir la producció de ROS.

En *Saccharomyces cerevisiae* existeixen dos sistemes implicats en la entrada de ferro en la cèl.lula.:

a) Sistema de baixa afinitat de captació de ferro, que funciona quan el ferro extracel.lular es troba en altes concentracions. Aquest mecanisme és troba altament regulat. El principal gen en aquest sistema és *FET4*.

b) Sistema d'alta afinitat de captació de ferro, que entra en funcionament quan el ferro extracel.lular resulta limitant per la cèl.lula. Aquest mecanisme sol ser constitutiu i els gens implicats són *FRE1*, *FRE2*, *FET3* i *FTR1*.

Donat que aquest últim sistema és el més estudiat en relació a les glutaredoxines Grx3 i Grx4 durant el primer capítol de la present Tesi doctoral, serà el que amb més detall és desenvoluparà en aquesta Introducció.

3.1.2.1- SISTEMA DE BAIXA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO.

En *S.cerevisiae* aquest sistema és el responsable del transport del Fe^{+2} , quan aquest es troba en altes concentracions en l'espai extracel.lular.

FET4 (*Fe⁺² transporter*) és el gen que codifica pel transportador del sistema de baixa afinitat de captació de ferro, mecanisme actiu en condicions anaeròbiques. *FET4* és una permeasa integral de membrana que forma part d'un sistema que s'activa en resposta a baixos nivells de ferro (Dix *et al.*, 1994).

3.1.2.1.1- REGULACIÓ DE L'ASSIMILACIÓ I EL TRANSPORT DE FERRO EN EL SISTEMA DE BAIXA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO.

FET4 s'indueix en condicions anaeròbiques, quedant reprimida la seva expressió en presència de l'O₂ (Laran *et al.*2002).

A més a més, la regulació transcripcional de *FET4* també és reprimida pel ferro. No obstant, s'ha suggerit que aquesta regulació mediada pel ferro, pot ser regulada dependent i independentment d'Aft1 (factor transcripcional que regula el sistema d'alta afinitat de captació de ferro) donat que el mutant simple *aft1* i el doble mutant *aft1 aft2* continuen presentant activitat transcripcional de *FET4* depenent del ferro en condicions aeròbiques.

3.1.2.2- SISTEMA D'ALTA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO.

En *S.cerevisiae* aquest sistema és el responsable del transport de Fe^{+2} quan es troba en concentracions limitants en l'espai extracel.lular Aquest mecanisme forma un gran complex proteïc de membrana on la seva regulació esdevé molt amplia.

En la **Figura 1** és mostren els principals elements que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro.

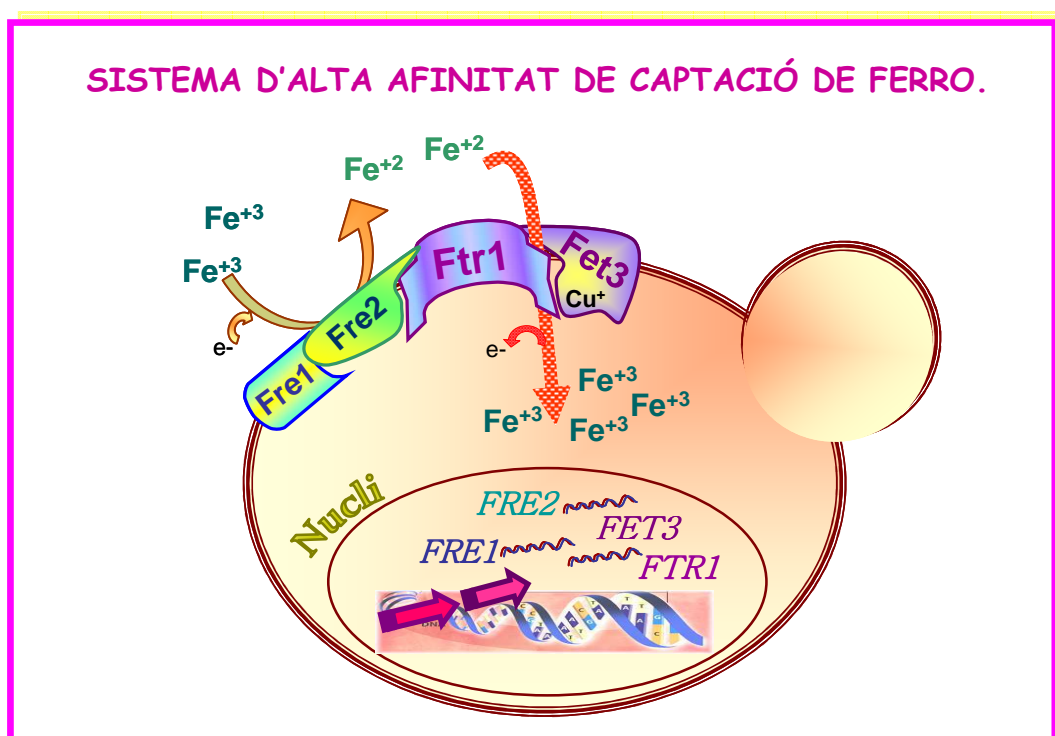


Figura 1- El sistema d'alta afinitat de captació de ferro en *S.cerevisiae*. Aquest sistema capta el Fe^{+3} del medi extern. Aquest Fe^{+3} és reduït per les ferro reductases **Fre1** i **Fre2** a Fe^{+2} . El Fe^{+2} es oxidat a Fe^{+3} per l'oxidasa **Fet3** de manera coure dependent. El Fe^{+3} és transferit a la permeasa **Ftr1**, que gràcies a un canvi conformacional, allibera Fe^{+3} al citoplasma.

3.1.2.2.1-COMPONENTS DEL SISTEMA D'ALTA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO.

3.1.2.2.1.1- METALLOREDUCTASES: *FRE1* I *FRE2*.

Les metalloreductases **Fre1** i **Fre2** comparteixen diverses propietats funcionals com a ferro reductases. L'expressió de **FRE1**, com la de **FRE2**, és induïda en resposta a dèficit de ferro. Part d'aquest control té lloc a nivell transcripcional, on s'han trobat regions homòlogues de regulació dependents de ferro.

FRE1 s'encarrega de reduir el ió Fe^{+3} present en el medi a Fe^{+2} , per induir la seva solubilitat i facilitar la seva captació i internalització dins la cèl·lula en condicions de dèficit de ferro (Dancis *et al.*, 1992; Georgastou i Alexandraki, 1994).

FRE2 codifica per la segona ferro reductasa de membrana present en aquest mecanisme i presenta les mateixes funcions que **FRE1** (Georgastou i Alexandraki, 1994).

3.1.2.2.1.2-COMPLEX TRANSPORTADOR: *FET3* I *FTR1*.

FET3 codifica per una ferro oxidasa situada en la superfície de la membrana plasmàtica. S'encarregada d'oxidar el Fe^{+2} , que prèviament ha estat reduït per les ferro reductases *Fre1* i *Fre2*, a Fe^{+3} (Askwith *et al.*, 1994)

En tot aquest procés, la conversió altre cop del Fe^{+2} a Fe^{+3} per acció de *Fet3* ha d'anar estretament relacionada amb el seu transport a l'interior de la cèl.lula (De Silva *et al.*, 1995).

Arvinder *et al.*, (2006) van demostrar que *Fet3* treballava estretament amb el transportador *Ftr*, formant l'anomenat **complex permeasa** del sistema d'alta afinitat de captació del ferro. En aquest complex multimèric, la permeasa *Ftr1* rebia com a substrat el Fe^{+3} oxidat per *Fet3* i el translocava a l'interior de la cèl.lula.

3.1.3- REGULACIÓ DE L'ASSIMILACIÓ I EL TRANSPORT DE FERRO EN EL SISTEMA D'ALTA AFINITAT DE CAPTACIÓ DE FERRO.

En un medi amb dèficit de ferro s'indueix l'activació de l'expressió gènica dels gens que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro: *FRE1*, *FRE2*, *FET3* i *FTR1* entre altres (Casas *et al.*, 1997; Spizzo *et al.*, 1997).

Yamaguchi-Iwai *et al.*, (1995) van aïllar el gen ***AFT1***, com a element clau en la regulació de l'expressió gènica de les proteïnes que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro. El mutant *AFT1-1^{op}*, mantenia elevats nivells transcripcionals de les ferro reductases *FRE1* i *FRE2* i dels transportadors del ferro *FET3* i *FTR1* independentment de la presència d'altres concentracions de ferro en el medi extracel.lular. Contràriament, un mutant *aft1* era incapaç d'induir l'activació transcripcional d'aquests gens en resposta a dèficit de ferro. Va ser aleshores, quan Yamaguchi-Iwai *et al.*, (1995) van proposar el producte del gen *AFT1* com **activador transcripcional** dels gens regulats en condicions de dèficit de ferro.

Desde aleshores, han estat molts els estudis realitzats sobre els mecanismes reguladors encarregats de mantenir un correcte equilibri en l'homeòstasi del ferro tant vital per a la supervivència cel.lular. Blaiseau *et al.*, (2001) van descriure un segon activador transcripcional en *S.cerevisiae* regulat també pel ferro i amb elevada homologia amb el factor transcripcional *Aft1*. L'anomenaren ***Aft2***.

Els estudis demostren que en condicions de dèficit de ferro, *Aft1* i *Aft2* activen els gens del sistema d'alta afinitat de captació de ferro. En canvi, en situacions d'excès de ferro,

decau l'activació transcripcional per part d'aquest dos factors transcripcionals quedant reprimint aquest sistema (Laran *et al.*,2002). A més a més, Aft2 és necessari en l'homeòstasi del ferro en absència d'Aft1, suggerint que Aft1 i Aft2 tindrien funcions solapants (Blaiseau *et al.*,2001).

3.1.3.1- *AFT1*.

AFT1 (*Activator Ferrous Transport*) funciona com activador transcripcional que respon a estímuls ambientals i és essencial per mantenir nivells basals i induïbles dels gens que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro: *FRE1*, *FRE2*, *FET3* i *FTR1*. En condicions de dèficit de ferro, Aft1 s'uneix a cadascuna de les regions promotores dels gens prèviament descrits, concloent que Aft1 és un dels factors transcripcionals que regulen homeòstasi del ferro en *S. cerevisiae* (Yamaguchi *et al.*, 1995)

3.1.3.1.1- DESCRIPCIÓ MOLECULAR.

AFT1 és un gen localitzat en el cromosoma VII que codifica per una proteïna de 690 aminoàcids de longitud i de 77,69 KDa de pes molecular. La seva estructura revela una proteïna de caràcter hidrofílic i no presenta dominis transmembrana.

L'extrem N-terminal, altament carregat d'aminoàcids bàsics, conté quatre cisteïnes: C¹⁴³, C²¹⁵, C²⁹¹, C²⁹³. Concretament les cisteïnes C²⁹¹, C²⁹³ estan presents en el motiu Cys-X-Cys adjacent al domini de reconeixement i d'unió a DNA (Frankel i Kim, 1991).

L'extrem C-terminal presenta dues regions riques en residus àcids (aspartic i glutamic) molt necessàries per l'activitat transcripcional d'Aft1 (Mitchell i Tijan, 1989).

D'altra banda, en condicions d'elevats nivells de ferro extracel.lulars, l'unió del ferro amb la proteïna Aft1 inhibiria la seva capacitat activadora. Pel contrari, el dèficit de ferro en el medi extern produiria la pèrdua d'aquesta d'unió entre el ferro i Aft1, induint doncs la resposta transcripcional d'Aft1 (Rutherford i Bird, 2004).

Yamaguchi *et al.*, (1995) van treballar amb diferents mutacions puntuals sobre el gen *AFT1* per trobar quines regions estaven implicades en la seva funcionalitat.

Una d'aquestes mutacions puntuals, quan la cisteïna situada en la posició 291 era substituïda per una fenilalanina, va donar lloc a l'al.lel *AFT1-1^{fp}*. L'al.lel *AFT1-1^{fp}* provoca una inducció constitutiva dels gens que codifiquen per les ferro reductases, ferro oxidases i transportadors del ferro, independentment de les concentracions de ferro extracel.lulars, encara que aquestes siguin elevades. Una conseqüència important d'aquest fet, és l'efecte

deletèri que presenta aquest mutant en un medi ric en ferro. Això es degut a que l'entrada continuada de ferro a l'interior citoplasmàtic, més enllà del que la cèl.lula necessita, provoca un fort desequilibri intern en la homeòstasi d'aquest metall que acaba sent deletèri per la cèl.lula (Yamaguchi *et al.*, 1995).

En la **Figura 2** es mostra un esquema de les regions del gen *AFT1* on es detalla les zones anteriorment descrites.

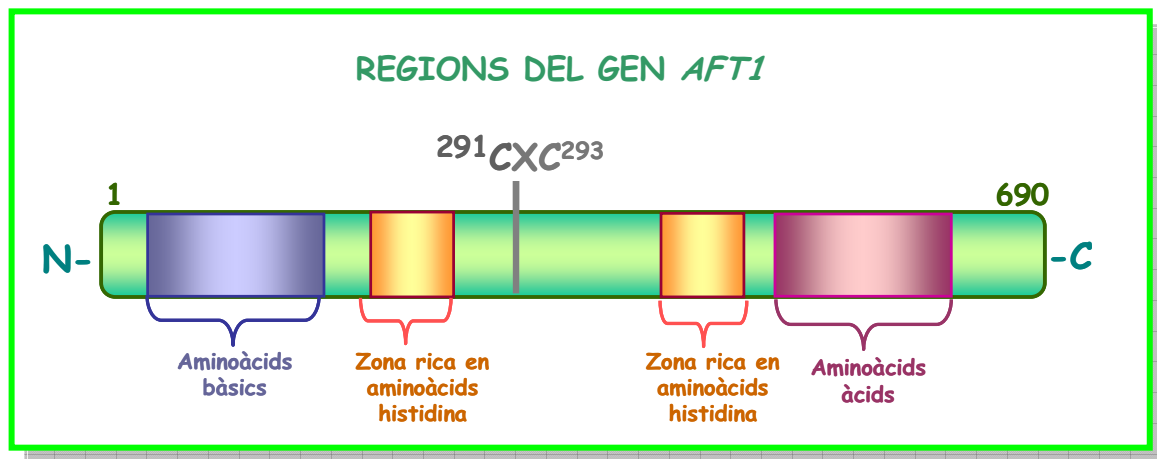


Figura 2- Esquema de les regions del gen *AFT1*. En l'extrem N-terminal indicat en color blau, els aminoàcids bàsics encarregats del reconeixement i unió a DNA. En l'extrem C-terminal, indicat en color rosa, els aminoàcids àcids (àcid aspàrtic i glutàmic principalment) necessaris per l'activitat transcripcional d'Aft1. Indicat en color taronja, les dues regions que presenten un 10% de residus histidina, zones

que participen en l'unió directa del metall ferro. ²⁹¹CXC²⁹³: la substitució de la cisteïna en posició 291 per una fenilalanina dona lloc a l'al·lel *AFT1-1^{sp}* provocant una inducció constitutiva dels gens del sistema de alta afinitat de captació de ferro independentment de les concentracions de ferro intracel.lular.

- . Nom estàndard: *AFT1*
- . Nom sistemàtic: *YGL071W*
- . Alias: *RCS1*
- . Cromosoma III
- . Factor de transcripció que activa els gens del Sistema d'Alta Afinitat de Captació de Ferro.
- . Tamany (aa): 690
- . Pes molecular (Da): 77,682
- . Punt isoelèctric (pI): 6,88

3.1.3.1.2- ACTIVITAT COM A FACTOR TRANSCRIPCIONAL.

Yamaguchi *et al.*, (1995) van observa que l'activitat de les ferro reductases Fre1 i Fre2 depenia de l'accessibilitat del ferro del medi extern. Aquest mecanisme de regulació també succeïa amb la ferro oxidasa Fet3, on el ferro extracel.lular també tenia l'habilitat de controlar l'expressió d'aquest gen.

No obstant, aproximacions a nivell genètic van permetre identificar la proteïna Aft1 com el factor transcripcional que induïa l'activació transcripcional d'aquests gens implicats amb la oxidoreducció i posterior transport del ferro dins la cèl·lula (Dancis *et al.*, 1992).

En un mutant simple *aft1* es detecten nivells salvatges d'expressió del gen *FRE1* en condicions de dèficit de ferro, però gairebé indetectables de l'activitat transcripcional de *FRE2*. Aquest fet indica que l'expressió del gen *FRE1* no és necessàriament depenent d'Aft1. De fet, l'unió que Aft1 manté amb el promotor del gen *FRE1* és menys intensa que la que manté amb els altres gens que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro (Yamaguchi *et al.*, 1996).

Aft1 també regula l'expressió del gen *FET3*. Aquesta regulació consisteix en l'unió de la proteïna Aft1 a una regió específica situada en el promotor del gen *FET3* (Yamaguchi *et al.*, 1996). Aquest grup van postular diverses hipòtesis de com el ferro inhibiria la funció transactivadora d'Aft1 sobre el gen *FET3*, fet aplicable a la resta de gens: una possibilitat era que el ferro podria unir-se directament a la proteïna Aft1 i bloquejar-la. O bé, que el ferro podria unir-se a regions properes del gen *AFT1*, produint alteracions en la seva transcripció i en conseqüència defectes en la proteïna. Una altra hipòtesi, també suggeria que el ferro s'uniria als promotors dels gens diana d'Aft1, evitant doncs que Aft1 accedís a ells. No obstant, Hasset *et al.*, (1998) van establir que en condicions anaeròbiques, el Fe^{+2} citosòlic seria la senyal directa o indirecta que provocaria la repressió d'Aft1 i posterior inhibició transcripcional dels seus gens diana.

3.1.3.1.3- LOCALITZACIÓ CEL·LULAR D'*AFT1*.

La regulació de la translocació nucli-citoplasma dels factor transcripcionals és una estratègia utilitzada per les cèl·lules eucariotes com mecanisme de resposta a canvis ambientals. En aquest cas, canvis en la localització nuclear d'Aft1 en resposta a les concentracions de ferro extracel·lulars és un mecanisme clau en la regulació ferro depenent de l'activació transcripcional dels gens implicats en el metabolisme d'aquest metall (Yamaguchi *et al.*, 2002).

3.1.3.1.3.1-IMPORTACIÓ NUCLEAR D'AFT1.

Aft1 és localitzada en el citoplasma en condicions d'excés de ferro extracel·lular i es translocat dins del nucli quant les concentracions d'aquest metall disminueixen (Ueta *et al.*, 2007).

Estudis més exhaustius van permetre caracteritzar **Pse1** com a la **importina**, que unint-se directament a Aft1, regulava la seva entrada dins del nucli.

Paral·lelament, es va descriure una senyal de localització nuclear o senyal d'importació **NLS** (*Nuclear Localisation Signal*) en la seqüència d'Aft1. Aquesta regió està formada per dues senyals NLS (dels aminoàcids 198-225 i 332-365) que contenen seqüències curtes d'aminoàcids bàsics, incloent serines i prolines, potencials aminoàcids indicadors de senyals NLS clàssiques. No obstant però, l'importació d'Aft1 no es duu a terme per les senyals NLS clàssiques.

Pse1 és la importina encarregada de reconèixer de manera independent aquestes dues NLS, on cadascuna d'elles és suficient per l'importació d'Aft1 dins de nucli. La mutació d'una d'aquestes seqüència NLS o de les dues simultàneament provoca la no localització del factor transcripcional dins de nucli, demostrant que ambdues regions NLS són necessàries per l'importació d'Aft1 a través de l'importina Pse1 (Ueta *et al.*, 2003).

El mutant *pse1-1* presenta defectes en l'inducció dels gens regulats per Aft1, provocant consegüentment un desequilibri en la homeòstasi del ferro intracel·lular. Per exemple, en condicions de dèficit de ferro els nivells de mRNA de *FTR1* són molt més baixos en un mutant simple *pse1-1* que en una soca salvatge, degut a la no importació d'Aft1 dins de nucli, fet que impedeix que Aft1 exerceixi la seva funció com a factor transcripcional d'aquets gens (Ueta *et al.*, 2003).

L'accessibilitat i la interacció entre les NLS d' Aft1 i Pse1 no es veu afectada pels nivells de ferro, donat que en condicions riques d'aquest metall, la unió també es realitza amb la mateixa afinitat que en condicions d'escassetat de ferro. Aquest fet indica que els nivells de ferro no són un pas crític en el control de la translocació nucli-citoplasma d'Aft1 (Ueta *et al.*, 2003).

3.1.3.1.3.2- EXPORTACIÓ A CITOPLASMA D'AFT1.

Yamaguchi *et al*, (2002) van determinar que l'exportació nuclear d'Aft1 també és un punt crític en l'activació transcripcional dels gens del sistema d'alta afinitat de captació de ferro.

Pel que fa a l'exportació, s'ha identificat una **NES** (*Nuclear Export Signal*) en la seqüència d'Aft1, situada entre els aminoàcids 99 i 107 de la seva seqüència peptídica. Aquesta NES conté regions hidrofòbiques riques en leucina. Una d'aquestes leucines, juntament amb una valina en posició 105, són indispensables per l'exportació d'Aft1. Mutacions en les regions NES impliquen la no exportació d'Aft1 del nucli. Aquest fet provoca la transcripció constitutiva dels seus gens diana regulats per Aft1 independentment de les concentracions de ferro intracel·lulars que presenta la cèl·lula.

Ueta *et al*, (2007) van caracteritzar a **Msn5** com la **exportina** encarregada de translocar Aft1 del nucli a citoplasma. El reconeixement entre el factor transcripcional Aft1 i l'exportina Msn5 depèn de les concentracions de ferro dins la cèl·lula, a diferència de l'importació que es realitza de manera independent a les concentracions de ferro intracel·lulars (vegeu l'apartat 3.1.3.1.3.1 de l'Introducció d'aquest capítol).

Per part d'Aft1, també s'han identificat dues regions compreses entre els aminoàcids 147-270 i 304-498 implicades en l'interacció amb l'exportina Msn5. Ambdues regions són necessàries per interaccionar amb l'exportina, essent cadascuna d'elles per separat insuficients per provocar l'exportació nuclear d'Aft1 del nucli en condicions d'excès de ferro (Ueta *et al*, 2007).

Concretament, aquestes regions presenten dues serines en les posicions 210 i 224 (dins la regió 147-270) i quatre treonines (en la regió 304-498) directament relacionades amb aquesta exportació. La fosforilació dins de nucli dels residus serina és important per al reconeixement de l'exportina Msn5 i conseqüent exportació d'Aft1. Mutacions en aquestes serines provoquen que Aft1 s'acumuli en nucli, independentment de les concentracions extracel·lulars de ferro. Es desconeix però quina proteïna s'encarrega de fosforilar aquests residus serina. No obstant, aquesta fosforilació però, no és suficient per crear una senyal dependent de ferro que provoqui l'exportació d'Aft1. Finalment, les quatre treonines de l'altra regió d'Aft1 són necessàries per completar aquest reconeixement de l'exportina Msn5 en presència de ferro (Ueta *et al*, 2007).

D'altra banda, a més a més d'aquestes dues importants regions presents en Aft1, s'han descrit que interaccions intermoleculares induïdes pel ferro entre l'extrem N-terminal i C-terminal de la pròpia proteïna Aft1, també són un punt crític pel reconeixement, interacció i exportació del factor transcripcional per part de Msn5. Així doncs, canvis conformacionals en la proteïna Aft1 es troben directament relacionats amb la seva capacitat d'entrar dins nucli sota condicions de déficit de ferro.

També s'ha demostrat que les quatre treonines situades en la regió localitzada entre els aminoàcids 304 i 498, participen en aquestes unions intermoleculares d'Aft1.

La cisteïna en posició 291 dins el motiu ²⁹¹CXC²⁹³ és essencial per la regulació d'Aft1 mediada pel ferro. Aquesta cisteïna 291 és crítica també per a que es donin aquestes unions intermoleculares entre l'extrem N-terminal i l'extrem C-terminal d'Aft1, necessàries per l'exportació nuclear d'Aft1.

Aquest és el motiu per el qual el mutant *AFT1-1^{np}* es localitza exclusivament en nucli. La mutació en la cisteïna 291 evita l'interacció intermolecular entre l'extrem N-terminal i C-terminal d'Aft1. Sense aquest canvi de conformació, l'exportina Msn5 no reconeix la proteïna Aft1. Com a conseqüència d'aquest fet, Aft1 no s'exporta del nucli, induint l'activació constitutiva dels gens que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro (Ueta *et al.*, 2007).

En resum, en condicions d'excés de ferro, l'exportina Msn5 té uns punts crítics i essencials per poder unir-se al factor transcripcional Aft1 i exportar-lo a citoplasma de manera dependent de ferro: per una banda, els canvis conformacionals d'Aft1 originats per les interaccions intermoleculares entre l'extrem N-terminal i C-terminal de la pròpia Aft1. El ferro, la cisteïna en posició 291 i les treonines de la regió 304-498 de la proteïna Aft1 són punts crítics en aquest procés. D'altra banda, les fosforilacions de les serines 210 i 224 situades en la regió 147-270 de la proteïna Aft1 també són importants pel reconeixement de l'exportina Msn5 i la conseqüent exportació nuclear d'Aft1.

En la **Figura 3** es mostra un esquema de les regions d'*AFT1* implicades en l'importació i l'exportació nucli-citoplasmàtica d'Aft1.

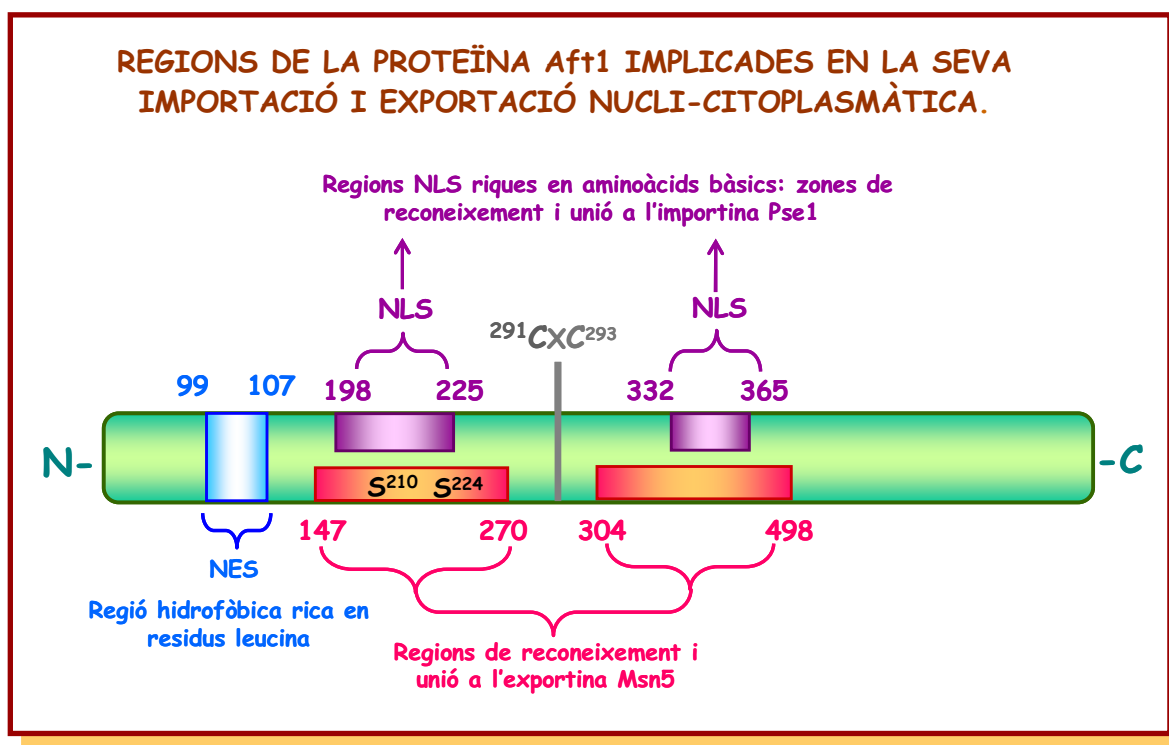


Figura 3- Esquema de les regions d'importació i d'exportació de la proteïna Aft1. En color malva estan indicades les NLS (senyals d'importació o de localització nuclear), regions situades entre els aminoàcids 198-25 i 332- 365 implicades en el reconeixement i unió a l'importina Pse1. En color blau, la seqüència NES o senyals d'exportació nuclear entre els aminoàcids 99-107. Aquesta regió rica en aminoàcids leucina és important per l'exportació d'Aft1 del nucli al citoplasma. En color taronja s'indiquen les regions situades entre els aminoàcids 147-270 i 304-498 implicades en el reconeixement i l'unió de l'exportina Msn5. Indicades en color negre les dues serines en posició 210 i 224 també importants per aquest reconeixement. El motiu ²⁹¹CXC²⁹³, indicat en color gris, marca la posició de la cisteïna 291. Aquesta cisteïna esdevé crítica en les interaccions intermoleculars entre l'extrem N-terminal i C-terminal d'Aft1, que generen els canvis conformationals necessaris per a que l'exportina Msn5 s'uneixi a Aft1 i la transloqui del nucli al citoplasma.

3.1.3.2- AFT2.

La presència d'una activitat transcripcional residual del gen *FET3* en un mutant *aft1*, posaven de manifest indicis de la presència d'un segon factor transcripcional relacionat amb el sistema d'alta afinitat de captació de ferro.

Blaiseu *et al.*, (2001) van descriure en el cromosoma XVI la presència d'una proteïna paràloga a Aft1 i que anomenarem **Aft2**.

3.1.3.2.1- DESCRIPCIÓ MOLECULAR.

Aft2 és una proteïna de 416 aminoàcids i de 47,10 KDa de pes molecular. Presenta un 39% d'homologia amb Aft1, en part degut a que els aminoàcids de la posició 38 a la 285 d'Aft2 són d'ídents als d'Aft1.

Aft2, s'uneix al DNA per la regió N-terminal. Aquest és el domini que més homologia presenta amb Aft1. De la mateixa manera que en Aft1, l'extrem N-terminal d'Aft2 presenta una regió rica en aminoàcids bàsics que conté quatre cisteïnes: C⁸⁶, C¹⁰⁹, C¹⁸⁷ i C¹⁸⁹. Com succeeix amb les cisteïnes C²⁹¹, C²⁹³ d'Aft1, les cisteïnes C¹⁸⁷, C¹⁸⁹ d'Aft2 estan presents en el motiu Cys-X-Cys adjacent al domini d'unió a DNA. Aquestes cisteïnes són possibles llocs d'unió directa amb el ferro. Mutacions en elles confereixen sensibilitat a aquest metall (Rutherford *et al.*, 2003).

En l'extrem C-terminal, el factor transcripcional Aft2 no presenta els dominis rics en glutamina, que en Aft1 li confereixen la funció transactivadora (vegeu l'apartat 3.1.3.1.1 de l'Introducció d'aquest capítol). No obstant, l'activitat transcripcional d'Aft2 sobre els gens relacionats amb la captura de ferro, també depèn de la presència d'aquest metall en el medi extern.

Rutherford *et al.*, (2001) van descriure el mutant **AFT2-1^{pp}**. Aquest mutant es va obtenir a partir de la substitució de la cisteïna en posició 187 per l'aminoàcid fenilalanina. Aquesta substitució d'aminoàcids, de la mateixa manera que passa amb l'al·lel hiperactiu **AFT1-1^{pp}**, induïx l'activació constitutiva dels gens dependents d'Aft2 independentment de les concentracions de ferro intracel·lular

En la **Figura 4** es mostra un esquema de les regions d'**AFT2** descrites prèviament.

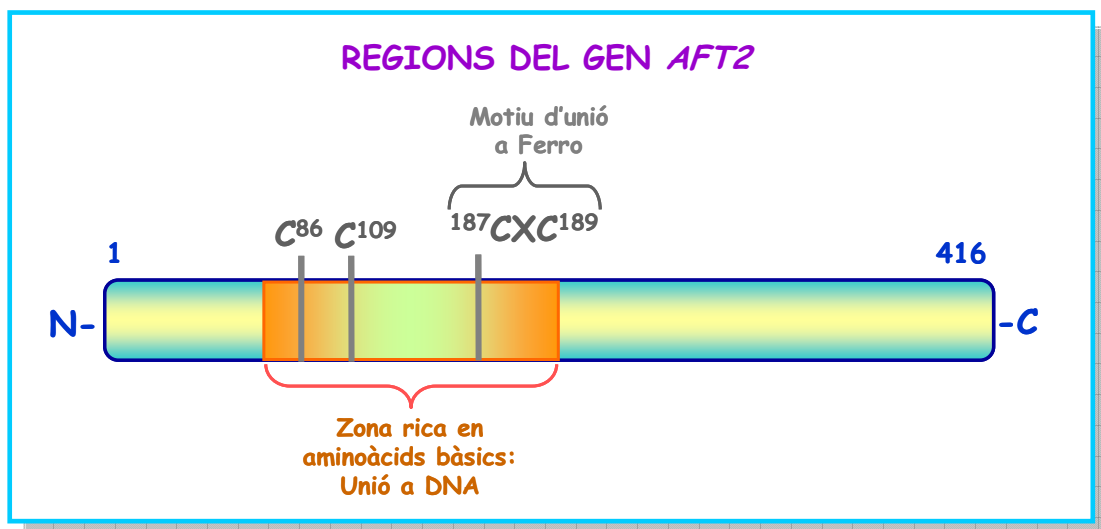


Figura 4- Esquema de les regions del gen

AFT2. En color taronja s'indica la regió d'unió a DNA. En color gris s'indiquen les cisteïnes en les posicions 86, 109, 187 i 189 d'aquesta regió d'unió a DNA. Concretament, el motiu ¹⁸⁷CXC¹⁸⁹ és important pel reconeixement i unió al ferro. La substitució de la cisteïna en posició 187 del motiu

¹⁸⁷CXC¹⁸⁹ per una fenilalanina, dona lloc a l'al·lel *AFT2-1^{np}* que provoca una inducció constitutiva dels gens regulats per Aft2, independentment de les concentracions de ferro en el medi extern.

- . Nom estàndard : **AFT2**
- . Nom sistemàtic: **YPL202W**
- . Cromosoma **XVI**.
- . Factor de transcripció que regula gens relacionats amb l'homeostasi del ferro.
39% d'homologia amb Aft1. Idèntica seqüència dels aminoàcids 38-285 amb Aft1.
- . Tamany (aa): **416**
- . Pes molecular (Da): **47,104**
- . Punt isoelèctric (pI): **9,15**

3.1.3.2.2- ACTIVITAT COM A FACTOR TRANSCRIPCIONAL.

Aft1 i Aft2 són funcionalment similars i presenten funcions solapades però no redundants pel que fa a les vies de control del ferro. Alguns gens regulats per Aft2 són coneguts per ser regulats també per Aft1. No obstant, cadascun d'ells té les seves pròpies dianes d'acció, implicant funcions diferents i en conseqüència provocant diferents efectes sobre la cèl·lula en resposta canvis en els nivells de ferro intracel·lular (Rutherford, *et al.*, 2001).

La finalitat d'ambdós factors transcripcionals seria la de coordinar la transcripció dels gens implicats en la homeòstasi del ferro amb l'objectiu de protegir a la cèl·lula de la toxicitat d'aquest. Per aquest motiu, la presència de dos factors transcripcionals en resposta a ferro confereix avantatges adaptatives a *S. cerevisiae* (Rutherford *et al.*, 2003).

En absència d'Aft1, Aft2 estaria regulant un seguit de gens implicats en la homeòstasi del ferro i de gens relacionats amb els diferents estats d'oxidació d'aquest. A més a més, també regularia els gens implicats en el transport de ferro a l'interior cel·lular i d'altres gens que generen resistència a estrès oxidatiu (Yamaguchi *et al.*, 1995; Rutherford, *et al.*, 2001).

El mutant simple *aft2* és sensible en condicions de dèficit de ferro i té dificultats per créixer en aquestes condicions. No obstant, aquest mutant presenta elevats nivells transcripcionals de *FET3* i *FTR1* mediats per Aft1, fet que acaba compensat aquesta sensibilitat cel·lular del mutant *aft2* (Courel *et al.*, 2005).

El doble mutant *aft1aft2* és incapaz de créixer en condicions de dèficit de ferro en ambients aeròbics. Aquest doble mutant presenta fenotips relacionats amb estrès oxidatiu, com elevada sensibilitat a H₂O₂, toxicitat en presència de cobre i auxotrofia en metionina dependent d'oxigen (Courel *et al.*, 2005). La sobreexpressió d'Aft1, Aft2 o els respectius al·lèls hiperactius però, no permeten restablir aquests fenotips, indicant que el doble mutant *aft1aft2* és molt més sensible a estrès oxidatiu i presenta defectes molt més severes en resposta a dèficit de ferro que els mutants simples *aft1* i *aft2* (Courel *et al.*, 2005). A més a més, el doble mutant *aft1aft2* suprimeix qualssevol activitat residual dels gens com *FET3*, que encara són lleugerament presents en els mutants simples *aft1* i *aft2* (Puig *et al.*, 2005; Courel *et al.*, 2005).

3.1.3.3- SEQÜÈNCIA CONSENS EN ELS PROMOTORS.

Els factors transcripcionals Aft1 i Aft2 regulen l'expressió de *FET3* i *FIT3* a través de la seqüència concens de resposta a ferro (FeRE) situada en els seus promotors: TGCACCC. No obstant, Aft1 reconeix més específicament aquest element concens que Aft2, degut a que Aft1 reconeix directament les bases TGCACCC (Yamaguchi *et al.*, 1996) mentre que Aft2 reconeix les bases G/ACACCC. Aquest fet indica que Aft1 i Aft2 reconeixen un tipus lleugerament diferent de seqüències concens en els respectius promotors que regulen (Courel *et al.*, 2005).

Malgrat aquestes diferències, Aft1 i Aft2 tenen la capacitat d'activar la transcripció gènica unint-se als mateixos promotors FeRE presents en els diversos gens relacionats amb l'homeòstasi del ferro, com els gens *FET3* i *FIT3*. No obstant, l'unió d'aquests factors transcripcionals sobre el mateix promotor pot generar diferents respostes transcripcionals, indicant que Aft1 i Aft2 mantenen especificitat alhora d'activar aquests gens (Rutherford *et al.*, 2003).

Finalment, s'ha descrit que en el promotor d'Aft1 també s'hi troba la seqüència concens d'activació TGCACCC i GGCACCC, que permetria la propia autoregulació d'Aft1, donat que Aft1 s'uneix a aquesta regió. No obstant, es desconeix si Aft2 es pot unir a aquesta seqüència. Per part d'Aft2, no s'ha trobat cap seqüència concens en el seu promotor que permeti aquest tipus d'autoregulació (Courel *et al.*, 2005).

3.1.3.4-DIFERÈNCIES EN LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DELS GENS SOTA CONTROL DELS FACTORS TRANSCRIPCIONALS *AFT1* I *AFT2*.

Tots els gens regulats per Aft1 i Aft2 estan relacionats directe o indirecte amb el metabolisme del ferro. Rutherford *et al*, (2003) van agrupar aquest gens en funció del grau d'inducció per part d'Aft1 i Aft2:

- Gens induïts igualment per Aft1 i Aft2: *FRE6*, *ATX1*, *COT1*.

S'especula que la diferència podria estar en les diverses concentracions de proteïna Aft1 o Aft2 per formar heterodímers o homodímers que s'unirien a les seqüències FeRE presents en aquests gens. Concretament, s'ha descrit que les quantitats de proteïna d'Aft1 o d'Aft2 augmenten en absència de l'altre en condicions de dèficit de ferro (Courel *et al*, 2005).

- Gens amb inducció més elevada en presència Aft1: *FIT3*, *FIT2*, *FTR1*.

Concretament, Aft1 s'uneix molt més al promotor consens de *FTR1* en absència d'Aft2, mentre que *FTR1* és activat directament per Aft2, només quan Aft1 és absent.

- Gens induïts exclusivament per Aft1: *ARN2*, *FTH1*, *HMX1*, *CTH2*, *FRE2*, *FET3*, *FTR1*.

Aft1 s'uneix més fortament al promotor FeRE del gen *FET3* que Aft2. A més amés, la transcripció de *FET3* es veu més augmentada en absència d'Aft2 (Courel *et al*, 2005).

- Gens induïts exclusivament per Aft2: *BNA2*, *ECM4*, *SFM3*, *MSR4*, *SNF3* i *ISU1*.

Aquests gens estan relacionats amb la homeòstasi de ferro en la mitocondria i en la vacuola (Courel *et al*, 2005). En aquest cas, Aft2 juga un paper molt important en la movilització del ferro intern emmagatzemat en vacuoles, orgànuls molt importants per la reutilització del ferro (Rutherford, *et al*, 2001).

- Gens induïts en el mutants hiperactius *AFT1-1^{hp}* o *AFT2-1^{hp}*:

FIT2, *FIT3*, *FRE3*, *FET5* i *FTH1* estan altament induïts en l'al.lel hiperactiu *AFT2-1^{hp}* (Li *et al*, 2001), mentre que *FIT3* i *FET3* es troben més fortament induïts per l'al.lel hiperactiu *AFT1-1^{hp}*, malgrat contenir les seqüència FeRE regulades per ambos factots transcripcionals

La **Figura 4**, mostra un resum adaptat de Rutherford *et al* (2003) dels diversos gens induïts per Aft1 i Aft2 respectivament.

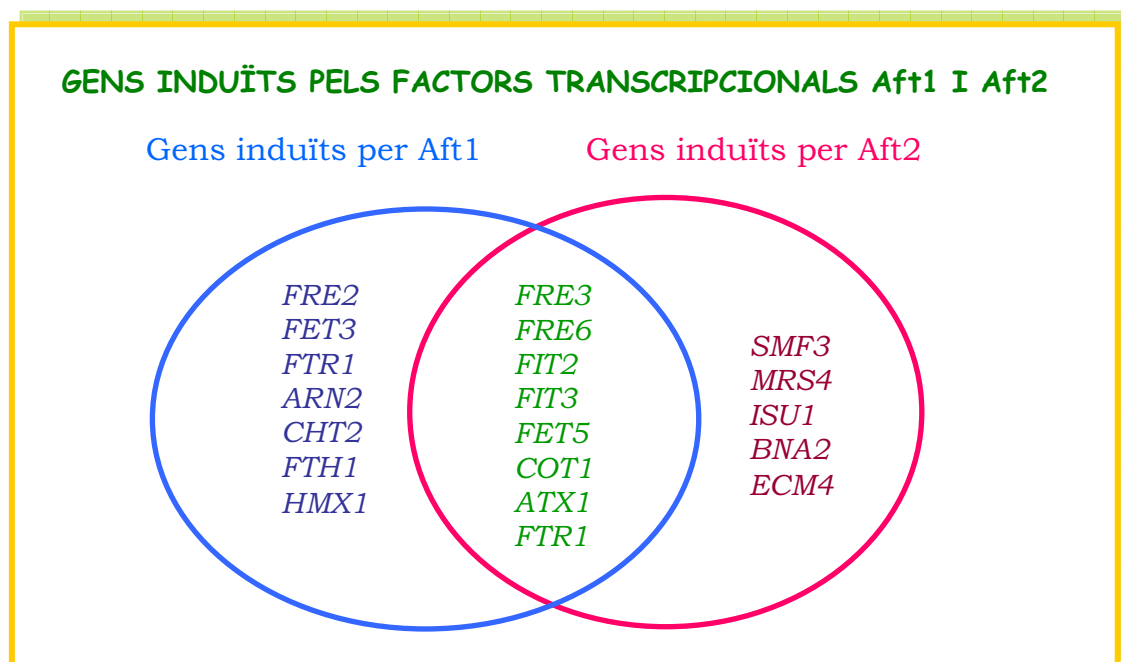


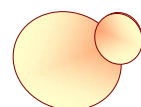
Figura 4- Resum dels gens induïts pels factors transcripcionals Aft1 i Aft2. En blau s'engloben els gens principalment regulats per Aft1. En vermell, els gens principalment regulats per Aft2. Els gens solapats entre els dos cercles, escrits en color verd, representen els gens que són activats per ambdos factors transcripcionals (Esquema adaptat de Rutherford *et al.*, (2003)).

En conclusió, els factors transcripcionals Aft1 i Aft2 presenten funcions redundants pel que fa al control dels gens implicats en la homeòstasi del ferro. No obstant, cadascun d'ells també presenta funcions específiques dins d'aquesta regulació, implicant importants diferències entre ambdos factors transcripcionals (Courel *et al.*, 2005).

Les últimes dades experimentals publicades indiquen que Aft1 activa específicament gens relacionats amb la captació de ferro extracel·lular: *FET3*, *FRE2*, *ARN2* o *FTR1*, mentre que Aft2 activa específicament gens relacionats amb l'utilització i compartimentalització del ferro en mitocondria i vacuola com: *SMF3*, *MRS4* o *ISU1* (Rutherford *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2003; Courel *et al.*, 2005). Aquest fet explica la presència en *S.cerevisiae* de dos factors transcripcionals seqüencialment tant homòlegs, però amb certa especificitat funcional.

Aft1 i Aft2 tindrien una especialització funcional en el control de la homeòstasi del ferro, aportant en les cèl·lules una major flexibilitat al canvi. D'aquesta manera es permet que les cèl·lules s'adaptin millor a les condicions del medi extern (Courel *et al.*, 2005).

3.2- ANTECEDENTS I OBJECTIUS



3.2.1-ANTECEDENTS.

La cèl·lula eucariota està exposada a gran nombre de canvis ambientals i necessita desenvolupar diverses estratègies per respondre i adaptar-se a les situacions d'estrès. Tan el metabolisme aeròbic cel·lular com substàncies alienes a la cèl·lula generen espècies reactives d'oxigen (ROS) com els anions superòxid, els radicals hidroxil o el pèroxid d'hidrogen, els quals causen estrès oxidatiu i provoquen dany cel·lular (Zagarese *et al.*, 2001; Brant *et al.*, 2004).

Les glutaredoxines són un dels sistemes enzimàtics que ha desenvolupat *Saccharomyces cerevisiae* per pal·liar els danys provocats en les proteïnes degut a l'estrès oxidatiu (Herrero i de la Torre *et al.*, 2006). Dins del grup de les glutaredoxines monotioliques, es desconeix el paper funcional que juguen les proteïnes Grx3 i Grx4 en la defensa cel·lular davant estrès oxidatiu.

Analitzant la base de dades de *Saccharomyces cerevisiae* (www.yeastgenome.org), estudis de Doble Híbrid en massa mostraven que Grx3 interaccionava *in vivo* amb Aft1 (Uetz *et al.*, 2000). Aft1 és un factor transcripcional que participa en la homeòstasi del ferro mitjançant la regulació d'un grup de gens que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro (Yamaguchi *et al.*, 1995). Aquests gens estan implicats en els processos de captura, transport, compartimentalització i ús del ferro, element essencial per la cèl·lula donat que forma part com a cofactor de multitud de processos intracel·lulars (Puig *et al.*, 2005).

Grx3 i Grx4 es localitzen majoritàriament dins del nucli (Molina *et al.*, 2004) i presenten un paper detoxificador en resposta a estrès oxidatiu.

Aft1, factor transcripcional que interacciona amb Grx3, s'encarrega de regular els nivells de ferro intracel·lulars, metall que en elevats nivells dins la cèl·lula reacciona amb l'oxigen, via reacció de Fenton, provocant la formació de radicals hidroxil que acaben oxidant i danyant a les biomolècules com el DNA, els lípids o les proteïnes (Halliwell i Guttering, 1988).

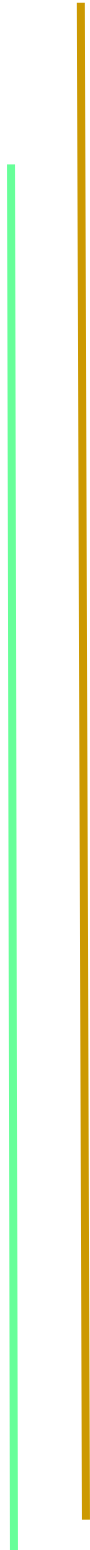
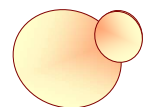
Tots aquets antecedents apuntaven al factor transcripcional Aft1 com a candidat per ser regulat per les glutaredoxines Grx3 i Grx4.

3.2.2-OBJECTIUS.

1. Caracteritzar el paper funcional de les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 de *Saccharomyces cerevisiae* en la resposta cel.lular davant estrés oxidatiu a través de la possible funció reguladora sobre el factor transcripcional Aft1.

2. Utilitzar *Saccharomyces cerevisiae* com un model cel.lular per l'estudi de l'estrés oxidatiu endògen induït per una desregulació en l'homeòstasi del ferro.

3.3- ARTICLE 1



Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*

Nuria Pujol-Carrion¹, Gemma Belli¹, Enrique Herrero¹, Antoni Nogues² and Maria Angeles de la Torre-Ruiz^{1,*}

¹Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Lleida 25198, Spain

²Servei d'anàlisis clíniques, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida 25192, Spain

*Author for correspondence (e-mail: madelatorre@cmb.udl.es)

Accepted 23 August 2006

Journal of Cell Science 119, 4554-4564 Published by The Company of Biologists 2006
doi:10.1242/jcs.03229

Summary

Grx3 and Grx4, two monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae*, regulate Aft1 nuclear localisation. We provide evidence of a negative regulation of Aft1 activity by Grx3 and Grx4. The Grx domain of both proteins played an important role in Aft1 translocation to the cytoplasm. This function was not, however, dependent on the availability of iron. Here we demonstrate that Grx3, Grx4 and Aft1 interact each other both *in vivo* and *in vitro*, which suggests the existence of a functional protein complex. Interestingly, each interaction occurred independently on the third member of the complex. The absence of both Grx3 and Grx4 induced a clear enrichment of G1 cells in asynchronous cultures, a slow growth phenotype, the accumulation of intracellular iron and a constitutive activation of the genes regulated by Aft1. The *grx3grx4* double mutant was highly sensitive to

the oxidising agents hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide but not to diamide. The phenotypes of the double mutant *grx3grx4* characterised in this study were mainly mediated by the Aft1 function, suggesting that *grx3grx4* could be a suitable cellular model for studying endogenous oxidative stress induced by deregulation of the iron homeostasis. However, our results also suggest that Grx3 and Grx4 might play additional roles in the oxidative stress response through proteins other than Aft1.

Supplementary material available online at
<http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/119/21/4554/DC1>

Key words: Grx3, Grx4, Oxidative stress, Iron homeostasis, Aft1, Cell cycle

Introduction

Cells are exposed to a number of environmental changes and must therefore develop different strategies to respond and adapt to the various resulting stresses. Aerobic metabolism gives rise to reactive oxygen species (ROS), such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl ions (Cadenas, 1989), which provoke oxidative stress and cause damage to cells (Aruoma et al., 1991). As a consequence, cells need to develop a series of different mechanisms to protect themselves from the harmful reactive oxygen species (Poyton, 1999). Iron is an essential element for all organisms and appropriate iron homeostasis is required to prevent the impairment of cellular functions caused by excesses or deficiencies of this metal. Iron is also required in a number of essential proteins related to respiratory chain reactions, and it plays an essential role in at least one electron chain reaction (Arredondo and Núñez, 2005). An excess of iron can be very toxic for cells because it generates free radicals that may oxidise and damage DNA, lipids and proteins (Halliwell and Gutteridge, 1991). Iron deficiency, on the other hand, is responsible for several health problems including anaemia (Beard, 2001) and both neuronal (Ortiz et al., 2004) and immunological alterations. In *Saccharomyces cerevisiae*, the transcription factor Aft1 regulates a subset of genes defined as the high-affinity iron-uptake regulon (Yamaguchi-Iwai et al., 1995; Casas et al., 1997). This group comprises genes involved

in the uptake, compartmentalisation and use of iron. Aft1 binds to specific promoter regions and induces expression of the iron regulon in conditions of iron depletion (Yamaguchi-Iwai et al., 1996). In a subsequent study, Yamaguchi-Iwai and co-workers (Yamaguchi-Iwai et al., 2002) reported that Aft1 responds to iron availability by changing its intracellular localisation. This means that under iron-replete conditions Aft1 localises to the cytoplasm, but under conditions of iron starvation Aft1 translocates to the nucleus. Even so, the transcriptional activity of Aft1 is determined by its nuclear localisation regardless of the iron intracellular status.

Another physiological effect of the intracellular iron accumulation mediated by Aft1 is cell-cycle arrest. Philpott and co-workers (Philpott et al., 1998) reported that the expression of an *AFT1*-up allele induces iron accumulation, and as a consequence, cells arrest in G1 at START. Constitutive activation of the iron-responsive regulon resulting from constant transcriptional induction driven by Aft1 therefore causes a reduced expression of the G1 cyclins, Cln1 and Cln2. One of the physiological effects derived from this accumulation of iron in cells affects cell-cycle progression in a similar way to that previously described for other environmental stresses, including heat shock and oxidative and nutritional stress (Cross, 1995; Lee et al., 1996).

Aft2 is another transcription factor required for iron

homeostasis and resistance to oxidative stress in the absence of Aft1 function (Blaiseau et al., 2001). Aft2 also activates transcription of specific genes in response to low iron conditions (Rutherford et al., 2001; Rutherford et al., 2005). A recent study has demonstrated that Aft2 acts in the absence of Aft1 (Courel et al., 2005) and that the transcriptional function of both proteins is iron-dependent. DNA microarray clustering has revealed that both Aft1 and Aft2 share the regulation of a number of iron-responsive genes. However, there is a group of genes related to iron homeostasis whose regulation depends on Aft2 but not on Aft1.

In proteins, cysteine residues are very susceptible to oxidation. Living cells contain regulatory proteins that are involved in maintaining the redox states of oxidised proteins (Rietsch and Beckwith, 1998; Carmel-Harel and Storz, 2000; Grant, 2001). Monothiol glutaredoxins are thiol oxidoreductases, which require the reduced form of glutathione, GSH, as an electron donor to reduce protein-glutathione disulfides (Holmgren, 1989; Holmgren and Aslund, 1995; Grant, 2001; Herrero and Ros, 2002).

In *Saccharomyces cerevisiae*, three different monothiol glutaredoxins, Grx3, Grx4 and Grx5 (Rodríguez-Manzanique et al., 1999), have been described to date. Grx5 plays a role in the biogenesis of iron/sulphur clusters at the mitochondria and its function has been extensively characterised (Rodríguez-Manzanique et al., 1999; Rodríguez-Manzanique et al., 2002; Bellí et al., 2002). Recent reports have demonstrated that Grx3 and Grx4 both localise to the nucleus (Lopreiato et al., 2004; Molina et al., 2004).

In this study we describe a function for Grx3 and Grx4 in the cellular iron homeostasis through the regulation of the nuclear localisation of Aft1. At the time of submission of this manuscript, one study was accepted in press (Ojeda et al., 2006), which contained a number of similarities with respect to the present one. Both studies demonstrate the interaction between Aft1 and the monothiol glutaredoxins Grx3 and Grx4, and also that in the absence of both Grx3 and Grx4, the genes regulated by Aft1 are constitutively induced. Here we analyse the consequences of this regulation in the transcriptional response mediated by Aft1 and hypothesise a possible mechanism by which Grx3 and Grx4 might regulate Aft1 translocation from the nucleus to the cytoplasm. In addition, we also demonstrate a physical nuclear interaction between Grx3, Grx4 and Aft1, which could reflect the functional specific regulation of Aft1 by both monothiol glutaredoxins. The simultaneous absence of both Grx3 and Grx4 proteins had a pronounced effect on cell-cycle progression, the rate of cell growth and sensitivity to oxidising agents. Hence, Grx3 and Grx4 might regulate the oxidative status of the cell by regulating iron homeostasis in iron-rich conditions.

Results

Grx3 and Grx4 are required for the cellular response to oxidative stress

Since both Grx3 and Grx4 are monothiol glutaredoxins we wondered whether they each could play a role in reducing oxidised proteins and therefore in the oxidative stress response. In order to answer this question we assayed sensitivity to various oxidant agents in *grx3*, *grx4*, *grx3grx4* and wild-type strains. We took aliquots from each of the cell cultures growing exponentially and spotted them on plates containing different concentrations of hydrogen peroxide, t-butylhydroperoxide and diamide. We obtained very encouraging results, although neither of the single mutants was substantially sensitive to the oxidising agents hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide, however, the double mutant turned out to be very sensitive to both agents compared with wild-type cells (Fig. 1). Interestingly, none of the mutants tested was sensitive to diamide. From this result we deduced that both Grx3 and Grx4 are required for cells to respond to certain types of oxidative stress and that both glutaredoxins perform additive functions in protecting against oxidation.

Both Grx3 and Grx4 interact in vivo and in vitro with Aft1 in the nucleus

In an attempt to further characterise the function of both Grx3 and Grx4 glutaredoxins, we searched the SGD database and found a possible interaction between Grx3 and Aft1. This interaction turned out to be quite interesting for several reasons: (1) Aft1 is a transcription factor involved in the high affinity system for iron capture, and misregulation of iron inside cells is an important cause of oxidative stress (Gakh et al., 2006); (2) Glutaredoxins are molecules that detoxify oxidised residues; (3) it has recently been reported that Grx3 and Grx4 localises in the nucleus and Aft1 operates in the nucleus by inducing the transcription of a subset of genes required for iron uptake. As a result, Aft1 proved a suitable candidate as a substrate for Grx3 and/or Grx4.

We first constructed a number of plasmids to perform two-hybrid analysis between Grx3 and Aft1, Grx3 and Grx4, and Grx4 and Aft1. We obtained a clear result: the existence of strong in vivo interactions in the nucleus between Grx3 and Aft1, Grx3 and Grx4 and Aft1 and Grx4 (Fig. 2A). We wondered whether Grx3 and Grx4 were precluding the interaction of the other glutaredoxin with the transcriptional factor Aft1. In an attempt to gain a clearer picture of this interaction we therefore performed two-hybrid assays between Grx4 and Aft1 in *grx3* background, between Grx3 and Aft1 in *grx4* mutant cells and between Grx3 and Grx4 in *aft1* background (Fig. 2C). We subsequently observed that: (1) in the absence of Grx3, Grx4 still interacted with Aft, (2) in the

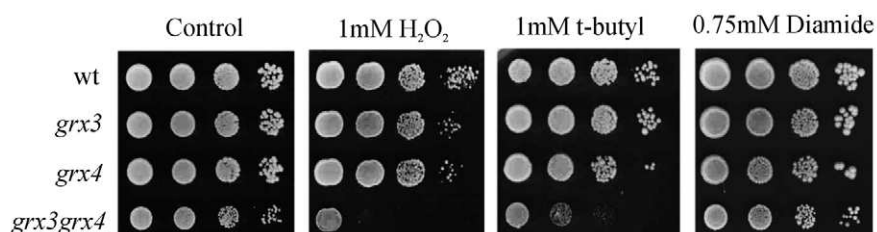


Fig. 1. Grx3 and Grx4 are required for survival upon treatment with hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide. Exponentially growing cells from wild-type, *grx3*, *grx4* and *grx3grx4* strains were harvested, serially diluted and spotted onto control SD plates or on SD plates containing 1 mM H₂O₂, 1 mM t-butylhydroperoxide or 0.75 mM diamide. Plates were incubated at 30°C for 3 days.

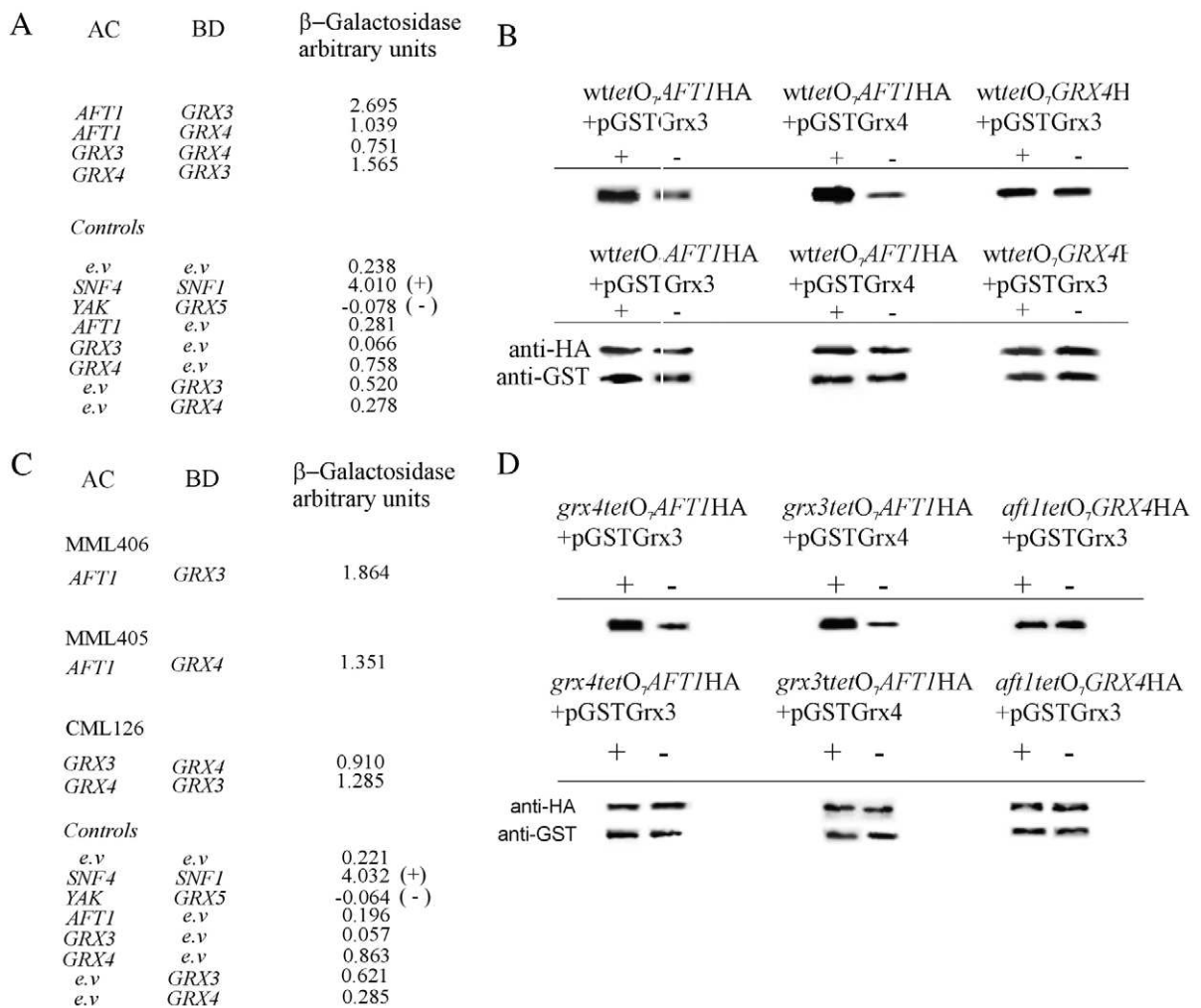


Fig. 2. In vivo and in vitro interaction of Grx3 and Aft1, Grx4 and Aft1 and Grx3 and Grx4. (A) Two-hybrid analyses for the following interactions: Grx3 with Aft1, Grx4 with Aft1 and Grx3 with Grx4. Values for interaction between *SNF4* and *SNF1* were used as a strong positive control for nuclear interaction (+). Values obtained from the nuclear interaction between *YAK1* and *GRX5* were used as a positive control for weak nuclear interaction (-). *e.v.*, empty vector. (B) Pull-down assays between Grx3 and Aft1, Grx4 and Aft1, Grx3 and Grx4. To detect these interactions, total protein extracts were obtained and subsequently bound to GST beads. In this first step we isolate either Grx3 or Grx4. To detect the second protein component of the complex, we tagged either Aft1 or Grx4 with the HA epitope and detected its presence by western blot with anti-HA antibody. As a loading control, we used anti-GST or anti-HA antibodies in aliquots taken from the same protein extracts. (C) Two-hybrid assay between: Grx3 and Aft1 in the *grx4* mutant MML406; Grx4 and Aft1 in the *grx3* strain MML405; Grx3 and Grx4 in the *aft1* mutant CML126. +, positive control; -, negative control; *e.v.*, empty vector. We performed a control for each of the backgrounds assayed, but for simplicity and because the three values were almost identical, the average values are shown. (D) Pull-down assays between Aft1 and Grx3 in the *grx4* mutant; between Aft1 and Grx4 in the *grx3* mutant; and Grx3 and Grx4 in the *aft1* background.

absence of Grx4, Grx3 interacted with Aft1; and (3) Grx3 and Grx4 also interacted in the absence of Aft1 (Fig. 2C). These results suggested that Grx3 and Grx4 both regulate Aft1 and also that Grx3, Grx4 and Aft1 form a complex and each of the three proteins interact with each other independently.

These interactions were confirmed by pull-down assays in all the mutants detailed above (Fig. 2B,D). We used ferrocene to sequester iron because in iron-limiting conditions Aft1 translocates to the nucleus. The addition of ferrocene produced a higher degree of isolation of the Aft1-Grx3 and Aft1-Grx4 complexes, but the complex formed between Grx3 and Grx4 did not vary. This indicated that Grx3 and Grx4 interact with Aft1 in the nucleus and that the greater the presence of Aft1 in

the nucleus the greater the interaction with Grx3 and Grx4. This led us to conclude that the interaction between Grx3 and Grx4 with Aft1 was only limited by Aft1 cellular localisation. Another relevant finding was that the physical binding between Grx3 and Grx4 in the nucleus was not dependent on either the availability of iron or the presence of Aft1.

Grx3 and Grx4 negatively regulate the transcriptional function of Aft1 in the nucleus

In view of the previously mentioned results we decided to investigate the functional significance of the interaction between Grx3, Grx4 and Aft1. Since Aft1 regulates the transcription of the high-affinity iron uptake genes, we decided

to select two of the genes whose transcriptional control is tightly regulated by Aft1: *FIT3* and *FET3*. *FIT3* encodes a mannoprotein involved in the retention of siderophore iron in the cell wall whose transcription is regulated by Aft1 (Philpott et al., 2002). *FET3* is a ferro-O₂-oxidoreductase required for high-affinity iron uptake and is located in the plasma membrane (De Silva et al., 1995; Rutherford et al., 2003).

Under conditions in which there is an excess of iron in the culture medium, neither of the two genes is transcriptionally induced but when iron concentration is a limiting factor in the external medium, Aft1 induces the expression of these genes. We used ferrocene, an iron-chelating agent, in order to mimic an environmental situation in which there was an iron deficiency. We then performed northern blot analysis in different backgrounds: *grx3*, *grx4*, *grx3grx4* and wild-type cells and used *FIT3* and *FET3* as probes. In Fig. 3 we observed how the addition of ferrocene to the culture medium gradually induced a very pronounced expression of these genes in wild-type, *grx3* and *grx4* backgrounds with respect to the basal level. In both single mutants: *grx3* and *grx4*, the constitutive mRNA levels of both *FIT3* and *FET3* genes were higher than those determined in wild-type cells; this indicated a negative regulation of each Grx3 and Grx4 on the Aft1 transcriptional function. However, the most revealing result was that obtained with the double mutant *grx3grx4*: both *FIT3* and *FET3* genes were constitutively induced with similar levels of expression in untreated cells and in cells treated with ferrocene (Fig. 3). These observations were in line with the previously mentioned results in which we observed that the glutaredoxins interacted and regulated Aft1 independently of each other, but that the two acted together in the regulation of Aft1 function in the nucleus. To ascertain whether the transcriptional upregulation detected in the *grx3grx4* double mutant was specifically Aft1 dependent, we constructed the *grx3grx4aft1* triple mutant and observed that in this background neither the *FET3* or *FIT3* transcriptional level was detectable at time 0 (exponentially growing cultures not treated with ferrocene): this was similar to that observed in the case of the *aft1* null mutant (Fig. 3). This led us to conclude that the very high constitutive expression levels of *FIT3* and *FET3* observed in the *grx3grx4* double mutant were due to Aft1 gene regulation and that Grx3 and Grx4 consequently negatively regulate the Aft1 transcriptional function regardless of iron availability.



Fig. 3. Grx3 and Grx4 negatively regulate the expression of *FIT3* and *FET3* in a manner dependent on Aft1 activity. Cells from the following strains: wild type, *grx3*, *grx4*, *grx3grx4*, *aft1* and *grx3grx4aft1*, were exponentially grown in SD medium plus amino acids, at 30°C, then treated with 2 mM ferrocene. Samples were taken after 4 and 8 hours as indicated. Samples were taken for mRNA isolation and northern blot using *FIT3* and *FET3* as probes, *U2* was detected as a loading control.

The existence of a low-affinity system for iron uptake, regulated mainly by Aft2 has already been widely documented. In the absence of Aft1, Aft2 induces the expression of the iron regulon of genes under conditions of iron limitation. Moreover, the expression levels of *FET3* and *FIT3* remarkably increased upon ferrocene treatment in both *aft1* and *grx3grx4aft1* strains, in a similar fashion as in wild-type cells (Fig. 3). These results are in accordance with a model in which Aft2 drives the expression of the iron regulon when iron constitutes a limiting factor in the culture medium and when Aft1 is not functional. It also suggests that Grx3 and Grx4 do not regulate the Aft2 function, but further studies are required to validate this model.

The absence of Grx3 and Grx4 do not influence the mRNA levels of Aft1

One possible interpretation of the results presented above is that Grx3 and Grx4 could have regulated the transcriptional levels of *AFT1*: this would lead to the increase in Aft1 protein levels and consequently to the transcriptional induction of the genes regulated by Aft1. We decided to perform northern blot analysis using samples from the wild-type, *grx3grx4*, *aft1*, *grx3grx4tetO₇Grx3HA*, *grx3grx4tetO₇Grx4HA*, *grx3grx4tetO₇Grx3HA+pGSTGrx4* and *tetO₇Grx4HA+pGSTGrx3* strains and using the probe *AFT1*. We observed (Fig. 4) that the mRNA levels in *AFT1* were independent of the presence or absence of Grx3 and Grx4. We therefore conclude that neither Grx3 nor Grx4 regulated the expression of *AFT1*.

The absence of Grx3 and Grx4 causes a growth and cell-cycle defect as a consequence of Aft1 upregulation. In the course of this study we observed that the double mutant *grx3grx4* presented a marked growth defect. This consisted of a much longer generation time (135 minutes) than that observed in wild-type cells (90 minutes in SD medium growing at 30°C) and also a curious accumulation of G1 cells in exponentially growing cells (Fig. 5). Since Aft1 overexpression also induces a delay in the G1 phase of the cell cycle (see Fig. 5) and we have demonstrated that both proteins negatively regulate Aft1 function, we wondered whether the cell-cycle phenotype observed in the *grx3grx4* double mutant was another consequence of Aft1 misregulation. When we measured the growth rate in the triple mutant *grx3grx4aft1* we

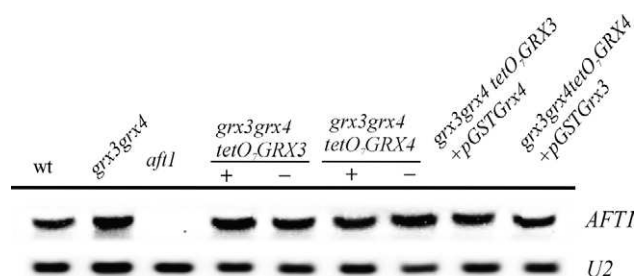


Fig. 4. *AFT1* RNA levels are not regulated by Grx3 nor Grx4. Northern blot analysis of *AFT1* expression levels in the wild type, *grx3grx4* and *aft1* mutants and under conditions of overexpression of Grx3, Grx4, or both. Overexpression of Grx3 and Grx4 was driven by the *tetO₇* or by the *ADHI* promoter (pGSTGrx3 or pGSTGrx4) as stated. To regulate gene expression under the *tetO₇* promoter, we added (+) or not (-) 20 µg/ml doxycycline to the culture media.

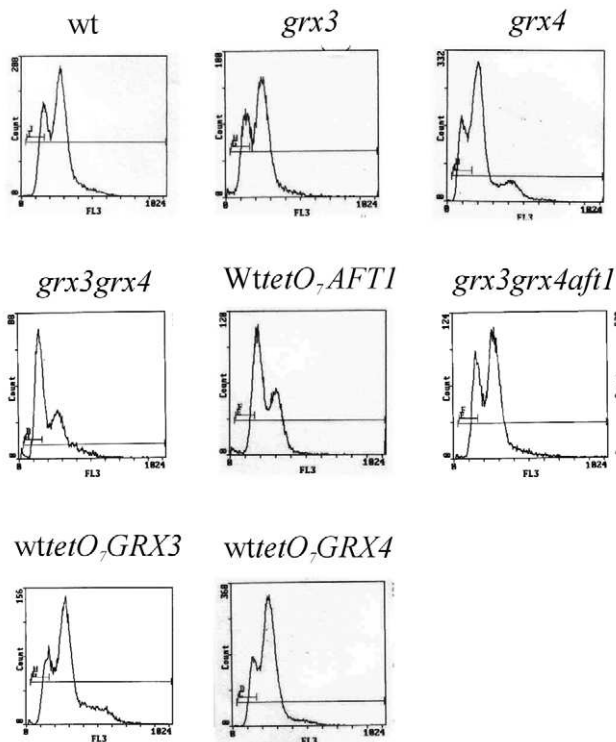


Fig. 5. The simultaneous absence of Grx3 and Grx4 induces accumulation of cells in G1. FACS profiles of different strains growing exponentially in SD medium plus amino acids. The strains are: wild type, *grx3*, *grx4*, *grx3grx4*, wild type overexpressing Aft1, *grx3grx4aft1*, wild type overexpressing Grx3 and wild type overexpressing Grx4. All the proteins tested were overexpressed under the *tetO₇* promoter.

observed that it was similar to that in wild-type cells (90 minutes of generation time in SD medium growing at 30°C). We also observed that the FACS profile of *grx3grx4aft1* was similar to that of wild-type cells in which the 2N DNA content of the population had been enriched in comparison with the 1N content. This was characteristic of the wild-type background used in this study. As expected, the absence of only Grx3 or Grx4 proteins did not affect cell-cycle progression nor did the overexpression of each of both proteins (Fig. 5). These results suggest that both the growth defects and cell-cycle defects observed in the *grx3grx4* double mutant were mediated by Aft1 activity.

Grx3 and Grx4 are involved in the regulation of iron homeostasis through Aft1

We then decided to investigate whether the Aft1 upregulation observed in this study in the absence of Grx3 and Grx4 would affect the concentration of intracellular iron. We measured total iron concentration in wild-type, *grx3*, *grx4*, *grx3grx4* and *aft1grx3grx4* strains. As shown in Fig. 6, in both *grx3* and *grx4* single mutants, total iron concentration significantly increased with respect to that recorded in wild-type cells, but it was in the double mutant that the highest intracellular iron levels were detected. Interestingly, in the triple *aft1grx3grx4* mutant the intracellular iron concentration was equivalent to that detected in wild-type cells, which clearly indicates that the iron

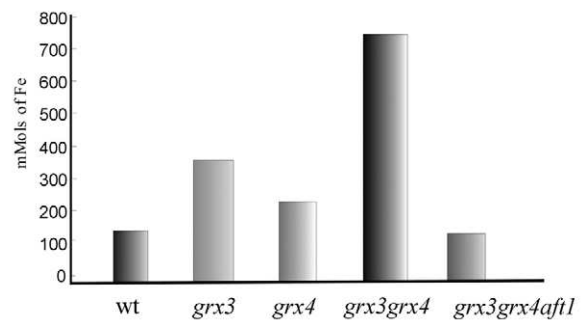


Fig. 6. Total iron accumulates in the cell in the absence of Grx3 and Grx4. Total iron concentration was spectrophotometrically determined as described in the Materials and Methods in exponentially growing cultures of wild-type, *grx3*, *grx4*, *grx3grx4* and *grx3grx4aft1* strains. Numerical values represented in the histograms of the figure are averages from three experiments. In all cases standard errors were lower than 10, therefore no error bars are distinguished.

accumulation observed in the absence of both Grx3 and Grx4 is a consequence of Aft1 activity. Therefore, we conclude that one cellular consequence of Aft1 upregulation in the *grx3grx4* mutant is the accumulation of intracellular iron.

It has already been demonstrated that the accumulation of iron inside cells provokes oxidative stress through the Fenton reaction, which releases hydroxyl radical to the cytoplasm. Bearing this in mind, we decided to investigate whether the greatest sensitivity to oxidant agents observed in the *grx3grx4* double mutant was the consequence of the upregulation of the genes governing iron uptake driven by Aft1. To determine this, we first tested sensitivity to various oxidant agents in the following strains: wild type, *grx3grx4*, *aft1* and *grx3grx4aft1*, and observed that the very high sensitivity of the *grx3grx4* double mutant to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide was only partly recovered to wild type levels upon *aft1* deletion (Fig. 7A). In order to further characterise whether the abrogation of sensitivity in the *grx3grx4aft1* triple mutant was due to iron accumulation, we decided to treat cells with hydrogen peroxide in the presence of ferrocene. The presence of the iron chelator abrogated most of the sensitivity to the oxidising agent observed in the *grx3grx4* double mutant (Fig. 7B). These data indicated that the phenotype of oxidative stress sensitivity characteristic of *grx3grx4* is at least in part, due to the accumulation of high levels of iron inside cells as a consequence of Aft1 upregulation. However, other specific functions not mediated by Aft1 must also be regulated by Grx3 and Grx4 within the oxidative stress response.

Grx3 and Grx4 regulate Aft1 compartmentalisation

Some authors have reported that the Aft1 function was determined by its nuclear localisation because the iron regulon of genes dependent on Aft1 was constitutively induced in a mutant of the protein permanently located in the nucleus (Yamaguchi-Iwai et al., 2002). We therefore wondered whether the upregulation of *FET3* and *FIT3* detected in the *grx3grx4* strain was also the consequence of Aft1 translocation to the nucleus. To check this, we constructed a GFP-Aft1 fusion protein in a multicopy plasmid to monitor, in vivo, the cellular localisation of the protein by fluorescence microscopy. In wild-

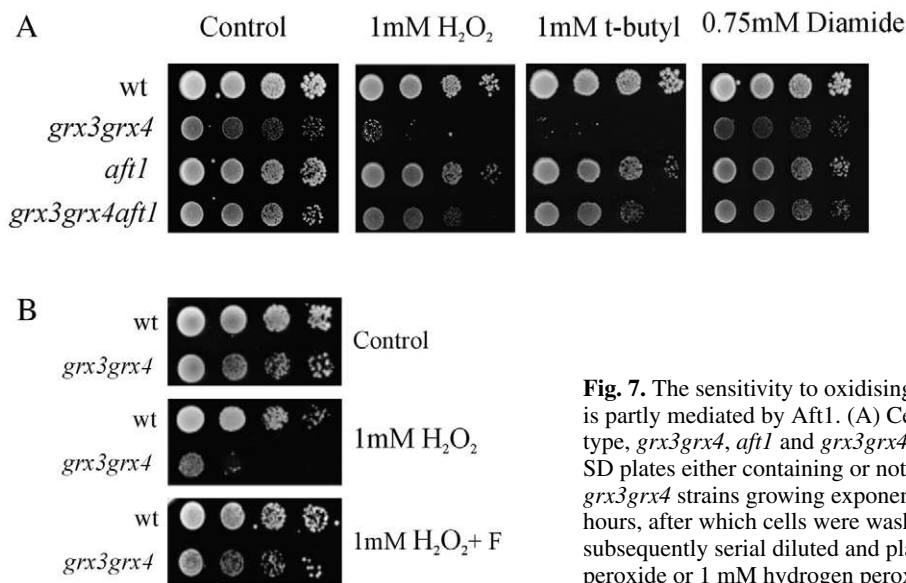


Fig. 7. The sensitivity to oxidising agents observed in the *grx3grx4* double mutant is partly mediated by Aft1. (A) Cells from exponentially growing cultures of wild-type, *grx3grx4*, *aft1* and *grx3grx4aft1* strains were serially diluted and spotted onto SD plates either containing or not oxidising agents as in Fig. 1. (B) Wild-type and *grx3grx4* strains growing exponentially were treated with 2 mM ferrocene for 6 hours, after which cells were washed and placed in fresh medium to be subsequently serially diluted and plated on SD plates containing 1 mM hydrogen peroxide or 1 mM hydrogen peroxide plus 150 μ M ferrocene (F).

type cells, Aft1 was dispersed throughout the cell (Fig. 8A, panel 1) whereas in the *grx3grx4* mutant, Aft1 was permanently located in the nucleus, as demonstrated by DAPI staining (Fig. 8B, panel 2). This finding is in accordance with the results shown in this study and explains the constitutive upregulation of *FIT3* and *FET3* detected in the *grx3grx4* double mutant.

The next question to investigate was whether Grx3 and Grx4 regulated the nucleus-cytoplasm Aft1 localisation. We designed an *in vivo* experiment that allowed us to determine how the two monothiol proteins regulated Aft1 nuclear localisation. To do this, we constructed two double conditional mutants. In the first, Grx3 was regulated by the *tetO₇* promoter, so that the addition of doxycycline would inhibit Grx3 expression and the release of doxycycline would induce Grx3 overexpression. The second double mutant was similar to the first, but with the difference that the regulated protein under the *tetO₇* promoter was Grx4. When we checked the transcriptional regulation of *FET3* we observed that there was a very high expression of this gene in samples taken from both mutants when they were exponentially grown in the presence of doxycycline. This was similar to what we observed in samples taken from the double mutant *grx3grx4* (Fig. 8B, lines 2, 5 and 7). Furthermore, under these conditions, Aft1 was located in the nucleus in all three cell populations (not shown). Upon removal of doxycycline, Grx3 protein was overexpressed and in this context Aft1 was partly translocated to the cytoplasm (Fig. 8A, panel 3) whereas expression of *FET3* diminished (Fig. 8B, line 6). We repeated this assay with the second strain, in which the regulatable protein was Grx4, and obtained qualitatively identical results (Fig. 8A, panel 4 and Fig. 8B, line 8). This result indicated that expression of either Grx3 or Grx4 was sufficient to allow the Aft1 translocation from the nucleus to the cytoplasm. We reasoned that if both Grx3 and Grx4 inhibited the importation of Aft1 to the nucleus, the treatment with ferrocene (which induces Aft1 nuclear translocation) in conditions of Grx3 and Grx4 overexpression, should impair Aft1 translocation to the nucleus. To test this

hypothesis we simultaneously overexpressed Grx4 and Grx3 in a *grx3grx4* strain. Upon the addition of ferrocene to the culture medium, Aft1 clearly accumulated in the nucleus after 6 hours of treatment (Fig. 9A) correlated to the induction of *FIT3* (Fig. 9B, line 9) and *FET3* (not shown) transcripts, in a similar manner to that observed for wild-type cells (Fig. 9B, line 3). In a *grx3grx4* double mutant, the addition of ferrocene did not produce variations in either patterns of gene expression or Aft1 localisation (as shown in Fig. 9A,B). Moreover, Grx3 and Grx4 protein levels were not affected by ferrocene, as indicated in Fig. 9C, which effectively rules out any possible posttranslational regulation of the two proteins resulting from iron depletion.

These results suggest the possibility that neither Grx3 nor Grx4 regulates Aft1 nuclear import. Our hypothesis, however, is that both proteins negatively regulate Aft1 activity by promoting its nuclear exportation from the nucleus to the cytoplasm. This is further supported by the observation of a more-pronounced inhibition of *FET3* transcription when we simultaneously overexpressed both Grx3 and Grx4 in the *grx3grx4* background (Fig. 8B, line 9).

Aft1 interacts with both the glutaredoxin and thioredoxin domains

Since both Grx3 and Grx4 present two functional domains, namely Grx, a glutaredoxin-like sequence and Trx, the thioredoxin domain, we decided to investigate the role of these domains in the regulation of Aft1 function. We first performed two-hybrid assays between each of the Grx and Trx domains of Grx3 and Grx4 and Aft1. We found that both Grx and Trx domains from Grx3 or Grx4 physically interacted with Aft1 in the nucleus (Fig. 10A). However, we observed that the full-length Grx3 protein interacted more strongly with Aft1 than each of its single Grx or Trx domains, and that Grx4 increased the binding efficiency between Grx3 and Aft1 (see Fig. 2A,C and Fig. 10A). We conclude not only that Grx3 and Grx4 can independently interact with Aft1 but also that Grx and Trx domains of Grx3 and Grx4 are able to independently bind Aft1

in the nucleus. We next wondered which of those domains was responsible for the regulation of the Aft1 transcriptional function and according to our model, for the translocation of Aft1 from the nucleus to the cytoplasm. To answer this question we overexpressed each of the pGrx and pTrx domains of Grx3 and Grx4, respectively, in a *grx3grx4* double mutant strain and analysed the levels of *FIT3* and *FET3* mRNAs. We observed that the overexpression of each of the Grx domains from Grx3 and Grx4, significantly diminished the levels of expression of *FIT3* and *FET3* compared with the *grx3grx4* double mutant (Fig. 10B). Following this observation and to investigate which domain was involved in Aft1 translocation from the nucleus to the cytoplasm, we decided to express each of the four domains in the nucleus. For this, we used the following plasmids: pTP17, pTP19, pTP20 and pTP21, which contain a nuclear localisation domain and a strong promoter such as ADH1. The results we obtained clearly indicated that high expression of the Grx domains from Grx3 and Grx4 in the nucleus induced Aft1 translocation from the nucleus to the cytoplasm in a *grx3grx4* double mutant bearing an Aft1GFP fusion protein (Fig. 10C). However, the overexpression of each of the Trx domains did not cause any variation in the levels of *FIT3* and *FET3* expression compared with that determined in the empty *grx3grx4* double mutant (Fig. 10B) and under these conditions, Aft1 remained localised in the nucleus. We conclude from all these results that both Grx domains from Grx3 and Grx4 are responsible for Aft1 transcriptional function by regulating its translocation from the nucleus to the cytoplasm.

Discussion

In this study we demonstrate that Grx3 and Grx4 regulate the subcellular localisation of Aft1 under conditions in which iron is not a limiting factor. In the absence of both proteins Aft1 localisation is nuclear in iron-rich medium. As discussed below, this function is directly related to the oxidative stress response. Grx3 and Grx4 negatively regulate Aft1 activity. The two proteins have overlapping additive functions, although the absence of either does not significantly affect cell viability under normal conditions or in response to oxidative treatment. Yamaguchi-Iwai et al. (Yamaguchi-Iwai et al., 2002) reported that Aft1 responds to iron concentration by regulating changes in the subcellular localisation of Aft1. Here, we demonstrate that both Grx3 and Grx4 regulate the cellular localisation of Aft1 and that both proteins are required to permit cytoplasmic localisation of Aft1 under iron-rich conditions.

If iron were to signal Aft1 for subcellular compartmentalisation in the absence of both Grx3 and Grx4, we would expect Aft1 to translocate to the cytoplasm. The fact that in the absence of both Grx3 and Grx4 Aft1 is always located in the nucleus, regardless of iron availability, suggests the direct regulation of both Grx3 and Grx4 on Aft1 nuclear localisation. This conclusion is supported by the fact that both monothiol glutaredoxins are always nuclear and also by our evidence of a clear physical interaction between Grx3 and Grx4 and Aft1 in the nucleus. The individual absence of either Grx3

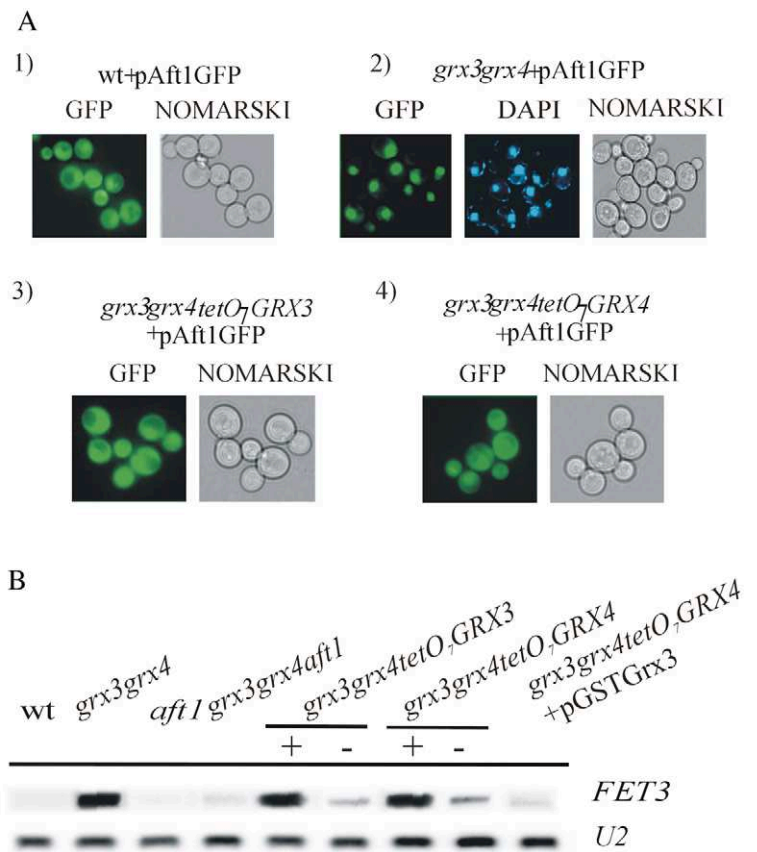


Fig. 8. Aft1 nuclear localisation is regulated by both Grx3 and Grx4. (A) GFP-Aft1 fusion protein was visualised by fluorescence microscopy and recorded in different backgrounds. 1. wild type. 2. *grx3grx4* double mutant. 3. *grx3grx4* double mutant overexpressing *GRX3* under the *tetO₇* promoter. 4. *grx3grx4* double mutant overexpressing *GRX4* under the *tetO₇* promoter. (B) Northern blot of *FET3* from mRNA samples collected from the same experiment described in A. To regulate gene expression under the *tetO₇* promoter, we added (+) or not (-) 20 µg/ml doxycycline to the culture media.

or Grx4 induces a partial translocation of Aft1 from the cytoplasm to the nucleus. As expected, in the *grx3grx4* double mutant, the genes under the control of Aft1 are totally upregulated under all the conditions tested. This observation has been confirmed in a simultaneous study carried out by Ojeda et al. (Ojeda et al., 2006). Furthermore, we demonstrate that this transcriptional upregulation observed in the *grx3grx4* double mutant is totally explained by the Aft1 activity in iron-rich conditions. However, in iron-limiting conditions, upon the addition of ferrocene, our results suggest that in the absence of Aft1, Aft2 activates the transcription of both *FIT3* and *FET3*. This hypothesis derives from the observation that in the *grx3grx4* double mutant the transcription levels of *FIT3* and *FET3* are five times higher than those in both *aft1* and *grx3grx4aft1* mutants upon ferrocene treatment (Fig. 3). In addition, the former model would be in accordance with the recent results published by Courel et al. (Courel et al., 2005) demonstrating that Aft2 acts in the absence of Aft1.

We also demonstrate that the upregulation of the genes dependent on Aft1 activity implies an additional number of cellular consequences: iron accumulates in the *grx3grx4* double

mutant, although the iron concentration is also greater in the two single mutants than in wild-type cells. This high intracellular iron concentration is potentially cytotoxic because it might produce free radicals in the presence of oxygen (Halliwell and Gutteridge, 1988). Apart from this, iron may also induce oxidative stress through the Fenton reaction, which eventually induces the accumulation of ROS (Symons and Gutteridge, 1998; Gutteridge and Halliwell, 2000). This explains why the double mutant is highly sensitive to some oxidative agents such as hydrogen peroxide or *t*-butylhydroperoxide. Thus, in a double mutant in which iron concentration is high, the addition of hydrogen peroxide would favour the Fenton reaction. The consequence of this would be the generation of endogenous oxidative stress in the double mutant with respect to the wild type. Curiously, the *grx3grx4* double mutant is not sensitive to diamide, an oxidative agent, which, as recently reported (Vilella et al., 2005) mainly oxidises cysteine residues present in cell-surface proteins. This supports the conclusion that iron accumulation in the *grx3grx4* strain activates the Fenton reaction and subsequently causes an accumulation of anion superoxide in the cell. This mechanism

resembles the oxidative effect of hydrogen peroxide but not that exerted by diamide. In accordance with our conclusions, Liu et al. (Liu et al., 2005) have recently reported in a genomic study performed with cardiac cells, that the expression of a number of genes responding to oxidative stress was affected by iron.

Oxidative stress induces an accumulation of cells in G1 (Philpott et al., 1998). The double mutant presents a defect in cell growth: its generation time is greater than that estimated for wild-type cells and FACS profiles indicate that the populations of exponentially growing *grx3grx4* cells also accumulate in G1. We have demonstrated that all these effects are the result of Aft1 misregulation, because in the absence of Aft1, cell growth and the FACS profile were restored to wild-type levels.

Recent reports have shown that both Grx3 and Grx4 localise in the nucleus (Molina et al., 2004) and that this localisation is also conserved in other eukaryotic models such as *Schizosaccharomyces pombe* (Chung et al., 2005). Our data demonstrate that iron homeostasis directly depends on Grx3 and Grx4 functions and not vice versa, because Grx3 and Grx4 nuclear localisation do not vary in the absence of Aft1 or under conditions of iron depletion upon treatment with ferrocene (not shown). We have observed that Grx3, Grx4 and Aft1 form a nuclear complex, and that the more Aft1 is localised to the nucleus the greater are the number of molecules that form the complex between the three proteins, Grx3, Grx4 and Aft1. Therefore Aft1 binding to Grx3 and Grx4 is determined by their nuclear localisation. However, binding of Grx3 to Grx4, Grx4 to Aft1 and Grx3 to Aft1 does not depend of the third partner of the complex. Aft1 binds to the glutaredoxin (Grx) and the thioredoxin (Trx) domains of Grx3 and Grx4 proteins. We have also demonstrated that Grx3 and Grx4 also interact each other in vivo and in vitro in the nucleus, and that this interaction does not depend on iron availability or on the presence of Aft1. It is probable that the respective functions of both Grx3 and Grx4 could be determined by the formation of a nuclear heterodimer. However, the biological meaning of the physical interactions between these proteins and the nature of the biochemical structure of the complexes deserves deeper future analyses.

It has been reported that Pse1 positively regulates Aft1 activity by regulating nuclear import of Aft1 independently of the Aft1 regulation resulting from iron starvation (Ueta et al., 2003). Furthermore, glucose exhaustion also positively regulates a set of genes through Aft1 (Haurie et al., 2003). In fact, these authors argue that the Snf1/Snf4 kinase pathway positively regulates the iron uptake pathway at the diauxic shift. Apart from this, only one report describes the negative regulation of Aft1 by Tpk2 (Robertson et al., 2000). In this study the authors demonstrate, by means of a genome-wide transcriptional profiling, that Tpk2, a PKA catalytic subunit, negatively regulates genes involved in iron uptake, whose transcriptional induction depends on Aft1. However, our study demonstrates a genetic, physical and functional interaction between Aft1 and two negative regulatory proteins: Grx3 and Grx4, and also the clear implication of this regulation in the endogenous oxidative status of the cell.

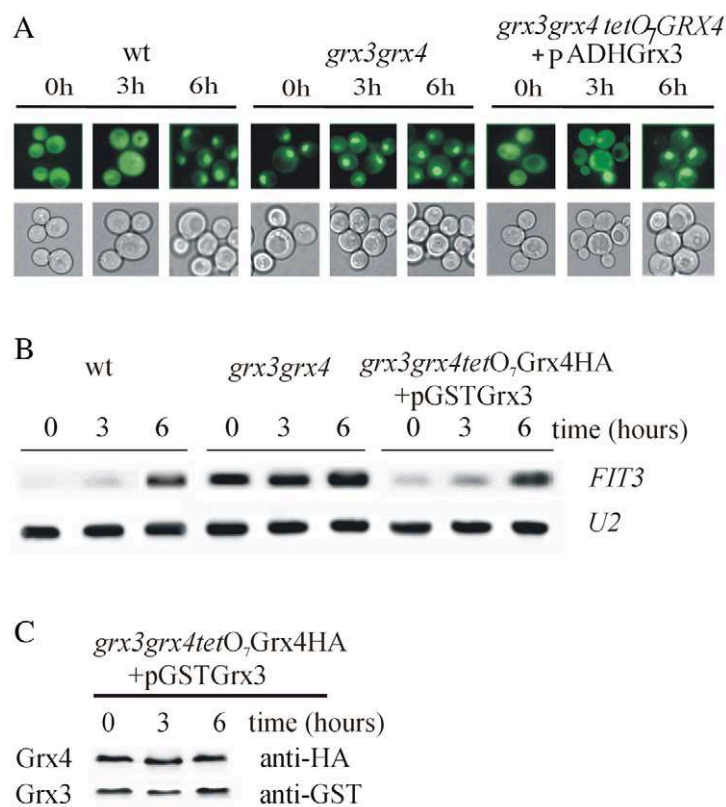


Fig. 9. Aft1 nuclear translocation mediated by iron deficit is independent of the Aft1 nuclear localisation mediated by both Grx3 and Grx4.

(A) GFP-Aft1 localisation in the different strains: wild type, *grx3grx4* and *grx3grx4tetO₇GRX4+pADH1Grx3*, upon the addition of 2 mM ferrocene to exponentially growing cells at 30°C in SD medium. (B) Northern blot of *FIT3* in mRNA samples extracted from aliquots collected from wild type, *grx3grx4* and *grx3grx4tetO₇GRX4+pGSTGrx3* upon the addition of 2 mM ferrocene to exponentially growing cells at 30°C in SD medium. (C) Western blot of total protein extracts prepared from the previous experiment. We used anti-HA antibody to detect Grx4 protein and anti-GST antibody to detect Grx3 protein.

One argument supporting the hypothesis that Grx3 and Grx4 regulate the export of Aft1 from the nucleus is that in a *pse1* mutant Aft1 cannot be imported to the nucleus and the absence of iron is unable to induce Aft1 nuclear translocation (Ueta et al., 2003). If Grx3 and Grx4 function were to negatively regulate Aft1 importation into the nucleus from the cytoplasm, we would expect Grx3 or Grx4 overexpression to avoid Aft1 nuclear translocation from the cytoplasm in iron-limiting conditions. However, we observed that this was not the case because Aft1 translocates to the nucleus under iron-limiting conditions, upon the addition of ferrocene, and even under conditions of Grx3 or Grx4 overexpression. Our hypothesis points to a role for Grx3 and Grx4 in Aft1 nuclear exportation.

Grx3 and Grx4 present two functional domains whose cellular localisation has been described (Molina et al., 2004). The glutaredoxin domain has a nuclear-cytoplasmic localisation, whereas the thioredoxin domain targets the protein to the nucleus. We present evidence demonstrating that the glutaredoxin domain of either Grx3 or Grx4 is the one

responsible for the regulation of a normal Aft1 transcriptional function in cells growing exponentially in rich medium. Consequently, the Grx domain drives a normal Aft1 translocation from the nucleus to the cytoplasm in iron-rich conditions. However, based on our unpublished results, either a complete Grx3 or Grx4 protein is required to restore cell viability to wild-type levels in response to peroxides, meaning that each of the Trx domains of Grx3 and Grx4 also play an essential role in the cellular response to oxidative stress. Also evident from our results is that Grx3 and Grx4 work cooperatively and additively and although one partly compensates the lack of function of the other, together both work more efficiently in their Aft1 regulatory function.

In summary, in this study we present a model for endogenous oxidative stress induced by the misregulation of iron homeostasis resulting from the absence of Grx3 and Grx4 function. We also characterise a novel function for Grx3 and Grx4 in the cellular defence against oxidative stress and also in the correct compartmentalisation of Aft1 ensuring iron stress detoxification.

A	AC	BD	β -Galactosidase arbitrary units
	<i>AFT1</i>	Dom <i>Trx</i> (<i>GRX3</i>)	1.337
	<i>AFT1</i>	Dom <i>Grx</i> (<i>GRX3</i>)	1.442
	<i>AFT1</i>	Dom <i>Trx</i> (<i>GRX4</i>)	1.395
	<i>AFT1</i>	Dom <i>Grx</i> (<i>GRX4</i>)	1.507
<i>Controls</i>			
	<i>e.v.</i>	<i>e.v.</i>	0.296
	<i>SNF4</i>	<i>SNF1</i>	3.810 (+)
	<i>YAK</i>	<i>GRX5</i>	-0.040 (-)
	<i>AFT1</i>	<i>e.v.</i>	0.332
	<i>e.v.</i>	<i>GRX3</i>	0.564
	<i>e.v.</i>	<i>GRX4</i>	0.324
	<i>AFT1</i>	<i>GRX3</i>	3.789
	<i>AFT1</i>	<i>GRX4</i>	1.567
	<i>e.v.</i>	Dom <i>Trx</i> (<i>GRX3</i>)	0.532
	<i>e.v.</i>	Dom <i>Grx</i> (<i>GRX3</i>)	0.309
	<i>e.v.</i>	Dom <i>Trx</i> (<i>GRX4</i>)	0.302
	<i>e.v.</i>	Dom <i>Grx</i> (<i>GRX4</i>)	0.243

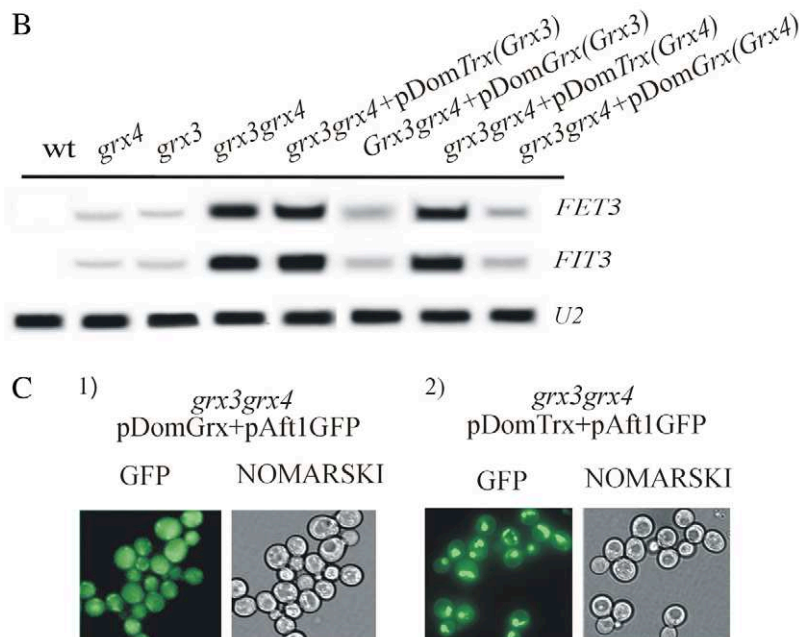


Fig. 10. Aft1 interacts with both Grx and Trx domains of Grx3 and Grx4, but the Grx domains of Grx3 or Grx4 are responsible for Aft1 transcriptional function and cellular compartmentalisation. (A) Two-hybrid analysis for the following interactions: Aft1 with the Grx domain of Grx3, Aft1 with the Trx domain of Grx3, Aft1 with the Grx domain of Grx4 and Aft1 with the Trx domain of Grx4, determined as in Fig. 2A and Fig. 2C. (B) Northern blot analysis of *FET3* and *FIT3* expression in samples taken from cultures of the following strains: wild type, *grx3grx4*, *grx3grx4*+pMM491 (pDomGrx of Grx3) (Dom, domain), *grx3grx4*+pMM486 (pDomTrx of Grx3), *grx3grx4*+ pMM506 (pDomGrx of Grx4) and *grx3grx4*+pMM502 (pDomTrx of Grx4). Cells were exponentially grown in SD at 30°C. (C) GFP Aft1 localisation in the *grx3grx4* strain co-transformed with pTP20 (pDomGrx, identical results were observed with pTP19) or with pTP17 (pDomTrx, identical results were observed with pTP21) in cultures growing exponentially at 30°C in SD medium.

pHW4 after amplifying Grx3 from genomic DNA using the oligos MMO455 and MMO456. The plasmid pMM483 contains the Grx4 ORF amplified with MMO521 and MMO522, and cloned into the *EcoRI* and *Sall* sites of the pHW4 vector.

For two-hybrid analysis we constructed the following plasmids: pACTII-*GRX3*, *GRX3* was amplified by PCR with MMO453 and MMO454 to be cloned in the *SmaI* and *EcoRI* sites. pACTII-*GRX4* was cloned following the same strategy as with *GRX3* but the oligos designed were MMO523 and MMO524. For constructing pACTII-*AFT1*, *AFT1* was amplified by means of MMO457 and MMO458, and subsequently cloned into the *SmaI-XhoI* sites. To obtain pGBT9-*GRX3* and pGBT9-*GRX4* plasmids, we amplified the two sequences from genomic DNA, respectively. Thus, MMO455 and MMO456 were used to amplify *GRX3*, which was then cloned into the *EcoRI-SmaI* sites. MMO170 and MMO171 were designed to amplify *GRX4* to be cloned into the *PstI-EcoRI* sites.

To construct pTP17, containing the Trx domain of Grx3 in pGBT9 we used MMO455 and MMO492 oligos bearing the *EcoRI-SamI* sites. The plasmid pTP20 contains the Grx domain of Grx3 cloned into pGBT9 in *EcoRI-SmaI* restriction sites using MMO494 and MMO456. The plasmid pTP21 carries the Trx domain of Grx4 cloned into pGBT9 in *EcoRI-SmaI* sites by means of MMO170 and GSLOL51. The vector pTP19 bears the Grx domain of Grx4 constructed in pGBT9 in *EcoRI-PstI* sites by using GSLOL52 and MMO171. As a control for positive nuclear interaction we used the pair of plasmids pACT2*SNF4* and pGBT9*SNF1* (see Vilella et al., 2004). And finally pACT2*YAK1* and pGBT9*GRX5* were used as a negative control for nuclear interaction (Vilella et al., 2004). The plasmid pMM351 is an integrative vector that contains three repetitions of the hemagglutinin (HA) epitope in the C-terminal position and also bears the regulatable *tetO₇* promoter. *EcoRV* was used to linearise this vector to make it integrative at the *LEU3* locus. The following plasmids are derivatives of the former one upon cloning *AFT1*, *GRX3* and *GRX4*, ORFs, respectively as detailed: pMM358 carries the *AFT1* ORF cloned by using *EcoRI* and *PstI* sites using GSLOL31 and GSLOL32 oligos. pMM367 bears *GRX3* ORF inserted at *NotI* and *PstI* restriction sites using GSLOL33 and GSLOL34. pMM518 carries *GRX4* cloned at *NotI* and *PstI* sites by using MMO543 and MMO583. The plasmid pCM265 is a centromeric vector containing three repetitions of the HA epitope in C terminal position and the regulatable *tetO₇* promoter (de la Torre-Ruiz et al., 2002). The following plasmids are derivatives of the former one upon cloning either the Grx or Trx domains of Grx3 and Grx4, respectively, into the *PmeI-NotI* restriction sites, as detailed: pMM491 bears the Grx domain of Grx3. pMM486 carries the Trx domain of Grx3. pMM506 bears the Grx domain of Grx4 and pMM502 carries the Trx domain of Grx4. All the oligonucleotides listed here are detailed in supplementary material Table S2.

Total iron determination

The total iron concentration in the different strains was determined in exponentially growing cultures as described (Fish, 1988).

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

This approach was used to characterise the DNA content in exponentially growing cells (de la Torre-Ruiz et al., 2002).

Two-hybrid assays

Two-hybrid analyses were carried out basically as described in (Rodríguez-Navarro et al., 2002) using (1) the pACT2 plasmid, which contains the *ADHI* promoter and the *GAL4*-activating domain. To construct a hybrid protein, genes encoding the protein of interest were appropriately cloned, in frame, into the MCS sited located just after *GAL4AD* (for activating domain), and (2) the pGBT9 vector, which contains the *ADHI* promoter followed by the *GAL4BD* (binding domain) and a MCS in which each protein of interest was cloned. The targeting of each hybrid protein was achieved using specific nuclear localisation sequences contained in the *GAL4*-binding domain.

In vivo cellular localisation of proteins

To study Aft1 subcellular localisation we cloned *AFT1* into the *Clal-EcoRI* sites of the vector pUG35 (a gift from Dr J. Hegemann, Institute für Mikrobiologie, Düsseldorf, Germany) using both MMO420 and MMO421. pUG35 vector contains the green fluorescence protein yEGFP3 and the repressible *Met25* promoter. We regulate protein expression levels by adding methionine to the culture medium to a final concentration of 25 μ M.

Pull-down assays and total protein extraction

Both methods were carried out as described by Garcia-Gimeno et al. (Garcia-Gimeno et al., 2003). Proteins retained by the affinity system were detected by immunoblot assays using anti-GST polyclonal antibody (Amersham) or anti-HA monoclonal antibody, and chemiluminescence reagents (Supersignal, Pierce)

RNA preparation and northern blot analyses

RNA purification, northern blot and probe labelling with digoxigenin were carried out according to Gallego et al. (Gallego et al., 1997). Probes covering the entire open reading frame, without adjacent sequences, were generated by PCR from genomic DNA.

Yeast extracts and immunoblot analyses

Both methods were performed as described in de la Torre-Ruiz et al. (de la Torre-Ruiz et al., 2002).

We would like to acknowledge Pascual Sanz for plasmid pHW4 and the protocol for pull-down assays. J. Hegemann for providing the pUG35 vector. We would like to mention Lidia Piedrafita for the excellent technical assistance. This work was supported by the project from the Instituto de Salud Carlos III (Spanish Ministry of Health and Consumption, PI030734). N.P.C. was granted a fellowship from the Generalitat de Catalunya (Spain).

References

- Arredondo, M. and Núñez, M. T. (2005). Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* **26**, 313-327.
- Aruoma, O. I., Kaur, H. and Halliwell, B. (1991). Oxygen free radicals and human diseases. *J. R. Soc. Health* **111**, 172-177.
- Beard, J. L. (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J. Nutr.* **131**, 568-579.
- Belli, G., Polaina, J., Tamarit, J., de la Torre, M. A., Rodríguez-Manzanque, M. T., Ros, J. and Herrero, E. (2002). Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* **277**, 37590-37596.
- Blaiseau, P. L., Lesuisse, E. and Camadro, J. M. (2001). Aft2, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1, intracellular iron use and resistance to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **276**, 34221-34226.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 79-100.
- Carmel-Harel, O. and Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 439-461.
- Casas, C., Aldea, M., Espinet, C., Gil, R. and Herrero, E. (1997). The Aft1 transcription factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 621-637.
- Chung, W. H., Kim, K. D. and Roe, J. H. (2005). Localization and function of three monothiol glutaredoxins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 604-610.
- Courel, M., Lallet, S., Camadro, J. M. and Blaiseau, P. L. (2005). Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6760-6771.
- Cross, F. R. (1995). Starting the cell cycle: what's the point? *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 790-797.
- de la Torre-Ruiz, M. A., Torres, J., Ariño, J. and Herrero, E. (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 33468-33476.
- De Silva, D. M., Davis-Kaplan, S., Fergestad, J. and Kaplan, J. (1995). The *FET3* gene product required for high affinity iron transport. *J. Biol. Chem.* **270**, 1098-1101.
- Fish, W. W. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol.* **158**, 357-364.
- Gakh, O., Park, S., Gang, L., Macomber, L., Imlay, J. A., Ferreira, G. C. and Isaya, G. (2006). Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 467-479.
- Gallego, C., Garí, E., Colomina, N., Herrero, E. and Aldea, M. (1997). The Cln3-cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J.* **16**, 7196-7206.
- García-Gimeno, M. A., Muñoz, I., Ariño, J. and Sanz, P. (2003). Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **278**, 47744-47752.
- Goldstein, A. L. and McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1541-1553.
- Grant, C. M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and responses to stress conditions. *Mol. Microbiol.* **39**, 533-541.
- Gutteridge, J. M. and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 136-147.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1988). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Haurie, V., Boucherie, H. and Saggiocco, F. (2003). The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 45391-45396.
- Herrero, E. and Ros, J. (2002). Glutaredoxins and oxidative stress defense in yeast. *Methods Enzymol.* **348**, 136-146.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**, 13963-13966.
- Holmgren, A. and Aslund, F. (1995). Glutaredoxin. *Methods Enzymol.* **252**, 283-292.
- Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Lee, J., Romeo, A. and Kosman, D. J. (1996). Transcriptional remodelling and G1 arrest in dioxygen stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 24885-24893.
- Liu, Y., Popovich, Z. and Templeton, D. M. (2005). Global genomic approaches to the iron-regulated proteome. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **35**, 230-239.
- Lopreato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrigoni, G., Casonato, S., Ruzzene, M.,

- Pinna, L. A. and Carignani, G. (2004). Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem. J.* **377**, 395-405.
- Molina, M. M., Bellí, G., de la Torre, M. A., Rodríguez-Manzanque, M. T. and Herrero, E. (2004). Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* **279**, 51923-51930.
- Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J. C., Lill, R. and Winge, D. R. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron-regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**, 17661-17669.
- Ortiz, E., Pasquini, J. M., Thompson, K., Felt, B., Butkus, G., Beard, J. and Connor, J. R. (2004). Effect of manipulation of iron storage, transport, or availability on myelin composition and brain iron content in three different animal models. *J. Neurosci. Res.* **77**, 681-689.
- Philpott, C. C., Rashford, J., Yamaguchi-Iwai, Y., Roulult, T. A., Dancis, A. and Klausner, R. D. (1998). Cell-cycle arrest inhibition of G1 cyclin translation by iron in *AFT1-1^{op}* yeast. *EMBO J.* **17**, 5026-5036.
- Philpott, C. C., Protchenko, O., Kim, Y. W., Boretsky, Y. and Shakoury-Elizeh, M. (2002). The response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of siderophore-based systems of iron uptake. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 698-702.
- Poyton, R. O. (1999). Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eukaryotes. *Respir. Physiol.* **115**, 119-133.
- Rietsch, A. and Beckwith, J. (1998). The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 163-184.
- Robertson, L. S., Causton, H. G., Young, R. A. and Fink, G. R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5984-5988.
- Rodríguez-Manzanque, M. T., Ros, J., Cabiscol, E., Sorbías, A. and Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8180-8190.
- Rodríguez-Manzanque, M. T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J. and Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulphur enzymes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109-1121.
- Rodríguez-Navarro, S., Llorente, B., Rodríguez-Manzanque, M. T., Ramne, A., Uber, G., Marchesan, D., Dujon, B., Herrero, E., Sunnerhagen, P. and Pérez-Ortín, J. E. (2002). Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamin B1 and B6. *Yeast* **19**, 1261-1276.
- Rutherford, J. C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P. O. and Winge, D. (2001). A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14322-14327.
- Rutherford, J. C., Jaron, S. and Winge, D. R. (2003). Aft1 and Aft2 mediate iron-responsive gene expression elements. *J. Biol. Chem.* **278**, 27636-27643.
- Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff Lill, R. and Winge, D. R. (2005). Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 10135-10140.
- Symons, M. C. R. and Gutteridge, J. M. C. (1998). *Free Radicals and Iron: Chemistry, Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.
- Ueta, R., Fukunaka, A. and Yamaguchi-Iwai, Y. (2003). Pse1 mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 50120-50127.
- Vilella, F., Alves, R., Rodríguez-Manzanque, M. T., Bellí, G., Swaminathan, S., Sunnerhagen, P. and Herrero, H. (2004). Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comp. Funct. Genomics* **5**, 328-341.
- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J. and de la Torre-Ruiz, M. A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **280**, 9149-9159.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A. and Klausner, R. D. (1995). *AFT1*: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 1231-1239.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A. and Klausner, R. D. (1996). Iron-regulated DNA binding by the Aft1 protein control the iron regulon in yeast. *EMBO J.* **15**, 3377-3384.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A. and Sasaki, R. (2002). Subcellular localisation of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 18914-18918.

Table S1. Yeast strains used in this work.

Strain	Relevant genotype	Reference
CML128	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1 his4 can1'</i>	Gallego <i>et al.</i> ,(1997)
CML126	<i>MATa aft1::URA</i> as CML128	Casas <i>et al</i> (1997)
MML405	<i>MATa grx3::natMX4</i> as CML128	This work
MML406	<i>MATa grx4::kanMX4</i> as CML128	This work
MML449	<i>MATa grx3::natMX4 grx4::kanMX4</i> as CML128	This work
MML547	<i>MATa grx3::natMX4 grx4::kanMX4 aft1::URA3</i> as CML128	This work
MML556	<i>MATa tetO₇AFT1HA</i> as CML128	This work
MML558	<i>MATa grx3::natMX4 tetO₇Aft1HA</i> as CML128	This work
MML560	<i>MATa grx4::kanMX4tetO₇Aft1HA</i> as CML128	This work
MML594	<i>MATa tetO₇GRX3HA</i> as CML128	This work
MML671	<i>MATa grx3::natMX4 grx4::kanMX4 tetO₇Grx3HA</i> as CML128	This work
MML674	<i>MATa tetO₇GRX4HA</i> as CML128	This work
MML675	<i>MATa grx3::natMX4 grx4::kanMX4 tetO₇Grx4HA</i> as CML128	This work
MML773	<i>MATa aft1::kanMX4</i> as CML128	This work
PJ69-4a	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4d gal80d GAL2-ADE2LYS2::GAL1-HIS3 met::GAL7-lacZ</i>	Vilella <i>et al.</i> ,(2004)
PJ69-4 α	<i>MATα</i> as PJ69-4a	Vilella <i>et al.</i> ,(2004)
MML702	<i>MATa grx3::natMX4</i> as PJ69-4a	This work
MML703	<i>MATαgrx3::natMX4</i> as PJ69-4a	This work
MML704	<i>MATa grx4::kanMX4</i> as PJ69-4a	This work
MML705	<i>MATαgrx4::kanMX4</i> as PJ69-4a	This work
MML724	<i>MATa aft1::kanMX4</i> as PJ69-4a	This work
MML725	<i>MATαaft1::kanMX4</i> as PJ69-4a	This work

Table S2. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence 5'-3'
MMO170	AGAGAGA <u>AATTC</u> ACTGTGGTTGAAATAAAAAAGCCA
MMO171	AGAGACTGCAGAAATAAGGCTTACTGTAGAGCATG
MMO420	ACTAGGA <u>AATTC</u> ATGGAAGGCTTCAATCCG
MMO421	ACTAG <u>ATCGAT</u> ATCTTCTGGCTTACATAC
MMO453	ACTAG <u>CCCCGGG</u> TGTTCTTTTCAGGTTCCA
MMO454	ACTAGGA <u>AATTC</u> TTAAGATTGGAGAGCATGC
MMO455	ACTAGGA <u>AATTC</u> TGTTCTTTTCAGGTTCCAT
MMO456	ACTAG <u>CCCCGGG</u> TTAAGATTGGAGAGCATGC
MMO457	ACTAG <u>CCCCGGG</u> CGAAGGCTTCAATCCGGCTG
MMO458	ACTAGCTCGAGCTAATCTTCTGGCTTACA
MMO492	ACTAG <u>CCCCGGG</u> TATGGATCCGCGCCGATAA
MMO494	ACTAGGA <u>AATTC</u> ATGTTATTTATGAAGGGGAG
MMO521	ACTAGGA <u>AATTC</u> ACTGTGGTTGAAATAAAAAAG
MMO522	ACTAGGTCGACTTACTGTAGAGCATGTTGG
MMO523	ACTAG <u>CCCCGGG</u> CACTGTGGTTGAAATAAAAAAG
MMO524	ACTAGGA <u>AATTC</u> TACTGTAGAGCATGTTGG
MMO525	ACTAGGTTTAAACATGTGTTCTTTTCAGGTTCC
MMO526	ACTAGGCGGCCGCTGGATCCGCGCCGATAA
MMO529	ACTAGGTTTAAACATGTTATTTATGAAGGGGAG
MMO530	ACTAGGCGGCCGCGAGATTGGAGAGCATGCTGCA
MMO541	ACTAGGTTTAAACATGACTGTGGTTGAAATAAA
MMO542	ACTAGGCGGCCGCGAGGATCTGCGGCTGATATTT
MMO543	ACTAGGCGGCCGCGATGACTGTGGTTGAAATAAA
MMO545	ACTAGGTTTAAACATGCTATTCATGAAAGGAAG
MMO546	ACTAGGCGGCCGCTGTAGAGCATGTTGAAATA
MMO583	ACTAGCTGCAGCTGTAGAGCATGTTGAAATA
GSL0L31	ACTAGGA <u>AATTC</u> ATGGAAGGCTTCAATCCG
GSL0L32	ACTAGCTGCAGATCTTCTGGCTTACATAC
GSL0L33	ACTAGGCGGCCGCGATGTGTTCTTTTCAGGTTCC
GSL0L34	ACTAGCTGCAGAGATTGGAGAGCATGCTGCA
GSL0L51	ACTAG <u>CCCCGGG</u> TTAAGGATCTGCGGCTGATATTT
GSL0L52	ACTAGGA <u>AATTC</u> ATGCTATTCATGAAAGGAAG

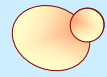
*New restriction sites are underlined.

A decorative graphic on the right side of the page consisting of two vertical lines, one green and one gold, and two overlapping circles at the bottom right, one gold and one orange.

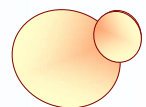
— 3.4- CONCLUSIONS

Les conclusions extretes en aquest article són les següents:

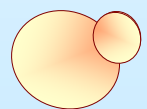
1. Grx3 i Grx4 presenten funcions redundants i additives en la resposta cel·lular davant estrès oxidatiu.
2. Grx3 i Grx4 interaccionen *in vivo* i *in vitro* dins del nucli independentment dels nivells de ferro intracel·lular i de la presència d'Aft1 en la cèl·lula.
3. Grx3 i Grx4 interaccionen *in vivo* i *in vitro* amb Aft1 formen un complex nuclear, on cadascuna de les tres proteïnes interacciona amb l'altra de manera independent entre sí.
4. Els dominis *GRX* i *TRX* de Grx3 i Grx4 interaccionen *in vivo* amb Aft1 independentment entre sí.
5. Grx3 i Grx4 no regulen els nivells transcripcionals d'*AFT1*.
6. Els dominis *GRX* de Grx3 i Grx4 regulen l'exportació nuclear d'Aft1 com a mecanisme regulador de la homeòstasi del ferro intracel·lular.
7. L'absència de Grx3 i Grx4 causa defectes en el creixement cel·lular i problemes en la fase G1 del cicle cel·lular com a conseqüència de l'activació constitutiva d'Aft1.



4- CAPÍTOL 2



**CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL
DE Grx3 I Grx4 EN ELS MECANISMES DE
REGULACIÓ DE LA VIA *PKC1*-MAP
QUINASA EN LA RESPOSTA CEL.LULAR
DAVANT ESTRÈS OXIDATIU EN
Saccharomyces cerevisiae.**





4.1- INTRODUCCIÓ



4.1.1-LA PARET CEL·LULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*: COMPONENTS I FUNCIONS.

La paret cel·lular de *S. cerevisiae* és una envolta externa a la membrana plasmàtica i es troba present tant en organismes procariotes (bacteris) com en eucariotes (fongs i plantes). Constitueix entre el 15% i el 30% del pes sec de la cèl·lula, el que suposa entre un 25 i un 50% del volum cel·lular (Lipke *et al.*, 1998). Per aquest motiu pel qual es destinen grans quantitats de material i energia a la seva construcció i ensamblatge.

La paret cel·lular de *S. cerevisiae* està bàsicament constituïda per:

- Polisacàrids de glucosa, manosa i N-acetilglucosamina.
- Proteïnes (en menor fracció).

El component més abundant és el **β -1,3-glucà**, polímer de glucosa localitzat principalment en la zona interna de la paret cel·lular. Presenta una estructura ramificada que confereix a la paret **propietats elàstiques**. Es sintetitza en la membrana citoplasmàtica per l'enzim glucà sintasa codificat pel gen *FKS1* (Parent *et al.*, 1993) i *FKS2* (Mazur *et al.*, 1995).

El **β -1,6-glucà**, polisacàrid de glucosa altament ramificat i es presenta en menors proporció que l'anterior. És important per a l'establiment d'unions creuades entre els diferents elements interns i externs de la paret, unint proteïnes al β -1,3-glucà a través de residus glicosilfosfatidilinositol (GPI-CWPs).

Els **polisacàrids de manosa** trobats bàsicament en la superfície exterior de la paret. S'uneixen a proteïnes formant les manoproteïnes. Aquestes arriben a tenir un contingut glucídic de fins a un 90%. Poden tenir units residus asparagina (mitjançant enllaços de tipus N-glicosídics) o serina i/o treonina (mitjançant enllaços de tipus O-glicosídics). A més a més, els ponts fosfodièster presents en aquestes cadenes N-O-glicosídiques li confereixen a la superfície cel·lular una **carga elèctrica neta negativa** (Orlean *et al.*, 1997). La presència d'aquestes cadenes aporta **permeabilitat en la paret cel·lular** per permetre el pas de molècules a través d'ella.

La **quitina** o polisacàrid lineal **β -1,4 de N-acetilglucosamina** és el component menys abundant en la paret cel·lular (entre l'1 i el 3%). És sintetitzada per l'enzim quitina sintasa. Les cadenes de quitina es disposen de forma antiparal·lela formant una estructura fibril·lar insoluble que confereix a la paret cel·lular una gran **resistència** (Ruiz-Herrera *et al.*,

1999). Es concentra especialment en les regions properes al punt de citoquinesis (regió del septe) tot i que es troba dispersa per tota la paret cel.lular (Cabib *et al.*, 2001).

En la **Figura 1**, es mostra un esquema de l'estructura de la paret cel.lular amb els components que la formen (adaptat de Lipke i Ovalle, 1998; Smits *et al.*, 1999).

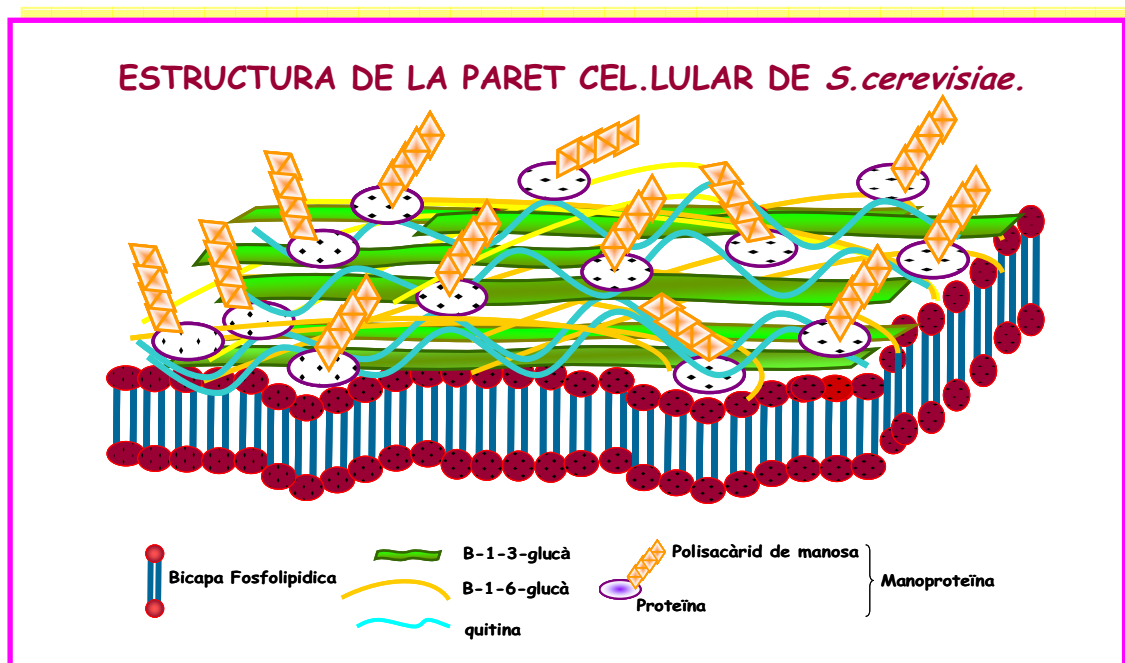


Figura 1- Esquema de l'estructura de la paret cel.lular de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptat de Lipke i Ovalle, 1998 i Smits *et al.*, 1999).

La rellevància de la paret cel.lular en els microorganismes radica en les següents funcions:

- Funció física de suport, determinant així la seva morfologia (Klis *et al.*, 1994).
- Assegurar una protecció osmòtica davant el medi extern. La cèl.lula de llevat llisaria si no disposés d'una paret, donat que la concentració de soluts és major en el seu interior que en l'exterior.
- Assegurar una protecció física davant el medi extern. Aquest esquelet extern li confereix resistència a diversos factors extrínsecs com substàncies tòxiques o enzims degradadors procedents d'altres microorganismes (Smits *et al.*, 1999).
- Es considera una estructura activa. Per aquest motiu juga un paper fonamental en processos morfològics com són l'adhesió cèl.lula-cèl.lula o en el creixement pseudohifal en resposta a falta de nutrients..

-També juga un paper important durant el cicle cel.lular, amb pics d'expressió de les diferents proteïnes de paret cel.lular en les diverses fases del cicle o en la citoquinesis (Lipke i Ovalle, 1998; Smits *et al.*, 1999; Ruiz-Herrera *et al.*, 1999; Cabib *et al.*, 2001)

4.1.2- LA VIA D'INTEGRITAT CEL.LULAR O VIA *PKC1* -MAP QUINASA.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la via *PKC1*-MAP quinasa, via *PKC1* o via d'integritat cel.lular és important tan per el manteniment de l'integritat cel.lular com per mantenir la morfologia de l'organisme durant el creixement vegetatiu. És una via de transducció de senyal que s'activa en resposta a una gran varietat d'estímuls externs que provoquen un estrès sobre la paret cel.lular. Aquesta activació indueix un seguit de respostes encaminades al manteniment de l'integritat cel.lular com són, l'activació de gens en resposta a estrès tèrmic, oxidatiu o osmòtic, la reorganització del citoesquelet d'actina, en resposta a dèficit de nutrients, a feromonas o fins i tot juga un paper important en els processos de secreció i endocitosi (Levin, 2005). A més a més, la via d'integritat cel.lular també és important durant la biogènesis de la paret en períodes de creixement polaritzat per mantenir la morfologia de l'organisme durant el creixement vegetatiu (Verna *et al.*, 1997).

4.1.3-COMPONENTS DE LA VIA D'INTEGRITAT CEL.LULAR EN *Saccharomyces cerevisiae*.

La via d'integritat cel.lular del llevat *Saccharomyces cerevisiae* és activada en resposta a nivell de l'envolta cel.lular detectats per uns receptors en la membrana citoplasmàtica: **Mtl1**, **Mid2** i la família **Wsc** (*Wsc1*-*Wsc4*) (Rajavel *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999). Aquests receptors transmeten l'informació a la proteïna GEF **Rom2**, la qual enviarà la senyal a la proteïna GTPasa, **Rho1** (Schmidt *et al.*, 1997; Philip i Levin, 2001).

Rho1 és capaç d'unir-se i activar la proteïna quinasa C de llevat, **Pck1** (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996), la qual s'encarrega de senyalitzar el mòdul de MAP quinases constituït per **Bck1**, **Mkk1** i **Mkk2** i **Slk2** (Kamada *et al.*; 1995, Martin *et al.*, 2000).

Un cop activada la proteïna **Slk2**, l'última quinasa efectora de la via, aquesta s'encarrega d'induir la resposta transcripcional mediada pels factors transcripcionals **Rlm1** i **Swi4/Swi6** (Lyer *et al.*, 2001; Ki-Young *et al.*, 2008).

En la **Figura 2** es detalla un esquema de la via d'integritat cel.lular.

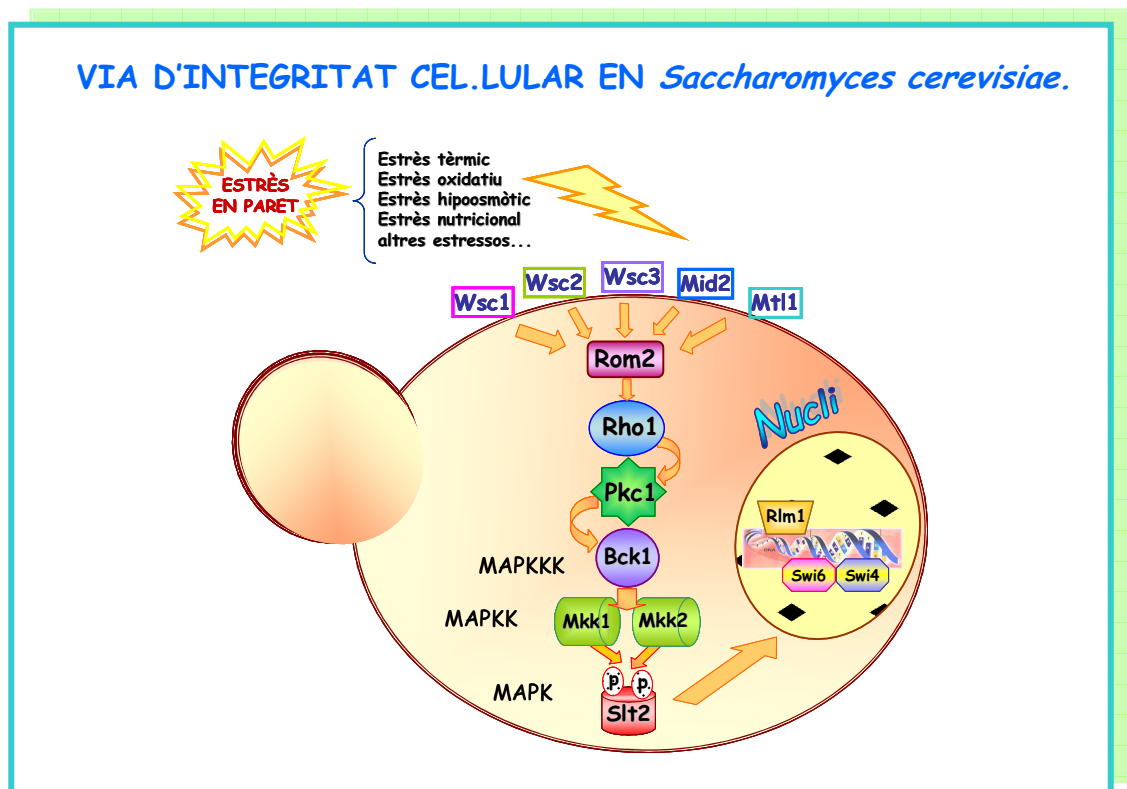


Figura 2- Esquema de la via d'integritat cel.lular o via *PKC1* en *S.cerevisiae*. Els canvis externs produïts en l'envolta cel.lular són detectats pels receptors de membrana *Wsc*, *Mtl1* i *Mid2*. Aquests sensors transmeten la senyal a la proteïna GEF *Rom2*, que acaba activant la proteïna G *Rho1*. Seguidament, *Rho1* activa la proteïna quinasa *Pkc1*, que transmet la senyal al mòdul MAP quinasa format per *Bck1*, *Mkk1* i *Mkk2* i finalment *Slt2*, l'última quinasa efectora de la via. *Slt2* es transloca a nucli i induïx la resposta transcripcional mediada pels factors transcripcionals *Rlm1* i *Swi4/Swi6*.

4.1.3.1- ELS SENSORS DE SUPERFÍCIE CEL.LULAR: *WSC1-WSC4*, *MID2* I *MTL1*.

La funció dels sensors de superfície és detectar diferents alteracions en l'envolta externa de la cèl·lula i transmetre la senyal a proteïnes integrants de la via *PKC1* per obtenir una resposta capaç de mantenir l'integritat cel.lular.

Els receptors de la via d'integritat cel.lular descrits fins l'actualitat són:

- La família de receptors de paret cel.lular, *Wsc*.
- Els receptors de paret cel.lular, *Mid2* i *Mtl1*.

a) **La família de receptors Wsc** està integrada per quatre glicoproteïnes transmembranals: **Wsc1** (també anomenat Hcs77 i Slg1 (Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998), **Wsc2**, **Wsc3** i **Wsc4** (Rajavel *et al.*; 1999, Ketela *et al.*, 1999).

Tots aquets receptors presenten un funció comuna: detectar canvis en la paret cel.lular causats per diversos estressos, com xoc tèrmic i transmetre aquest estímul a la resta de components de la via d'integritat cel.lular (Levin *et al.*, 2005).

Tots els mutants *wscs* presenten una menor activació de la quinasa Slt2 en resposta a estrès tèrmic. La triple delecció *wsc1wsc2wsc3* presenta més termosensibilitat que els mutant simples *wsc1*, *wsc2* i *wsc3* i presenta una menor activació de la quinasa Slt2 en resposta a aquest estrès. Aquest fet indica la parcial redundància d'aquests tres gens en la senyalització de la via *PKC1* en resposta a estrès tèrmic (Verna *et al.*, 1997). Aquests defectes són suprimits al sobreexpressar les quinases de la via *PKC1*, Rom2, Rho1 o Pkc1 (Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998).

b) D'altra banda, tenim els receptors de paret cel.lular **Mid2** i **Mtl1**.

Mid2 al igual que *Wsc1*, és una proteïna altament O-glicosilada i es creu que la presència dels residus de manosa és necessària per l'activitat d'aquest receptor (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). No obstant, no hi ha cap similitud entre la seqüència peptídica de *Mid2* i de *Wsc1*. A més a més, *Mid2* no presenta el motiu extracel.lular ric en cisteïnes, característic de tota la família *Wsc* (Ketela *et al.*, 1999).

Mid2 presenta un 50% d'homologia amb un tercer receptor de paret cel.lular **Mtl1** (*Mid two like*) (Rajavel *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999).

Vilella *et al.* (2005) van descriure per primera vegada que el receptor *Mtl1* funcionava com a receptor de superfície d'estrès oxidatiu. Concretament, s'encarrega de detectar canvis estructurals en l'envolta cel.lular causats per l'agent oxidant diamida. Així doncs, aquest receptor transmet la senyal a l'interior de la cèl.lula a través de la via *PCK1* en resposta a estrès oxidatiu (Vilella *et al.*, 2005).

La sobreexpressió del receptor *Wsc1* suprimeix la sensibilitat induïda per feromonas del mutant *mid2* i la sobreexpressió de *Mid2* suprimeix la sensibilitat a altes temperatures del mutant *wsc1* (Rajavel *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999). Aquests fets suggereixen que existeix una relació funcional entre els membres de la família *Wsc* i el receptor *Mid2* dins la via d'integritat cel.lular.

4.1.3.2– ELS INTERCANVIADORS GEF: *ROM2*.

Rom2 codifica per a una proteïna GEF (*GTPase Exchange Factor*). Les proteïnes GEF poden unir-se a proteïnes G a través del seu domini DH i catalitzen l'intercanvi de GDP (guanosina difosfat) per GTP (guanosina trifosfat) en les proteïnes G. Aquestes últimes, només són actives quan estan unides a GTP i per tant les proteïnes GEF contribueixen a l'activació de les proteïnes G (Symons i Settleman, 2000; Gulli i Meter, 2000).

La proteïna GEF Rom2, interacciona física i genèticament amb la proteïna G Rho1, activant-la en resposta a problemes en paret a través de l'intercanvi de GDP a GTP (Ozaki *et al.*, 1996; Delley i Hall, 1999).

Altres proteïnes intercanviadores de GTP importants són **Rom1** (Ozaki *et al.*, 1996; Schimdt *et al.*, 1997), **Bem4** (també anomenada Rom7) (Drees *et al.*, 2001) i **Tus1** (Ozaki *et al.*, 1996; Schmelzel *et al.*, 2002).

4.1.3.3– LA PROTEÏNA G *RHO1*.

Diversos processos cel·lulars, com són l'establiment del creixement polaritzat i la morfogènesis cel·lular, requereixen d'una correcta regulació espacial i temporal per a que tinguin lloc en estadis específics durant el creixement vegetatiu i durant el procés de conjugació sexual. En el control d'aquests processos intervenen les proteïnes G, intercambiadora de GTP a GDP (Gulli i Meter; 2001).

Algunes de les funcions en les quals està implicada la proteïna G Rho1 són: funcionament de les vies de transducció de senyal on s'uneix i activa la quinasa Pkc1 (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996), control i organització del citoesquelet d'actina a través de les formines Bni1 i Bnr1 (Evangelista *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003), regulació de la polaritat cel·lular mitjançant el control de les funcions de secreció (Guo *et al.*, 2001), control de la morfogènesis durant la formació de la gemma (Drgonova *et al.*, 1996), l'organització del septe i estimulació de l'activitat glucà sintasa durant la citoquinesis (Ki-Young Kim *et al.*, 2007) i durant la biogènesis vacuolars (Eitzen *et al.*, 2001).

4.1.3.4– LA PROTEÏNA QUINASA C: *PKC1*.

El gen *PKC1* de llevat va ser el primer element de la via d'integritat cel·lular en ser clonat (Levin *et al.*, 1990, Yoshida *et al.*, 1992). El gen *PKC1* codifica per una proteïna quinasa homòloga a la proteïna quinasa C de mamífers i s'ha suggerit que existeixen elements comuns entre la regulació de la quinasa Pck1 de llevat i la quinasa Pck de mamífers (Watanabe *et al.*, 1994; Antonsson *et al.*, 1994).

Estudis genètics en mamífers han permès definir una superfamília de fins a 20 gens diferents que codifiquen per diversos subtipus de proteïnes quinasa C (*PKC*). Aquesta superfamília de *PKCs* en mamífers, està formada per proteïnes dependents de fosfolípids que es poden localitzar en el citoplasma, en el nucli i en llocs de creixement polaritzat (Mellor i Parker, 1998). En *S. cerevisiae* només existeix una proteïna quinasa C, Pck1, mentre que en *S. pombe* existeixen dues, Pck1 i Pck2 (Perez *et al.*, 2002).

En *S. cerevisiae*, la funció principal de Pck1 és protegir la integritat de la paret cel·lular, donat que el mutant *pck1* només és viable a temperatures permissives en presència d'un estabilitzador osmòtic com el sorbitol (Levin i Bartlett-Heubusch, 1992; Roemer *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1997). Un mutant *pck1* termosensible és incapaz d'induir la fosforilació i l'activitat de la quinasa Slt2 en resposta a xoc tèrmic, mentre que els al·lels hiperactius de Pck1, mostren elevats nivells d'activació de Slt2 en les mateixes condicions d'estrès en paret cel·lular (Martin *et al.*, 2000).

D'altra banda, Vilella *et al.* (2005) van demostrar que Pck1 es localitza en la perifèria cel·lular, activant la via d'integritat cel·lular, en resposta a la despolarització del citoesquelet d'actina causada per l'estrès oxidatiu induït pels agents oxidants diàmid i peròxid d'hidrogen. A més a més, la sobreexpressió de la quinasa Pck1 induïx una ràpida restauració dels cables d'actina de manera específica a l'efecte induït pel peròxid d'hidrògen.

4.1.3.5– EL MÒDUL MAP QUINASA: *BCK1, MKK1/MKK2 I SLT2*.

Les cascades de MAP quinases són elements presents en tots els organismes eucariotes, desde els animals i les plantes fins als fongs. Estàn implicades en la transducció de diverses senyals extracel·lulars generades en la superfície de la cèl·lula (Gustin *et al.*, 1998).

La via *PKC1* en *S. cerevisiae* conté una cascada de MAP quinases, en la qual participa en primer lloc la proteïna **MAP quinasa quinasa quinasa** (MAPKKK) **Bck1** (Lee i Levin, 1992). Bck1 és activada per la fosforilació de les serines i treonines conservades en el seu motiu Ser/Thr/Tyr.

El següent element de la cascada són les **MAP quinasa quinasa** (MAPKK) **Mkk1/Mkk2** (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007). Aquestes proteïnes són Ser/Thr/Tyr quinases són activades pel reconeixement i la fosforilació de la treonina i la tirosina situada en el motiu Thr-X-Tyr del seu centre actiu. El tercer i últim element de la cascada és la proteïna **MAP quinasa** (MAPK de *Mitogen Activated Protein Kinase*) **Slt2/Mpk1** que actua com a efectora final en aquest mòdul MAP quinasa (Torres *et al.*, 1991; Widman *et al.*, 1999; Cobb, 1999).

El mutant *bck1* presenta un fenotip lític en resposta a estrès tèrmic similar al del mutant *pkc1* però menys acusat (Lee i Levin, 1992). Aquesta observació, unida a la capacitat supressora de l'al·lel *BCK1-20* (que manté la via constitutivament activa) sobre el mutant *pkc1*, situava a la quinasa Bck1 dins la via d'integritat cel·lular (Lee i Levin, 1992).

L'existència de dues quinases consecutives més amunt de la MAPK Slt2: **Mkk1 i Mkk2** permet l'amplificació de la senyal a través d'incrementar la quantitat de proteïna quinasa en cada pas del mòdul (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007). Ambdues proteïnes són funcionalment redundants i cadascuna d'elles és capaç de transduïr eficientment la senyal a través de la via. Interaccionen *in vivo* i *in vitro* amb Pkc1 (Paravicini i Friedly, 1996) i Slt2 (Soler *et al.*, 1995). A més a més, Slt2 també és capaç de fosforilar-les *in vitro* (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007).

D'altra banda, la sobreexpressió de Slt2 suprimia els defectes del doble mutant *mkk1mkk2*, fet que suggeria que la quinasa Slt2 també estava situada per sota de Mkk1 i Mkk2 (Irie *et al.*, 1993). Com altres MAPKs, l'activitat de **Slt2** ve determinada per la fosforilació dual en els dos residus treonina i tirosina situades en les posicions 190 i 192 del seu centre actiu. La defosforilació o mutació de qualsevol dels dos punts de fosforilació és suficient per inactivar la funció de Slt2 (Lee *et al.*, 1993a). A més a més, conté un residu lisina molt conservat en la posició 54 del lloc d'unió a ATP. Si aquest residu és mutat, Slt2 es torna catalíticament inactiva (Martin *et al.*, 2000).

4.1.3.5.1– DIANES D'ACCIÓ DE LA MAP QUINASA *SLT2*.

Com la majoria de cascades de MAPKs, la regulació transcripcional és un dels principals mecanismes de resposta a l'estímul que activa la via.

Slt2 conté dues regions que poden ser separades i que són capaces d'induir la transcripció de gens regulats per Slt2:

- L'extrem no catalític C-terminal (373-484) posseeix un domini activador transcripcional (Soler *et al.*, 1995).

- L'extremcatalític N-terminal (1-373), posseeix els dos residus Tyr/Thr fosforilables de Slt2. Concretament, la regió situada entre els residus 274-329 de l'extrem N-terminal de Slt2, juntament amb el domini activador situat en l'extrem C-terminal, són els responsables de l'activació transcripcional dels gens necessaris per respondre a estrès en paret cel·lular (Ki -Young Kim, 2007).

La via *PKC1* media les respostes transcripcionals bàsicament a través de dos reguladors: Rlm1 (Jung *et al.*, 2002) i les Swi4/Swi6 del complex heterodimèric SBF (Ki-Young *et al.*, 2008).

El gen ***RLM1*** és un factor transcripcional responsable de la major part de les respostes de la via d'integritat cel·lular.

L'extrem N-terminal de la proteïna Rlm1 conté el domini d'unió a DNA. La part C-terminal conté el domini d'activació transcripcional. En la part central de Rlm1 es troba el punt d'interacció física i de fosforilació per part de Slt2 (Watanabe *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 2002).

Rlm1 és el responsable de l'inducció dels RNAm de Slt2 en resposta xoc tèrmic i com a conseqüència regulador dels gens relacionats amb metabolisme de paret cel·lular (Jung *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2000; García *et al.*, 2004). A més a més, també regula els gens de a estrès oxidatiu (Stavela *et al.*, 2004).

El **factor SBF**, aquest està implicat en la transició G1/S del cicle cel·lular en *S.cerevisiae* (Andrews i Herskowitz, 1989; Lowndes *et al.*, 1991) i participa en l'inducció de gens relacionats amb la biogènesis de la paret cel·lular (Lyer *et al.*, 2001). Està constituïda per la subunitat reguladora **Swi6** i una proteïna d'unió a DNA, **Swi4**.

La subunitat reguladora Swi6 també és modificada *in vitro* per la fosforilació de la quinasa Slt2 i *in vivo* en resposta a un estrès en paret (Madden *et al.*, 1997; de la Torre-Ruiz,

et al., 2002). Més tard, es va aïllar el complex Slt2/Swi4 (Baetz *et al.*, 2001) i els últims estudis revelen que la proteïna Slt2 fosforilada, forma un complex amb Swi4 capaç de reclutar Swi6. Aquest complex Slt2-Swi6-Swi4 és necessari per activar la transcripció gènica de gens relacionats amb la biogènesis de la paret cel.lular, com són *FKS2* i *PCL1* (Ki-Young *et al.*, 2008).

En la **Figura 3** es mostra un esquema de la regulació del factor SBF format per Swi4 i Swi6, per part de Slt2 (adaptació de Levin, 2005 i Ki-Young *et al.*, 2008).

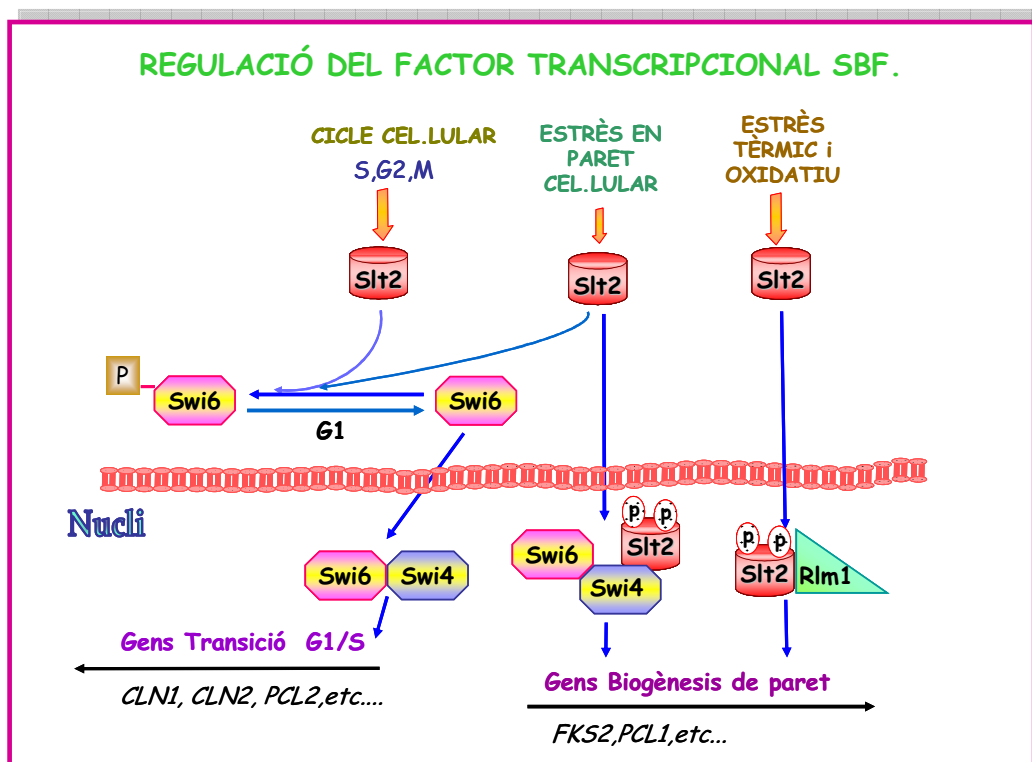


Figura 3 - Model de regulació del complex SBF per la quinasa Slt2. La quinasa Slt2 s'activa en resposta a diversos estressos: estrès en paret cel.lular, estrès oxidatiu, estrès tèrmic o durant es diverses fases del cicle cel.lular, entre altres. El factor de transcripció específic de cicle cel.lular SBF, està format per dues proteïnes: Swi4 i Swi6. Swi4 és la subunitat d'unió a DNA mentre que Swi6 és la subunitat reguladora. Durant la fase G1, la subunitat reguladora Swi6 és fosforilada per la quinasa Slt2, modificació que provoca la seva sortida de nucli. Slt2 també fosforila Swi6 en resposta a estrès en paret. Swi4 també pot unir-se *in vitro* amb Slt2 formant un complex transcripcional alternatiu per la regulació de diversos gens relacionats amb la morfogènesis i la paret cel.lular com són *FKS2* i *PCL1* entre altres (adaptació de Levin, 2005 i Ki-Young *et al.*, 2008).

4.1.4- PROTEÏNES REGULADORES DE LA VIA DE INTEGRITAT CEL·LULAR.

Dins de les proteïnes que regulen la via d'integritat cel·lular tenim:

- a) les proteïnes quinases: Pkh1, Pkh2, Pkh3, Yph1 i Yph2.
- b) les proteïnes fosfatases: Ptp2, Ptp3, Ppz1, Ppz2, Sit4, Sdp1 i Msg5.

a) El grup de Schmelze *et al.*, (2002) van caracteritzar el paper de les **proteïnes quinases Pkh i Ypk** com a reguladores de la senyalització de la via *PKC1*.

Els gens ***PKH1*, *PKH2*** i ***PKH3*** de *Saccharomyces cerevisiae* codifiquen per a proteïnes quinases homòlogues a les PDK humanes i de *Drosophila* (Casamayor *et al.*, 1999).

Els gens ***YPK1*** i ***YPK2*** codifiquen per a quinases homòlogues a les quinases SGK de mamífers (Casamayor *et al.*, 1999). Sembla ser, al igual que en eucariotes superiors, que les quinases Pkh1, Pkh2 i Pkh3 són capaces de fosforilar i activar les quinases Ypk1 i Ypk2 (Casamayor *et al.*, 1999; Schmelzle *et al.*, 2002).

b) Les **proteïnes fosfatases** juguen un paper molt important en el control de l'activitat d'elements regulats per una fosforilació dels seus residus. Tres tipus de fosfatases estan implicades en la regulació negativa de les MAPKS (Martin *et al.*, 2005):

- a) les tirosina fosfatases Ptp2 i Ptp3.
- b) les serina –treonina fosfatases, Ppz1, Ppz2 i Sit4.
- c) les fosfatases d'especificitat dual (DPS), Sdp1 i Msg5.

a) Les **tirosina fosfatases, Ptp2 i Ptp3** actuen en la defosforilació i conseqüent inactivació de Slt2, tant *in vivo* com *in vitro* (Mattison *et al.*, 1999) essent responsables de mantenir uns nivells baixos d'activitat de Slt2 (Hahn i Thiele, 2002).

b) D'altra banda tenim les **serina-treonina fosfatases, Ppz1, Ppz2 i Sit4**.

Els gens ***PPZ1*** i ***PPZ2*** codifiquen per fosfatases membres de la família PPP i relacionades amb les proteïnes PP1 (Ariño, 2002).

Els fenotips deletèris en mutants *ppz* van fer pensar en la participació d'aquestes fosfatases en els processos de manteniment de la integritat cel·lular, de tolerància a l'estrès salí i de la progressió per cycle cel·lular (Hughes *et al.*, 1993; Posas *et al.*, 1993; Posas *et al.*, 1995; Clotet *et al.*, 1999).

D'altra banda estudis basats en interaccions genètiques entre aquestes fosfatases i elements en la via *PKC1*, suggereixen que *PPZ1* i *PZZ2* actuarien en una via paral·lela a la via *PKC1* alhora de mantenir la integritat cel·lular (Lee *et al.*, 1993b).

Sit4 modula la via d'integritat cel·lular a nivells per sota dels receptors de membrana plasmàtica: *Mid2*, *Wsc1*, *Wsc2* i per sobre de la proteïna G *Rho1*, afectant doncs a l'activitat basal i induïda de la quinasa *Pkc1* (de la Torre *et al.*, 2002). Regula de forma negativa les funcions dependents de *Pkc1*, com són: la regulació del mòdul MAP quinasa, la repressió de gens ribosomals per un bloqueig en la secreció i la despolarització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès tèrmic.

c) Dins les proteïnes **fosfatases d'especificitat dual (DPS)**, tenim **Sdp1** i **Msg5**. Ambdues fosfatases estan classificades dins la família de les WH fosfatases per contenir els residus Trp I His del motiu WXH al·tament conservades (Fox *et al.*, 2007).

Inicialment es va demostrar que **Sdp1** (*stress inducible dual specificity phosphatase*) era activada genètica i bioquímicament en condicions d'estrès tèrmic, ja que estava implicada en la inactivació *in vivo* i *in vitro* de *Slt2* en resposta 39°C (Hahn i Thiele, 2002).

Més tard, es va descriure que *Sdp1* adqueria activitat catalítica i era capaç de defosforilar *Slt2* condicions oxidatives (Fox *et al.*, 2007). A més a més, era la primera fosfatasa dependent de ponts disulfur que relacionava l'estrès oxidatiu amb el reconeixement de substrat (Fox *et al.*, 2007).

L'altra fosfatasa d'especificitat dual, **Msg5**, s'encarrega de mantenir nivells d'activació de *Slt2* en condicions normals. *Msg5* i *Slt2* interaccionen tan *in vivo* com *in vitro* (Flández *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2008). D'altra banda, el centre actiu de *Msg5* es localitza l'extrem C-terminal, on el residu cisteïna conservat en posició 319 és essencial per l'activitat fosfatasa de *Msg5* (Doi *et al.*, 1994). Per part de *Slt2*, la regió N-terminal és suficient per unir-se a *Msg5* (Flández *et al.*, 2004).

En la **Figura 4** es detalla un esquema dels components que formen la via *PKC1* i les proteïnes reguladores que participen en la seva regulació.

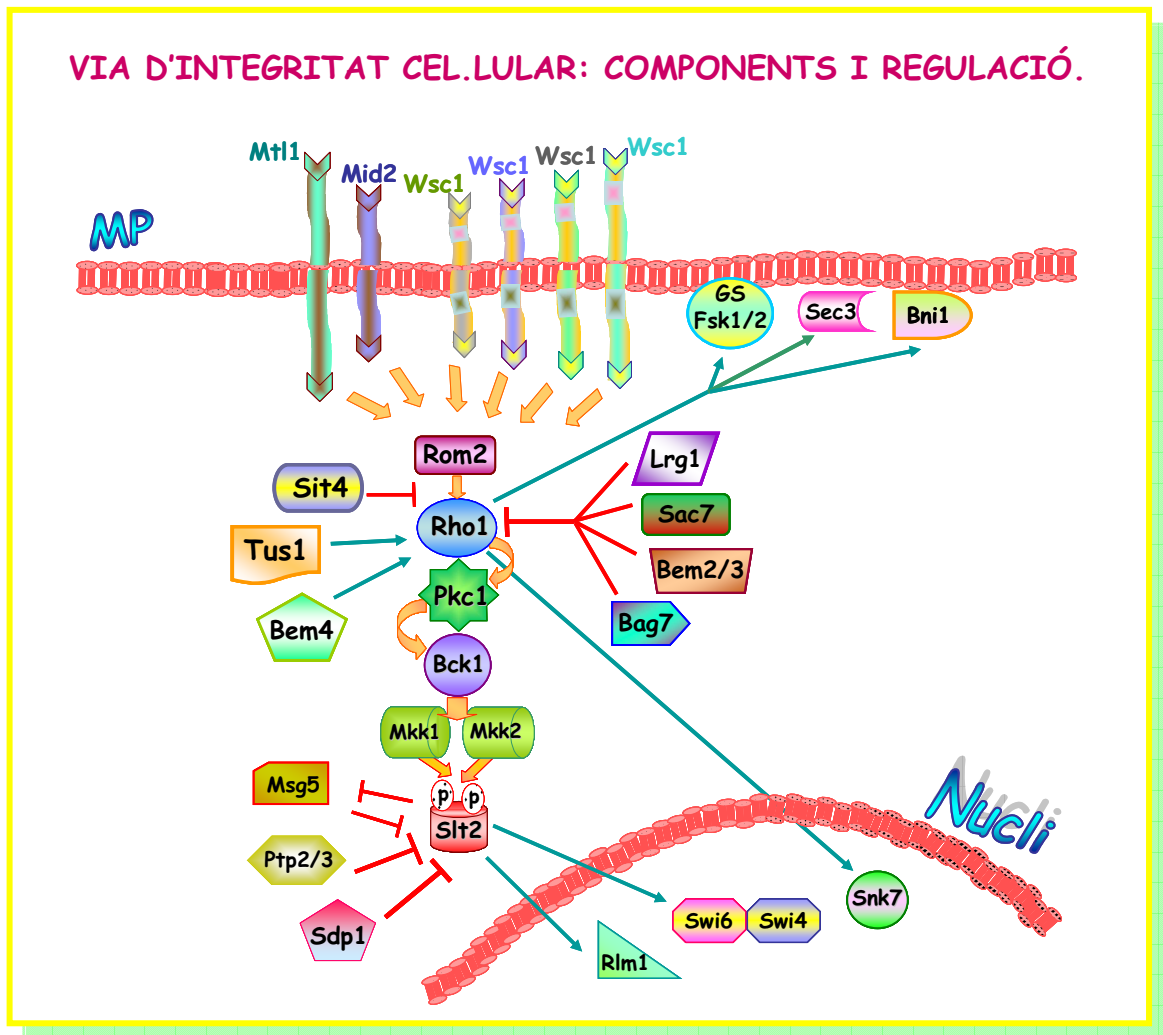


Figura 4 Components i proteïnes reguladores de la via *PKC1*. Les senyals són detectades a través dels sensors superficials Wsc1-4, Mid2 i Mtl1. La senyal és transmesa a la GEF Rom2, la qual s'encarrega d'activar la proteïna G Rho1. Rho1 activa el mòdul MAP quinasa (Bck1, Mkk1/Mkk2 Slt2) a través de Pkc1. A més a més, Rho1 també activa la β 1,3 glucà sintasa (GS), la formina Bni1, el component exocític Sec3 i el factor transcripcional Snk7. En la Figura també s'indiquen regulacions addicionals d'altres GEF, com Tus1 i Bem4 i la regulació de les GAPs, proteïnes inactivadores de la proteïna G com Lrg1, Sac7, Bem2/3 i Bag7 (Roumanie *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2002; Caviston *et al.*, 2003). Diverses fosfatases regulen negativament la via a nivells inferiors com són les fosfatases Msg5, Ptp2/3 i Sdp1 sobre la quinasa Slt2. Finalment, Slt2 activa els dos factors transcripcionals, Rlm1 i el complex SBF, format per Swi4 i Swi6. MP: membrana plasmàtica (adaptació de Levin, 2005).

4.1.5- FUNCIONS GENERALS DE LA VIA D'INTEGRITAT CEL·LULAR.

4.1.5.1- RESPOSTA A L'ESTRÈS CAUSAT PER AGENTS QUE DANYEN LA PARET CEL·LULAR.

mutants en diverses proteïnes de la via *PKC1* presenten sensibilitat davant agents que dancen la paret cel·lular, com són:

- **Calcofluor White**, que s'uneix al β -1,4 glucà i la quitina.
- **Congo Red**, que s'uneix al β -1,4 glucà (Ketela *et al.*, 1999; de Nobel *et al.*, 2000).
- **Diamida**, que forma ponts disulfur entre les proteïnes de paret i produeix canvis en les propietats estructurals de la superfície cel·lular (Vilella *et al.*, 2005).
- **Cafeïna**, del qual es desconeix el mecanisme exacte amb el qual causa estrès sobre paret cel·lular, però es creu que els complexos proteïna quinasa Tor poden ser la diana d'aquesta droga (Martin *et al.*, 2000).
- **Zimoliasa**, enzim que produeix lisi en la paret cel·lular actuant sobre els enllaços β -1,3 glucà (Jung *et al.*, 2002; Lum *et al.*, 2004).

Tots aquests agents tenen en comú que provoquen una agressió en la paret cel·lular generant un estrès sobre aquesta. Com a conseqüència, activen la via *PKC1* en un procés en el qual intervenen tots els components que integren la via (Martin *et al.*, 2000; de Nobel *et al.*, 2000).

Mutants de la via *PKC1* presenten fenotips de lisi i sensibilitat davant agents que danyen la paret cel·lular que són suprimibles per l'estabilitzador osmòtic **sorbitol** (Martin *et al.*, 2000; de Nobel *et al.*, 2000). L'addició d'un estabilitzador osmòtic actua de forma preventiva sobre la lisi de les cèl·lules causada per danys o defectes en la paret.

Així doncs, qualssevol tractament o estímulo que generi un estrès i alteri l'estructura de la paret cel·lular és suficient per activar la via *PKC1*-MAP quinasa en *S.cerevisiae*. (Levin, 2005; Vilella *et al.*, 2005).

4.1.5.2- DESPOLARITZACIÓ DEL CITOESQUELET D'ACTINA EN RESPOSTA A ESTRÈS SOBRE L'ENVOLTA CEL.LULAR.

En *S. cerevisiae*, després de la citoquinesis i de forma propera al final de la fase G1, el citoesquelet d'actina és repolaritzat cap al punt de projecció de la gemma i és manté en aquest estat durant tota la fase S i la fase G2 del cicle. Al final de G2, quan la gemma es prou gran, el citoesquelet es despolaritza per la resta del cos cel.lular, mantenint-se en aquest estat fins al final de G2/M. Finalment, l'actina es altre cop relocalitzada cap al punt on tindrà lloc la nova citoquinesis.

En la **Figura 5** es presenta un esquema de les estructures que formen el citoesquelet d'actina i la seva organització durant el creixement polaritzat de la cèl.lula.

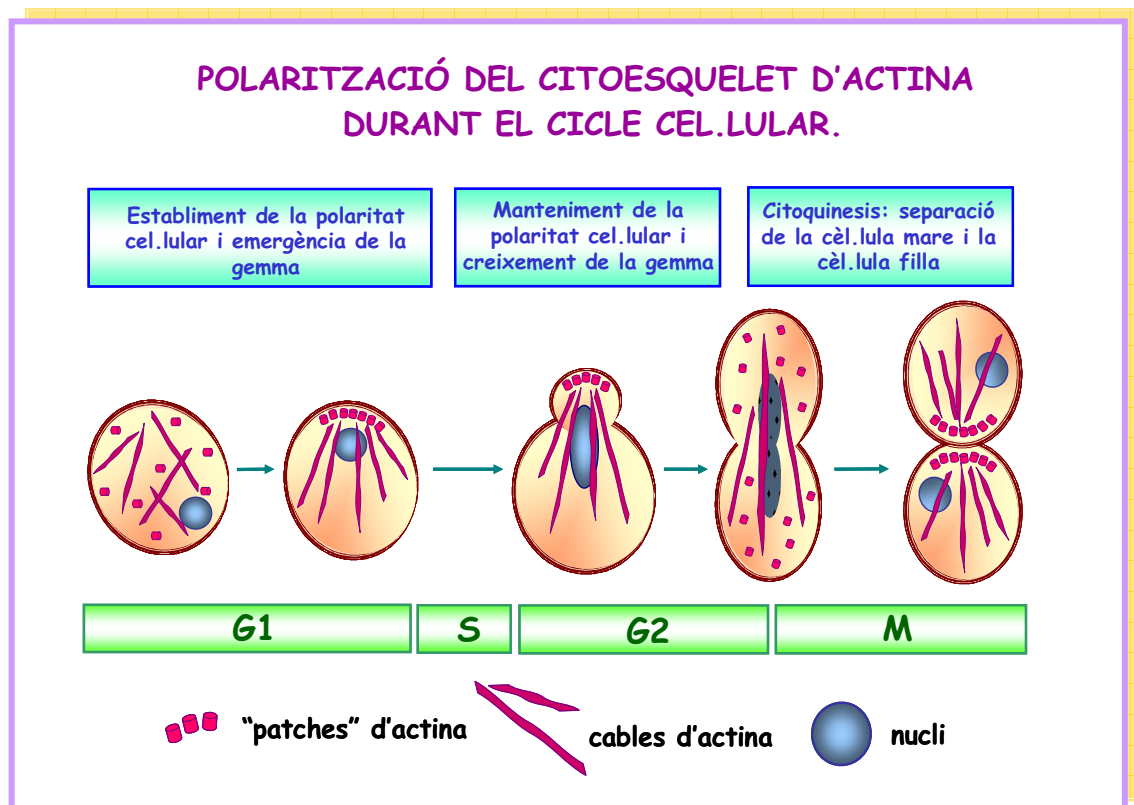


Figura 5- Polarització del citoesquelet d'actina durant el cicle cel.lular en *S.cerevisisiae*. A l'inici de la fase G1, els "patches" d'actina i els cables d'actina estan distribuïts aleatòriament pel citoplasma cel.lular. Quan el llevat inicia un nou cicle cel.lular, els "patches" d'actina es concentren en el lloc de creixement polaritzat de la gemma i els cables d'actina s'orienten uniformement cap a aquesta direcció. En aquestes condicions, comença el creixement de la gemma. En fase G2, durant el creixement de la gemma, els "patches" d'actina es localitzen al l'extrem apical de la gemma, mentre que els cables d'actina es distribueixen axialment desde la cèl.lula mare cap a la cèl.lula filla.

Quan la gemma assoleix un tamany adequat, finaliza el creixement polaritzat i la cèl.lula es prepara per entrar en mitosis. En aquesta fase, els “patches” d’actina es redistribuïxen per la cèl.lula mare i la cèl.lula filla i els cables d’actina perden part de la seva distribució axial. Prèviament a la citoquinesi, els “patches” d’actina es concentren en l’anell citocinètic i els cables d’actina es tornen a redistribuir uniformement tant en la cèl.lula mare com en la cèl.lula filla, permetent la divisió final entre les dues cèl.lules (esquema adaptat de Schimdt i Hall, 1998 i Pruyne *et al.*, 2004).

La família de GTPases Rho està implicada en la transducció de senyals al citoesquelet d’actina, participant en la seva polarització i organització (Cabib *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1998). L’ensamblatge dels cables d’actina és dependent de dues formines funcionalment redundants Bni1 i Bnr1 (Evangelista *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003). Rho1 interacciona amb aquestes formines Bni1 i Bnr1 i el complex format intervé en la reorganització del citoesquelet d’actina en l’extrem creixent de les gemmes (Fujiwara *et al.*, 1998; Evangelista *et al.*, 2003). La hiperactivació de Rho1, indueix una deslocalització del citoesquelet d’actina (Delley *et al.*, 1999).

Agents oxidants com la diamida o el peròxid de hidrògen activen la via d’integritat cel.lular i provoquen una despolarització transitòria del citoesquelet. En aquesta situació, Pkc1 es localitza en la perifèria cel.lular, activant la via d’integritat cel.lular (Vilella *et al.*, 2005). La sobreexpressió de la quinasa Pck1 indueix una ràpida restauració dels cables d’actina específicament en desposta a peròxid d’hidrògen. Recentment hem descrit que aquesta repolarització dependent de Pkc1 requereix l’activitat de Pfy1 (Pujol i Bonet *et al.*, 2009) (vegeu Annex, pàg.254). Pfy1 és una proteïna citoplasmàtica que s’uneix als monòmers d’actina per promoure l’intercanvi entre ADP i ATP, augmentant la tasa de polimerització de l’actina per formar les cables i els patches (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1992).

Mtl1 i Rom2 també són necessaris per la repolarització del citoesquelet en presència de diamida i peròxid d’hidrògen.

Helliwell *et al.*, (1998) van descriure que el mutant termosensible *rho1-2^{ts}* presentava una desorganització del citoesquelet d’actina. La sobreexpressió de Pkc1 era capaç de suprimir tant els defectes en l’organització del citoesquelet d’actina con la viabilitat cel.lular en aquest mutant termosensible En canvi, la sobreexpressió de Slt2 només era capaç de suprimir els defectes en el citoesquelet d’actina. Aquests autors proposen que la via *PKC1*

presenta una bifurcació en les seves funcions per sota de Pkc1 i suggereixen que la via *PKC1* té una funció directa sobre el citoesquelet d'actina on la quinasa Pkc1 senyalitza el citoesquelet a través de la via d'integritat cel·lular.

4.1.5.3– RESPOSTA A ESTRÈS TÈRMIC.

Els fenotips termosensibles de molt mutants en la via *PKC1* demostren la participació d'aquesta via de senyalització en la resposta a estrès tèrmic (Levin i Bartlett-Heubusch, 1992; Irie *et al.*, 1993).

Un xoc tèrmic sobre la cèl·lula provoca canvis en la fluidesa de la membrana plasmàtica i l'afebliment de la paret cel·lular (Kamada *et al.*, 1995). Aquests danys en la paret, incrementen la lisi cel·lular i provoquen finalment l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès tèrmic (Levin i Barlett-Heubush, 1992).

Mutants en elements de la via *PKC1* com *pkc1*, *bck1*, *mkk1* i *mkk2* presenten defectes en l'activació de Slt2 en resposta a estrès tèrmic i estrès oxidatiu (Torres *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 2004; Vilella *et al.*, 2005). No obstant, un mutant *pkc1* amb l'al·lel constitutivament actiu *BCK1-20* és capaç d'activar Slt2 en resposta a un estrès tèrmic moderat (Harrison *et al.*, 2004). En un mutant *bck1*, on s'hi expressa la forma constitutivament activa de la MAP quinasa quinasa Mkk1, també permet l'activació de Slt2 en aquestes condicions d'estrès tèrmic (Inagaki *et al.*, 1999).

4.1.5.4– RESPOSTA AL ESTRÈS OXIDATIU.

Vilella *et al.* (2005) van demostrar que els agents oxidants diamida i el peròxid d'hidrògen provoquen dany oxidatiu a diversos nivells. La diamida actua principalment a nivell de paret cel·lular, formant ponts disulfur entre els residus cisteïna de les diverses proteïnes. El peròxid d'hidrògen (H₂O₂) travessa les membranes cel·lulars, on la seva descomposició dona lloc al radical hidroxil (HO·), altament reactiu dins la cèl·lula (vegeu Introducció General, pàg 13). Ambdós agents són capaços d'induir l'activació de la via *PKC1*.

El mutant *mid2*, presenta una parcial fosforilació de Slt2 en resposta a peròxid d'hidrògen i diamida, mentre que en mutant *mtl1*, aquesta fosforilació és pràcticament imperceptible en resposta a diamida. De fet, Mtl1 és el receptor de paret cel·lular responsable de la detecció i transmissió de la senyal de l'estrès oxidatiu causat per la diamida (Vilella *et al.*, 2005).

Els mutants *rom2* i *pkc1* són significativament sensibles a tractaments amb agents oxidants i no presenten activació de Slt2 en aquestes condicions, essent Rom2, Pkc1 i també Bck1 elements indispensables en el procés de transmissió de la senyal i d'activació de la via d'integritat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu (Vilella *et al*, 2005).

No obstant, els elements més inferiors del mòdul MAP quinasa són dispensables per aquesta viabilitat cel.lular (Vilella *et al*, 2005).

D'altra banda, està descrit que l'estrès oxidatiu produeix efectes negatius durant el cicle cel.lular. Flattery *et al*, (1998) van descriure que el peròxid d'hidrògen provocava parada del cicle cel.lular en fase G2, mentre que la menadiona, un agent que genera radicals superòxid, provoca una parada del cicle cel.lular en fase G1.

Més tard, Alic *et al*, (2001) van descriure que l'àcid hidroperòxid linoleic, un agent que produeix peroxidació lipídica, també provocava una parada del cicle cel.lular en fase G1. Aquests autors van determinar que la tirosina fosfatasa Oca1 era necessària pel creixement cel.lular en presència de l'àcid hidroperòxid linoleic, indicant que aquesta fosfatasa participava en la connexió entre estrès oxidatiu, cicle cel.lular i creixement.

4.1.5.5- RESPOSTA A ESTRÈS HIPOOSMÒTIC.

El fenotip lític de mutants en la via *PKC1* es posa de manifest de forma més evident en resposta a xocs hipoosmòtics (Lee i Levin, 1992; Irie *et al*, 1993). El principal efecte d'un xoc hipoosmòtic, és l'increment de la turgència causada per l'entrada de l'aigua en l'interior de la cèl.lula, fet que indueix estrès sobre la membrana plasmàtica i la paret cel.lular.

En aquestes condicions, el manteniment de la paret cel.lular resulta de vital importància per la integritat de la cèl.lula. Per aquest motiu, la via d'integritat cel.lular també presenta una especificitat en resposta a les baixes concentracions de soluts extracel.lulars (Davenport *et al*, 1995; Kamada *et al*, 1995; Levin *et al*, 2005).

4.1.5.6- RESPOSTA A CANVIS EN EL pH DEL MEDI.

L'alcalinització del medi extern també acaba traduint-se en un estrès directe sobre la paret cel.lular, donat que afecta a la organització i la integritat del polímer de glucà.

Serrano *et al*, (2006) van caracteritzar que el r de membrana Wsc1, com a receptor de la via *PKC1* capaç de sensar canvis en el pH del medi extern i transmetre la senyal a l'interior de la cèl.lula a través de la via *PKC1*.

La resposta de la via *PKC1* a l'alcalinització del medi s'atenua amb l'osmoregulator sorbitol. A més a més, el fet que el mutant *bck1* no presenti fosforilació de Slt2 en resposta a canvis en el pH extracel·lular, demostra que la via *PKC1* participa activament davant aquest estímul.

4.1.5.7- REGULACIÓ DELS PROCESSOS DE SECRECIÓ I D' EXOCITOSI

Els processos de secreció i d'endocitosi dins la cèl·lula són mecanismes bàsics per permetre el tràfic de molècules entre els diferents compartiments intracel·lulars. La vacuola del llevat, equivalent al lisosoma de les cèl·lules eucariotes superiors, és un dels orgànuls clau que forma part d'aquestes vies de tràfic vesicular (Clemens *et al.*, 2008).

Banta *et al.*, (1988) van realitzar una primera classificació de mutants en proteïnes diana de vacuola (*vpt*) segons la seva morfologia vacuolar en tres classes: classe A, B i C. Més tard, aquesta classificació va ser ampliada per Raymond *et al.*, (1992), caracteritzant fins a tres classes més de mutants *vps* en base a la morfologia vacuolar i la quantitat de proteïna CPY secretada.

Respecte a la regulació dels processos de secreció i exocitosi per part de la via *PKC1*, s'han relacionat els receptors Wsc1 i Mid2 amb la polaritat cel·lular a través de regular l'exocitosi i l'organització del citoesquelet d'actina (Adamo *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 1999; Roumanie *et al.*, 2005).

Guo *et al.*, (2001) van descriure que Rho1 era necessària per al direccionament de vesícules cap als punts d'exocitosi i secreció durant el transport de materials per a la construcció de la paret cel·lular i posterior creixement de l'envolta. A més a més, van caracteritzar l'interacció de Rho1 amb Sec3 (una subunitat del complexe exocític que va desde golgi a membrana plasmàtica) i la necessitat d'aquesta interacció per a la correcta localització de l'aparell d'exocitosi. El mateix any, Eitzen *et al.*, (2001) van demostrar que Rho1 també actuava de forma directa en la fusió de membranes vacuolars.

Recentment, Cohen *et al.*, (2008) han publicat un estudi on el complexe Hos2p-Set3p, essencial per la resposta a estrès en secreció, és necessari per l'activació de la via *PKC1* en resposta a dit estrès. L'activació de Slt2 és suficient per restablir la resposta a estrès en secreció en absència de la proteïna Hos2. No obstant, Hos2 és necessària per la correcta activació de la quinaas Slt2 en resposta a estrès en secreció.

4.1.5.8– RESPOSTA AL DÈFICIT DE NUTRIENTS.

En situacions de dèficit de nitrògen o font de carboni, esporulació o entrada a fase estacionària provoquen que les cèl·lules entrin en fase G_0 o en quiescència (Torres *et al.*, 2002 ; Krause *et al.*, 2002).

La via Tor (*target of rapamycin*) controla el creixement cel·lular en resposta a la disponibilitat de nutrients en les cèl·lules eucariotes. L'absència de nutrients en el medi, inactiva les proteïnes de la via TOR, induïent l'entrada a la quiescència. En aquest procés, la quinasa Pkc1 i l'activació de la via PKC1 són necessàries per remodelar la superfície cel·lular (Alarcon *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2002).

Pkc1 actua per sota de l'inhibició de la via TOR alhora de mantenir l'integritat de la cèl·lula i de remodelar la superfície cel·lular durant l'entrada a la quiescència (Krause *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002). Mutants defectius en elements de la via d'integritat cel·lular són sensibles a la falta de nutrients, indicant que la via PKC1 també és necessària per mantenir la viabilitat en condicions de dèficit de nutrients (Heitman *et al.*, 1991; Kunz *et al.*, 1993; Krause *et al.*, 2002).

Durant l'entrada en fase estacionària apareixen les típiques situacions fisiològiques de falta de nutrients on també és requerida l'activació de la via PKC1. Aquesta activació de la via també resulta ser molt important per la viabilitat en cèl·lules que entren en aquesta fase G_0 o en fase estacionària (Torres *et al.*, 2002).

4.1.5.9– RESPOSTA A FEROMONES.

Les feromonas són substàncies químiques secretades en el medi extren per induir un comportament d'atracció sexual cap un altre individu de la mateixa espècie.

L'activació de la via PKC1 en la resposta a feromonas és pas previ a l'aparellament entre individus de diferent sexe (Elion, 2000).

Durant la resposta a feromonas, s'indueix una parada en G1 prèvia la formació dels "shmoos", estructures necessàries per a que tingui lloc l'aparellament i la formació del zigot. Durant el procés de formació dels "shmoos" apareix una reorganització i polarització del citoesquelet d'actina. Durant aquest procés és necessària una maquinària secretora activa i l'inducció d'elements de la via PKC1 (Zarrov *et al.*, 1996; Buehrer i Errede, 1997).

Bar *et al*, (2003) descriuen que Rho1 i Pkc1 és localitzan en els extrems dels “shmoos” durant la seva formació. Finalment, l'exposició al Factor alpha acaba induint l'activació de la quinasa Slt2 (Buehrer i Errede, 1997).

Finalment, en la **Figura 6** és mostra un resum de les funcions que realitza la via d'integritat cel.lular .

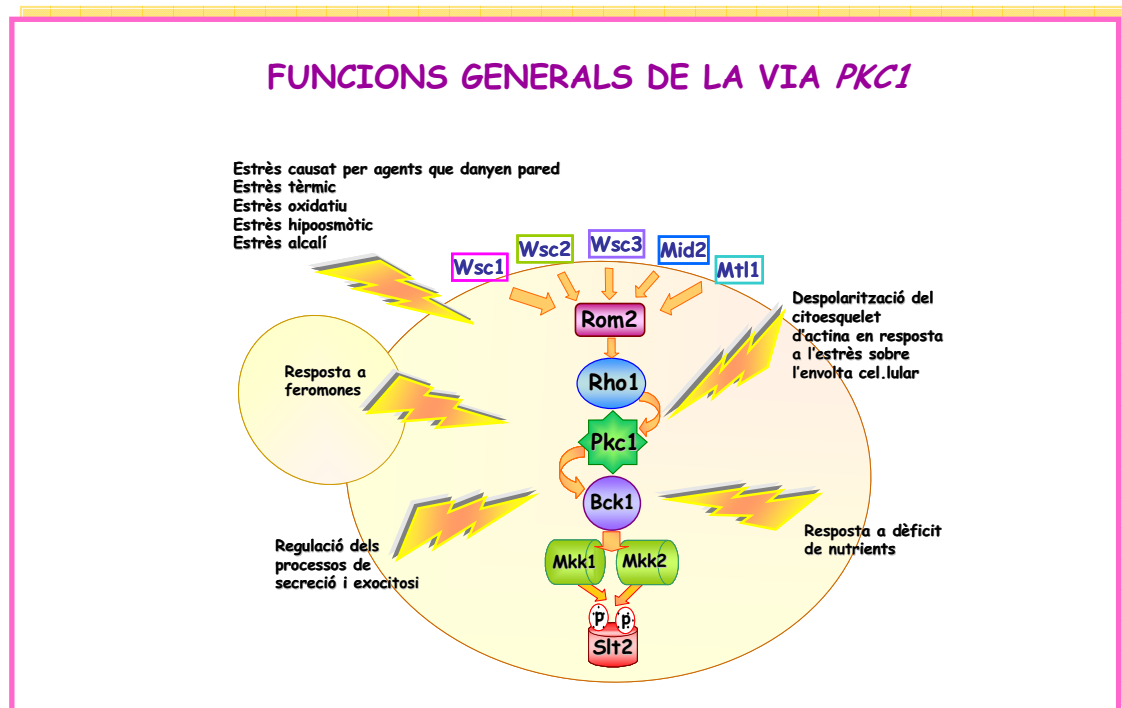
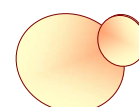
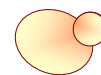


Figura 6- Resum de les funcions generals de la via d'integritat cel.lular. La via d'integritat cel.lular o via *PKC1* és la responsable d'activar la resposta cel.lular davant els diversos estímuls externs que causen dany en la paret cel.lular com són: l'estrès tèrmic, l'estrès oxidatiu, l'estrès hipoosmòtic o l'estrès alcalí. A més a més, s'encarrega de l'organització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès en l'envolta cel.lular i en la correcta polarització de la cèl.lula durant el cycle cel.lular. Finalment aquesta via també participa en els processos d'exocitosis i de secreció, en la resposta a feromones i en absència de nutrients, juga un paper important en l'entrada a la fase quiescent.

4.2- ANTECEDENTS I OBJECTIUS



4.2.1-ANTECEDENTS.

En les cèl·lules linfocitàries T del sistema immunitari humà existeix la glutaredoxina monotiòlica anomenada PICOT (*PKC-interacting cousin protein of thioredoxin*). La PICOT humana regula l'estat redox de la proteïna quinasa PKC humana, exercint un paper fonamental com a regulador negatiu de la via d'integritat cel·lular en la resposta cel·lular davant l'estrès oxidatiu.

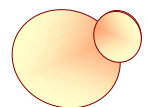
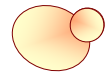
L'estructura de la PICOT humana presenta un domini homòleg tioredoxina (domini TRX) seguit de dues repeticions en tandem del domini PICOT-HD (domini GRX). Ambdós dominis comparteixen una elevada homologia seqüencial amb els respectius dominis GRX i TRX de les glutaredoxines monotiòliques Grx3 i Grx4 de *Saccharomyces cerevisiae* (vegeu Introducció General, pàg.26).

En els resultats publicats en Pujol *et al.*, (2006), demostravem que Grx3 i Grx4, glutaredoxines que regulen l'estat redox de les proteïnes, eren necessàries en la resposta cel·lular davant estrès oxidatiu. A més a més, l'absència simultània de Grx3 i Grx4 induïen fenotips equivalents als detectats en mutants en la via d'integritat cel·lular i sensibilitat cel·lular davant diversos agents que causaven dany en la paret cel·lular, com el Calcofluor White, el Congo Red o la Cafeïna o en resposta a xoc tèrmic (dades mostrades en el aquest Capítol).

4.2.2-OBJECTIUS.

1. Caracterització funcional, genètica i molecular de les glutaredoxines monotiòliques Grx3 i Grx4 de *Saccharomyces cerevisiae* en la regulació de la via *PKC1*-MAP quinasa en resposta a estrès oxidatiu.

4.3- MATERIALS I MÈTODES



4.3.1–SOQUES DE LLEVAT I OBTENCIÓ DE MUTANTS.

Totes les soques de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades durant aquest treball investigador es troben descrites en la **Taula 1**.

Els gens *GRX4* i *BCK1* es van disruptonar mitjançant el reemplaçament de les corresponents ORFs pel cassette *kanMX4* i els gens *GRX3* i *MSG5* mitjançant el reemplaçament de les respectives ORFs pel cassette *natMX4* a través de tècniques de recombinació homòloga descrites en Goldstein i Mc Cusker, (1999).

El gen *SLT2* es va disruptonar mitjançant l'integració del vector YEP352-*mpk1::LEU2*, linearitzat prèviament amb l'enzim de restricció *XbaI*, dins la ORF del gen *SLT2*. L'orientació del marcador *LEU2* es oposada a la del gen.

El gen *PDR5* es va disruptonar amb el cassette *URA3MX4*. Aquest gen també es va deleccionar, juntament amb el gen *SDP1*, amb el cassette *HIS3MX6* mitjançant reemplaçament de les ORFs a través de les tècniques de recombinació homòloga descrites Goldstein i Mc Cusker, (1999).

En la **Taula 2** es descriuen els oligonucleòtids (Sigma) i el DNA motlle utilitzats per a realitzar totes les disruptcions descrites anteriorment.

.Taula 1- Soques de *S.cerevisiae* utilitzades en aquest segon treball.

SOCA	FENOTIP	FONT o REFÈRENCIA
CML125	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1 his4 can1^r</i> .	de la Torre <i>et al</i> ,(2002).
CML126	<i>MATα aft1:: URA3MX4</i> as CML125	Casas <i>et al</i> , (1997)
CML128	<i>MATα</i> as CML125.	Gallego <i>et al</i> , (1997)
MML200	<i>MATα bck1::kanMX4</i> as CML125.	de la Torre <i>et al</i> , (2002).
MML405	<i>MATα grx3::natMX4</i> as CML128.	Pujol <i>et al</i> , (2006).
MML406	<i>MATα grx4::kanMX4</i> as CML128.	de la Torre <i>et al</i> , (2005).
MML411	<i>MATα Galpkc1:: kan</i>	Vilella <i>et al.</i> , (2006).
MML449	<i>MATα grx3::natMX4 grx4::kanMX4</i> as CML128.	Pujol <i>et al</i> , (2006).
MML547	<i>MATαgrx3::natMX4grx4::kanMX4aft1::URA3MX4</i> as CML128.	Pujol <i>et al.</i> , (2006)
MML594	<i>MATα tetO₇GRX3HA</i> as CML128	Pujol <i>et al</i> , (2006).
MML671	<i>MATαgrx3::natMX4grx4::kanMX4 tetO₇Grx3HA</i> as CML128.	Pujol <i>et al</i> , (2006).
MML674	<i>MATα tetO₇GRX4HA</i> as CML128.	Pujol <i>et al</i> , (2006).

MML675	<i>MATa grx3::natMX4grx4::kanMX4 tetO₇Grx4HA</i> as CML128.	Pujol <i>et al.</i> , 2006.
MML702	<i>MATa grx3::natMX4</i> as PJ69-4a.	Pujol <i>et al.</i> , (2006).
MML703	<i>MATa grx3::natMX4</i> as PJ69-4a.	Pujol <i>et al.</i> , (2006).
MML704	<i>MATa grx4::kanMX4</i> as PJ69-4a.	Pujol <i>et al.</i> , (2006).
MML705	<i>MATa grx4::kanMX4</i> as PJ69-4a.	Aquest treball.
MML749	<i>MATa slt2::LEU2MX5</i> as CML128.	Aquest treball.
MML750	<i>MATa grx3::natMX4 grx4::kanMX4 slt2::LEU2</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL12	<i>MATa grx3::natMX4grx4::kanMX4slt2::LEU2 pdr5::HISMX3</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL13	<i>MATa grx3::natMX4grx4::kanMX4slt2::LEU2 pdr5::URA3MX4</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL14	<i>MATa slt2::LEU2MX5 pdr5::HIS3MX6</i> as CML128	Aquest treball.
GSL15	<i>MATa msg5::natMX4</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL16	<i>MATa grx4::kanMX4 msg5::natMX4</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL17	<i>MATa msg5:: natMX4 tetO₇GRX3HA</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL18	<i>MATa msg5:: natMX4 tetO₇GRX4HA</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL19	<i>MATa sdp1:: HIS3MX6</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL20	<i>MATa sdp1:: HIS3MX6 grx3::natMX4</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL21	<i>MATa sdp1:: HIS3MX6 grx4::kanMX4</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL22	<i>MATa sdp1:: HIS3MX6 tetO₇GRX3HA</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL23	<i>MATa sdp1:: HIS3MX6 tetO₇GRX4HA</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL25	<i>MATa grx3::natMX4grx4::kanMX4msg5::HIS3MX6</i> as CML128.	Aquest treball.
GSL24	<i>MATa grx3::natMX4 msg5::HIS3MX6</i> as CML128.	Aquest treball.
PJ69-4a	<i>MATa trp1-901leu2-3,112ura3-52his3-200gal4dgal80d GAL2-ADE2LYS2::GAL1-HIS3 met::GAL7-lacZ.</i>	Obtingut pel Dr.Martí Aldea.
PJ69-4b	<i>MATα</i> as PJ69-4a	Dr.Martí Aldea.

.Taula 2- Oligonucleòtids i DNAs motlles utilitzats per la disrupció de gens.

DISRUPCIÓ, OLIGONUCLEÒTID I DNA MOTLLE

SEQÜÈNCIA

grx3::natMX4.

YDR098S1:	5'-AATGTGTGCCGGGTCATGAGATGCCAAACTAAGAGGTCATTACAGC-3'
YDR098S2	5'-CACTAAATACATCTATTTATTTAAGATTGGAGAGCATGCATAGGCCAC-3'
DNA motlle	pAG25.

grx4::kanMX3.

YER174S1 5'-AACTAAATTTCTGTGCTCTTCTCCAATAAAATATGACTGTGGCAGCT-3'
 YER174S2 5'-TAGTTTTTCATTACAAAATAGGCTTACTGTAGAGCATGTTGGATAGG-3'
 DNA motlle pFA6a-*kanMX4*.

bck1::kanMX4.

MMO40 5'-ATGCCCTTTTTGAGGAAAATAGCGGGGACAGCACATACACACGTACG
 CTGCAGGTCGAC-3'
 MMO41 5'-CGTCATTCCGTCATCTATGTTTATTGTTCTATATTATTACGTATGCATC
 GATGAATTCGAGCTCG-3'
 DNA motlle pFA6a-*kanMX4*.

msg5::natMX4 i msg5::HIS3MX6.

MMO48 5'-ATGCAATTTCACTCAGATAAGCAGCATTGGACAGTAAAACCGACAT
 CGCGTACGCTGCAGGTCGAC-3'
 MMO49 5'-CCTTAAGGAAGAAACATCATCTGTTCCGGGGCAGTAGATATTGATTCCG
 TTCATCGATGAATTCGAGCTCG-3'
 DNA motlle pAG25.
 DNA motlle pFA6a-*HIS3MX6*.

pdr5::HIS3MX3 i pdr5::URA3MX4.

GSLOL 65 5'-CGAAAGACTTTAGACAAAAATGCCCGAGGCCAAGCTTAACAAT
 AACGTFCACGTACGCTGCAGGTCGAC-3'
 GSLOL 66 5'-ATGTATGTTTATTA AAAAAGTCCATCTTGGTAAGTTTCTTTTCTT
 AACACATCGATGAATTCGAGCTCG-3'
 DNA motlle pFA6a-*HIS3MX6*.
 DNA motlle pAG60.

sdp1::HIS3MX6

GSLOL79 5'-GAAGAAAAAAGAGCATCGTGCCCTCAATAAAGCCTCATTGAATGCT
 ATCATCGATGAATTCGAGCTCG-3'
 GSLOL80 5'-ACTTGTAGCCATAATCTCGCATGAACATATACACATCACCCACGCGAAC
 ACCGACGTACCGTACGCTGCAGGTCGAC-3'
 DNA motlle pFA6a-*HIS3MX6*.

4.3.2- MANIPULACIÓ DEL DNA I PLÀSMIDS UTILITZATS.

- El plàsmid **pMM351** és un vector integratiu que conté tres repeticions de l'epítop hemaglutinina (HA) en l'extrem C-terminal. En l'extrem N-terminal conté el promotor regulable *tetO₇*. Per linearitzar aquest vector es va utilitzar l'enzim EcoRV. Posteriorment el vector linearitzat va ser integrat en el locus *LEU3*.

Els plàsmids pMM367 i pMM518 són plàsmids derivats del vector pMM351:

. pMM367 conté l'ORF de *GRX3* clonat entre els llocs de restricció NotI i PstI del vector pMM351 utilitzant els oligonucleòtids GSLOL33 i GSOL34.

. pMM518 conté l'ORF de *GRX4* clonat entre els llocs de restricció NotI i PstI del vector pMM351 utilitzant els oligonucleòtids MMO543 i MMO583.

- Els vectors **pACTII** i **pGBT9** contenen el promotor constitutivament actiu *ADH1* i van ser utilitzats per realitzar els assajos de Doble Híbrid.

El vector pACTII conté la seqüència d'activació del gen *GALA* seguida de l'epítop HA i d'una seqüència MCS per clonar la proteïna d'interès. Aquest vector presenta *LEU2* com a marcador de selecció.

El vector pGBT9 conté la seqüència d'unió a DNA del gen *GALA* seguida de la seqüència MCS (*multi cloning site*) per realitzar les clonacions necessàries. La proteïna de fusió resultant es dirigida al nucli a través d'una seqüència de localització nuclear (NLS) situada dins de la seqüència d'unió del gen *GALA*. *TRIP1* és el marcador de selecció d'aquest vector.

. El gen *SLT2* va ser amplificat pels oligonucleòtids GSLOL57 i GSLOL58 mitjançant PCR. Seguidament es va clonar entre els llocs de restricció SmaI i XhoI del MCS del vector pACTII donant lloc al plàsmid pTP24.

. GSLOL59 i GSLOL60 van ser els oligonucleòtids utilitzats per clonar *SLT2* en els llocs de restricció EcoRI i SmaI del MCS del vector pGBT9 per donar lloc al plàsmid pTP36. Aquest plàsmid va ser utilitzat per mantenir la proteïna Slt2 constitutivament dins del nucli.

- El plàsmids pTP66 i pTP63 són derivats del plàsmids pACTII i pGBT9 respectivament, en els quals es va clonar la ORF del gen *MSG5* per realitzar assajos de Doble híbrid.

. GSLOL81 i GSLOL82 són els oligonucleòtids utilitzats per amplificar mitjançant PCR el gen *MSG5*. Seguidament, es va realitzar la clonació entre els llocs de restricció SmaI i XhoI del MCS del vector pACTII, donant lloc al plàsmid pTP66.

. GSLOL83 i GSLOL84 són els oligonucleòtids utilitzats per clonar la ORF de *MSG5* entre els llocs de restricció EcoRI i SmaI del vector pGBT9, donant lloc al plàsmid pTP63.

La resta de construccions que apareixen en els diversos assajos de Doble Híbrid presents en l'apartat de Resultats d'aquest segon treball, es troben àmpliament descrits en l'article Pujol *et al*, (2006) present en el primer capítol.

- El plàsmid pTP4 es va obtenir per clonació del gen *SLT2* mitjançant els oligonucleòtids MMO754 i MMO755 entre els llocs de restricció EcoRI i SalI del vector **pHW4** (proporcionat pel Dr. Pascual Sanz). pHW4 és un vector que conté el promotor constitutivament actiu *ADH1* seguit de l'epítot GST.

. El plàsmid pTP61 conté el gen *MSG5* clonat entre els llocs de restricció SmaI i BamHI del vector pHW4. GSLOL85 i GSLOL86 van ser els oligonucleòtids utilitzats per realitzar aquesta clonació.

pTP4 i pTP61 es van utilitzar pels l'assajos de Pull-Down. La resta de construccions que apareixen en els experiments de Pull-Down del present treball, es troben detallats en l'article Pujol *et al*, (2006) present en el primer capítol.

- Per als estudis de localització subcel.lular de Slt2, es va clonar el gen *SLT2* en els llocs de restricció EcoRI i ClaI del vector **pUG35** (proporcionat pel Dr.J.Hegeman) utilitzant els oligonucleòtids MMO756 i MMO757.

El vector pUG35 conté la proteïna fluorescent verda yGFP3 i el promotor regulable *MET25*. Durant els experiments de localització subcel.lular de Slt2, l'expressió dels nivells de proteïna van ser regulats afegint una concentració final de 25µM de metionina en el medi de cultiu.

pTP58 correspon al plàsmid **pRS414-CDC11-GFP**. Conté la proteïna de fusió Cdc11GFP (proporcionat pel Dr. Francesc Posas) per realitzar els estudis de localització subcel.lular de la septina Cdc11.

- El plàmid YEP352 (**pSlt2HA**) conté la proteïna Slt2 sota el seu propi promotor i està marcada amb l'epítot HA en la seva regió C-terminal. Presenta el marcador de selecció *URA* (proporcionat per la Dra. Maria Molina). Mitjançant l'anticòs monoclonal anti-hemaglutinina (anti-HA) es possible detectar la quantitat total de proteïna Slt2 present en les mostres transformades amb aquest vector.

- El plàsmid **pBCK1-20** conté l'al·lel constitutivament actiu *BCK1-20*. Presenta el marcador de selecció *TRIP* (proporcionat pel Dr. Joaquín Ariño).

- Els plàsmids **YEPlac195-Vps70**, **YEPlac195-Vps73**, **YEPlac195-Vps4** contenen les corresponents proteïnes vacuolars Vps70, Vps73 i Vps4 clonades en el vector YEPlac195. Presenten el marcador de selecció *URA3* (proporcionat pel Dr. Antoni Casamayor).

En la **Taula 3** es descriuen les seqüències dels oligonucleòtids dissenyats per la construcció dels plàsmids prèviament descrits.

La resta de vectors i oligonucleòtids utilitzats per a les construccions que apareixen en la resta d'experiments descrits en l'apartat de Resultats del present treball, es troben àmpliament detallats en Pujol *et al*, (2006).

.Taula 3- Oligonucleòtids utilitzats per les clonacions.

OLIGONUCLÈOTID	SEQÜÈNCIA
MMO543	5'-ACTAGGCGGCCGCATGACTGTGGTTGAAATAAA-3'
MMO754	5'-ACTAGGAATTCGCTGATAAGATAGAGAGGCAT-3'
MMO755	5'-ACTAGGTCGACCTAAAAATATTTTCTATCTAATCCA-3'
MMO756	5'-ACTAGGAATTCATGGCTGATAAGATAGAGAGG-3'
MMO757	5'-ACTAGATCGATAAAAATATTTTCTATCTAATCCAAAC-3'
MMO583	5' ACTAGCTGCAGCTGTAGAGCATGTTGGAAATA--3'
GSLOL33	5'-ACTAGGCGGCCGCATGTGTTCTTTTCAGGTTCC-3'
GSLOL34	5'-ACTAGCTGCAGAGATTGGAGAGCATGCTGCA-3'
GSLOL57	5'-ACTAGCCC GGCGCTGATAAGATAGAGAGGCAT-3'
GSLOL58	5'-ACTAGCTCGAGCTAAAAATATTTTCTATCTAATCC-3'
GSLOL60	5'-ACTAGCCC GGCTAAAAATATTTTCTATCTAATCC-3'
GSLOL81	5'- ACTAGCTCGAGTTAAGGAAGAAACATCATCTG-3'
GSLOL82	5'- ACTAGGAATTC AATTTCACTCAGATAAGCAG-3'
GSLOL83	5'-ACTAGGAATTC AATTTCACTCAGATAAGCAG-3'
GSLOL84	5'-ACTAGCCC GGTTAAGGAAGAAACATCATCTG-3'
GSLOL85	5'-ACTAGCCC GGCAATTTCACTCAGATAAGCAG-3'
GSLOL86	5'-ACTAGGGATCC TTAAGGAAGAAACATCATCTG-3'
GSLOL88	5'-ACTAGGGATCC ATGAAGCTACTGTCTTTCTATCGAAC-3'

* Subratllades apareixen les seqüències de restricció seleccionades per a cada construcció.

4.3.3-MEDIS DE CULTIU I CONDICIONS DE CREIXEMENT.

A) MEDIS DE CULTIU:

Els **medis de cultiu** líquid utilitzats durant els diversos assajos experimentals són:

-Medi definit SD (2% de glucosa com a font de carboni i 0,67% de base nitrogenada de llevat) amb els requeriments d'aminoàcids auxotròfics necessaris

-Medi definit SC (2% de glucosa, 0,67% de base nitrogenada de llevat i 0,2% de drop out) amb els requeriments d'aminoàcids auxotròfics necessaris.

-Medi definit SGalactosa (2% de galactosa i 0,67% de base nitrogenada de llevat) amb els requeriments d'aminoàcids auxotròfics necessaris.

-Medi definit SGlicerol (3% de glicerol i 0,67% de base nitrogenada de llevat) amb els requeriments d'aminoàcids auxotròfics necessaris.

-Medi definit SLactat (2% de lactat i 0,67% de base nitrogenada de llevat) amb els requeriments d'aminoàcids auxotròfics necessaris.

-Medi d' esporulació (1% d'acetat potàssic i 0,1% d'extracte de llevat)

-Medi ric YPD (2% de glucosa, 2% de peptona i 1% de extracte de llevat)

Els medis de cultiu sòlid s'obtenen afegint agar al 2%.

B) TEMPERATURA DE CREIXEMENT:

En condicions estàndard la temperatura normal de creixement del llevat és de 30°C.

En el segon Capítol del present treball investigador, relacionat amb l'activitat de la quinasa Slt2, la temperatura utilitzada va ser de 25°C.

En els tractaments de xoc tèrmic, la temperatura seleccionada va ser de 38°C.

C) AGENTS QUÍMICS:

-Els agents **peròxid d'hidrogen**, **t-butil d'hidroperòxid**, **Calcofluor White**, **Congo Red** i **Cafeïna** (Sigma) es van diluir en aigua MilliQ estèril per obtenir les següents solucions stock: peròxid d'hidrògen i t-butil d'hidroperòxid (dilució 1:10); Calcofluor White (4mg/ml); Congo Red (12mg/ml) i Cafeïna (15mg/ml).

Les concentracions finals de cadascun dels agents afegides en el medi de cultiu van ser: peròxid d'hidrògen i t-butil d'hidroperòxid: 1mM; Calcofluor White: 20µg/ml; Congo Red: 6,5µg/ml i Cafeïna: 3mM.

-L'agent osmoregulador **Sorbitol** (USB Europe Gmb) es va afegir en el medi de cultiu a una concentració final de 0,8M.

-El quelant de ferro **Ferrocina** (Sigma) es va diluir en aigua MiliQ estèril per obtenir una solució stock: 50mM. La concentració final de Ferrocina afegida en el medi de cultiu va ser de 2mM.

-L'agent **MnSO₄** (Sigma) es va diluir en aigua MiliQ estèril per obtenir una solució stock: 400mM. La concentració final de MnSO₄ afegida en el medi de cultiu va ser de 2mM.

4.3.4- MÈTODE D'OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTÈICS DE LLEVAT I ANÀLISI D' IMMUNODETECCIÓ PER WESTERN BLOT.

Per l'obtenció d'extractes protèics de llevat es van créixer els cultius en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial (OD₆₀₀-0,5-0,6 aprox.). Les cèl·lules van ser recollides per filtració en membranes de cel·lulosa de 0,22µM de poro (Millipore), rentades amb medi de cultiu fresc i posteriorment aliquidades en eppendorfs, per ser centrifugades durant 30sg a 12000 rpm. Tot aquest procés es va realitzar a temperatures baixes de 4°C, en gel.

L'extracció de proteïna total es va realitzar segons el protocol descrit en Gallego *et al*, (1997). Per calcular la concentració de proteïna obtinguda es va utilitzar l'assaig de proteïna Micro DC (Bio-Rad). Quantitats equivalents de proteïna total de cadascuna de les mostres, van ser processades en gels de SDS-poliacrilamida al 10% per realitzar l'assaig de Western blot.

En funció dels experiments realitzats es van utilitzar diversos anticossos primaris i secundaris (vegeu apartat 5 de Material i Mètodes).

Per la detecció quimioluminiscent es va utilitzar el kit SuperSignal West Dura Extended duration Substrate (Pierce) i l'equip de detecció Lumi-Imager (Roche Moleculars Biochemicals).

4.3.5- CONDICIONS D'ÚS DELS ANTICOSSOS.

Els anticossos policlonals **anti-fosfo-p44/42** (Cell Signalling Technology) i **anti-Swi6** (de la Torre-Ruiz *et al*, 2002), va ser utilitzat en una dilució 1:5000 en buffer TBST (20mM Tri-HCl, pH8, 0,125M NaCl i 0,1% Tween 20).

Com anticòs secundari es va utilitzar l'anti-rabbit (Amersham-Bioscience) a una dilució final de 1:10000 en buffer TBST al 1% de llet desnatada en pols.

L'anticòs monoclonal **anti-HA** (Vilella *et al.*, 2005) va ser utilitzat en una dilució 1:1000 en buffer TBST en presència de 0,25% de llet en pols desnatada. Com anticòs secundari es va utilitzar l'anti-mouse (Amersham-Bioscience) a una dilució final de 1:10000 en buffer TBST al 0,25% de llet desnatada en pols.

L'anticòs policlonal **anti-GST** (Molina *et al.*, 2004) va ser utilitzat en una dilució 1:1000 en buffer TBST en presència de 5% de llet en pols desnatada. Com anticòs secundari es va utilitzar anti-rabbit a una dilució final de 1:10000 en buffer TBST al 5% de llet desnatada en pols.

L'anticòs monoclonal **anti-CPY** (Carboxipeptidas Y) (Molecular probes) va ser utilitzat en una dilució 1:100 en buffer TBST en presència de 5% de llet en pols desnatada. Com anticòs secundari es va utilitzar l'anti-mouse a una dilució final de 1:10000 en buffer TBST al 0'25% de llet desnatada en pols.

4.3.6- MÈTODE D'OBTENCIÓ DE RNA TOTAL DE LLEVAT I ANÀLISI TRANSCRIPCIONAL PER NORTHERN BLOT.

La purificació de RNA total de llevat, la preparació dels gels d'agarosa i les condicions d'electroforesi, de transferència en membrana de Nylon i fixació dels RNAs, l'hibridació, el marcatge de sonda amb digoxigenina i la detecció de la senyal es van realitzar segons el protocol descrit en Gallego *et al.*, (1997).

Les sondes *SLT2*, *PST1*, *U1* i *U2* es van obtenir a partir de la tècnica de PCR (*polimerase chain reaction*) de DNA genòmic mitjançant el mètode de PCR descrit en la **Taula 4**, utilitzant oligonucleòtids dissenyats per amplificar fragments que cobrien part de la ORF, sense tenir en compte les seqüències adjacents (vegeu **Taula 5**).

La detecció de senyal es va realitzar mitjançant l'equip de Lumi-Imager (Roche Molecular Biochemicals).

.Taula 4- Mètode de PCR.

Temperatura de desnaturalització inicial.	95°C durant 2min.	} 30Cicles
Temperatura de desnaturalització.	95°C durant 30sg.	
Temperatura d'annealig/unió del cebador	24°C durant 1 min.	
Temperatura d'extensió/ d'elongació de la cadena.	72°C durant 30sg*.	
Temperatura de conservació.	4°C ∞	

* rampa de temperatura: en cada cicle s'augmenta la temperatura un 30%.

.Taula 5- Oligonucleòtids utilitzats per obtenir sondes de DNA.

OLIGONUCLÈOTID	SEQÜÈNCIA
Sonda SLT2	
MMO1053	5'-GATAGAGAGGCATACTTTCA-3'
MMO1054	5'-AATAACCTCTAGCTAACCCA-3'
Sonda PST1	
MMO394	5'-CACTTATCGCTTCAACTGC-3'
MMO395	5'-CCAGAACTAGAAACACTAG-3'
Sonda U1	
CMO265	5'-CTAAGGCGACGAGTTTTTC-3'
CMO266	5'-GATCCACCCGTTCTACC-3'
Sonda U2	
CMO263	5'-GATCAAGTGTAGTATCTGTTC-3'
CMO264	5'-GAACGACTCCACAAGTGCG-3'

4.3.7- ASSAIG DE DOBLE HÍBRID.

L'assaig de Doble Híbrid es van realitzar segons el protocol descrit en Ausubel *et al*, (1989). La quantificació dels nivells d'interacció entre proteïnes mitjançant l'assaig de la β -galactosidasa es va realitzar segons descriuen Guarante *et al*,(1983).

Els vectors de clonació pACTII i pGBT9 i les clonacions realitzades en aquests vectors per duu a terme els diversos assajos de Doble Híbrid, estan descrits en l'apartat 4.3.2 de Material i Mètodes.

4.3.8- ASSAIG DE PULL-DOWN.

L'extracció de proteïna total i l'assaig de Pull-Down es van realitzar segons el protocol descrit en Garcia-Gimeno *et al*, (2003).

Les proteïnes van ser purificades mitjançant boles de Glutatió-Sefarosa 4B (Amersham-Biosciences) prèviament equilibrades amb buffer fosfat salí PBS1x.

Pels anàlisis d'immunodetecció es va utilitzar l'anticòs policlonal anti-GST, per determinar la presència de proteïna purificada i l'anticòs monoclonal anti-HA, per detectar la quantitat total de proteïna present en els extractes (vegeu l'apartat 4.3.5 de Material i Mètodes).

4.3.9- TINCIÓ D'ACTINA AMB RODAMINA FALOIDINA.

Les cèl.lules crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C van ser fixades amb formaldehid 37% diluït al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient. Seguidament les mostres es van centrifugar a 3000 rpm durant 5 minuts i es van fixar tota la nit en buffer fosfat salí (PBS1x pH 7,2) en presència de formaldehid 37% a una concentració final del 4%. Al dia següent van ser sotmeses a una rentat amb buffer PBS1x en presència de dietanolamina al 0,06%, seguit de dos rentats més amb el mateix buffer sense dietanolamina.

Les cèl.lules resuspeses en PBS1x van ser tractades amb l'agent Rodamina-Faloidina (Sigma, solució stock: 6,6 Mm en metanol) a una concentració final de 0,6 mM per realitzar la tinció de l'actina. Les cèl.lules es van mantenir un mínim de 2 hores en la foscor a 4°C. Posteriorment, es realitzen cinc rentats amb el buffer PBS1x abans de ser resuspeses en la solució de montage SlowFade Gold antifade (Invitrogen) per ser visualitzades en el microscopi òptic de fluorescència Olympus BX51 vertical.

Totes les centrifugacions es van realitzar a 3000rpm per evitar que l'organització del citoesquelet d'actina es veies afectada.

4.3.10-TINCIÓ DE LA MEMBRANA VACUOLAR AMB EL COLORANT FM4-64.

La tinció de la membrana vacuolar amb el colorant FM4-64 es va realitzar mitjançant el protocol adaptat descrit en Vida i Emr, (1995).

Les cèl.lules van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Alíquotes d'un mililitre de cada cultiu, van ser recolectades, centrifugades a 3000 rpm durant 5 minuts i resuspeses en 50µl de medi de cultiu fresc. Seguidament, les mostres es van incubar amb 32µg del FM4-64 (Molecular Probes. solució stock: 4mM en DMSO) durant 30 minuts a 30°C.

Seguidament, es va realitzar un primer rentat amb agua MilliQ estèril, seguit de dos rentats amb medi de cultiu fresc.

Finalment es van resuspendre les cèl.lules en 50µl de medi de cultiu per ser visualitzades en el microscopi òptic de fluorescència.

4.3.11- ASSAIG D'INTERNALITZACIÓ DEL COLORANT LUCIFER YELLOW.

L'assaig d'internalització del colorant Lucifer Yellow per detectar defectes en la fase fluida de l'endocitosi es va realitzar mitjançant el protocol adaptat descrit en Belmont *et al*, (1999).

Les cèl.lules van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase logarítmica. Alíquotes de dos mililitres de cada cultiu van ser recolectades, centrifugades a 3000 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient i resuspeses en 40 µl de medi de cultiu fresc. Les mostres es van incubar amb 0,2 mg de Lucifer Yellow (Molecular Probes). Solució stock: 40mg/ml en aigua MilliQ estèril) durant 2 hores a 30°C.

Seguidament es van realitzar tres rentats amb el buffer azida/succinat àcid a 4°C (50mM fosfat potàssic pH 7,5, 10mM NaN₃ i 10mM NaF).

Finalment les cèl.lules es van resuspendre en el mateix buffer per ser visualitzades en el microscopi òptic de fluorescència.

4.3.12- ASSAIG DE DETECCIÓ D'ANIONS SUPERÒXID.

L'assaig de detecció d'anions superòxid es va realitzar mitjançant el protocol adaptat descrit en Bindokas *et al*,(1996) i Aguilaniu *et al*, (2003).

Cèl.lules crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C es van recolectar en alíquotes d'un mililitre. Seguidament, les mostres es van centrifugar a 6000rpm durant 4 minuts a temperatura ambient i es van resuspendre en un mililitre de buffer fosfat salí (PBS1x) en presència de 0,1% de glucosa (o glicerol).

Les longituds d'ona per a mesurar la fluorescència emesa per l'Etidina en el espectrofluorofotòmetre RF-5000 són les seqüents: $\lambda_{d'excitació}=520\text{nm}/\lambda_{d'emissió}=590\text{nm}$.

En primer lloc, es va realitzar un blanc amb les cèl.lules resuspeses en buffer PBS1x sense sonda dihidroetidi (DHE). Seguidament es va afegir la sonda DHE (Sigma. Solució stock: 5mg/ml) a una concentració final de 5 µg/ml, directament a la cubeta de quars.

Les lectures es van realitzar cada 5 minuts després d'afegir el DHE durant 30 minuts. El DHE reacciona amb l'anió superòxid i genera etidina fluorescent, la qual es detectada per l'aparell. Amb el temps (més de 30 minuts aprox.) l'etidi comença a reaccionar amb el DNA de les cèl.lules i això comporta un increment més accentuat de la quantitat d'anions superòxid presents a l'interior cel.lular. Per aquest motiu, no es aconsellable allargar el tractament amb el DHE més de 30 minuts.

4.3.13- MICROSCOPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ.

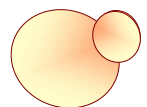
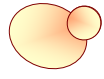
Les cèl.lules crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C es van fixar amb 2,5% de glutaraldehyd durant 1h en buffer fosfat 0,1M a pH 7,4 a 4°C.

Seguidament, les mostres es van rentar tres vegades amb el mateix buffer per realitzar una segona fixació en aigua amb 1% de tetraòxid de osmi durant 2 hores a 4°C.

Després dels rentats, les cèl.lules van ser deshidratades realitzant un seguit de dilucions seriades en acetona en un rang entre el 30 i el 100% de concentració, seguit d'un últim tractament amb òxid de propilè. Seguidament, les mostres van ser incubades en una resina (resina epoxi Durcupan ACM, de Fluka) de la següent manera: òxid de propilè 3:1 durant 45 minuts, 1:1 durant 45 minuts i 1:3 durant 45 minuts més abans de ser completament sumergides en la resina.

Les seccions per les preparacions de microscopia electrònica es van tallar i tractar amb citrat abans de ser visualitzades en el microscopi electrònic de transmissió Zeiss 910.

4.4- RESULTATS



L'objectiu que es preten assolir en aquesta segona part de la present Tesi Doctoral es caracteritzar la possible funció reguladora de les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 sobre l'activació de la via *PKC1*-MAP quinasa en resposta a estrès oxidatiu

Els antecedents bibliogràfics descriuen a la proteïna PICOT com la glutaredoxina monotiolica humana que intervé en la regulació de la via d'integritat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu regulant negativament la quinasa PKC (Isakov *et al.*, 2000; Witte *et al.*, 2000) (vegeu Introducció General, pàg.26).

Els antecedents derivats d'estudis realitzats en el nostre grup d'investigació demostren que:

- 1- Les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 són necessàries en resposta a estrès oxidatiu, presentant funcions redundants i additives en la protecció contra aquest tipus d'estrès (Pujol *et al.*, 2006).
- 2- L'estrès oxidatiu induït per l'agent oxidant peròxid d'hidrògen indueix l'activació de la via d'integritat cel.lular (Vilella *et al.*, 2005).
- 3- El doble mutant *grx3grx4* presenta sensibilitat cel.lular a agents que danyen la paret cel.lular, uns dels estímuls que activen la via d'integritat cel.lular (dada mostrada a continuació).

D'acord amb aquests antecedents i tenint en compte que els respectius dominis *GRX* i *TRX* de les glutaredoxines Grx3 i Grx4 de *S.cerevisiae* presenten una elevada homologia seqüencial amb els dominis *GRX* i *TRX* de la glutaredoxina humana PICOT (vegeu Introducció General, pàg.27), l'objectiu d'aquest treball investigador es centra en determinar l'implicació de les glutaredoxines Grx3 i Grx4 en la regulació de la via *PKC1*-MAP quinasa en resposta a estrès oxidatiu en *S.cerevisiae*.

1- El doble mutant *grx3grx4* presenta fenotips característics de mutants en elements de la via d'integritat cel.lular

Un fenotip característic de soques mutants en elements de la via d'integritat cel.lular és la pèrdua de viabilitat cel.lular en presència d'elevades temperatures (39°C) (Martín *et al.*, 1993), davant d'agents que danyen la paret cel.lular (Ketela *et al.*, 1999) o que causen estrès oxidatiu com el peròxid d'hidrogen (Vilella *et al.*, 2005).

Per iniciar aquest estudi, vam decidir sotmetre la soca salvatge, el mutant simple *slt2* i el doble mutant *grx3grx4* a un extensiu assaig de viabilitat cel.lular en presència de diversos agents que danyen específicament la paret cel.lular i agents que causen estrès oxidatiu:

- 20µg/ml de Calcofluor White, agent que inhibeix la síntesis de quitina de la paret cel.lular.
- 6,5µg/ml de Congo Red, agent que inhibeix la síntesis del β-1,4 glucà de la paret cel.lular.
- 3mM de Cafeïna, agent que causa estrès sobre la paret cel.lular, encara que es desconeix el mecanisme exacte a través del qual exerceix aquest estrès.
- 1mM de peròxid d'hidrògen, agent oxidant que pot travessar fàcilment la membrana cel.lular i penetrar a l'interior de la cèl.lula mitjançant un mecanisme de transport passiu (Chance *et al.*, 1979). A través de la reacció de Fenton, el peròxid d'hidrogen genera radicals hidroxil. Aquestes espècies reactives d'oxigen són tòxiques a nivell intracel.lular, provocant efectes a nivells de les proteïnes (Storz *et al.*, 1987; Flint *et al.*, 1993), els lípids (Coyle i Puttfarcken, 1993) o el DNA (Cadet *et al.*, 1997; Girard and Boiteux, 1997) (vegeu l'Introducció General, pàg.13).
- També vam realitzar un tractament d'estrès tèrmic a 38°C.

Com es detalla en la Figura 1, els resultats obtinguts en l'assaig de viabilitat cel.lular en placa ens van verificar que el doble mutant *grx3grx4* era sensible a tots els agents que causaven dany en la paret cel.lular, además de presentar termosensible a 38°C i sensibilitat a peròxid d'hidrogen. D'altra banda, també vam observar que en el nostre fons genètic CML128, el mutant simple *slt2* no presentava sensibilitat cel.lular davant cap dels diversos agents utilitzats en aquest assaig.

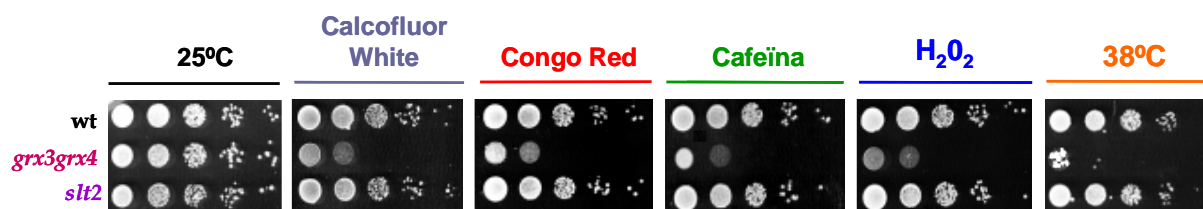


Figura 1- Assajos de viabilitat cel.lular en el doble mutant *grx3grx4* en presència d'agents que causen estrès en paret cel.lular, estrès tèrmic i estrès oxidatiu. Cultius de la soca salvatge i els mutants *grx3grx4* i *slt2* van ser crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C. Seguidament es van realitzar dilucions seriades que van ser replicades en plaques de medi mínim SD tractades amb els diversos agents químics descrits anteriorment. Aquestes plaques van ser incubades a 30°C. El tractament de xoc tèrmic es va realitzar a 38°C. Totes les plaques van ser incubades durant 2-3 dies.

La sensibilitat cel.lular que presenten alguns mutants de la via d'integritat cel.lular en resposta a estrès en paret cel.lular o estrès oxidatiu, s'ha associat a defectes en l'estructura de la paret cel.lular. Per aquest motiu vam decidir realitzar un estudi de l'ultraestructura de la paret cel.lular del doble mutant *grx3grx4* mitjançant microscopia electrònica de transmissió (TEM).

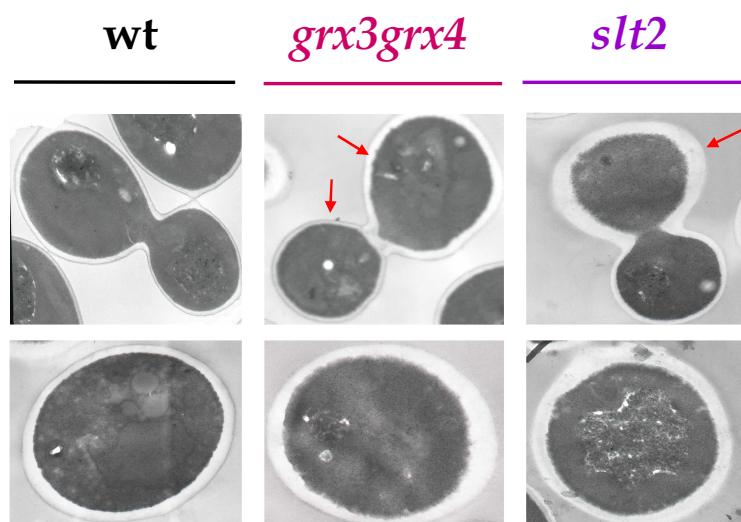


Figura 2- Modificacions ultraestructurals en la paret cel.lular. Cultius de la soca salvatge, del doble mutant *grx3grx4* i del mutant simple *slt2* van ser crescudes en fase exponencial en medi mínim SD a 25°C sense cap tractament addicional. Posteriorment, alíquotes de cada cultiu van ser processades segons el protocol descrit en Materials i Mètodes pàg.125 per ser visualitzades en el microscopi electrònic de transmissió.

Les imatges corresponents al doble mutant *grx3grx4* ens mostraven una major acumulació del polímer glucà tan en la paret cel.lular de la cèl.lula mare com de la cèl.lula filla, respecte a la quantitat de polímer glucà observada en la soca salvatge. En canvi, en el mutant simple *slt2* aquest augment en el polímer glucà només era visible en la cèl.lula mare (Figura 2).

Observats aquests resultats, ens vam plantejar si les sensibilitats cel.lulars detectades en el doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès en la paret cel.lular i estrès oxidatiu (Figura 1), eren una conseqüència directa dels defectes en l'estructura de la paret cel.lular (Figura 2) o bé eren deguts a problemes en l'activació de la via *PKC1*.

Per respondre aquesta qüestió van realitzar l'assaig de viabilitat cel.lular sota les mateixes condicions descrites en la Figura 1, afegint en el medi de cultiu 0,8M de Sorbitol. El sorbitol és un estabilitzador osmòtic de paret cel.lular. L'addició d'un estabilitzador osmòtic actua de forma preventiva sobre la lisi de les cèl.lules causada per danys o defectes en la paret cel.lular. La supressió per sorbitol de la sensibilitat cel.lular davant agents que danyaven la paret cel.lular, era una característica general en molts mutants d'elements implicats en la via d'integritat cel.lular.

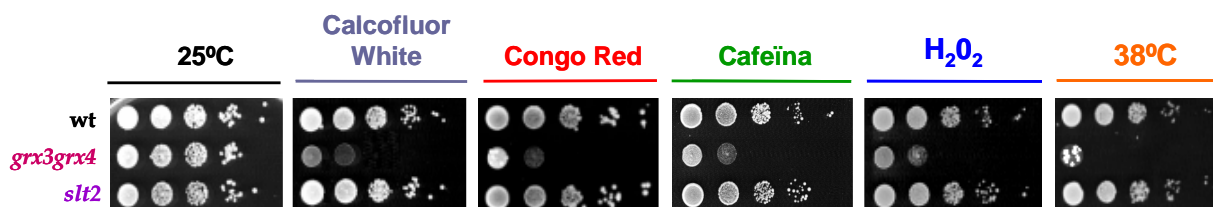


Figura 3- Assajos de viabilitat cel.lular en el doble mutant *grx3grx4* davant agents que causen estrès en paret cel.lular, estrès tèrmic i estrès oxidatiu en presència de 0,8M de Sorbitol. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser processades i analitzades sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 1. En aquest cas, en totes les plaques es va afegir 0,8M de Sorbitol.

Els resultats detallats en la Figura 3, ens mostraven que la presència de l'agent osmoregulador Sorbitol no restaurava la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* davant els diversos tractaments utilitzats.

Aquest fet indicava que el defectes en la paret cel.lular no eren la causa de la pèrdua de viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* davant els diversos agents que causaven estrès en la paret cel.lular i estrès oxidatiu.

Un dels altres fenotips característics en mutants en la via d'integritat cel.lular eren els defectes en la formació del septe: problemes en el diàmetre i l'estabilitat del septe, defectes en l'organització i la localització de proteïnes septines al voltant de septe o canvis en la morfologia cel.lular durant la gemmació, com una elongació desmesurada de la cèl.lula filla (Gladfelter *et al.*, 2002). Van Drogen *et al.*, (2002) van observar que Slt2 es localitzava en les zones de creixement polaritzat de la gemma. A mesura que el cicle cel.lular anava avançant cap a la fase mitòtica, Slt2 es relocalitzava en la regió del septe, entre la cèl.lula mare i la cèl.lula filla.

Per observar si l'absència de Grx3 i Grx4, també afectava a la localització de Slt2 en el septe, vam realitzar un estudi *in vivo* de la localització subcel.lular de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4* durant la fase exponencial. Per monitoritzar *in vivo* la localització de Slt2, la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* van ser transformades amb un plàsmid multicòpia que contenia la proteïna de fusió Slt2-GFP sota el promotor regulable *MET* (pSlt2GFP) (vegeu Materials i Mètodes, pàg. 117).

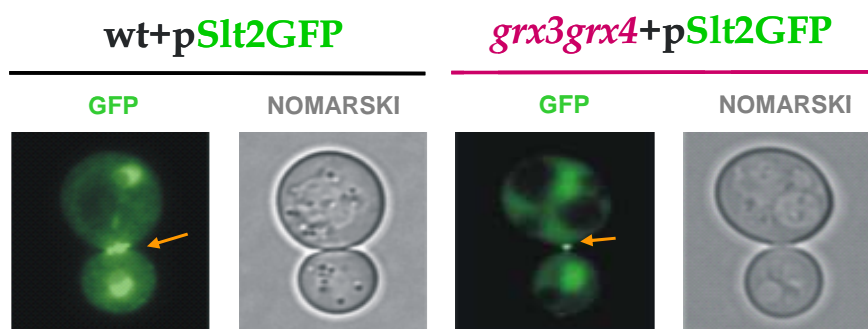


Figura 4- Localització *in vivo* de la quinasa Slt2 en el septe. Cultius de la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* transformades amb la quinasa Slt2 marcada amb l'epítip GFP van ser crescudes en medi mínim SD en presència de 25µM de metionina fins arribar a fase exponencial. Seguidament les mostres van ser visualitzades en el microscopi òptic de fluorescència.

Com es detalla en la Figura 4, en condicions normals la localització de Slt2 en la soca salvatge era nucli-citoplasmàtica i a més a més es distribuïa correctament al llarg de tot el septe cel.lular.

En el doble mutant *grx3grx4*, Slt2 també presentava una localització nucli-citoplasmàtica. No obstant, Slt2 es distribuïa aberrantment al llarg del septe, concentrant-se en una zona concreta d'aquest.

Finalment, amb l'objectiu d'aprofundir en la caracterització morfològica del septe en el doble mutant *grx3grx4*, vam analitzar la localització de la septina Cdc11. La septina Cdc11, juntament amb altres cinc septines, forma un complex que s'acopla al septe i que participa activament durant la citoquinesi (Versele *et al.*, 2005; Aurelie *et al.*, 2008; Nagaraj *et al.*, 2008).

Per aquest motiu, cultius de la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* van ser transformades amb un plàsmid que contenia la proteïna de fusió Cdc11-GFP (pCdc11GFP) (vegeu Materials i Mètodes, pàg.117) per poguer monitoritzar *in vivo* la localització de la septina Cdc11 en el doble mutant *grx3grx4* en condicions normals.

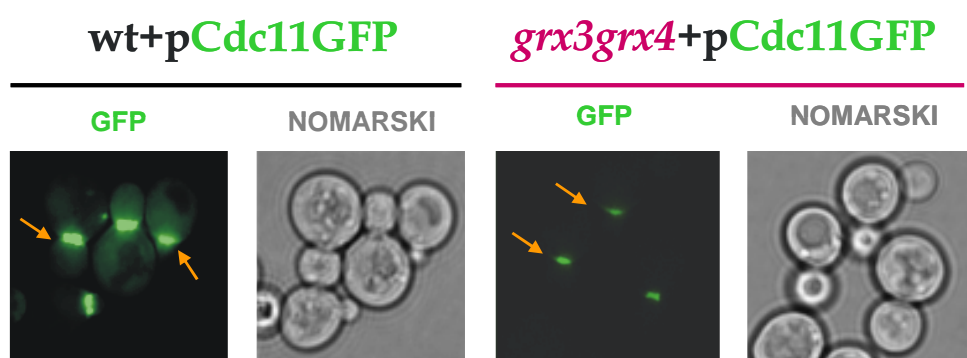


Figura 5- Localització *in vivo* de la septina Cdc11 en el septe. Cultius de les soques detallades en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a una OD₆₀₀ de 0,5-0,6. Seguidament, alíquotes de cada cultiu van ser visualitzades directament en el microscopi òptic de fluorescència.

Com s'observa en la Figura 5, en la soca salvatge la septina Cdc11 no presentava defectes en la seva correcta localització, distribuïnt-se homogèniament per tot el llarg i l'ample del septe cel.lular. En canvi, en absència de Grx3 i Grx4, Cdc11 presentava una localització aberrant, concentrant-se només en una regió del septe.

En resum, el doble mutant *grx3grx4* presentava sensibilitat cel.lular davant agents que danyaven la paret cel.lular i causaven estrès oxidatiu. Malgrat presentar defectes estructurals en la paret cel.lular, la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* no era restablerta per Sorbitol. A més a més, presentava defectes en la correcta localització de la quinasa Slt2 i de la septina Cdc11 en el septe cel.lular. Aquests resultats suggerien que alguns dels defectes fenotípics observats en absència de Grx3 i Grx4 podrien ser una conseqüència secundària de problemes en la via *PKC1*.

2- En absència de les glutaredoxines Grx3 i Grx4 la via *PKC1*-MAP quinasa no s'activa en resposta a estrès oxidatiu.

Amb l'objectiu d'identificar defectes en l'activació de la via *PKC1* en absència de Grx3 i Grx4, vam iniciar un exhaustiu estudi de la fosforilació de Slt2 en condicions d'estrès oxidatiu i en resposta a agents que danyen la paret cel.lular.

Cultius cel.lulars de la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* van ser crescudes fins arribar a fase exponencial i seguidament tractades amb 1mM de l'agent oxidant peròxid d'hidrògen. Alíquotes de cada cultiu van ser recolectades en diversos intervals de temps durant les dues hores de tractament amb el peròxid de hidrogen. Seguidament les mostres van ser processades per realitzar l'assaig de Western blot, utilitzant l'anticòs policlonal p44/42 per detectar la fosforilació de la quinasa Slt2 com a conseqüència de l'activació de la via *PKC1* (vegeu Materials i Mètodes, pàg.120).

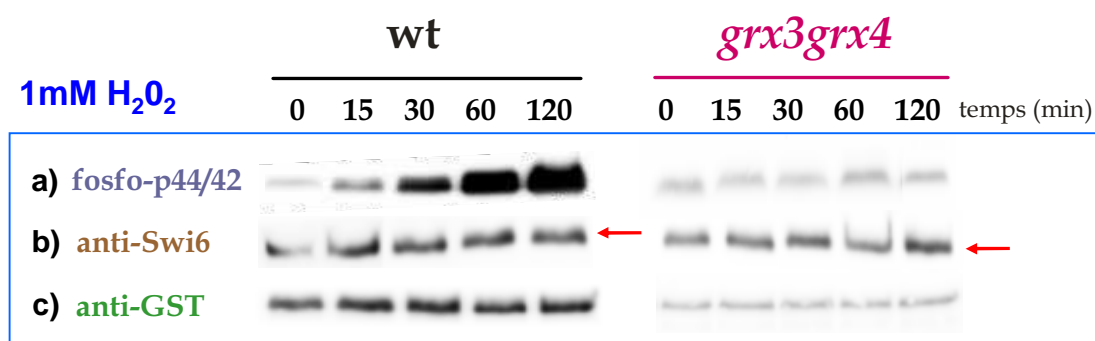


Figura 6- En absència de les glutaredoxines Grx3 i Grx4 la via *PKC1* no s'activa en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* van ser crescudes exponencialment a 25°C en medi mínim SD i seguidament tractades amb 1mM de peròxid d'hidròge. Extractes proteïcs de cadascuna de les alíquotes recolectades en els temps indicats en la Figura van ser analitzats mitjançant Western blot. **(a)** Detecció de la fosforilació de la proteïna quinasa Slt2 utilitzant l'anticòs policlonal anti-fosfo-p44/42. Aquest anticòs detecta la doble fosforilació en els residus Thr²⁰² /Tyr²⁰⁴ de la proteïna Slt2. Està acceptat que la detecció de la forma doblement fosforilada de Slt2 proporciona una mesura de l'activació d'aquesta quinasa i en conseqüència de l'activació de la via *PKC1* (de Nobel *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000). **(b)** Detecció de la fosforilació de la proteïna Swi6 mitjançant l'anticòs policlonal anti-Swi6 (de la Torre-Ruiz *et al.* 2002). **(c)** Detecció de la quantitat total de proteïna Slt2 amb l'anticòs policlonal anti-GST (Molina *et al.*, 2004). En els tres casos, l'anti-rabbit va ser utilitzat com anticòs secundari (de la Torre *et al.*, 2002) (vegeu Materials i Mètodes, pàg. 120).

En absència de Grx3 i Grx4, la via *PKC1* no s'activava en resposta a l'estrès oxidatiu causat pel peròxid d'hidrogen, respecte a l'activació gradual de la via detectada en la soca salvatge (Figura 6a).

En la majoria de les cascades de MAPKs, l'estrès que activa la via finalitza amb la regulació transcripcional dels gens encarregats de protegir a la cèl.lula de dit estrès. La via *PKC1* regula l'activació de dos factors transcripcionals, Rlm1 i Swi4/Swi6 (vegeu l'Introducció Capítol 2, pàg.93). La fosforilació del factor transcripcional **Swi6** per part de Slt2 detectada amb anti-Swi6, és un altre paràmetre que indica que la via *PKC1* està activada.

En el doble mutant *grx3grx4* no s'observava retard en la mobilitat electroforètica de la proteïna Swi6, respecte al retard observat en la soca salvatge (Figura 6b), dada consistent amb l'absència d'activació de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4*.

Per completar aquest anàlisi també es van quantificar els nivells de proteïna total Slt2 presents en totes les mostres analitzades (Figura 6c). Els resultats obtinguts amb **anti-GST** van mostrar que el doble mutant *grx3grx4* presentava uns nivells de proteïna total Slt2 molt més baixos que els nivells detectats en la soca salvatge.

Amb l'objectiu d'identificar l'especificitat de Grx3 i Grx4 en la regulació de l'activitat de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu, van analitzar la fosforilació de Slt2 en resposta a altres tipus d'estrès que afectaven a la paret cel·lular i activaven la via *PKC1*, com eren l'estrès tèrmic o el tractament amb el Calcofluor White o la Cafeïna .

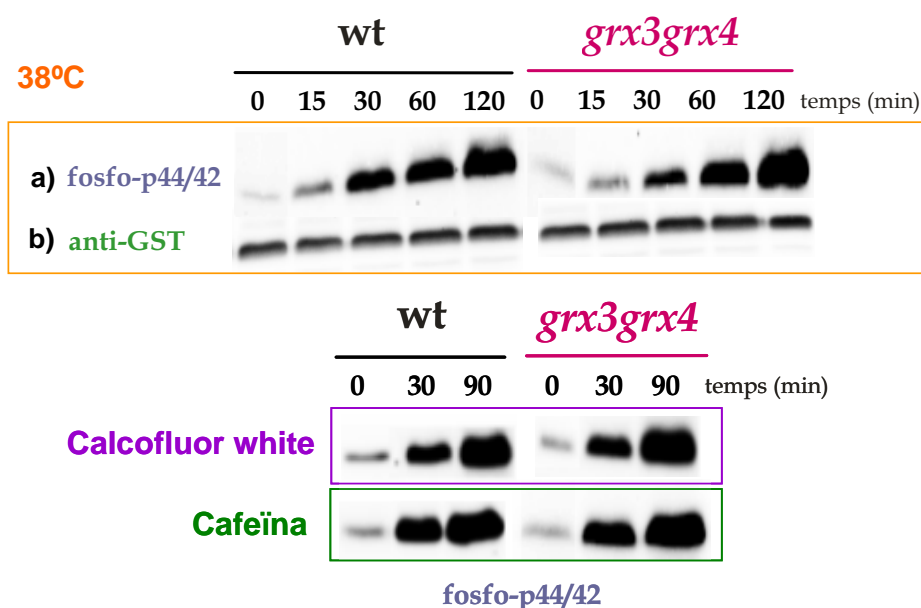


Figura 7- L'absència de les Grx3 i Grx4 no afecta a l'activació de la via *PKC1* en resposta a agents que danyen la paret cel.lular. Cultius de la soca salvatge i del doble mutant *grx3grx4* van ser crescudes exponencialment a 25°C en medi mínim SD. Mostres de cada cultiu van ser recolectades en els temps que s'indiquen en la Figura, després de realitzar els següents tractaments: xoc tèrmic a 38°C i tractament amb Calcofluor White (20µg/ml) i Cafeïna (12mM). **(a)** Detecció dels nivells de fosforilació de Slt2 amb anti p44/42. **(b)** Quantitat de proteïna total Slt2 amb anti-GST.

Com es mostra en la Figura 7, l'absència de Grx3 i Grx4 no afectava a l'activació de la via *PKC1* ni en resposta a xoc tèrmic de 38°C ni en resposta al dany en paret cel.lular causat pel Calcofluor White o la Cafeïna. A més a més, l'anàlisi amb anti-GST no va mostrar canvis en els nivells de proteïna total Slt2 en el doble mutant *grx3grx4* a 38°C respecte als nivells detectats en la soca salvatge.

En resum, aquests resultats confirmaven que Grx3 i Grx4 participaven en l'activació de la via *PKC1* específicament en resposta a estrès oxidatiu.

No obstant, ens vam qüestionar si l'absència de Grx3 i Grx4 només afectava a nivell d'activació de Slt2 o també participaven en la regulació d'altres funcions regulades per Slt2.

Com es detalla ampliament en l'Introducció del present capítol, el citoesquelet d'actina és una de les dianes ampliament regulades per la via *PKC1*. Es ben conegut que diversos tipus d'estrès com xoc tèrmic (Lillie *et al.*, 1994; Desrivieres *et al.*, 1998), xoc osmòtic (Chowdhury *et al.*, 1992), estrès oxidatiu (Vilella *et al.*, 2005) i en general estrès en la paret cel.lular (Delley *et al.*, 1999, Torres *et al.*, 2002) indueixen despolarització transitòria del citoesquelet d'actina.

A més a més, resultats previs en el nostre laboratori demostraven que:

- 1- Algunes proteïnes de la via d'integritat cel.lular mediaven la repolarització del citoesquelet d'actina en condicions d'estrès oxidatiu, com la quinasa Pkc1 (Vilella *et al.*, 2005).
- 2- Les glutaredoxines Grx3 i Grx4 eren necessàries en resposta a estrès oxidatiu, presentant funcions redundants i additives en la protecció contra dit estrès (Pujol *et al.*, 2006).

D'acord amb els antecedents i amb l'objectiu d'investigar el possible paper funcional de Grx3 i Grx4 en les funcions regulades per via *PKC1*, vam decidir realitzar estudis de l'organització del citoesquelet d'actina en el doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu.

Cultius de la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* van ser crescudes exponencialment a 25°C en medi mínim SD. Seguidament van ser tractats amb 1mM de peròxid d'hidrogen. Després d'aplicar a les mostres el protocol de tinció d'actina amb Rodamina Faloidina (vegeu Materials i Mètodes, pág.123), vam realitzar el seguiment morfològic del citoesquelet d'actina després de 30 minuts i 3 hores de tractament amb l'agent oxidant. Per completar les imatges obtingudes en el microscopi òptic de fluorescència, paral·lelament es va contabilitzar la proporció de cèl·lules despolimeritzades en cada mostra.

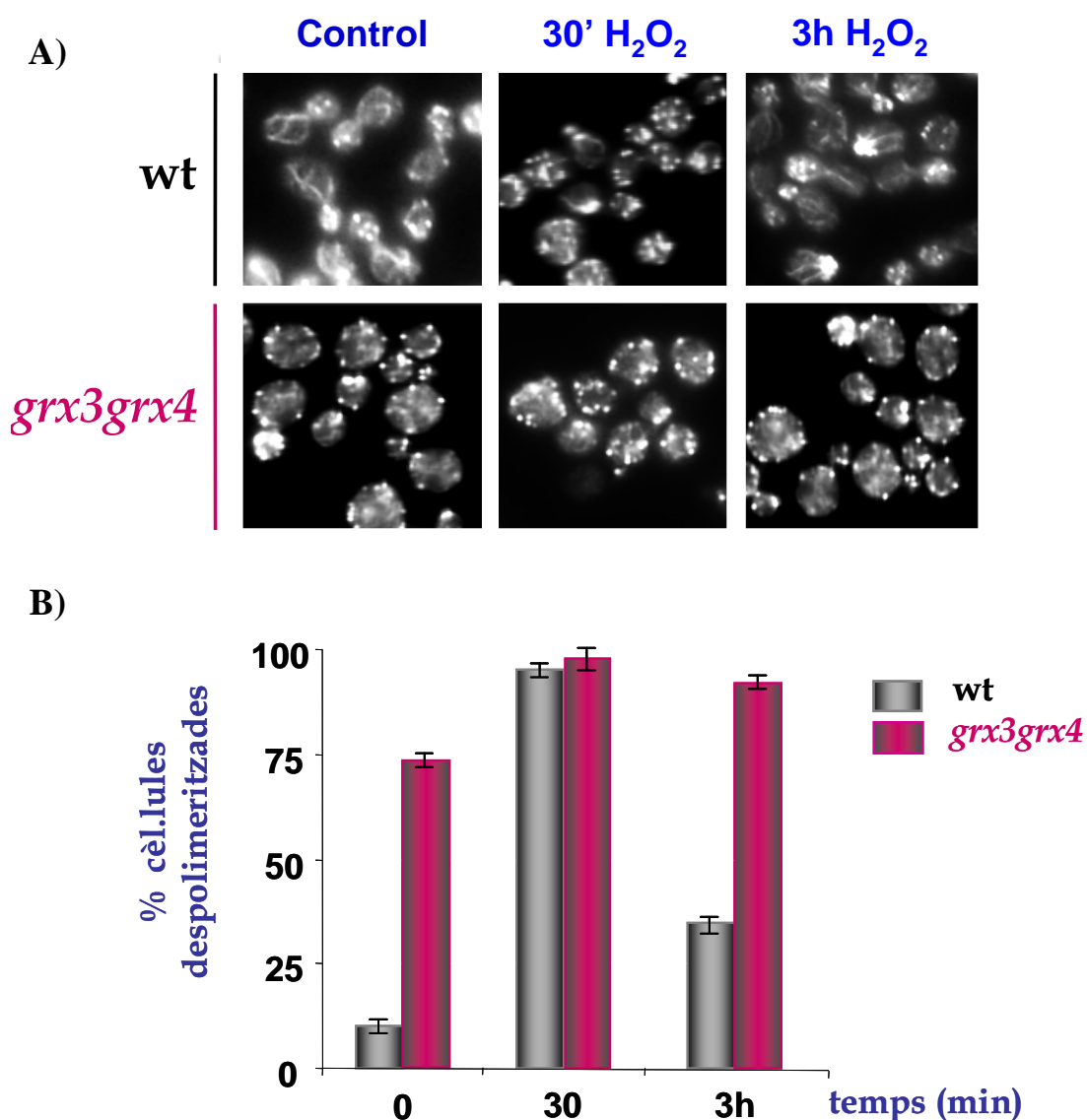


Figura 8- Organització del citoesquelet d'actina del doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu. Tincions d'actina en mostres procedents de cultius de la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C i posteriorment tractades durant 3 hores amb 1mM de peròxid d'hidrogen. **(A)** Seguiment morfològic del citoesquelet d'actina mitjançant microscopi òptic de fluorescència. **(B)** Histogrames que representen en % el nombre de cèl.lules despolaritzades presents en cada mostra analitzada.

Com es detalla en les imatges i en l'histograma de la Figura 8, després de 30 minuts de tractament amb peròxid d'hidrogen, la soca salvatge presentava una despolarització transitòria del citoesquelet d'actina (visualitzada com a “patches” d'actina distribuïts a l'atzar per tot el citoplasma) seguit d'una repolarització gradual que començava lentament a partir de les 3 hores.

En canvi, el doble mutant *grx3grx4* presentava una desorganització intrínseca del citoesquelet d'actina en condicions normals que s'anava accentuant gradualment després de 30 minuts de tractament amb l'agent oxidant. No obstant, el citoesquelet d'actina no era repolaritzat passades les 3 hores de tractament.

Aquests resultats ens van permetre concloure dos fets:

- En condicions normals, Grx3 i Grx4 eren necessàries per mantenir la correcta polarització del citoesquelet d'actina.
- En resposta a estrès oxidatiu, els defectes en la repolarització del citoesquelet d'actina i l'absència d'activació de Swi6 detectada en el doble mutant *grx3grx4* (Figura 6), confirmaven que Grx3 i Grx4 estaven implicades en l'activació de Slt2 i en conseqüència en els mecanismes regulats per la via *PKC1*.

3- En absència de Grx3 i Grx4 la sobreexpressió de la quinasa Slt2 i l'al.lel constitutivament actiu *BCK1-20* restauren parcialment l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

Amb l'objectiu de confirmar si Grx3 i Grx4 estaven directament relacionades amb la via *PKC1*, vam decidir transformar la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* amb els següents plàsmids:

a) plàsmid multicòpia que contenia la quinasa Slt2 sota el seu propi promotor. Aquest plàsmid contenia l'epítot HA en l'extrem C-terminal de la proteïna (pSlt2HA) (vegeu Material i Mètodes, pàg. 117).

b) plàsmid que contenia l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* (pBCK1-20) (vegeu Materials i Mètodes, pàg. 118). Bck1 és la MAPKK del mòdul MAP quinasa de la via *PKC1* activat per la proteïna Pkc1. La substitució de l'aminoàcid alanina per una prolina en la regió propera al domini catalític de *BCK1* genera l'al·lel hiperactiu *BCK1-20*. Aquest al·lel manté la via constitutivament activa independentment dels estímuls rebuts (Lee i Levin, 1992).

Aquest estudi es va iniciar amb l'anàlisi dels nivells d'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu en les soques prèviament descrites.

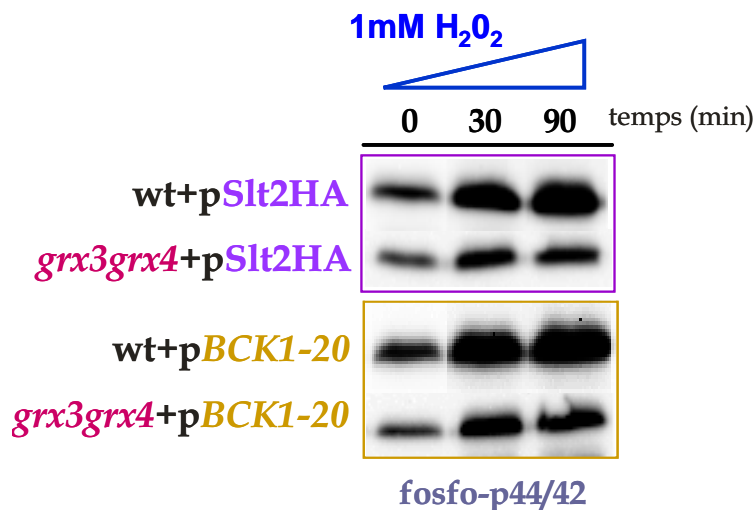


Figura 9- La sobreexpressió de la quinasa Slt2 i l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* en el doble mutant *grx3grx4* restauren parcialment l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu. Les soques descrites en la Figura van ser crescudes exponencialment en medi mínim SD i posteriorment tractades amb 1mM de peròxid d'hidrògen durant 90 minuts. Alíquotes de cada cultiu van ser recolectades en el temps indicats i posteriorment processades per detectar la fosforilació de Slt2 mitjançant l'anticòs fosfo-p44/42.

Com s'observa en la Figura 9 tan la sobreexpressió de Slt2 com l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* en el doble mutant *grx3grx4* restablen parcialment l'activació de la via *PKC1*, detectant uns nivells de fosforilació de Slt2 més baixos que els nivells detectats en la soca salvatge.

Seguidament, aquestes soques van ser sotmeses a assajos de viabilitat cel.lular en resposta a estrès en la paret cel.lular i estrès oxidatiu. A més a més, també vam analitzar l'organització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu.

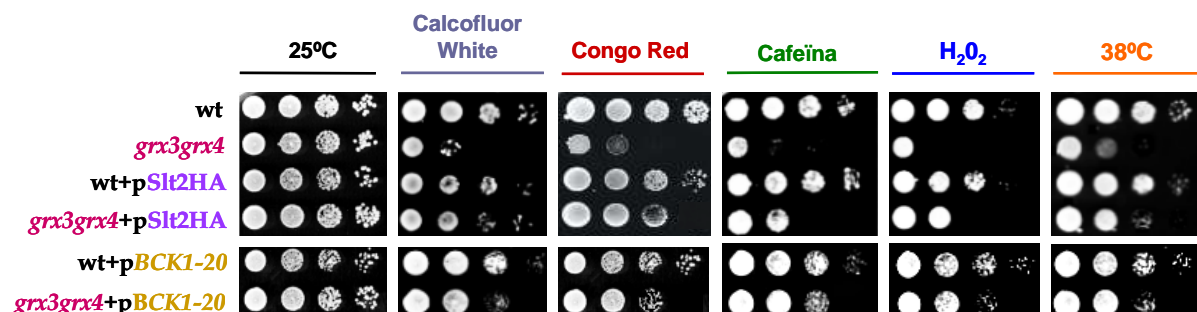


Figura 10- Viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant la quinasa Sl2 i l'al.lel hiperactiu *BCK1-20* en resposta a dany en paret cel.lular i estrès oxidatiu. Soca salvatge i doble mutant *grx3grx4* van ser transformades respectivament amb el plàsmid derivat del vector YEP352 que contenia el gen *SLT2* sota el seu propi promotor i amb el plàsmid que contenia l'al.lel constitutivament actiu *BCK1-20*. Cultius d'aquestes soques van ser processades i analitzades sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 1.

Els assajos de viabilitat cel.lular mostraven que tan la sobreexpressió de Sl2 com l'al.lel hiperactiu *BCK1-20* restablien parcialment la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* en totes les condicions d'estrès descrites, respecte a la viabilitat cel.lular observada en la soca salvatge.

D'altra banda, l'anàlisi del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu mostrava que les sobreexpressions de Sl2 (Figura 11A) i l'al.lel hiperactiu *BCK1-20* (Figura 11B) restauraven l'organització del citoesquelet d'actina del doble mutant *grx3grx4* tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu.

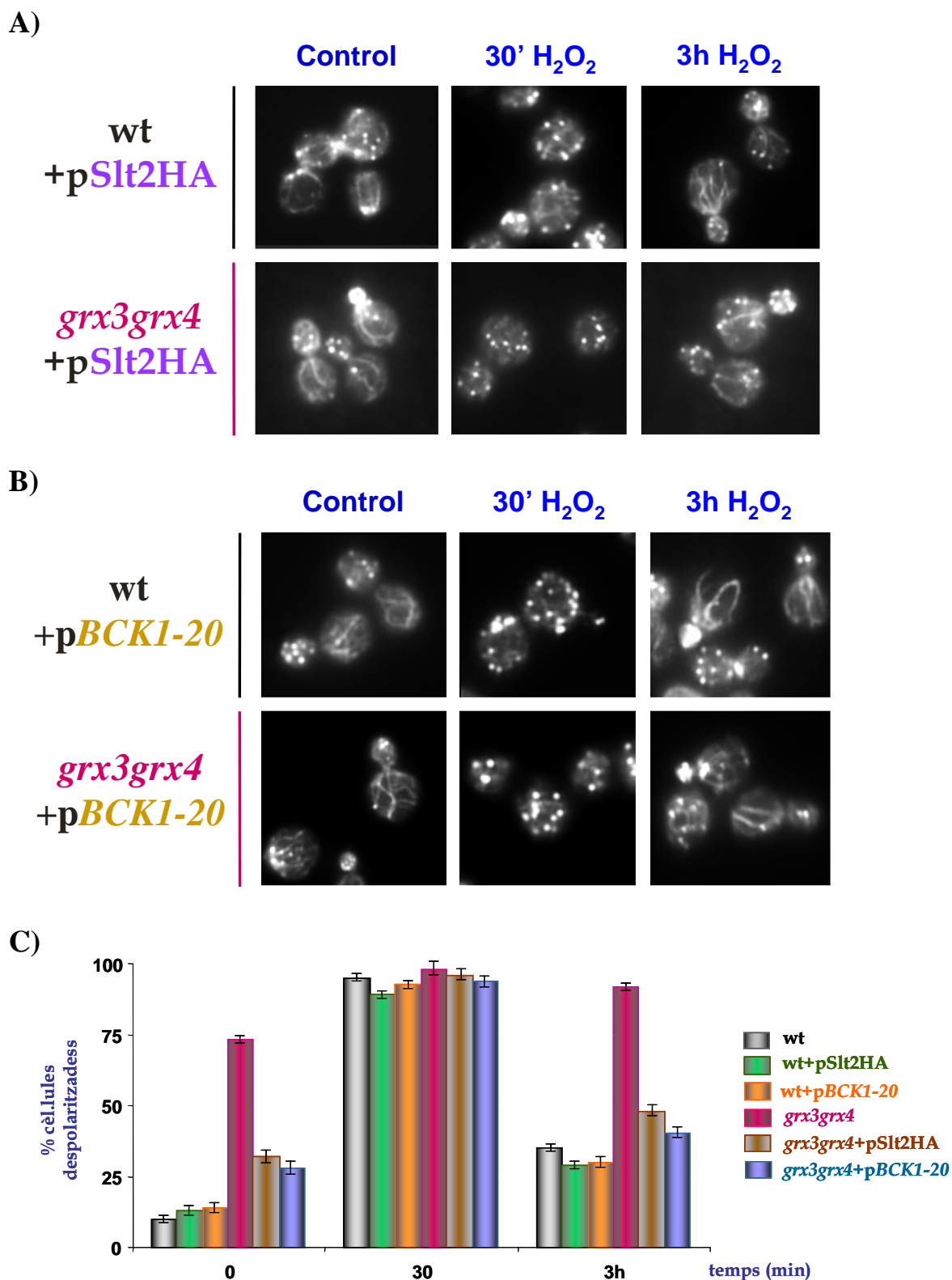


Figura 11- Organització del citoesquelet d'actina del doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Slt2 i amb l'al·lel hiperactiu *BCK1-20*. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser processades i analitzades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 8 per realitzar *in vivo* el seguiment morfològic del citoesquelet d'actina en resposta a estress oxidatiu.

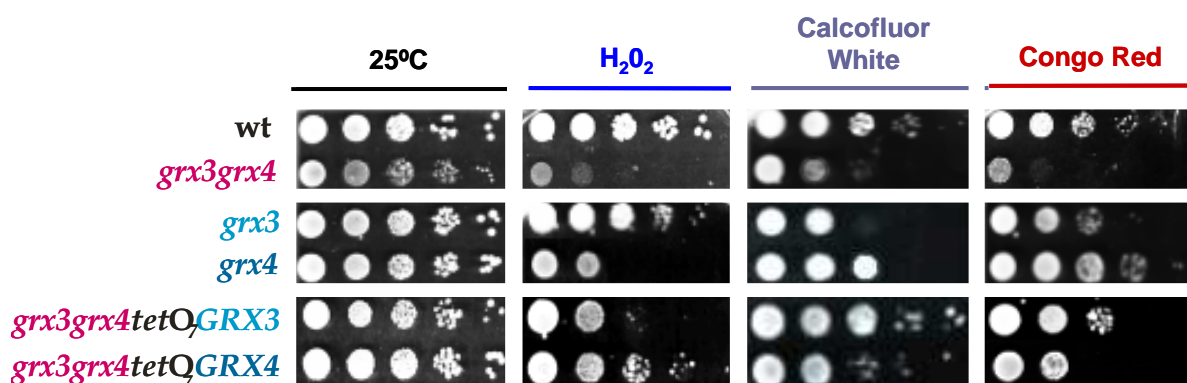
En resum, el fet de que la sobreexpressió de Slt2 o l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* restauressin parcialment l'activació de la via i la viabilitat cel·lular del doble mutant *grx3grx4*, confirmava que Grx3 i Grx4 eren necessàries per la correcta i eficaç activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

D'altra banda, els resultats obtinguts amb l'anàlisi del citoesquelet d'actina suggerien que Grx3 i Grx4 actuarien cooperativament amb Slt2 en els processos de polarització del citoesquelet d'actina tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu.

4- Grx3 i Grx4 presenten especificitat en la resposta cel·lular davant diversos estímuls que activen la via *PKC1*.

Fins ara hem considerat que els defectes en l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu del doble mutant *grx3grx4* eren deguts a l'absència simultània de Grx3 i Grx4. No obstant, ens vam plantejar si Grx3 i Grx4 presentaven funcions redundants i additives en la regulació de la via *PKC1*, com succeïa durant la regulació del factor transcripcional *Aft1* (Pujol *et al.*, 2006) o si pel contrari, Grx3 i Grx4 per separat presentaven funcions independents en la regulació d'aquesta via.

Una aproximació de la possible especificitat de Grx3 i Grx4 en la regulació de la via *PKC1* va ser mitjançant estudis de viabilitat cel·lular davant agents que danyaven la paret cel·lular i que causaven estrès oxidatiu, en les següents soques: la soca salvatge, els mutants simples *grx3* i *grx4*, el doble mutant *grx3grx4* i la soca salvatge i doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Grx3 i Grx4.



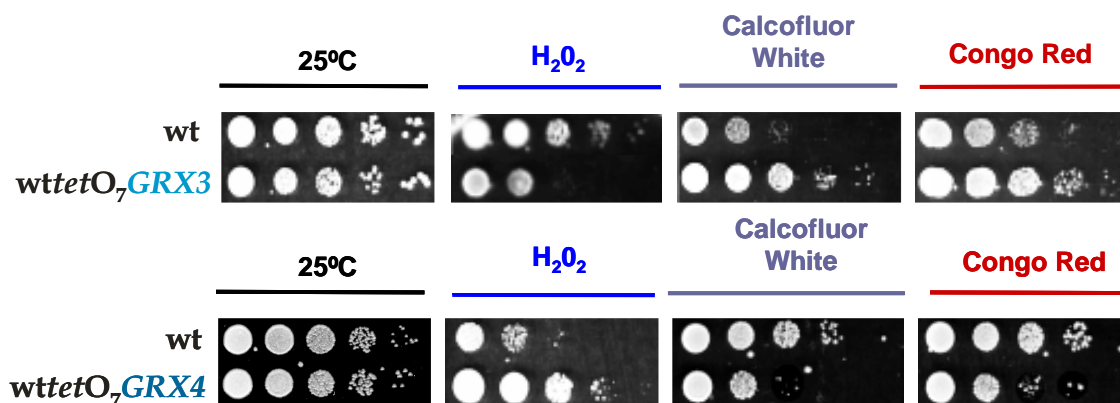


Figura 12- La glutaredoxina Grx3 confereix resistència cel.lular davant estrès en la paret cel.lular mentre que la glutaredoxina Grx4 confereix resistència cel.lular davant estrès oxidatiu. Cultius de les soques detallades en la Figura van ser crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C. Seguidament al·lquotes de cada cultiu van ser recolectades per realitzar els diversos assajos de viabilitat cel.lular en resposta a peròxid d'hidrogen (1mM), Calcofluor White 20µg/ml i Congo Red (6,5µg/ml). Les plaques, realitzades per duplicat, van ser incubades a 30°C durant 3 dies.

Com es mostra en la Figura 12, mentre que el mutant simple *grx3* i el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Grx4 presentaven una parcial sensibilitat cel.lular a Calcofluor White i a Congo Red respecte a la elevada sensibilitat cel.lular detectada en el doble mutant *grx3grx4*, el mutant simple *grx4* i el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Grx3 eren parcialment sensibles a peròxid hidrogen.

D'altra banda, la sobreexpressió de Grx3 provocava més resistència cel.lular a agents que danyaven la paret i paral.lelament més sensibilitat a estrès oxidatiu en la soca salvatge, mentre que la sobreexpressió de Grx4 en la soca salvatge induïa més resistència en resposta a dany oxidatiu però més sensibilitat cel.lular davant Calcofluor White i Congo Red.

En resum, aquestes dades mostraven que Grx3 i Grx4 presentaven certa especificitat davant els diversos estímuls que activaven la via *PKC1*: Grx3 conferia resistència cel.lular davant estrès en paret cel.lular, mentre que Grx4 conferia resistència a estrès oxidatiu.

5- L'absència de Grx4 afecta negativament l'activació de la via *PKC1* en resposta estrès oxidatiu.

Amb l'objectiu de determinar si les sensibilitats cel.lulars detectades en el mutant simple *grx4* i de la soca salvatge sobreexpressant Grx3 en resposta a peròxid de hidrògen eren conseqüència de defectes en l'activació de la via *PKC1*, vam analitzar els nivells d'activació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu en diverses de les soques analitzades en l'apartat 4. A més a més, per quantificar els nivells de proteïna total Slt2 presents en les mostres, les soques van ser prèviament transformades amb el vector multicòpia que contenia el gen *SLT2* sota el seu propi promotor (pSlt2HA).

Paral.lelament, també vam realitzar un tractament de xoc tèrmic a 38°C amb l'objectiu d'analitzar amb més detall les possibles especificitats de Grx3 i Grx4 en l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès en la paret cel.lular i estrès oxidatiu

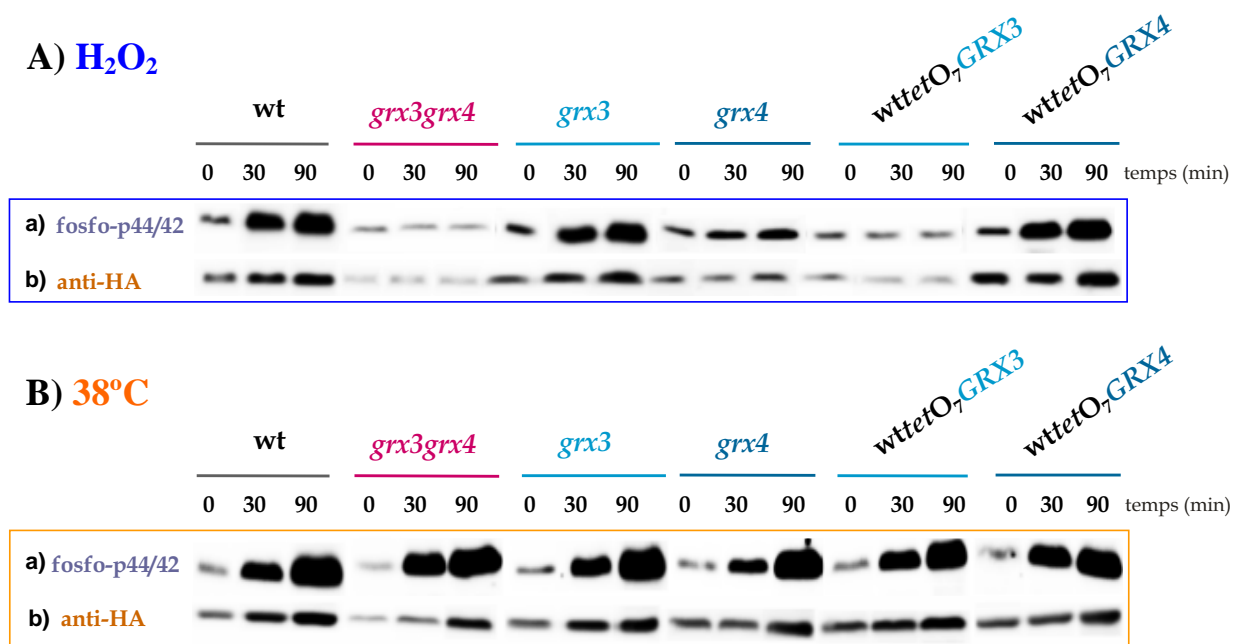


Figura 13- L'absència de Grx4 i la sobreexpressió de Grx3 afecten negativament l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de la soca salvatge, mutants simples *grx3* i *grx4* i soca salvatge sobreexpressant Grx3 i Grx4 respectivament van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament es van realitzar en paral.lel els següents tractaments: estrès oxidatiu amb 1mM de peròxid d'hidrògen **(A)** i xoc tèrmic a 38°C **(B)**. Alíquotes de cada soca van ser recolectades en els temps indicats en la Figura i processades per realitzar Western blot: l'anticòs fosfo-p44/42 va ser utilitzat per detectar la fosforilació de Slt2 **(a)**. L'anticòs monoclonal anti-hemaglutinina (anti-HA) va ser utilitzat per detectar els nivells de proteïna total Slt2 present en els extractes proteïcs **(b)** (vegeu Materials i Mètodes, pàg.120).

Com es detalla en la Figura 13A, apartat a), en resposta a estrès oxidatiu, l'absència de Grx3 no produïa cap efecte sobre l'activació de Slt2 detectada en la soca salvatge.

En canvi, en absència de Grx4 vam detectar baixos nivells de fosforilació de Slt2 respecte als nivells detectats en la soca salvatge i respecte a l'absència de fosforilació de Slt2 detectada en el doble mutant *grx3grx4*.

D'altra banda, mentre que la sobreexpressió de Grx4 no produïa cap efecte sobre la fosforilació de Slt2 en la soca salvatge, la sobreexpressió de Grx3 en la soca salvatge inhibia l'activació de la via *PKC1*.

Respecte als nivells totals de proteïna Slt2 en resposta a estrès oxidatiu (Figura 13A, apartat b), el mutant simple *grx4* presentava uns nivells de proteïna més baixos que els detectats en la soca salvatge i el mutant simple *grx3*.

D'altra banda, mentre que la sobreexpressió de Grx4 no produïa cap efecte sobre els nivells de proteïna Slt2 de la soca salvatge, la sobreexpressió de Grx3 provocava un descens en aquests nivells.

Finalment, com vam observar anteriorment (vegeu Figura 6c), el doble mutant *grx3grx4* presentava uns nivells de proteïna Slt2 molt més baixos que els nivells detectats en el mutant simple *grx4* i respecte als nivells detectats en la soca salvatge i el mutant simple *grx3*.

En resum, aquests resultats suggerien el paper que realitzava concretament la glutaredoxina Grx4 en la regulació de la via *PKC1* específicament en resposta a estrès oxidatiu, donat que en resposta a xoc tèrmic (Figura 13B) no van observar diferències en la fosforilació de Slt2 en cap de les soques analitzades respecte a la fosforilació detectada en la soca salvatge. A més a més, les nostres dades també suggerien que la sobreexpressió de Grx3 podria estar exercint un control negatiu sobre la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

En l'apartat 2 de Resultats vam mostrar que defectes en l'activació de la via *PKC1* en el doble mutant *grx3grx4* repercutien en la correcta organització del citoesquelet d'actina. Per aquest motiu vam analitzar si els defectes en la correcta fosforilació de Slt2 en el mutant simple *grx4* en resposta a estrès oxidatiu també es veien reflexats en defectes en l'organització del citoesquelet d'actina.

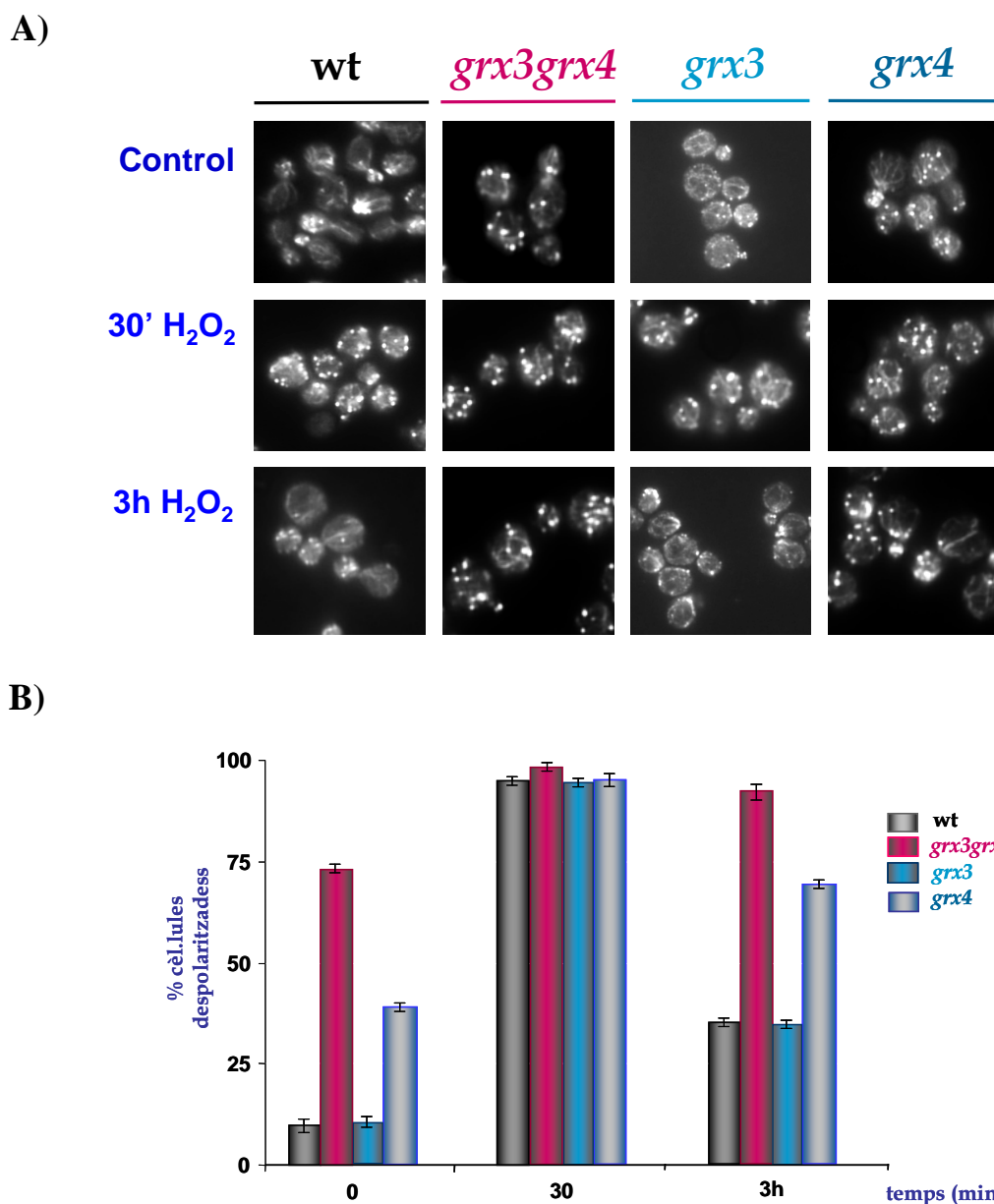


Figura 14- Organització del citoesquelet d'actina en els mutants simples *grx3* i *grx4*. Cultius de la soca salvatge, els mutants simples *grx3* i *grx4* i el doble mutant *grx3grx4*, van ser processades i analitzades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 8, per realitzar el seguiment morfològic *in vivo* del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu.

Com s'observa en la Figura 14A, l'absència de Grx3 no causava defectes en la correcta organització del citoesquelet d'actina.

En canvi, l'absència de Grx4 provocava una parcial despolarització del citoesquelet en condicions normals i continuava presentant defectes en la correcta repolarització del citoesquelet a les 3 hores de tractament amb el peròxid d'hidrogen. No obstant, els nivells de despolarització del citoesquelet d'actina tan en condicions normals com en resposta a

estrès oxidatiu continuaven sent més elevats en el doble mutant *grx3grx4* que en el mutant simple *grx4*.

En resum, mentre que el mutant *grx4* presentava defectes en la correcta fosforilació de Slt2 i en la polarització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu, el mutant *grx3* no presentava cap d'aquests fenotips. Aquestes dades suggerien que Grx4 era la principal glutaredoxina encarregada de regular la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu. No obstant, l'absència d'activació de Slt2 i la elevada desorganització del citoesquelet d'actina presents amb l'absència simultània de Grx3 i Grx4, confirmaven les dades obtingudes en l'apartat 3 i demostraven que Grx3 i Grx4 actuaven cooperativament per permetre la correcta activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu i la correcta polarització del citoesquelet d'actina.

6- Les glutaredoxines Grx3 i Grx4 estan implicades en la regulació transcripcional del gen *SLT2* i en la regulació dels gens dependents del factor transcripcional Rlm1 en resposta a estrès oxidatiu i estrès tèrmic.

Com s'ha detallat en l'Introducció del present capítol, la via *PCK1*-MAP quinasa media les respostes transcripcionals a través de dos factors transcripcionals: Rlm1 (Garcia *et al.*, 2004) i Swi4/Swi6 (Ki-Young *et al.*, 2008). Garcia *et al.*, (2004) van relacionar el factor transcripcional Rlm1 amb l'inducció transcripcional de *SLT2* en la resposta a estrès en paret cel.lular. Entre els gens implicats en la supervivència cel.lular davant aquest estrès es troba el gen *PST1*, que codifica per una proteïna de la paret de la família de les GPI (Pardo *et al.*, 2004) necessària durant la síntesis i la reparació de la paret cel.lular. Més tard, Stavela *et al.*, (2004) també relacionaven el factor Rlm1 amb la transcripció de gens implicats en la resposta cel.lular davant estrès oxidatiu a través de la via *PKC1*.

En l'apartat 5 vam demostrar que el mutant *grx4* presentava baixos nivells de fosforilació de Slt2, nivells gairebé indetectables en el doble mutant *grx3grx4*. Per aquest motiu i d'acord amb els antecedents descrits en la literaruta, vam decidir analitzar si Grx3 i Grx4 estaven participant en la regulació de la via *PKC1* a nivell transcripcional mitjançant dues aproximacions:

- 1) Anàlisi dels nivells transcripcionals de *SLT2*.
- 2) Anàlisi dels nivells transcripcionals dels gens dependents de Rlm1, com *PST1*, el qual es correlaciona directament amb els nivells de fosforilació de Slt2 (Jung, *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2004).

Cultius de la soca salvatge, els mutants *grx3*, *grx4* i *grx3grx4* i la soca salvatge sobreexpressant Grx3 i Grx4 respectivament, van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament, aquests cultius van ser tractats amb 1mM de peròxid d'hidrogen i paral·lelament a 38°C, per determinar la possible especificitat de Grx3 i Grx4 en la regulació transcripcional de *SLT2* i dels gens regulats per Rlm1.

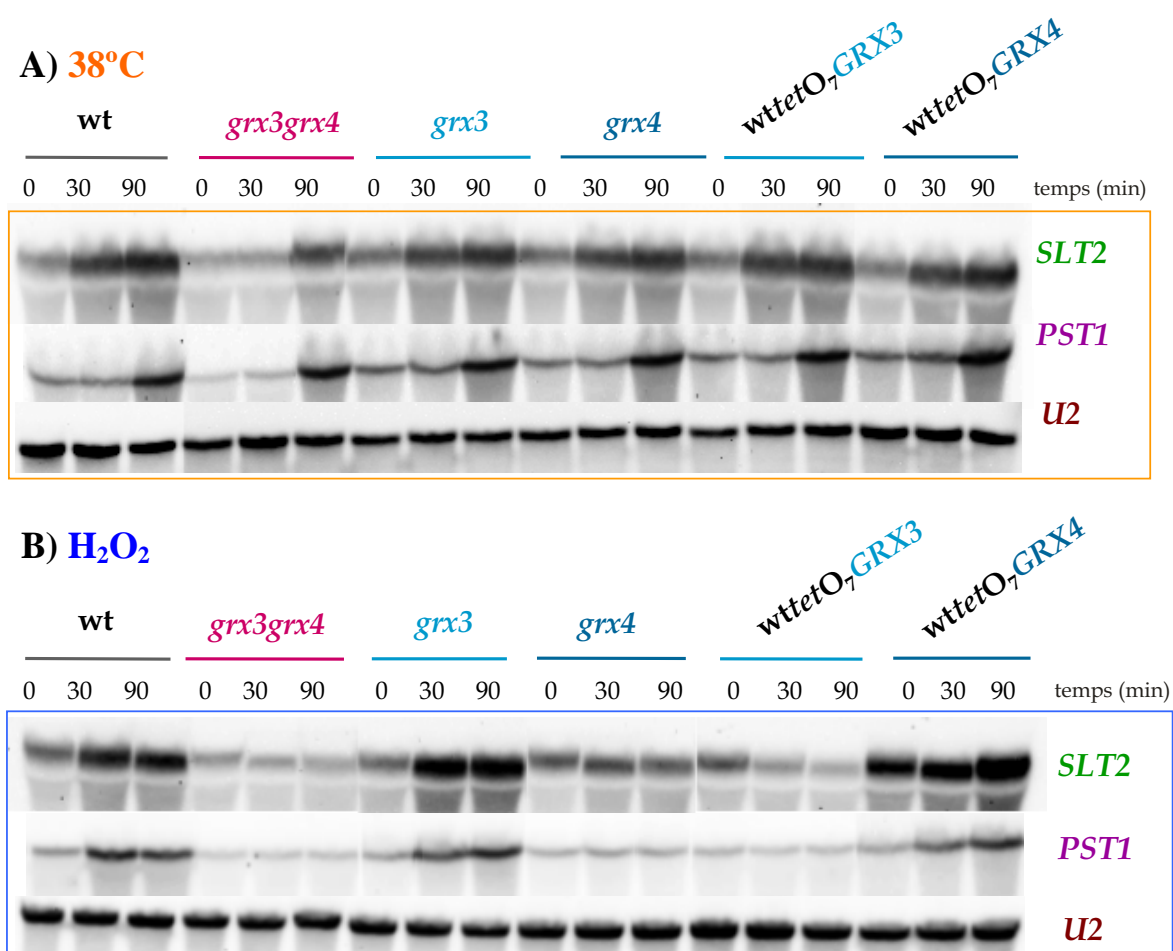


Figura 15- Anàlisi transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* en resposta a estrès tèrmic i estrès oxidatiu. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament els cultius van ser sotmesos a xoc tèrmic de 38°C (A) i a estrès oxidatiu amb 1mM de peròxid d'hidrogen (B). Les mostres recolectades en els temps indicats en la Figura van ser processades per extraure RNA total i analitzar els nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1*. La sonda *U2* va ser utilitzada com a control de carga.

En resposta a estrès tèrmic (Figura 15A) l'absència de Grx3 i Grx4 induïa un retard en l'activació transcripcional de *SLT2* i de *PST1* respecte a la resta de soques analitzades, les quals presentaven iguals nivells d'activació transcripcional de *SLT2* i de *PST1* que els nivells detectats en la soca salvatge.

En resposta a estrès oxidatiu (Figura 15B), els nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* no eren induïts en el mutant simple *grx4* respecte als nivells detectats en la soca salvatge i el mutant simple *grx3*. Aquesta dada es correlacionava amb els baixos nivells de fosforilació de Slt2 i amb la menor quantitat de proteïna Slt2 detectada en aquest mutant (vegeu Figura 13A).

El doble mutant *grx3grx4* presentava uns nivells basals de transcripció de *SLT2* i de *PST1* inferiors als detectats en la soca salvatge. A més a més, *SLT2* i *PST1* no s'indueïen en resposta a estrès oxidatiu. Aquestes dades es correlacionaven amb l'absència de fosforilació de Slt2 i amb els baixos nivells de proteïna Slt2 detectats en el doble mutant *grx3grx4* respecte a la soca salvatge i el mutant simple *grx3* (vegeu Figura 13A).

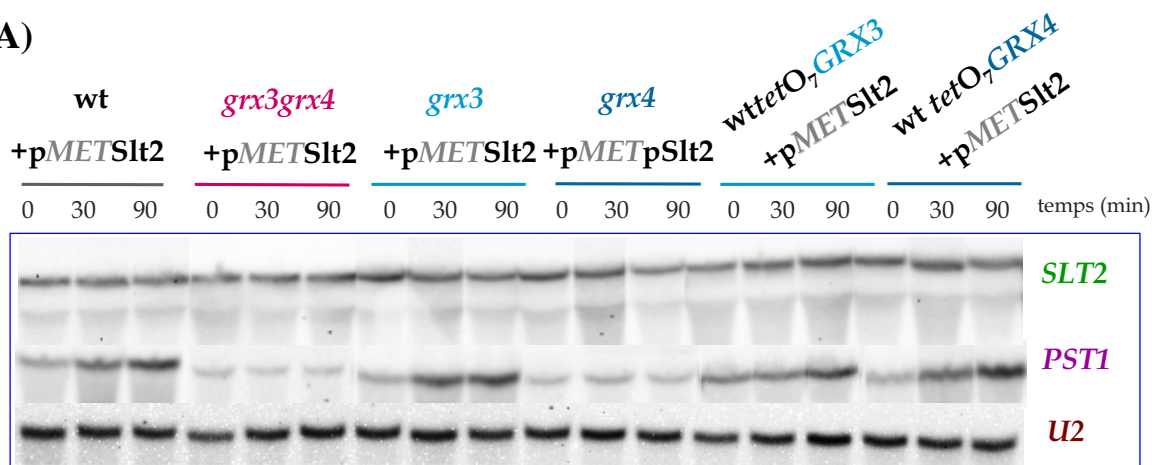
La sobreexpressió de Grx3 en la soca salvatge inhibia la transcripció de *SLT2*, fet consistent amb els descens en els nivells de proteïna Slt2 detectats en aquesta soca. A més a més, la sobreexpressió de Grx3 tampoc induïa la transcripció de *PST1*, fet que guardava relació amb l'absència d'activació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu (vegeu Figura 13A). En canvi, la sobreexpressió de Grx4 induïa un augment en la transcripció de *SLT2* tan a nivell basal com en resposta a estrès oxidatiu. No obstant, els nivells de fosforilació de Slt2 i en conseqüència els nivells transcripcionals de *PST1* eren similars a les detectades en la soca salvatge (vegeu Figura 13A).

Donat que Slt2 regula la seva pròpia transcripció i aquesta depen de l'activitat de Slt2 (Garcia *et al*, 2004) ens vam plantejar a quin nivell Grx3 i Grx4 estaven regulant la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu, si a nivell postraduccional (activació de Slt2) o a nivell transcripcional de *SLT2*. Per aquest motiu, amb l'objectiu d'obtenir els mateixos nivells transcripcionals de *SLT2* en totes les soques i analitzar separatament els nivells de fosforilació de Slt2, vam realitzar l'anàlisi transcripcional de *SLT2* sota un promotor exògen no regulat per Rlm1.

Per duu a terme aquest estudi, vam transformar les soques anteriorment descrites un vector multicòpia que contenia la proteïna Slt2 sota el promotor regulable per Metionina, *MET* (*pMETSl2*) (vegeu Materials i Mètodes, pàg.117). Per completar l'estudi,

també vam analitzar la transcripció de *PST1*, així com la fosforilació i la quantitat de proteïna total Slt2 present en les mostres.

A)



B)

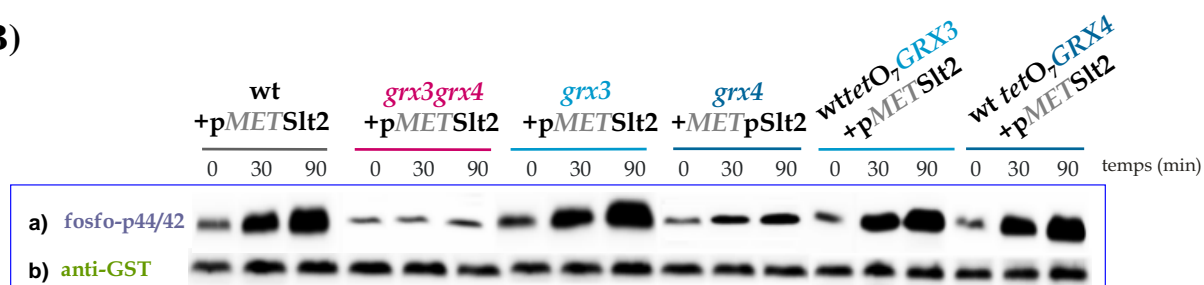


Figura 16- La sobreexpressió de Grx3 i Grx4 en la soca salvatge exerceixen un efecte directe sobre el promotor del gen *SLT2* en resposta a estrès oxidatiu (A) Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD sense metionina fins arribar a fase exponencial i posteriorment van ser tractades amb 1mM de peròxid d'hidrogen. Les mostres recolectades en els temps indicats van ser processades i analitzades per detectar els nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1*. *U2* es va utilitzar com a control de carga. (B) Extractes proteïcs de mostres extretes en els mateixes condicions experimentals descrites en l'apartat A) van ser analitzades mitjançant Western blot per detectar la fosforilació de Slt2 (fosfo-p44/42) (a) i la quantitat total de proteïna Slt2 (anti-GST) (b).

Els resultats detallats en la Figura 16A, mostraven que sota el promotor exògen *MET*, els nivells transcripcionals de *SLT2* en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu eren equivalents en totes les soques analitzades. A més a més, en la Figura 16B, apartat b), també vam comprovar que en aquestes condicions els nivells de proteïna total Slt2 eren igual en totes les soques.

Partint d'aquestes condicions, vam obtenir els següents resultats:

En el mutant *grx4* es continuaven detectant baixos nivells de fosforilació de Slt2 (Figura 16B), fet que es correlacionava amb la baixa activació transcripcional de *PST1* (Figura 16A).

En el doble mutant *grx3grx4*, els nivells de fosforilació de Slt2, així com els nivells transcripcionals de *PST1*, també continuaven sent pràcticament indetectables en aquestes condicions experimentals.

D'altra banda, la sobreexpressió de Grx3 en la soca salvatge induïa la fosforilació de Slt2 en resposta estrès oxidatiu, dades correlacionades amb l'augment transcripcional de *PST1*, mentre que la sobreexpressió de Grx4 en la soca salvatge en les mateixes condicions experimentals, no induïa un augment transcripcional de *SLT2*. A més a més, els nivells transcripcionals de *PST1* i la fosforilació de Slt2 en aquesta soca eren similars als detectats en la soca salvatge.

En resum, amb aquests resultats ens van permetre concloure dos fets:

- Grx3 i Grx4 regulaven la via *PKC1* a nivell postraduccional, on Grx4 regulava la fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu, funció que exerciria cooperativament amb Grx3.
- La sobreexpressió de Grx3 i Grx4 en la soca salvatge exercien un efecte directe sobre el promotor de *SLT2*: la sobreexpressió de Grx3 reprimia la transcripció de *SLT2* en resposta a estrès oxidatiu, mentre que la sobreexpressió de Grx4 incrementava els nivells transcripcionals de *SLT2* en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu. A més a més, aquests resultats també demostraven que Grx3 i Grx4 no actuaven sobre altres promotors regulats per Rlm1, com *PST1* (Figura 16A).

7- La hiperactivació de la funció d'Aft1 només explica parcialment alguns del fenotips observats en el doble mutant *grx3grx4*.

En absència de Grx3 i Grx4, el factor transcripcional Aft1 es localitzava permanentment dins del nucli activant constitutivament els gens que formen part del sistema d'alta afinitat de captació de ferro, provocant una entrada massiva d'aquest metall dins la cèl.lula (Pujol *et al.*, 2006). Elevats nivells de ferro intracel.lular generen radicals hidroxil, via reacció de Fenton, que són altament tòxics i danyen directament a les

biomolècules de la cèl.lula com són el DNA, els lípids i les proteïnes (vegeu Introducció General, pàg.13).

Per aquest motiu vam decidir comprovar si els defectes observats fins ara en el doble mutant *grx3grx4* en relació a l'activitat de la via *PKC1* eren deguts al dany oxidatiu causat per aquest augment dels nivells de ferro intracel.lular i que podria estar afectant a l'activitat i a les funcions regulades per Slt2.

Amb l'objectiu de determinar si l'absència de fosforilació de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4* era deguda al dany oxidatiu causat per la hiperactivació d'Aft1, vam analitzar els nivells d'activació de la via *PKC1* en el triple mutant *grx3grx4aft1* en resposta a estrès oxidatiu

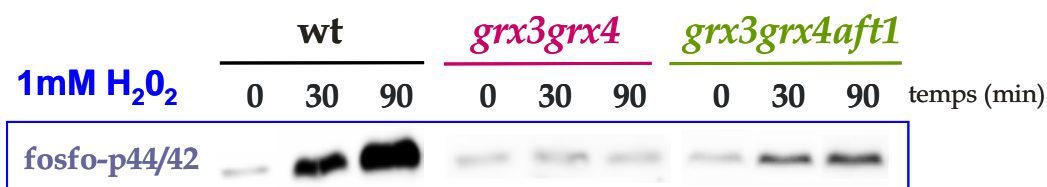


Figura 17- Activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu en el triple mutant *grx3grx4aft1*. Cultius de la soca salvatge, del doble mutant *grx3grx4* i triple mutant *grx3grx4aft1* van ser creixudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Posteriorment els cultius van ser tractats amb 1mM de peròxid d'hidrògen. Alíquotes de cada cultiu van ser recolectades en els temps indicats en la Figura i processades per analitzar la fosforilació de Slt2.

Com s'observa en la Figura 17, l'absència d'Aft1 restaurava lleugerament la fosforilació de Slt2 del doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu. Aquest fet suggeria que l'oxidació endògena causada per la hiperactivació d'Aft1 era en part, una de les causes que afectaven a la correcta fosforilació de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu.

La sensibilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* davant agents que danyaven la paret cel.lular, causaven estrès oxidatiu o estrès tèrmic també van ser analitzades en absència d'Aft1.

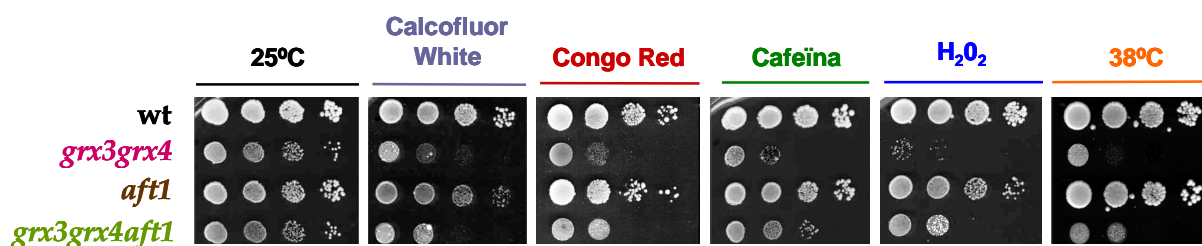


Figura 18- Viabilitat cel.lular del triple mutant *grx3grx4aft1* davant agents que causen estrès en paret la cel.lular, estrès tèrmic i estrès oxidatiu. Cultius de la soca salvatge i els mutants *grx3grx4*, *aft1* i *grx3grx4aft1* van ser crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C fins a obtenir una OD₆₀₀ de 0,6. Posteriorment, alíquotes de cada cultiu van ser recolectades i analitzades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 1.

Com s'observa en la Figura 18, l'absència d'Aft1 restaurava parcialment la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* davant els diversos estressos analitzats respecte a la soca salvatge, fet consistent amb la lleugera fosforilació de Slt2 detectada en el triple mutant *grx3grx4aft1* (Figura 17).

Vilella *et al.*, (2005) van descriure que l'estrès oxidatiu induïa depolimerització transitòria del citoesquelet d'actina. Per aquest motiu i donat que el doble mutant *grx3grx4* presentava una desorganització intrínseca del citoesquelet d'actina (vegeu Figura 8) vam realitzar l'estudi del citoesquelet d'actina en el triple mutant *grx3grx4aft1* en resposta a estrès oxidatiu

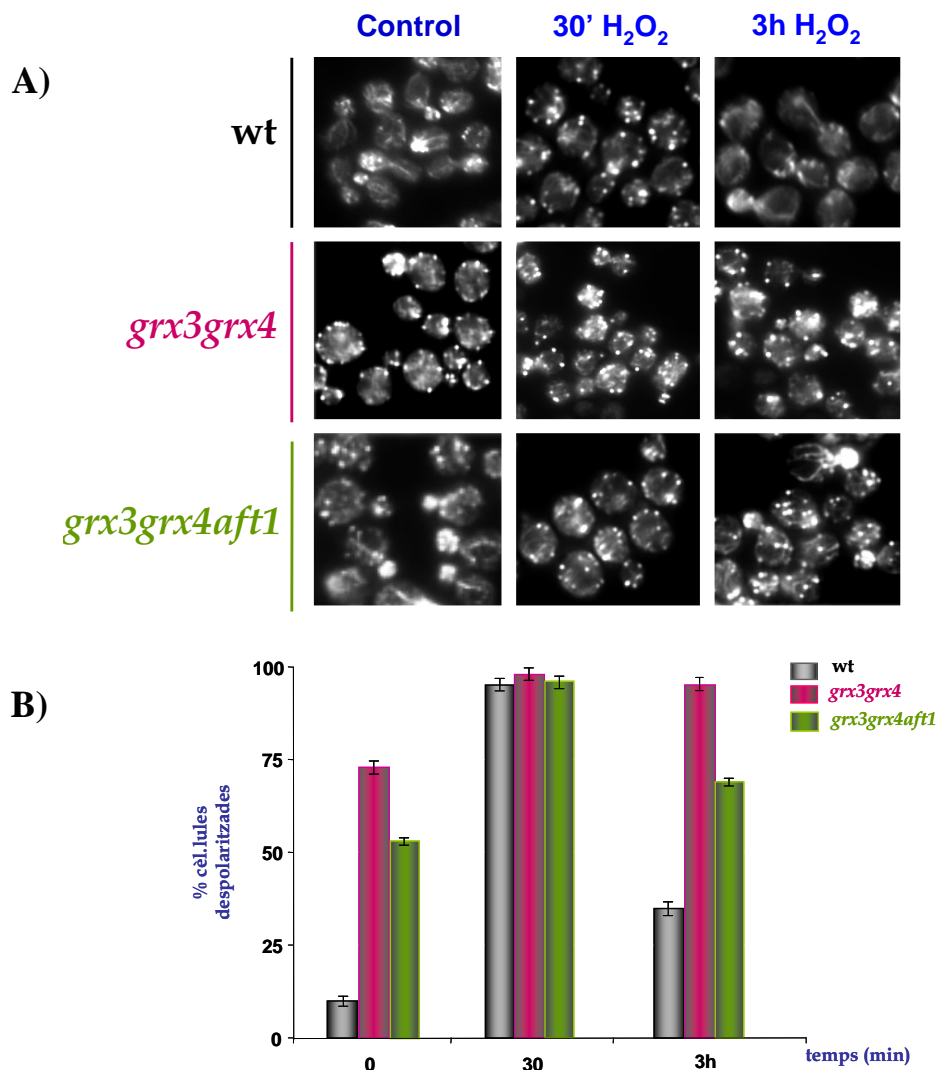


Figura 19- Organització del citoesquelet d'actina en el triple mutant *grx3grx4aft1*. Tincions d'actina de les soques descrites en la Figura sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 8.

Com s'observa en la Figura 19, malgrat l'absència d'Aft1, encara s'observava una parcial despolarització del citoesquelet d'actina en el doble mutant *grx3grx4* respecte a la soca salvatge en condicions normals. Després de 30 minuts de tractament amb el agent oxidant, el triple mutant *grx3grx4aft1* presentava una completa despolarització del citoesquelet d'actina que era parcialment restablerta després de 3 hores de tractament amb el peròxid d'hidrogen.

Aquestes dades mostraven que el dany oxidatiu causat pel elevats nivells de ferro intracel.lular deguts a la hiperactivació d'Aft1, no eren la causa de la despolarització del citoesquelet d'actina en el doble mutant *grx3grx4*. Més bé, els nostres resultats suggerien un efecte directe de Grx3 i Grx4 sobre el citoesquelet d'actina.

En resum, l'oxidació endògena generada per l'augment dels nivells de ferro intracel.lular com a conseqüència de la hiperactivació d'Aft1 no era la causa més important de l'absència de fosforilació de Slt2, de la sensibilitat cel.lular davant agents que danyaven la paret cel.lular i causaven estrès oxidatiu i de la despolarització del citoesquelet d'actina en el doble mutant *grx3grx4*, si bé contribuïa parcialment a aquest fet. Més bé, les nostres dades reforçava la nostra hipòtesi inicial i confirmaven que Grx3 i Grx4 jugaven un paper directe en la regulació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu, independentment dels nivells d'oxidació endògena generats en aquest mutant.

8- Les glutaredoxines Grx3 i Grx4 interaccionen *in vivo* i *in vitro* amb la proteïna quinasa Slt2 en el nucli.

Per continuar amb la caracterització funcional de Grx3 i Grx4 en la regulació de la via d'integritat cel.lular, el següent pas va ser aprofundir sobre la possible interacció física entre Grx3, Grx4 i Slt2, d'acord als següents antecedents:

- 1- El doble mutant *grx3grx4* presentava fenotips característics de mutants en la via *PKC1* com:
 - a) absència de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

- b) defectes en l'estructura de la paret cel.lular.
- c) sensibilitat cel.lular davant agents que danyaven la paret cel.lular i causaven estrès oxidatiu
- 2- Slt2 es translocava dins del nucli en resposta a l'estímul per activar els factors transcripcionals Swi6/Swi4 i Rlm1 (Kim *et al.*, 2008).
- 3- Grx3 i Grx4 es troben majoritàriament localitzades dins del nucli (Molina *et al.* 2004) i ejerceixen les seves funcions reguladores dins del nucli (Pujol *et al.*, 2006).

D'acord aquests antecedents, el següent pas va ser dissenyar un seguit d'experiments per confirmar l'existència d'una interacció física entre les glutaredoxines Grx3, Grx4 i la quinasa Slt2. Per duu a terme aquests anàlisis, es van construir tots els plàsmids necessaris per realitzar els assajos de Doble Híbrid i Pull-Down entre les proteïnes Grx3 i Slt2 i Grx4 i Slt2 (vegeu Materials i Mètodes, pag.117).

Com es detalla en la Taula de la Figura 20, Grx3 i Grx4 interaccionaven *in vivo* amb Slt2 dins del nucli.

Domini activador	Domini d'unió	Unitats de β -Galactosidasa
<i>SLT2</i>	<i>GRX3</i>	24,87
<i>SLT2</i>	<i>GRX4</i>	22,47
Controls		
<i>e.v</i>	<i>e.v</i>	3,10
<i>SNF4</i>	<i>SNF1</i>	36,30 (+)
<i>YAK</i>	<i>GRX5</i>	-0,919 (-)
<i>SLT2</i>	<i>e.v</i>	9,15
<i>e.v</i>	<i>GRX3</i>	4,98
<i>e.v</i>	<i>GRX4</i>	2,08

Figura 20- Interaccions *in vivo* en el nucli entre Grx3 i Slt2 i Grx4 i Slt2 mitjançant l'assaig de Doble Híbrid. Els valors de l'interacció entre *SNF4* i *SNF1* van ser utilitzats com a control positiu d'una forta interacció dins de nucli (+). Els valors obtinguts de l'interacció entre *YAK1* i *GRX5* van ser utilitzats com a control positiu d'una interacció dèbil dins de nucli (-). *e.v*, empty vector. Els valors numèrics representen la mitja de dos experiments realitzats independentment (vegeu Materials i Mètodes, pàg. 122).

Les interaccions *in vivo* entre Grx4 i Slt2 i Grx3 i Slt2 van ser confirmades *in vitro* amb l'assaig de coimmunoprecipitació mitjançant la tècnica de Pull-Down (Figura 21).

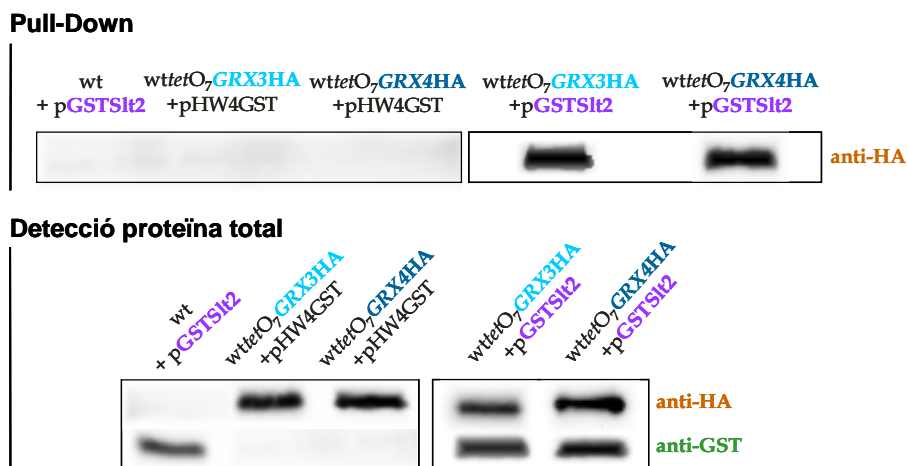


Figura 21- Interaccions *in vitro* entre Grx3 i Slt2 i Grx4 i Slt2 mitjançant assaig de Pull-Down. Extractes proteïcs de les soques descrites en la Figura es van unir a una columna de glutatió (GST-beats) per realitzar l'assaig de coimmunoprecipitació mitjançant la tècnica de Pull Down, segons el protocol descrit en García-Gimeno *et al.*, (2003). La presència de Grx3 i Grx4 en els extractes proteïcs va ser detectada mitjançant Western blot amb l'anticòs monoclonal anti-HA. La presència de Slt2 va ser detectada amb l'anticòs policlonal anti-GST (vegeu Materials i Mètodes pàg.122 i pàg.120).

Finalment, amb l'objectiu d'aprofundir més en l'estudi de les interaccions físiques entre Grx3, Grx4 i Slt2, van decidir analitzar *in vivo* a través de quins dominis Grx3 i Grx4 s'unien a Slt2.

Domini activador	Domini d'unió	Unitats de β -Galactosidasa
SLT2	DomTrx(GRX3)	20,50
SLT2	DomGrx(GRX3)	17,96
SLT2	DomTrx(GRX4)	16,02
SLT2	DomGrx(GRX4)	19,80
Controls		
<i>e.v</i>	<i>e.v</i>	3,60
SNF4	SNF1	40,65 (+)
YAK	GRX5	-0,811 (-)
SLT2	<i>e.v</i>	6,39
<i>e.v</i>	DomTrx(GRX3)	5,78
<i>e.v</i>	DomGrx(GRX3)	4,55
<i>e.v</i>	DomTrx(GRX4)	3,92
<i>e.v</i>	DomGrx(GRX4)	5,00

Figura 22- Interaccions *in vivo* entre els dominis GRX i TRX de Grx3 i Grx4 i Slt2 mitjançant l'assaig de Doble Hídrid. Els valors d'interacció entre *SNF4* i *SNF1* van ser usats com a control positiu d'una forta interacció dins del nucli (+). Els valors obtinguts d'interacció entre *YAK1* i *GRX5* són usats com a control positiu d'una interacció dèbil dins deL nucli (-). *e.v.*, empty vector. Els valors numèrics corresponen a la mitja de tres experiments realitzats independentment.

Els resultats representats en la taula de la Figura 22, mostraven *in vivo* que Slt2 interaccionava per igual amb cadascun dels dominis GRX i TRX de Grx3 i Grx4 dins del nucli.

En resum, els nostres resultats demostraven que Grx3 i Grx4 interaccionava *in vivo* i *in vitro* amb Slt2 dins del nucli a través dels respectius dominis GRX i TRX.

9- Grx4 regula l'activació de la via d'integritat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu a través de la fosfatasa Msg5.

Com es detalla ampliament en l'Introducció del present Capítol (vegeu pàg. 95), les quinases i les fosfatases són les principals proteïnes que regulen els nivells de fosforilació de Slt2 en resposta als diversos estímuls que activen la via *PKC1*.

Els resultats obtinguts en l'apartat 3, demostraven que la sobreexpressió de les quinases *BCK1-20* o Slt2, restablien parcialment la fosforilació de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4* en condicions oxidatives. Aquestes dades descartaven que l'absència de Grx3 i Grx4 estiguessin provocant una inhibició de les quinases reguladores de Slt2. Per aquest motiu, ens vam centrar en una possible activitat fosfatasa com causa de l'absència de fosforilació de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu.

Fox *et al.*, (2007) van descriure que la fosfatasa Sdp1, caracteritzada fins ara com una fosfatasa implicada en la inactivació *in vivo* i *in vitro* de Slt2 en resposta a estrès tèrmic (Hahn i Thiele, 2002), adquiria activitat catalítica en condicions oxidatives, presentant un model on Sdp1 era la fosfatasa capaç de defosforilar Slt2 específicament en resposta a estrès oxidatiu.

Com es mostrava en l'aparat 7, el dany oxidatiu provocat per els elevats nivells de ferro intracel.lulars presents en el doble mutant *grx3grx4* era una de les causes que explicaven l'absència de fosforilació de Slt2. No obstant i donat que Sdp1 s'activava en condicions oxidatives, la nostra hipòtesi de treball es va centrar en la possible activació de

la fosfatasa Sdp1 com a principal causa de l'absència de fosforilació de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu.

Amb l'objectiu de confirmar que els elevats nivells de ferro intracel·lular presents en el doble mutant *grx3grx4* generaven estrès oxidatiu endogen, vam duu a terme l'assaig de detecció d'anions superòxid intracel·lular (vegeu Materials i Mètodes, pàg.124).

Aquest assaig ens va permetre valorar, de manera quantitativa, els nivells d'oxidació endògena presents la soca salvatge i en el doble mutant *grx3grx4* mitjançant l'agent dihidroetidi (DHE). El dihidroetidi, quan reacciona amb l'anió superòxid (O_2^-) perd un hidrògen del seu l'anell heterocíclic. Aquest canvi de conformació genera la molècula Etidina que emet una fluorescència detectada en la longitud d'ona $\lambda_{\text{emissió}}=590\text{nm}$. La quantitat de fluorescència emesa durant 30 minuts dona una aproximació quantitativa dels nivells d'oxidació intracel·lular presents en les cèl·lules (Bindokas *et al.*, 1996).

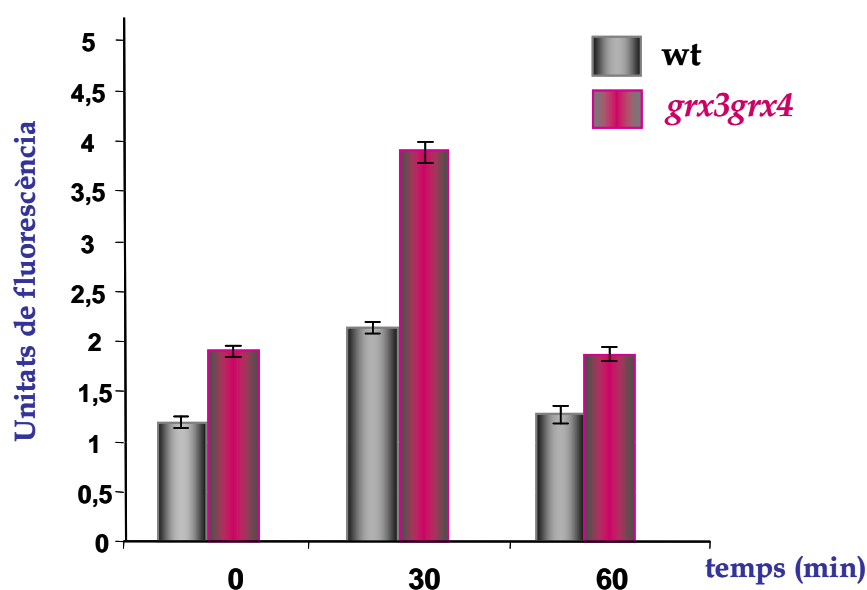


Figura 23- Assaig de detecció d'anions superòxid. Cultius de la soca salvatge i del doble mutant *grx3grx4* van ser crescudes en medi mínim SD fins arribar a una OD_{600} de 0,5-0,6. Posteriorment van ser tractades amb peròxid d'hidrògen 1mM recolectant alíquotes després de 30 minuts i 1 hora de tractament amb l'agent oxidant. Les mostres van ser processades simultàniament per realitzar l'assaig de detecció d'anions superòxid amb dihidroetidi (DHE). La concentració final de DHE afegida en cadascuna de les mostres resuspeses en buffer PBS1x va ser de $5\mu\text{g/ml}$. Els histogrames de barres representen en unitats de fluorescència la mitja de tres experiments realitzats independentment.

Com es detalla en la Figura 23, el doble mutant *grx3grx4* presentava elevats nivells de radicals superòxid respecte als nivells detectats en la soca salvatge.

Aquest resultat mostrava que els elevats nivells de ferro intracelulars presents en el doble mutant *grx3grx4* causaven estrès oxidatiu endogen. Com es demostrarà més endavant en l'apartat 17 de Resultats, la hiperactivació d'Aft1, responsable d'aquests elevats nivells de ferro intracel.lular en el doble mutant *grx3grx4*, era la causa d'aquesta oxidació endògena.

Un cop confirmat la presència d'oxidació endògena en el doble mutant *grx3grx4*, el següent pas va ser comprovar si l'absència de Sdp1 restablia la fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu tan en el doble mutant *grx3grx4* com en el mutant simple *grx4*.

Tot i que no va ser possible disrupcionar *SDP1* en el doble mutant *grx3grx4* (podria ser que es tractés d'un mutant sintètic letal), cultius dels mutants *sdp1*, *grx3sdp1* i *grx4sdp1* van ser crescuts en medi mínid SD a 25°C fins arribar a fase logarítmica i posteriorment tractats amb 1mM de peròxid d'hidrògen amb l'objectiu d'analitzar la fosforilació de Slt2.

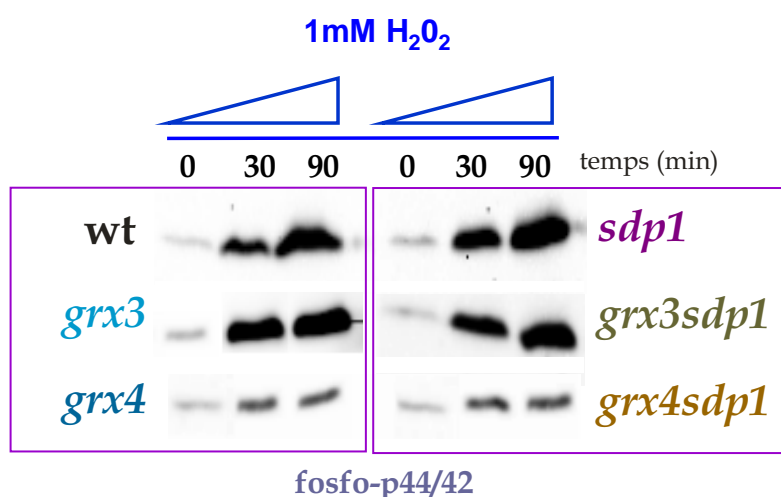


Figura 24- La fosfatasa Sdp1 no regula la fosforilació de Slt2 en el mutant simple *grx4* en resposta a estrès oxidatiu Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescuts en medi mínim SD a 25°C fins arribar a OD₆₀₀ de 0,5-0,6. Alíquotes recolectades en els temps indicats en la Figura durant el tractament amb 1mM de peròxid d'hidrògen van ser processades mitjançant Western blot per detectar la fosforilació de Slt2.

Com es detalla en la Figura 24, l'absència de Sdp1 no restablia l'activació de Slt2 en el mutant *grx4* en resposta a estrès oxidatiu. Aquesta dada descartava a Sdp1 com la fosfatasa implicada en la regulació de la via *PKC1* en absència de Grx4 en resposta a estrès oxidatiu.

Fox *et al.*, (2007) també van descriure que la fosfatasa Msg5, al igual que Sdp1, era activada en presència d'agents oxidants. Msg5 és una fosfatasa ampliament estudiada que regula els nivells basals de la quinasa Slt2 (Fandez *et al.*, 2004). No obstant i d'acord amb les dades publicades en Fox *et al.*, (2004) vam decidir analitzar la fosfatasa Msg5 com a segona candidata en la regulació de la via *PKC1* en els mutant *grx4* i *grx3grx4* en condicions d'estrès oxidatiu.

Per realitzar aquest anàlisi van seguir la mateixa estratègia utilitzada anteriorment: en primer lloc van deleccionar la fosfatasa *MSG5* en la soca salvatge, en els mutants simples *grx3* i *grx4* i en el doble mutant *grx3grx4*. En aquest cas, vam procedir a l'anàlisi dels nivells de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu i estrès tèrmic, amb l'objectiu de determinar l'existència de possibles diferències en la regulació de la via *PKC1* per part de Msg5.

A) 38°C



B) H₂O₂

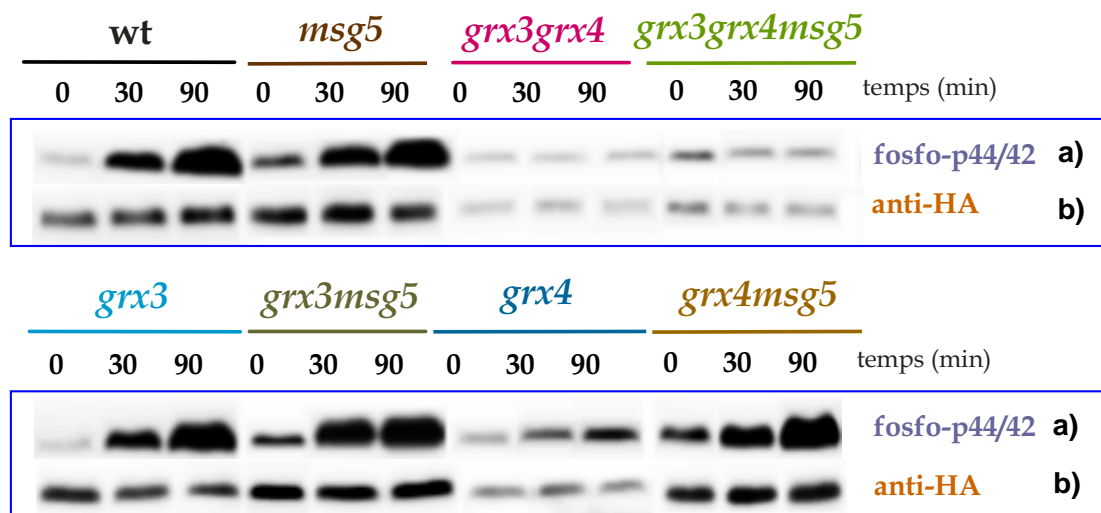


Figura 25- Grx4 regula l'activació de la via *PKC1* a través de la fosfatasa *Msg5* en resposta a estrès oxidatiu. (A) Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament els cultius van ser exposats a 38°C durant 90 minuts per induir xoc tèrmic. Alíquotes de cada cultiu van ser recolectades i posteriorment analitzades per detectar la fosforilació de Slt2 mitjançant l'anticòs p44/42. (B) Paral·lelament, es va realitzar un tractament amb 1mM de peròxid d'hidrogen per analitzar dels nivells de fosforilació de Slt2 (a: fosfo-p44/42). Per detectar la quantitat de proteïna total Slt2 present en les mostres, els mutants descrits en la Figura van ser prèviament transformats amb el plàsmid multicòpia pSlt2HA (b: anti-HA).

Com es mostra en la Figura 25, els nivells basals d'activació de Slt2 es veien incrementats en aquelles soques delectonades en *MSG5*, com demostraven els resultats publicats en Flandez *et al.*, (2004).

En resposta a estrès tèrmic (Figura 25A), l'absència de *Msg5* no provocava canvis en la fosforilació de Slt2 en cap de les soques analitzades, respecte a les soques control

En resposta a estrès oxidatiu (Figura 25B), l'absència de la fosfatasa *Msg5* restablí els baixos nivells de fosforilació de Slt2 del mutant simple *grx4* a uns nivells similars als detectats en els mutants *msg5* i *grx3msg5*. No obstant, l'absència de *Msg5* no restablí la fosforilació de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4*.

Amb l'objectiu de determinar la quantitat de proteïna total Slt2 present en les mostres tractades amb peròxid d'hidrogen, les soques descrites en la Figura 25 van ser transformades amb el plàsmid multicòpia pSlt2HA

Com es detalla en Figura 25B, apartat b), en resposta a estrès oxidatiu el doble mutant *grx4msg5* restablí els baixos nivells de proteïna total Slt2 del mutant simple *grx4*. No obstant, el triple *grx3grx4msg5* continuava presentant uns nivells de proteïna Slt2 molt més baixos, pràcticament indetectables, com els que presentava en el doble mutant *grx3grx4*.

D'acord amb els resultats obtinguts en la fosforilació i en la quantitat de proteïna Slt2 detectada en els diversos mutants en la fosfatasa *Msg5*, també vam analitzar els nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* en les mateixes condicions experimentals d'estrès oxidatiu. A més a més, per ampliar aquest estudi també vam realitzar un assaig de viabilitat cel·lular i l'anàlisi del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu .

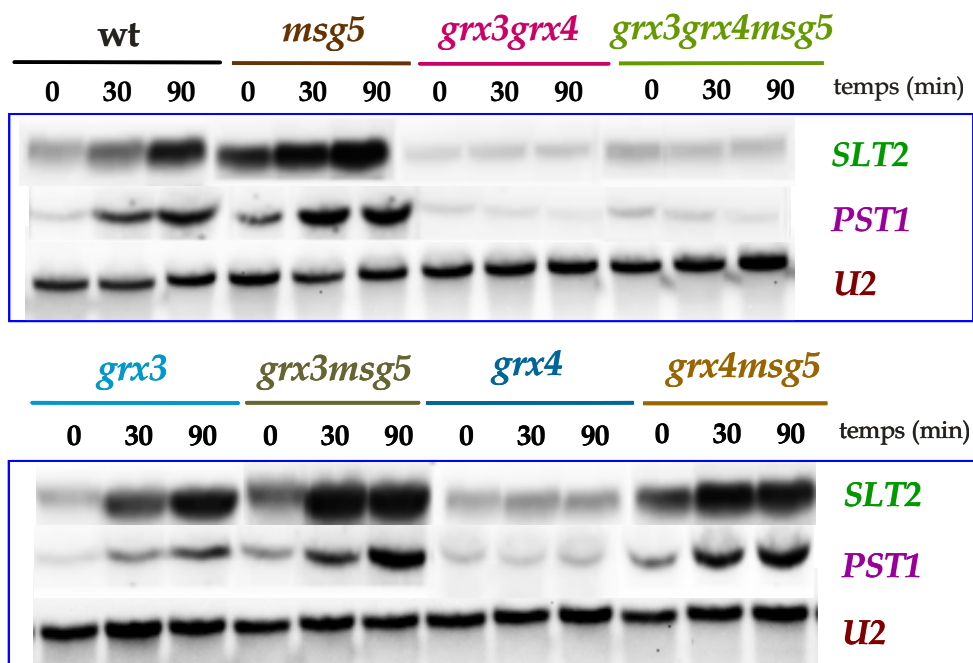


Figura 26- Anàlisi dels nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* en resposta a estrès oxidatiu en mutants en la fosfatasa *MSG5*. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser tractades sota les mateixes condicions experimentals d'estrès oxidatiu descrites en la Figura 25B per analitzar els nivells transcripcionals de *SLT2* i *PST1* mitjançant Northern blot. *U2* va ser utilitzat com a control de carga.

Com s'observa en la Figura 26, els nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* en el doble mutant *grx4msg5* en resposta a estrès oxidatiu assolien nivells similars als obtinguts en els mutants *msg5* i *grx3msg5*, dades correlacionades amb els nivells de proteïna i de fosforilació Slt2 observades prèviament en el doble mutant *grx4msg5* (vegeu Figura 25B).

L'absència de *Msg5* no restablia l'activació transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* en resposta a estrès oxidatiu en el doble mutant *grx3grx4*, dades que guardaven relació amb els baixos nivells de proteïna Slt2 i l'absència de fosforilació Slt2 detectats en el triple mutant *grx3grx4msg5*.

D'altra banda, en l'assaig de viabilitat cel.lular (Figura 27), vam observar que l'absència de *Msg5* restablia la viabilitat cel.lular del mutant simple *grx4* en resposta a peròxid d'hidrogen, fet que es correlacionava amb l'activació de la via *PKC1* detectada en el doble mutant *grx4msg5* (vegeu Figura 25B).

No obstant, l'absència de *Msg5* no restablia la viabilitat cel.lular davant estrès oxidatiu del doble mutant *grx3grx4*, fet consistent amb l'absència d'activació de la via *PKC1* en el triple mutant *grx3grx4msg5* en resposta dit estrès.

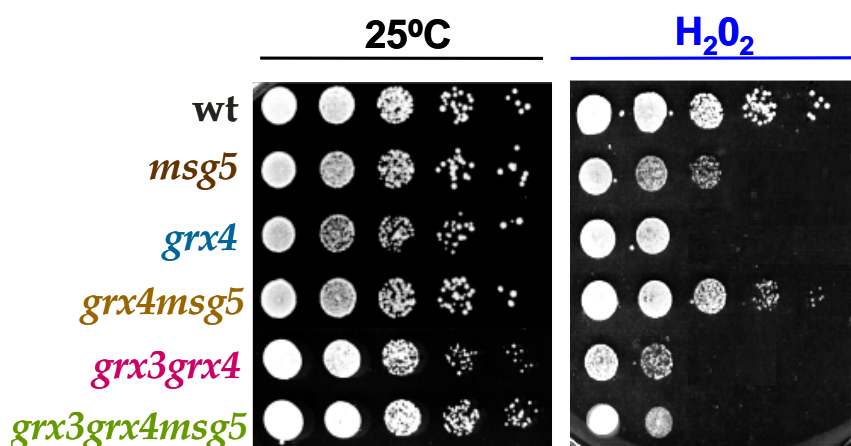


Figura 27- L'absència de Msg5 restableix la sensibilitat cel·lular del mutant *grx4* en resposta estrès oxidatiu. Cultius de la soca salvatge, els mutants simples *msg5* i *grx4*, els dobles mutant *grx4msg5*, *grx3grx4* i el triple mutant *grx3grx4msg5* van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Alíquotes de cada cultiu van ser recolectades per realitzar dilucions seriades. Seguidament, aquestes dilucions van ser replicades en plaques de medi mínim SD tractades amb 1mM de peròxid d'hidrògen. Les plaques van ser incubades a 30°C durant 3 dies.

Finalment, l'estudi del citoesquelet d'actina en els mutants *msg5*, *grx3msg5*, *grx4msg5* i *grx3grx4msg5* i com es detalla en les imatges i en els histogrames de la Figura 28 (vegeu Figura 14 per als controls) ens van aportar els següents resultats:

En general, l'absència de Msg5 provocava una major despolarització del citoesquelet en condicions normals, possiblemet deguda als elevats nivells basals d'activació de Slt2 presents aquests mutants.

En resposta a estrès oxidatiu, a les 3 hores de tractament amb el peròxid de hidrogen, l'absència de Msg5 restablia significativament la polarització del citoesquelet d'actina en el mutant *grx4*, assolint uns nivells de repolarització similars als detectats en els mutants *msg5* i *grx3msg5*.

En canvi, el triple mutant *grx3grx4msg5* presentava una despolarització del citoesquelet d'actina tan en condicions basals com en resposta a estrès oxidatiu superior a la despolarització detectada en el doble mutant *grx3grx4*.

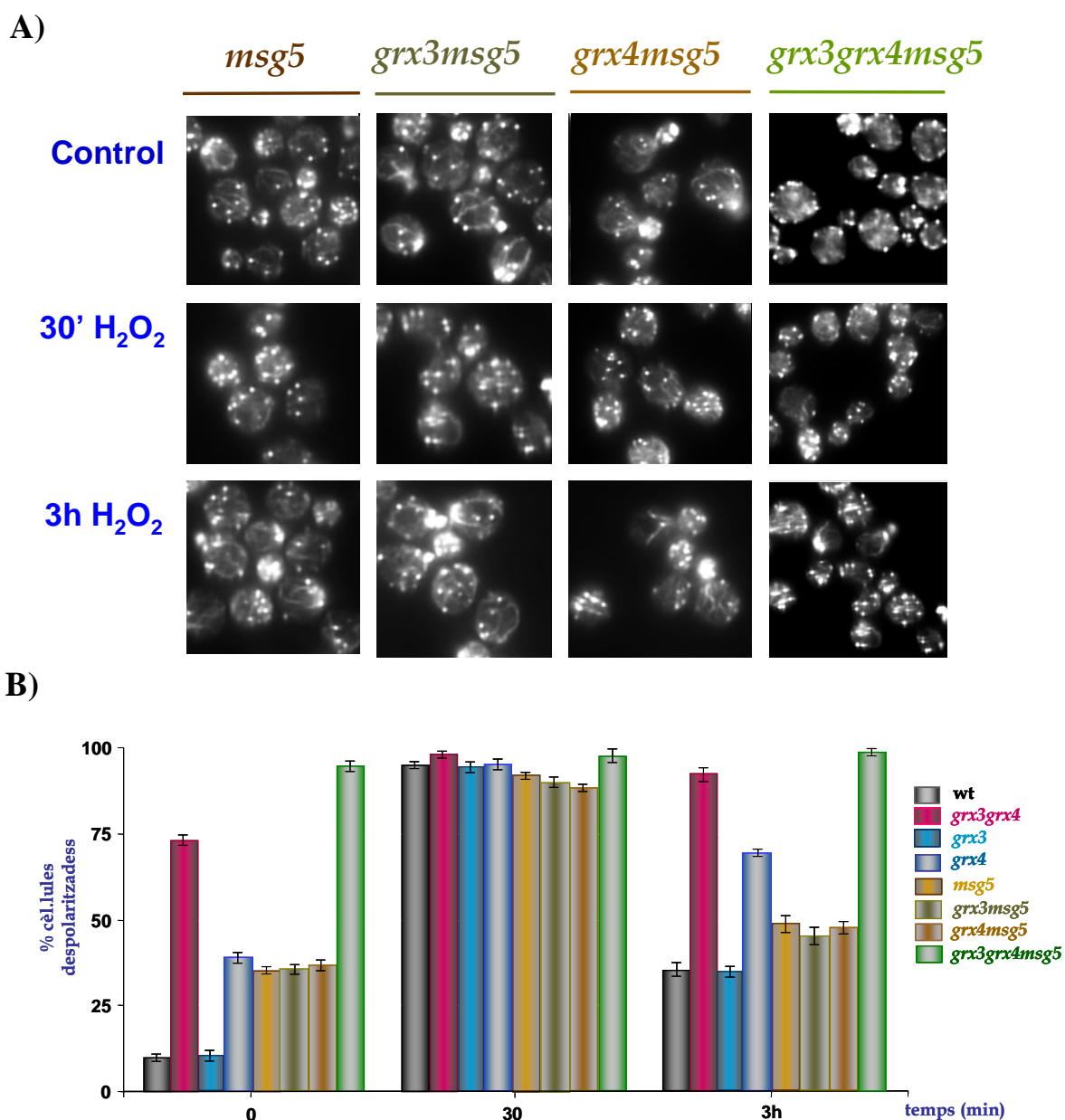


Figura 28- Anàlisi de l'organització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu en mutants en la fosfatasa *Msg5*. Cultius de les soques descrits en la Figura van ser processades i analitzades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 8 per realitzar *in vivo* el seguiment del citoesquelet d'actina en resposta a 1mM de peròxid d'hidrogen.

En resum, les nostres dades suggerien que en absència de *Grx4*, *Msg5* defosforilava *Slr2*, exercint un efecte negatiu sobre l'activació i en les funcions regulades per la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

Amb l'objectiu de confirmar que *Msg5* jugava un paper directe sobre la l'activació de *Slr2* en resposta a estrès oxidatiu, vam transformar la soca salvatge amb un plàsmid multicòpia que contenia *MSG5* sota el promotor constitutivament actiu *ADH1* (vegeu

Materials i Mètodes, pàg.117). A més a més, per determinar l'especificitat de Msg5 en la regulació de la via *PKC1* en condicions oxidatives, vam analitzar els nivells de fosforilació de Slt2 tan en resposta a peròxid d'hidrogen com en a xoc tèrmic

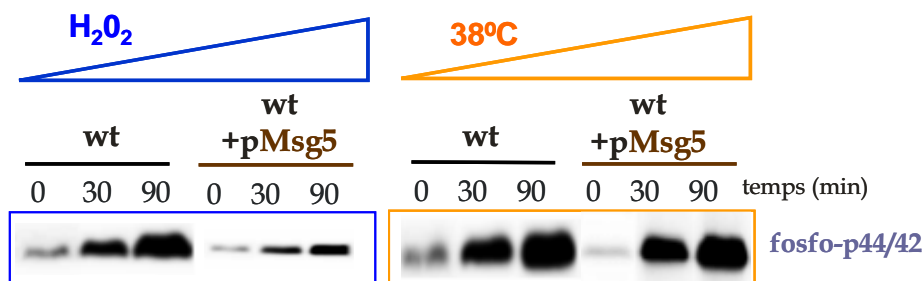


Figura 29- La fosfatasa Msg5 regula els nivells de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu. La soca salvatge va ser transformada amb el plàsmid multicòpia pMsg5 i va ser crescuda en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament el cultiu van ser dividit en dos parts: la meitat del cultiu va ser tractat amb 1mM de peròxid d'hidrogen per induir estrès oxidatiu. L'altra meitat va ser transferida a 38°C per realitzar un tractament de xoc tèrmic. Les mostres recolectades en els temps indicats en la Figura van ser processades per detectar els nivells de fosforilació de la Slt2.

Els resultats representats en la Figura 29, demostraven que la fosfatasa Msg5, a banda reduir els nivells basals de fosforilació de Slt2, com van descriure prèviament Flandez *et al.*, (2004), també disminueix els nivells de fosforilació de Slt2 específicament en resposta a estrès oxidatiu, donat que la sobreexpressió de Msg5 en la soca salvatge no provocava canvis en els nivells d'activació de Slt2 a 38°C.

En resum, les nostres dades van aportar nous indicis sobre el mecanisme amb el qual Grx4 regulava l'activitat de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu:

- 1- L'absència de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu en el mutant *grx4* era deguda a l'activitat de la fosfatasa Msg5 sobre Slt2. Aquest fet demostrava que Grx4 regulava l'activitat de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu a través de Msg5.
- 2- El fet de que els dobles mutants *grx3msg5* i *grx4msg5* presentessin activació de la via *PKC1*, mentre que el triple mutant *grx3grx4msg5* manqués d'ella, suggeria un mecanisme més ampli que implicava la participació de Grx3 cooperativament amb Grx4, per duu a terme la correcta activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

10- La fosfatasa Msg5 no interacciona amb les glutaredoxines Grx3 i Grx4, però en el mutant *grx4* l'interacció entre Msg5 i Slt2 augmenta en resposta a estrès oxidatiu.

Flandez *et al*, (2004) van demostrar que Msg5 interaccionava *in vivo* i *in vitro* amb la Slt2. A més a més, van determinar *in vitro* que Msg5 disminuïa la seva interacció amb Slt2 en resposta a xoc tèrmic, suggerint la dissociació d'aquest complex com un mecanisme per permetre la regulació de la via *PKC1* en resposta a estrès tèrmic.

Analitzant els resultats prèvis i d'acord amb aquests antecedents, vam continuar amb el nostre estudi, realitzant dues aproximacions:

- 1- Analitzar si existia interacció física entre Grx3, Grx4 i Msg5.
- 2- Analitzar si en absència de Grx4 s'afavoria l'interacció entre Msg5 i Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

Per començar aquests estudis, es van contruir tots els plàsmids necessaris per realitzar l'assaig de Doble híbrid entre les proteïnes Grx3 i Msg5, Grx4 i Msg5 i Slt2 i Msg5 (vegeu Materials i Mètodes, pàg. 116).

1-En primer lloc, van determinar les interaccions físiques *in vivo* entre Grx3 i Msg5 i Grx4 i Msg5 tan la soca salvatge com en els mutants simple *grx3* i *grx4* en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.

Soca salvatge			
Domini activador	Domini d'unió	Unitats de β -Galactosidasa	
		Sense tractament	1mM H ₂ O ₂
<i>MSG5</i>	<i>GRX3</i>	3,09	3,43
<i>MSG5</i>	<i>GRX4</i>	2,40	2,94
Mutant <i>grx3</i>			
<i>MSG5</i>	<i>GRX4</i>	3,11	2,83
Mutant <i>grx4</i>			
<i>MSG5</i>	<i>GRX3</i>	3,03	3,24
Controls			
<i>e.v</i>	<i>e.v</i>	3.40	
<i>SNF4</i>	<i>SNF1</i>	42,93 (+)	
<i>YAK</i>	<i>GRX5</i>	-0.492 (-)	
<i>MSG5</i>	<i>e.v</i>	3.32	
<i>e.v</i>	<i>GRX3</i>	2,89	
<i>e.v</i>	<i>GRX4</i>	1,75	

Figura 30- Interaccions *in vivo* en el nucli entre Msg5 i Grx3 i Msg5 i Grx4 mitjançant l'assaig de Doble Híbrid. Els valors de l'interacció entre *SNF4* i *SNF1* van ser utilitzats com a control positiu d'una forta interacció dins de nucli (+). Els valors obtinguts de l'interacció entre *YAK1* i *GRX5* van ser utilitzats com a control positiu d'una interacció dèbil dins de nucli (-). *e.v.*, empty vector. Els valors numèrics corresponen a la mitja de tres experiments realitzats independentment.

Com es detalla en taula representada en la Figura 30, Grx3 i Grx4 no interaccionaven físicament amb la fosfatasa Msg5 ni en condicions normals ni en resposta a estrès oxidatiu.

2-Per determinar si els nivells d'interacció entre Slt2 i Msg5 variaven en relació a la presència o absència de Grx4, es van realitzar assajos de Doble Híbrid en la soca salvatge i en el mutant simple *grx4* en condicions normals i comparativament en resposta a estrès oxidatiu i estrès tèrmic.

A) Soca salvatge

	Domini activador	Domini d'unió	Unitats de β -Galactosidasa	Unitats de β -Galactosidasa				
				Sense tractament	38°C		1mM H ₂ O ₂	
					30'	60'	30'	60'
Mutant <i>grx4</i>	<i>SLT2</i>	<i>MSG5</i>	25,0	16,0	15,7	18,9	20	
	<i>SLT2</i>	<i>MSG5</i>	24,2	15	16,6	22,1	24,1	
Controls	<i>e.v.</i>	<i>e.v.</i>	3,20					
	<i>SNF4</i>	<i>SNF1</i>	43,9 (+)					
	<i>YAK</i>	<i>GRX5</i>	-0,450 (-)					
	<i>SLT2</i>	<i>e.v.</i>	7,14					
	<i>e.v.</i>	<i>MSG5</i>	3,79					

B)

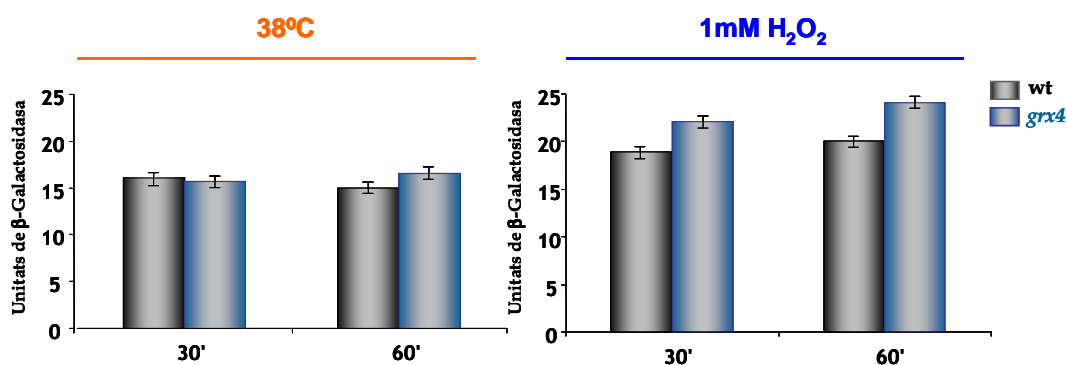


Figura 31- Interaccions *in vivo* en el nucli entre Slt2 i Msg5 en el mutant *grx4* mitjançant l'assaig de Doble Híbrid. Els valors de l'interacció entre *SNF4* i *SNF1* van ser utilitzats com a control positiu d'una forta interacció dins de nucli (+). Els valors obtinguts de l'interacció entre *YAK1* i *GRX5* van ser utilitzats com a control positiu d'una interacció dèbil dins de nucli (-). *e.v.*, empty vector. Els valors numèrics corresponen a la mitja de tres experiments realitzats independentment **(A)**. Histograma de barres que representa les unitats de β -Galactosidasa obtingudes en les diferents condicions experimentals analitzades **(B)**.

Com es detalla en la taula de la Figura 31A, en resposta a xoc tèrmic vam detectar uns valors equivalents d'interacció entre Slt2 i Msg5 tan en la soca salvatge com en el mutant *grx4*.

No obstant, en resposta a estrès oxidatiu, després de 30 minuts de tractament amb el peròxid d'hidrogen, els valors d'interacció entre Slt2 i Msg5 augmentaven 3,2 unitats de β -galactosidasa en el mutant simple *grx4* respecte als valors detectats en la soca salvatge, valors d'interacció que s'incrementant fins a 4,1 unitats de β -galactosidasa després d'una hora de tractament amb l'agent oxidant (vegeu l'histograma de la Figura 31B).

Aquestes dades demostraven que en absència de Grx4 s'augmentava l'interacció entre Slt2 i Msg5 en resposta a estrès oxidatiu, fet que es correlacionava amb els baixos nivells de fosforilació de Slt2 detectats en el mutant *grx4*.

Doi *et al.*, (1994) van descriure que la fosfatasa Msg5 defosforilava Fus3, l'última quinasa de la via de resposta a feromones, regulant l'adaptació cel.lular en presència de Factor α en el medi extern (vegeu Introducció Capítol 2, pàg.104). Consistent amb aquest fet, l'augment de l'activitat fosfatasa Msg5 podia ser mesurada indirectament per els nivells de defosforilació de Fus3.

Per aquest motiu, mitjançant l'estudi de l'activació de Fus3, vam analitzar de manera indirecta si en absència de Grx4 s'incrementava l'activitat fosfatasa de Msg5.

Cultius de les soques salvatge, mutants simples *msg5* i *grx4* i el doble mutant *grx4msg5* van ser crescuts en fase exponencial i seguidament tractats amb 1mM de peròxid d'hidrogen per determinar l'activació de Fus3 mitjançant l'anticòs fosfo-p44/42, el qual detecta les tres quinases que s'activen mitjançant la fosforilació dels dos residus Tirosina i Treonina, que son: Slt2, Kss1 i Fus3.

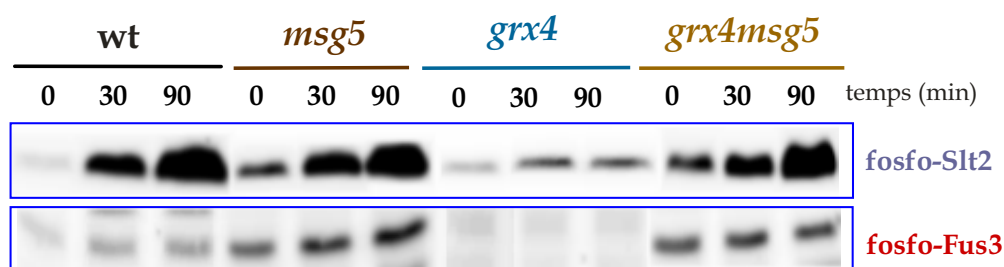


Figura 32- Detecció dels nivells de fosforilació de la quinasa Fus3. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament els cultius van ser tractats amb 1mM de peròxid d'hidrogen. En els temps indicats en la Figura es van recolectar alíquotes que van ser processades per determinar els nivells de fosforilació de Fus3 mitjançant l'anticòs p44/42.

Els resultats descrits en la Figura 32, demostraven l'absència de fosforilació de Fus3 en el mutant simple *grx4* en resposta a estrès oxidatiu respecte a la soca salvatge, fet que indicava que la fosfatasa Msg5 estava més activada en absència de Grx4. L'augment dels nivells de fosforilació de Fus3 detectats en el doble mutant *grx4msg5* respecte al mutant simple *grx4*, confirmaven aquest resultat.

En resum, aquests resultats aportaven més indicis de l'activitat fosfatasa de Msg5 sobre Slt2 en el mutant *grx4* com a mecanisme de regulació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu

11- Grx4 necessita a Grx3 per activar la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

D'acord amb el mecanisme proposat on Msg5 regularia negativament la fosforilació de Slt2 en absència de Grx4 en resposta a estrès oxidatiu, l'absència de fosforilació de Slt2 en el triple mutant *grx3grx4msg5* suggeriria un mecanisme de regulació més complex, que implicava la funció de la glutaredoxina Grx3, actuant cooperativament amb Grx4, per duu a terme la correcta activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

Una possible explicació de les diferències en l'activació observades entre els mutants *grx4msg5* i *grx3grx4msg5* podria ser deguda a una qüestió estequiometrica en relació al nombre de molècules de Slt2 doblement fosforilades que l'anticòs p44/42 és capaç de detectar. Com es demostrava en la Figura 13A, els nivells de proteïna total de Slt2 en el

doble mutant *grx3grx4* eren molt més baixos que els nivells detectats en el mutant *grx4*. A més a més, els nivells de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu eren comparativament més baixos que els nivells detectats en resposta a dany en la paret cel·lular (vegeu Figura 6 i 7 com a exemple), fet que dificultava encara més la detecció de la fosforilació de Slt2 en unes condicions de baixos nivells de proteïna Slt2.

Amb l'objectiu, d'analitzar realment els nivells de fosforilació de Slt2 que esperavem visualitzar en el triple mutant *grx3grx4msg5* d'acord amb el model proposat, vam decidir analitzar la fosforilació de Slt2 hiperactivant la via *PKC1* amb l'al·lel *BCK1-20* en resposta a estrès oxidatiu en les següents soques: soca salvatge i mutants *msg5*, *grx3grx4* i *grx3grx4msg5*. Comparativament també vam realitzar un tractament de xoc tèrmic a 38°C.

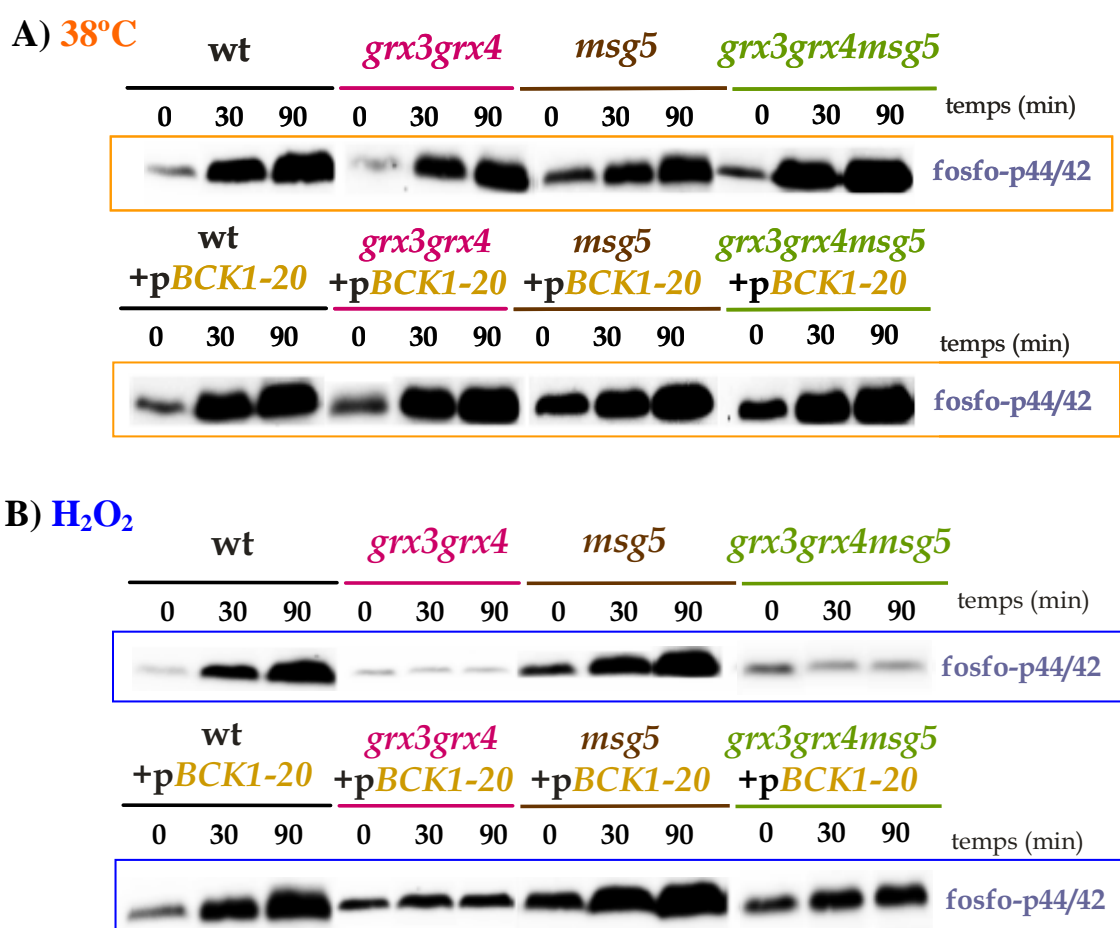


Figura 33- Anàlisi de la fosforilació de Slt2 en mutants en la fosfatasa *Msg5* amb l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* en resposta a estrès oxidatiu i estrès tèrmic. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crecudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar fase exponencial **(A)** Anàlisi dels nivells de fosforilació de Slt2 en resposta a xoc tèrmic de 38°C. **(B)** Anàlisi dels nivells de fosforilació de Slt2 en resposta a 1mM de peròxid d'hidrogen.

Com s'observa en la Figura 33A, en resposta a xoc tèrmic, l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* augmentava tan els nivells basals de fosforilació de Slt2 com els nivells induïts en totes les soques analitzades.

D'altra banda, en el mutant *msg5* sobreexpressant *BCK1-20* no vam observar una inducció addicional en la fosforilació de Slt2 respecte a la detectada en la soca salvatge sobreexpressant *BCK1-20* en resposta a xoc tèrmic, fet consistent amb l'especificitat de *Msg5* en la defosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

En resposta a estrès oxidatiu (Figura 33B) la hiperactivació de *BCK1-20* en el *grx3grx4msg5* incrementava lleugerament l'activació de Slt2, respecte als baixos nivells de fosforilació detectats en el doble mutant *grx3grx4* amb l'al·lel *BCK1-20*.

Els resultats obtinguts a nivell de fosforilació de Slt2, guardaven relació amb la viabilitat cel·lular en resposta a estrès oxidatiu observada en aquestes soques.

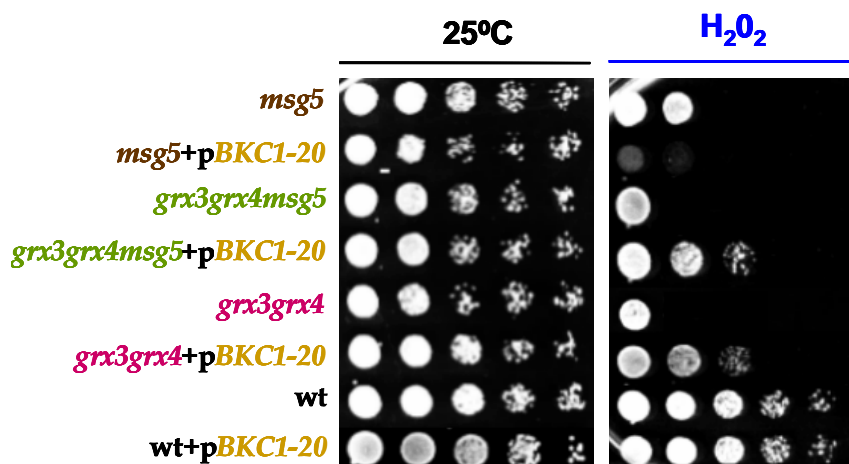


Figura 34- Assaig de viabilitat cel·lular en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de les soques descrits en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Alíquotes de cada cultiu van ser recolectades per realitzar dilucions seriades. Tot seguit, les mostres van ser replicades en plaques de medi mínim SD tractades amb 1mM de peròxid d'hidrògen. Les plaques van ser incubades durant 3 dies a 25°C.

Com es demostra en la Figura 34, la hiperactivació de l'al·lel *BCK1-20* restablí parcialment la viabilitat cel·lular dels mutants *grx3grx4* i *grx3grx4msg5* en resposta a estrès oxidatiu.

D'altra banda, vam observar que la hiperactivació de l'al·lel *BCK1-20* en el mutant *msg5* era deletèria per a la cèl·lula, possiblement degut als elevats nivells basals de fosforilació de Slt2 causats per l'absència de *Msg5*, més la prolongada i permanent activació

de la via *PKC1* deguda a la presència de l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* en resposta a estrès a estrès oxidatiu.

Donat que l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* no restaurava els nivells de fosforilació de Slt2 en el triple mutant *grx3grx4msg5* a nivells de la soca salvatge, vam transformar les soques prèviament descrites amb el plàsmid pSlt2HA, utilitzant com a estratègia l'augment del nombre de molècules de Slt2 més la hiperactivació de la via, per visualitzar realment els nivells de fosforilació de Slt2 en el triple mutant *grx3grx4msg5* en resposta a estrès oxidatiu.

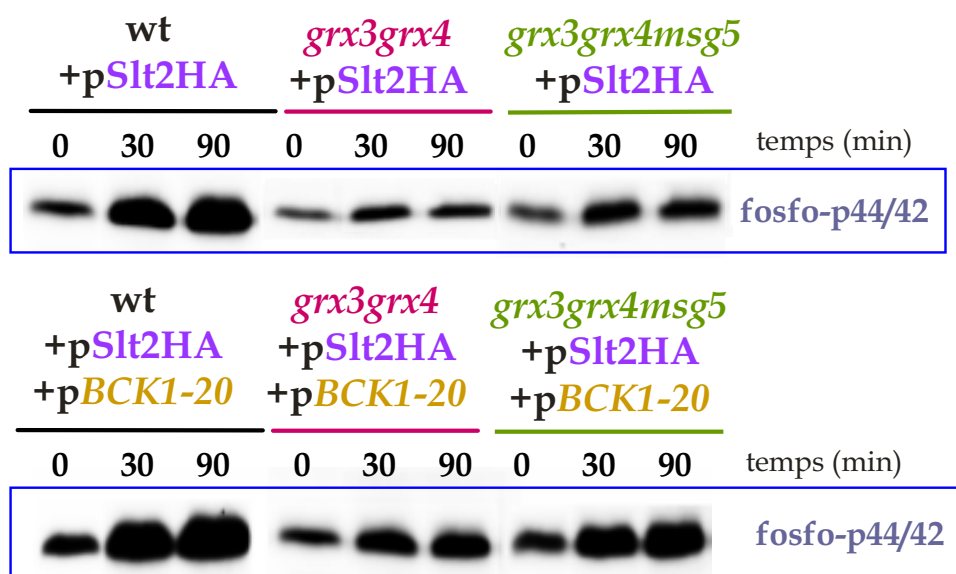


Figura 35- Anàlisi de la fosforilació de Slt2 en mutants en la fosfatasa *Msg5* amb l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* en resposta a estrès oxidatiu i estrès tèrmic. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser tractades i processades per detectar la fosforilació de Slt2 en a les mateixes condicions experimentals d'estrès oxidatiu descrites en la Figura 33.

Els resultats representats en la Figura 35 mostraven que el triple mutant *grx3grx4msg5* sobreexpressant Slt2 i amb l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* restablia la fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu, com a mínim a uns nivells similars als obtinguts en la soca salvatge sobreexpressant Slt2

Per completar aquest estudi, també es van analitzar en aquestes soques els nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* i les viabilitats cel·lulars en resposta a estrès oxidatiu.

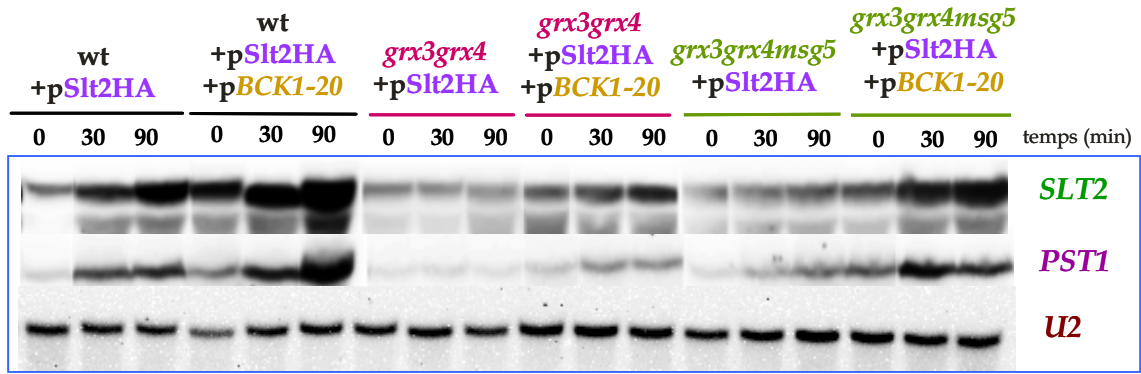


Figura 36- Anàlisi transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* en mutants en la fosfatasa *Msg5* sobreexpressant *Slt2* i amb l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser tractades sota les mateixes condicions experimentals d'estrès oxidatiu amb 1mM de peròxid d'hidrogen descrites en la Figura 33. Les mostres van ser processades per extreure RNA total analitzar els nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1*. *U2* va ser la sonda utilitzada com a control de carga.

Com s'observa en la Figura 36, els nivells transcripcionals de *SLT2* i de *PST1* en el triple mutant *grx3grx4msg5* sobreexpressant *Slt2* i l'al·lel *BCK1-20* eren similars als detectats en la soca salvatge sobreexpressant *Slt2*, dades consistents amb els nivells de fosforilació de *Slt2* detectats en el triple mutant *grx3grx4msg5* sobreexpressant ambdues quinases.

Finalment, com s'observa en la Figura 37 i en correlació amb tots els resultats obtinguts prèviament, mentre que la sobreexpressió de *Slt2* restablí parcialment la viabilitat cel·lular dels mutants *grx3grx4* i *grx3grx4msg5*, la sobreexpressió de *Slt2* i l'al·lel *BCK1-20* restablien completament la viabilitat cel·lular del triple mutant *grx3grx4msg5*, respecte a la parcial viabilitat cel·lular detectada en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant ambdues quinases.

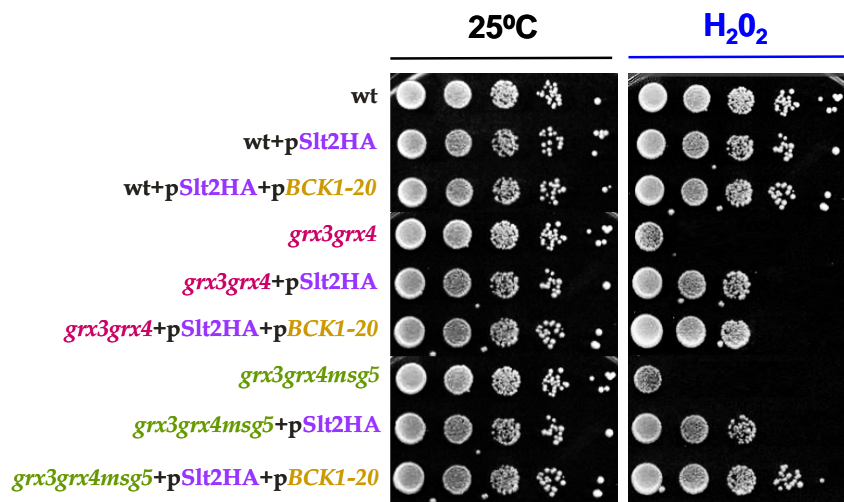


Figura 37- Assaig de viabilitat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes fins arribar a fase exponencial en medi mínim SD a 25°C. Seguidament, alíquotes de cada cultiu van ser processades i analitzades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 34.

En resum, els resultats mostrats en aquest apartat ens demostraven que Grx4 necessitava la funció de Grx3 per duu a terme la correcta activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu a través d'impedir l'accés de la fosfatasa *Msg5* a *Slt2* evitant la seva defosforilació.

12- Grx3 i Grx4 no regulen la localització de *Slt2* en resposta a estrès oxidatiu.

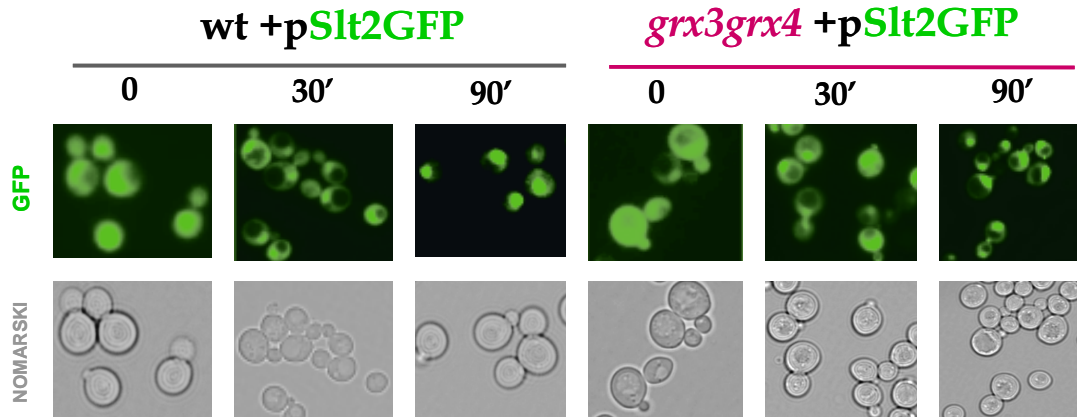
En els resultats publicats en Pujol *et al.*, (2006) demostravem que Grx3 i Grx4 regulaven l'exportació nuclear del factor transcripcional d'*Aft1* com a mecanisme per regular l'homeòstasi del ferro intracel.lular.

Per aquest motiu i abans d'aprofundir més en la caracterització del mecanisme de regulació de la via *PKC1* per part de Grx3 i Grx4, vam decidir analitzar si Grx3 i Grx4 participaven en la regulació de la localització nucli-citoplasmàtica de *Slt2*, com succeïa amb *Aft1*, en les següents soques: soca salvatge, mutants simples *grx3* i *grx4*, dobles mutant *grx3grx4*, *grx4msg5* i soca salvatge sobreexpressant Grx3 i Grx4 respectivament.

Per realitzar aquests estudis, cultius de les soques descrites prèviament, van ser transformades amb el plàmid que contenia la proteïna de fusió *Slt2-GFP* sota el promotor regulable *MET* (*pSlt2GFP*) (vegeu Materials i Mètodes, pàg.117), amb l'objectiu de monitoritzar *in vivo* la localització subcel.lular de *Slt2* en resposta a estrès oxidatiu.

Paral.lelament, es va realitzar un tractament de xoc tèrmic a 38°C en les soques salvatge i doble mutant *grx3grx4* amb l'objectiu de determinar possibles diferències en la localització subcel.lular de *Slt2* segons l'estímul rebut.

A) 38°C



B) H₂O₂

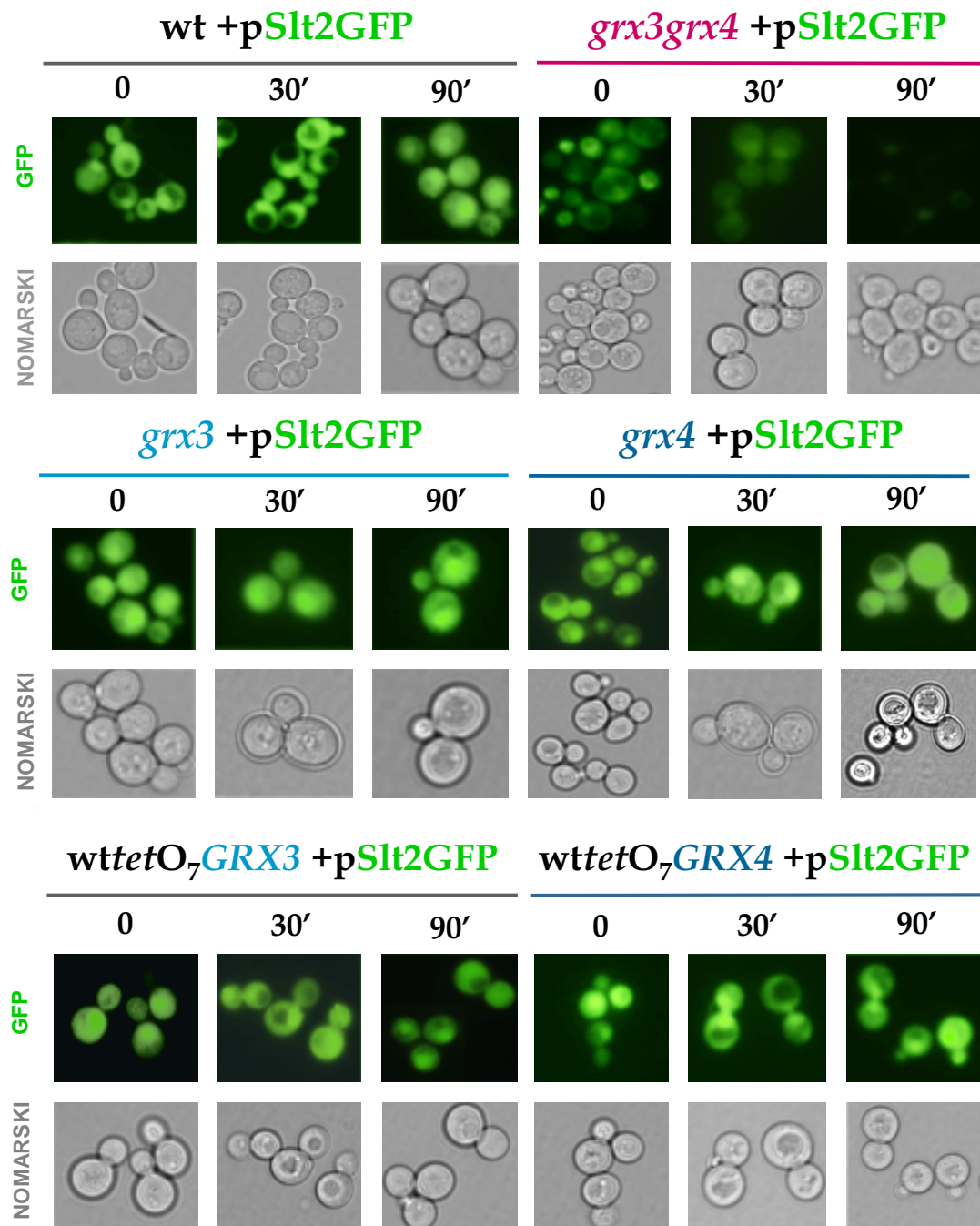


Figura 38- Localització subcel.lular de Slt2 *in vivo* en resposta a estrès tèrmic i estrès oxidatiu. Soca salvatge, mutants *grx3*, *grx4* i *grx3grx4* i soca salvatge sobreexpressant Grx3 i Grx4 respectivament van ser transformats amb la proteïna de fusió Slt2-GFP. Posteriorment les soques transformades van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C en presència de 25µM de metionina fins arribar a fase exponencial. Seguidament els cultius van ser exposats durant 90 minuts a 38°C **(A)** i paral.lelament tractats amb 1mM de peròxid d'hidrogen **(B)**. En els temps indicats en la Figura es va realitzar el seguiment *in vivo* de la localització subcel.lular de Slt2.

Com es detalla en la Figura 38, en condicions normals, la localització de Slt2 era nucli-citoplasmàtica tan en la soca salvatge com en el doble mutant *grx3grx4*.

En resposta a estrès tèrmic (Figura 38A), Slt2 era translocada dins del nucli en la soca salvatge, com demostraven els resultats descrits prèviament per Hahn i Thiele (2002).

En el doble mutant *grx3grx4*, Slt2 també era translocat dins del nucli després de 90 minuts de tractament a 38°C, dada consistent amb l'activació de Slt2 detectada en el doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès tèrmic (vegeu Figura 7).

En canvi, en resposta a estrès oxidatiu (Figura 38B) la localització de Slt2 continuava sent nucli-citoplasmàtica tan en la soca salvatge com en la resta de soques analitzades. No obstant, en el doble mutant *grx3grx4* els nivells de fluorescència de la proteïna de fusió Slt2-GFP anaven disminuint al llarg del tractament amb el peròxid d'hidrògen.

Aquests primers resultats demostraven que Grx3 i Grx4 no regulaven la localització nucli-citoplasmàtica de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

D'altra banda, com s'observa en la Figura 39, l'absència de Msg5 no produïa canvis en la localització nucli-citoplasmàtica de Slt2 detectada en el mutant *grx4* ni en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu.

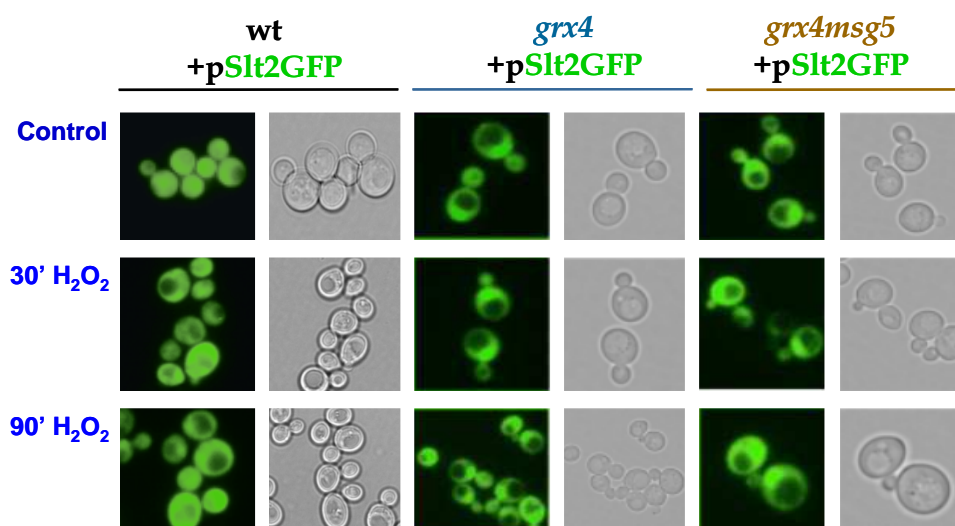


Figura 39- El doble mutant *grx4msg5* no presenta canvis en la localització nucli-citoplasmàtica de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu. Soca salvatge i mutants *grx4* i *grx4msg5* van ser transformats amb la proteïna de fusió Slt2-GFP i posteriorment tractats amb 1mM de peròxid d'hidrogen. El seguiment *in vivo* de la localització subcel.lular de Slt2 es va realitzar sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 38.

En resum, aquests resultats descartaven que Grx3 y Grx4 reguessin la localització subcel.lular de Slt2 com a mecanisme de regulació de l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu. A més a més, també demostraven que la localització nucli-citoplasmàtica de Slt2 en el mutant *grx4* en resposta a estrès oxidatiu tampoc es veia afectada per l'absència de Msg5.

13- Grx3 i Grx4 regulen l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu a través dels dominis *TRX*.

L'objectiu dels següents experiments va ser aprofundir en la caracterització funcional dels dominis estructurals *GRX* i *TRX* de Grx3 i Grx4 en la regulació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

Amb l'objectiu d'analitzar a través de quins dominis, Grx3 i Grx4 regulaven la fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu, cultius de les soques salvatge, *grx3*, *grx4* i doble mutants *grx3grx4* van ser transformades amb plàmidcs centromèrics que contenien cadascun dels dominis *GRX* i *TRX* de Grx3 i Grx4 respectivament sota el promotor regulable *tetO₇* (vegeu Pujol *et al.*, (2006), apartat de Material i Mètodes)

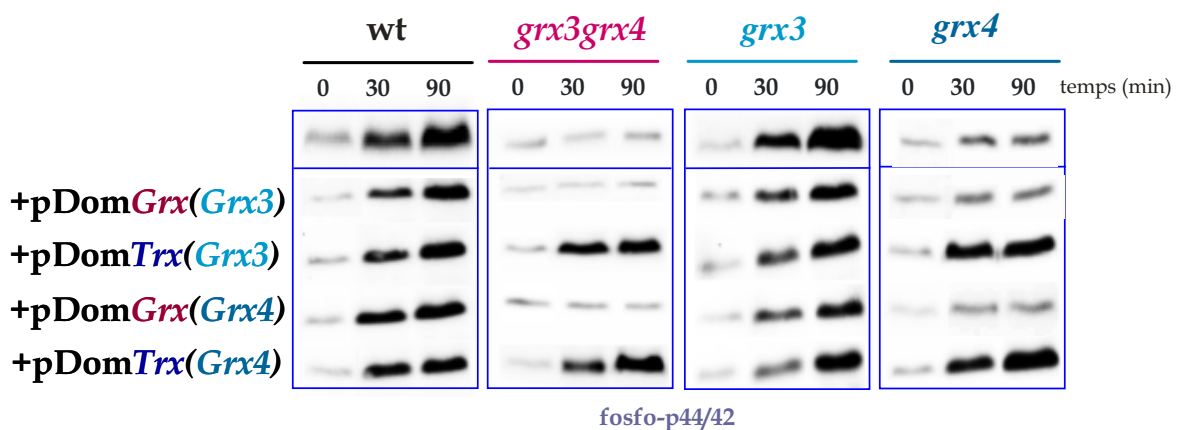


Figura 40- Els dominis *TRX* de *Grx3* i *Grx4* activen *Slt2* en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de la soca salvatge, mutants *grx3*, *grx4* i *grx3grx4* i cadascuna d'aquestes soques sobreexpressant els dominis *GRX* i *TRX* de les glutaredoxines *Grx3* i *Grx4* respectivament, van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. En els temps indicats en la Figura es van recolectar mostres que posteriorment van ser processades per detectar la fosforilació de *Slt2* en resposta a 1mM peròxid d'hidrogen.

Com es detalla en la Figura 40, la sobreexpressió dels dominis *TRX* de *Grx3* i *Grx4* restablien la fosforilació de *Slt2* en els mutants *grx4* i *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu, mentre que la sobreexpressió dels dominis *GRX* no induïen cap efectes sobre l'activació de *Slt2*. Aquestes dades demostraven que *Grx3* i *Grx4* regulaven l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu a través dels dominis *TRX*.

D'acord a aquests resultats i donat que *Grx4* era la glutaredoxina directament implicada en l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu, ens vam plantejar si el domini *TRX* de *Grx4* requeria dels elements que formaven part de la via *PKC1* per regular la fosforilació de *Slt2*.

Per analitzar aquesta qüestió vam utilitzar els següents mutants:

a) El mutant *bck1* (de la Torre *et al.*, 2002). La proteïna *Bck1* forma part del mòdul MAP quinasa de la via *PKC1*, encarregada de rebre i transmetre la senyal que reb de la quinasa *Pkc1* (vegeu Introducció Capítol 2, pàg.91).

b) El mutant *pkc1* (Vilella *et al.*, 2005). *Pkc1* és la quinasa encarregada d'activar el mòdul MAP quinasa de la via *PKC1* (vegeu Introducció Capítol 2, pàg.91). Aquest mutant va ser construït mitjançant la substitució del promotor endògen de *PKC1* pel promotor regulable per galactosa, *GAL1* (Vilella *et al.*, 2005). En presència en el medi de cultiu de galactosa, el promotor *GAL1* s'indueix i la quinasa *Pkc1* es expressada. En canvi, la presència d'un sucre diferent a la galactosa, com la glucosa, reprimeix el promotor *GAL1*, fet que inhibeix l'expressió de la quinasa *Pkc1*, actuant doncs com un mutant *pkc1*.

Cultius de les soques prèviament descrites van ser transformats amb el plàsmid que contenia el domini *TRX* de la glutaredoxina *Grx4*. Les condicions de creixement que es vam utilitzar en aquest assaig van ser les següents:

a) El mutant *bck1* sobreexpressant en domini *TRX* de *Grx4* va ser crescut en medi mínim SD a 25°C.

b) El mutant *pkc1* sobreexpressant el domini *TRX* de Grx4 va ser crescut a 25°C en els diferents medis de cultiu:

- en medi mínim SD per reprimir l'expressió de *PKC1* i obtenir un mutant *pkc1*
- en medi mínim SGalactosa per activar l'expressió de *PKC1*.

Seguidament, aquests cultius van ser tractats amb 1mM de peròxid d'hidrogen per analitzar l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

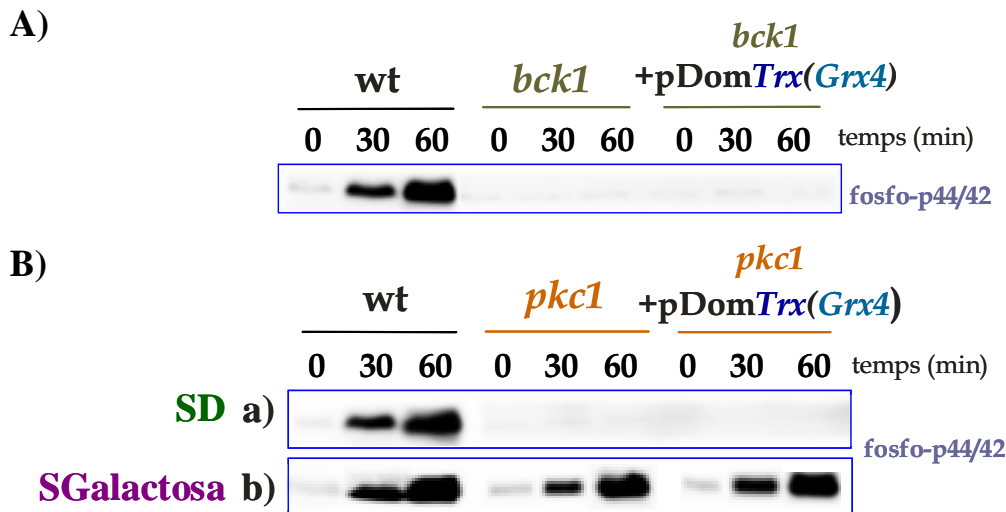


Figura 41- El domini *TRX* de la glutaredoxina Grx4 regula l'activació de Slt2 a través de la via *PKC1*. **(A)** Cultius de la soca salvatge, del mutant *bck1* i del mutant *bck1* sobreexpressant el domini *TRX* de la glutaredoxina Grx4 van ser crescuts en medi mínim SD a 25°C fins obtenir una OD₆₀₀ de 0,6. Alíquotes de cada cultiu van ser recolectades en els temps indicats en la Figura després d'afegir 1mM de peròxid d'hidrògen. Les mostres van ser processades per realitzar Western blot i detectar la fosforilació de Slt2 mitjançant l'anticòs p44/42. **(B)** Cultius de la soca salvatge, del mutant *pkc1* i del mutant *pkc1* sobreexpressant el domini *TRX* de Grx4 van ser crescudes a 25°C en medi mínim SD **(a)** i SGalactosa **(b)** fins arribar a una OD₆₀₀ de 0,6. Seguidament els cultius van ser tractats amb 1mM de peròxid d'hidrogen per detectar la fosforilació de Slt2, com es descriu en l'apartat A)

Com s'observa en la Figura 41A, la sobreexpressió del domini *TRX* de Grx4 no revertia l'absència de fosforilació de Slt2 del mutant *bck1* en resposta a estrès oxidatiu.

D'altra banda, en condicions de creixement amb glucosa, Figura 41B apartat a), la sobreexpressió del domini *TRX* de Grx4 tampoc revertia l'absència de fosforilació de Slt2 del mutant *pkc1*. En condicions de creixement amb galactosa, Figura 41B apartat b), la quinasa Pkc1 s'estava expressant i com a conseqüència la via *PKC1* s'activava correctament.

En aquest cas, la sobreexpressió del domini *TRX* de Grx4 no provocava variacions en els nivells de fosforilació de Slt2 detectats en aquestes condicions experimentals.

Per completar aquest estudi, les soques prèviament descrites van ser sotmeses a assajos de viabilitat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu, sota les mateixes condicions experimentals de creixement en medi SD i SGalactosa.

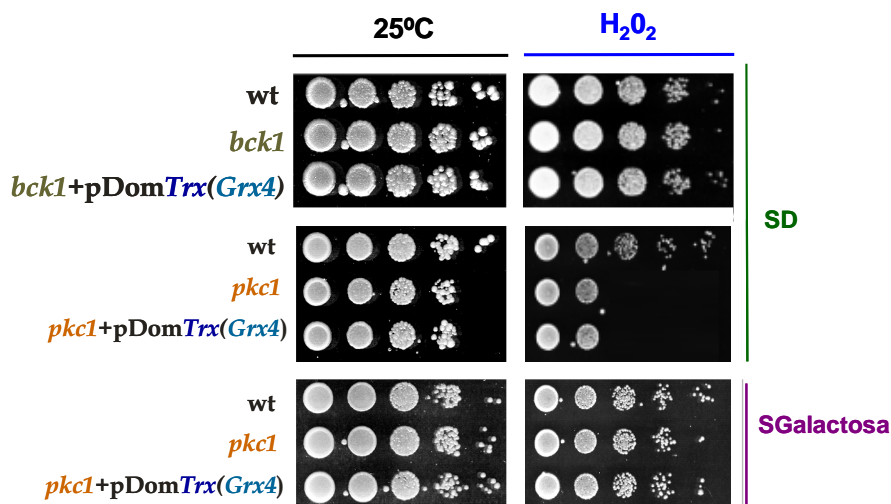


Figura 42- Estudis de viabilitat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi SD a 25°C. Seguidament vam realitzar dilucions seriades que van ser replicades en les respectives plaques de medi mínim SD i SGalactosa tractades amb 1mM de peròxid d'hidrogen. Totes les plaques van ser incubades durant 3 dies a 30°C.

Com s'observa en la Figura 42, el mutant *bck1* no presentava defectes de viabilitat cel.lular en presència de peròxid d'hidrogen, com van descriure prèviament Vilella *et al*, (2005). En aquestes condicions, la sobreexpressió del domini *TRX* de Grx4 no produïa cap efecte sobre la viabilitat cel.lular del mutant *bck1*.

D'altra banda, en medi amb glucosa (SD), la sobreexpressió del domini *TRX* no restaurava la viabilitat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu que presentava el mutant *pkc1*, fet consistent amb l'absència d'activació de la via *PKC1* en aquestes condicions de creixement. En canvi, en medi amb galactosa (SGalactosa), on la quinasa Pkc1 estava sent expressada, la viabilitat cel.lular observada en resposta a estrès oxidatiu era equivalent a la de la soca salvatge. En aquest cas, la sobreexpressió del domini *TRX* de Grx4 tampoc induïa canvis en aquesta viabilitat.

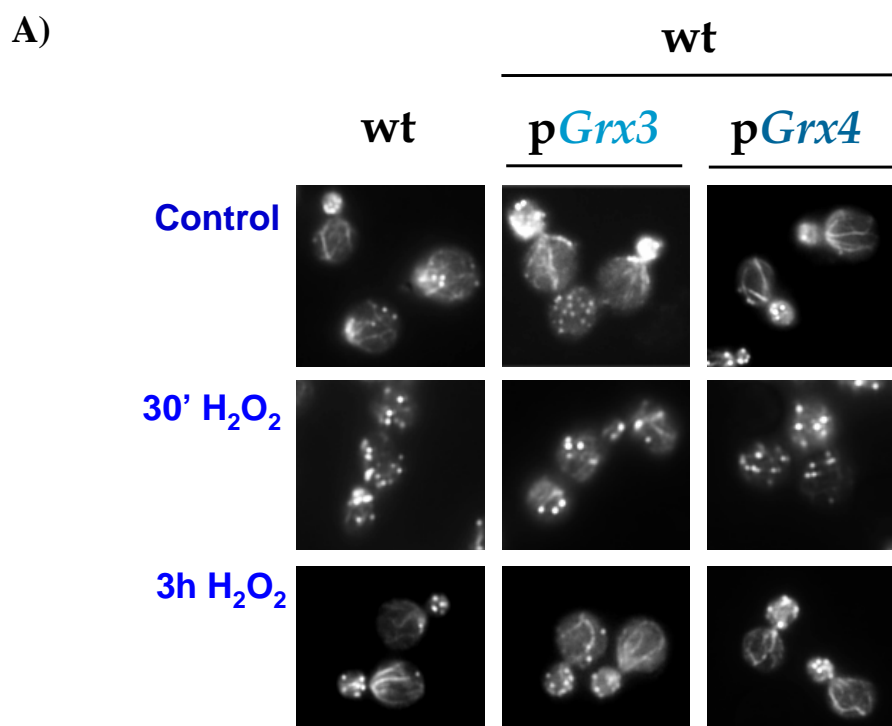
Tot plegat, els resultats obtinguts ens van permetre concloure que el domini *TRX* de Grx4 regulava l'activació de Slt2 a través dels elements que integraven la via *PKC1*.

14- Els dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 regulen l'organització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.

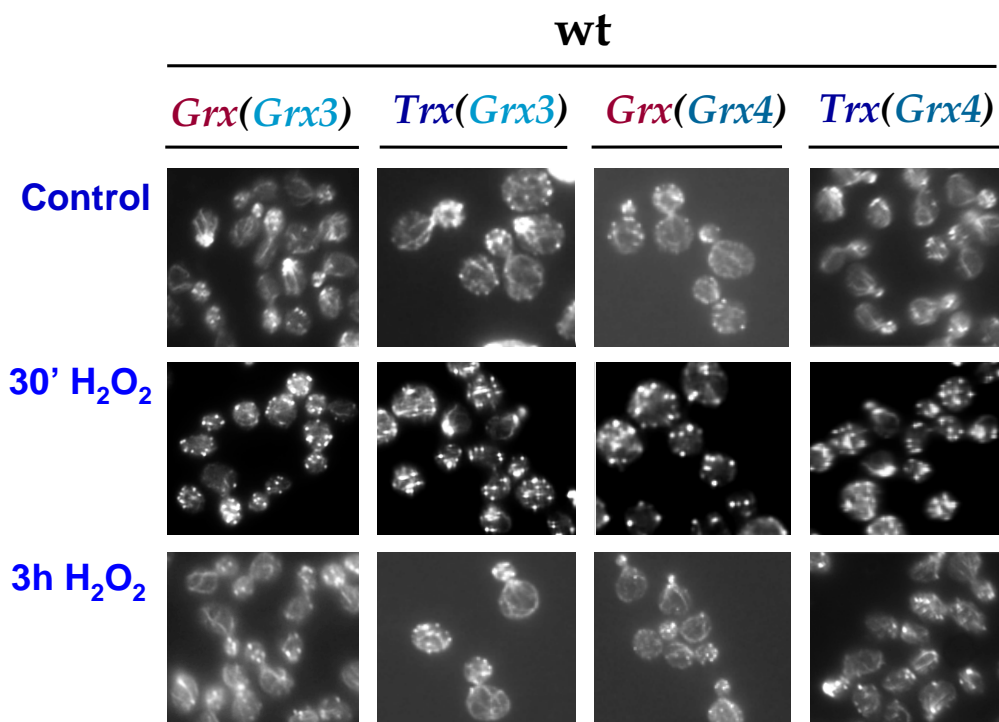
Un cop demostrat que els dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 restablien la fosforilació de Slr2 en resposta a estrès oxidatiu en els mutant *grx4* i *grx3grx4*, ens vam plantejar analitzar dues qüestions:

- 1- Determinar si els dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 participaven en l'organització del citoesquelet d'actina del mutants *grx4* i *grx3grx4* en condicions normals.
- 2-Determinar si els dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 participaven en la repolarització del citoesquelet d'actina dels mutants *grx4* i *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu.

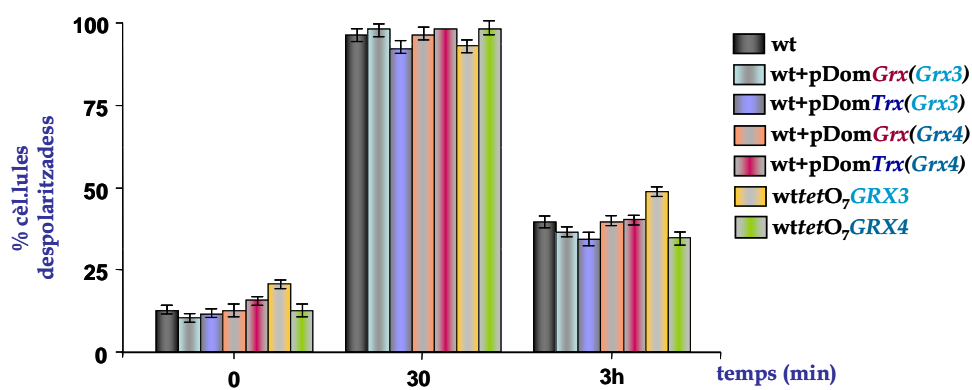
Per completar aquest anàlisi i amb l'objectiu de reforçar les dades obtingudes sobre el possible paper funcional de Grx3 i Grx4 en la regulació de la polarització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu, vam incloure en aquests experiments la sobreexpressió de les proteïnes senceres Grx3 i Grx4 i la sobreexpressió dels respectius dominis *GRX*. Paral·lelament, també van realitzar assajos de viabilitat cel·lular en presència de 1mM de peròxid d'hidrogen.



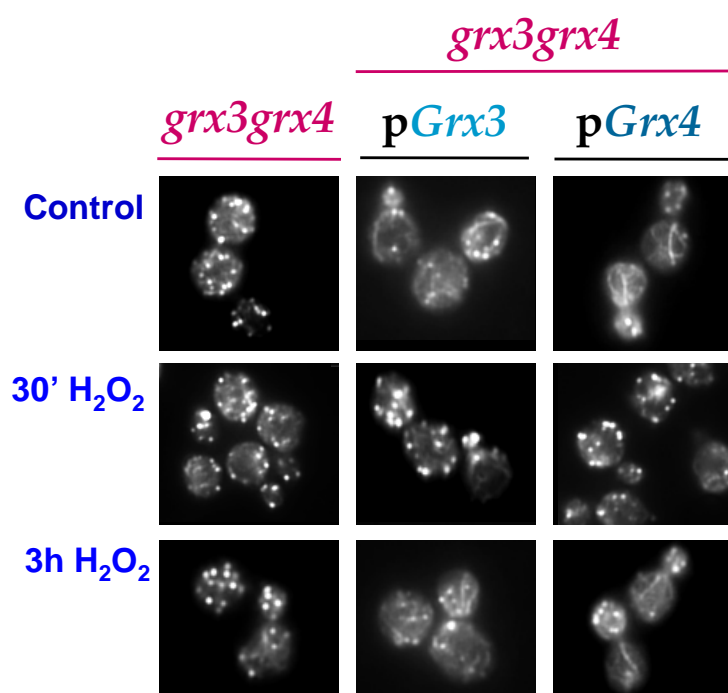
B)



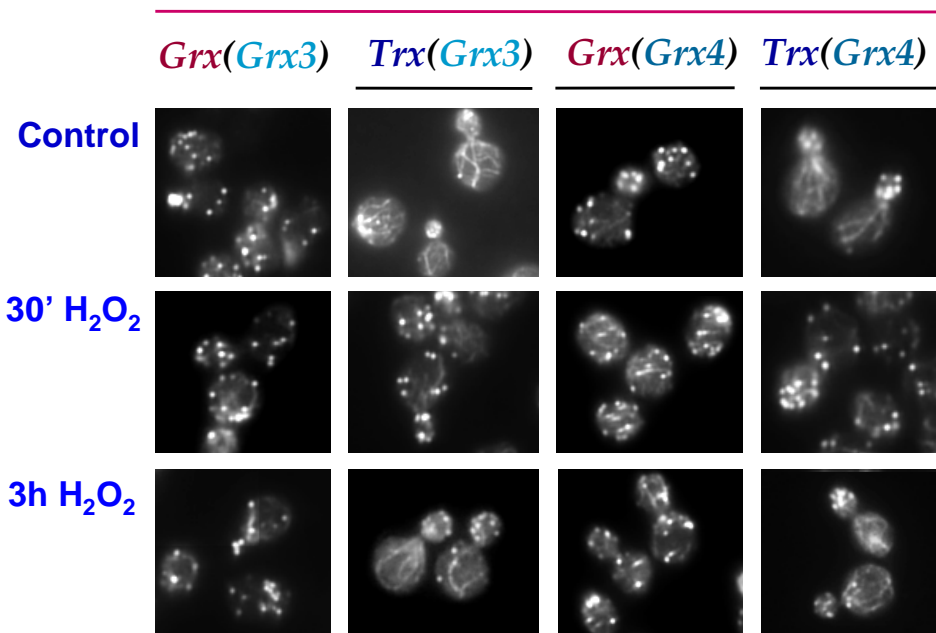
C)



D)



E)

grx3grx4

F)

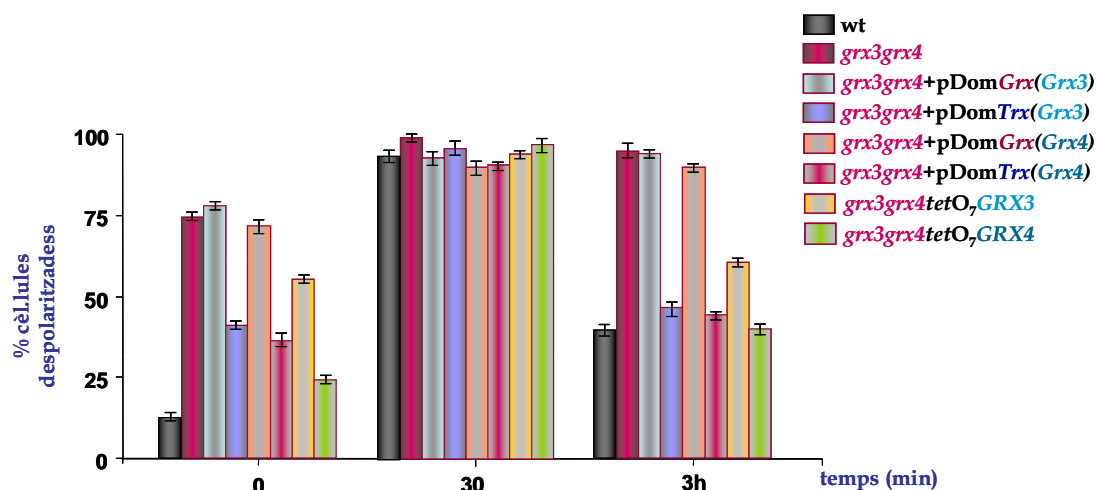


Figura 43- Grx3, Grx4 i els respectius dominis *TRX* regulen l'organització del citoesquelet d'actina en el doble mutant *grx3grx4* en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de la soca salvatge i del doble mutant *grx3grx4* van ser transformades d'una banda, amb un plàsmid centromèric que contenia cadascun dels dominis *GRX* i *TRX* de Grx3 i Grx4 i d'altra banda amb un vector integratiu que contenia cadascuna de les glutaredoxines Grx3 i Grx4 senceres (vegeu Pujol *et al.*, (2006), apartat de Material i Mètodes). Cultius d'aquestes soques van ser crescudes en mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial i posteriorment tractades durant 3 hores amb peròxid d'hidrògen 1mM. El processament i l'anàlisi de les mostres es van realitzar sota les mateixes condicions experimentals detallades en la Figura 8. (A, B) Tincions d'actina en la soca salvatge. (D-E) Tincions d'actina en el doble mutant *grx3grx4*. (C-F) Histogrames de barres que representen en % el nombre de cèl.lules despolaritzades presents en cada mostra analitzada.

Com es detalla en les Figura 43D, E i F, la sobreexpressió dels dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 restablen la polarització del citoesquelet d'actina tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu del doble mutant *grx3grx4*, dades que guardaven relació amb la fosforilació de Slt2 observada al sobreexpressar els dominis *TRX* en aquest mutant (vegeu Figura 40). En canvi, la sobreexpressió dels dominis *GRX* de Grx3 i Grx4 no induïen canvis en la despolarització del citoesquelet del doble mutant *grx3grx4*.

La sobreexpressió de la proteïna sencera Grx4 també restablia la polarització del citoesquelet d'actina del doble mutant *grx3grx4* tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu a uns nivells similars als observats en la soca salvatge (Figures 43A, B i C).

En canvi, la polarització del citoesquelet era parcialment restablerta amb la sobreexpressió de la proteïna sencera Grx3 en el doble mutant *grx3grx4* en ambdues condicions experimentals. Aquestes dades es correlacionaven amb la correcta organització del citoesquelet d'actina detectada en el mutant simple *grx3* i la parcial despolarització del citoesquelet d'actina detectada en el mutant simple *grx4* (vegeu Figura 14).

Les soques prèviament descrites, també van ser sotmeses a l'assaig de viabilitat cel.lular en resposta a peròxid d'hidrogen.

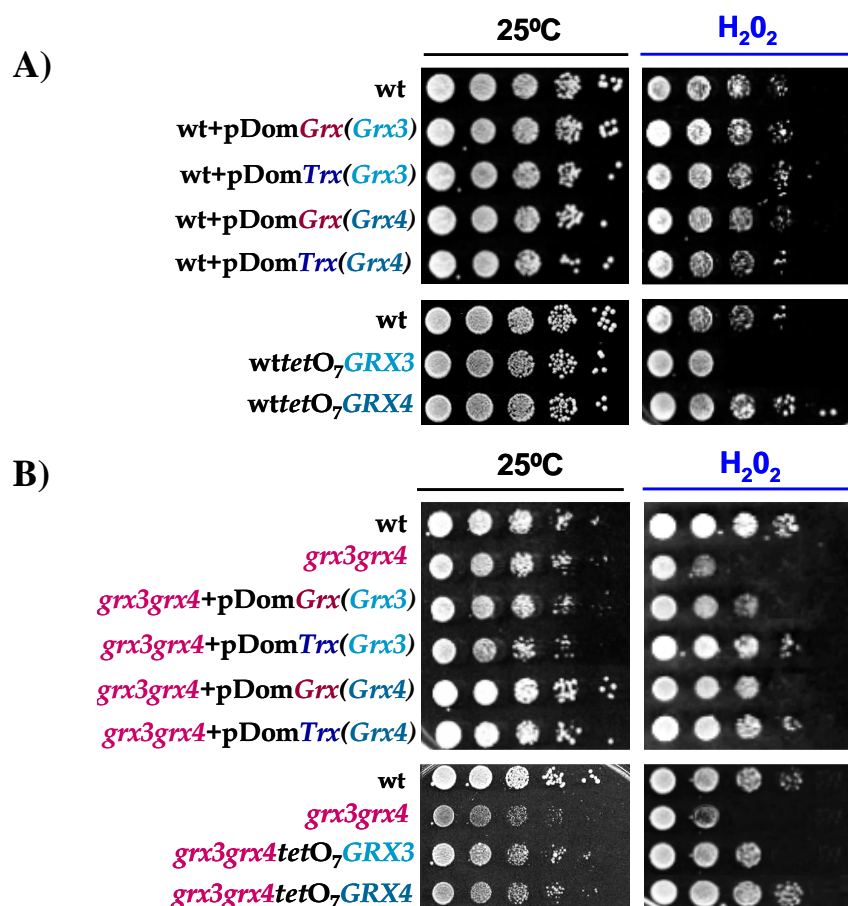


Figura 44- Assajos de viabilitat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu en les soques salvatge i el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Grx3, Grx4 i els dominis GRX i TRX. Soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament, alíquotes de cada cultiu van ser recolectades per realitzar dilucions seriades. Posteriorment, les mostres van ser replicades en plaques de medi mínim SD tractades peròxid d'hidrogen 1mM. Les plaques van ser incubades a 30°C durant 3 dies.

Com s'observa en la Figura 44B, la sobreexpressió dels dominis GRX i TRX de Grx3 i Grx4 respectivament, restablien la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu.

Per una banda, el restabliment de la viabilitat cel.lular observada en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant els dominis TRX era consistent amb la fosforilació de Slt2 i la polarització del citoesquelet d'actina detectats en aquesta soca.

D'altra banda, els dominis GRX de Grx3 i Grx4 regulaven l'exportació nuclear d'Aft1, mecanisme amb el qual es disminuïen els elevats nivells de ferro intracel.lular (Pujol *et al.*, 2006) i en conseqüència els alts nivells d'oxidació endògena (com es detalla en l'aparat 17). Aquest fet explicaria perquè els dominis GRX restablien la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu, malgrat no restablir ni la fosforilació de Slt2 ni el citoesquelet d'actina.

D'altra banda, la sobreexpressió de Grx4 restablia més eficaçment la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu que la sobreexpressió de Grx3. Aquests fets que es correlacionaven amb l'organització del citoesquelet d'actina detectada en aquestes soques (vegeu 43D, E i F) i amb les viabilitat cel.lular detectades en els mutants simples *grx3* i *grx4* en resposta a estrès oxidatiu (vegeu Figura 12).

Finalment, com es detalla en la Figura 45A i B, els dominis TRX també restablien la polarització del citoesquelet d'actina en el mutant simple *grx4*, en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu. A més a més, la sobreexpressió de Grx3 també restablia parcialment aquest defectes en ambdues condicions experimentals.

En aquest cas, els dominis GRX tampoc restablien la polarització del citoesquelet d'actina en el mutant *grx4*.

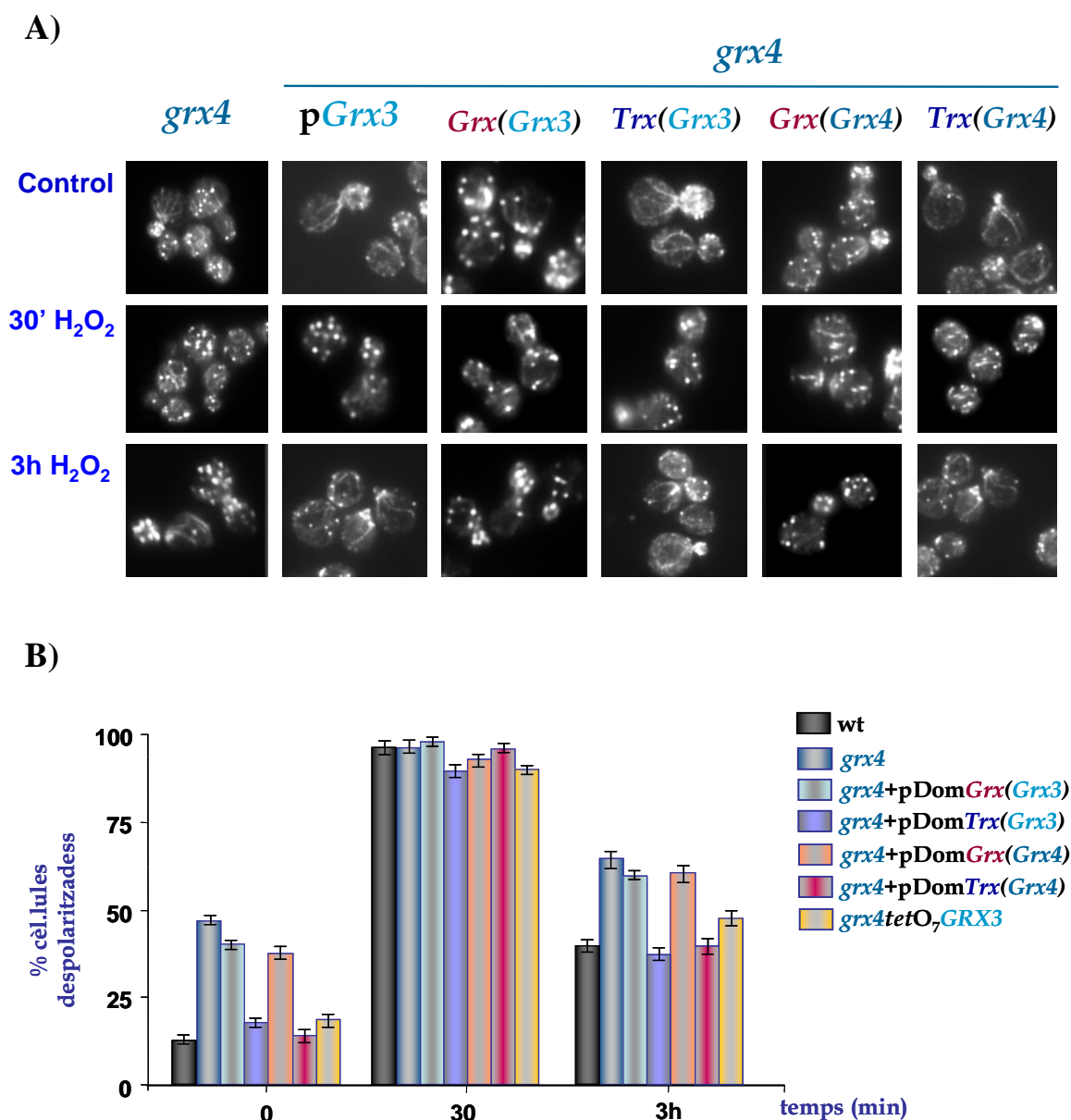


Figura 45- *Grx3* i els dominis *TRX* de *Grx3* i *Grx4* regulen l'organització del citoesquelet d'actina en el mutant *grx4* en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser processades i analitzades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 43.

Aquests dades es correlacionaven amb els resultats obtinguts mitjançant l'assaig de viabilitat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu (Figura 46): la sobreexpressió dels dominis *TRX* i de la proteïna sencera *Grx3* restablen la viabilitat cel.lular del mutant *grx4* en resposta a peròxid d'hidrogen als nivells de la soca salvatge. No obstant, els dominis *GRX* no restablen aquesta viabilitat cel.lular.

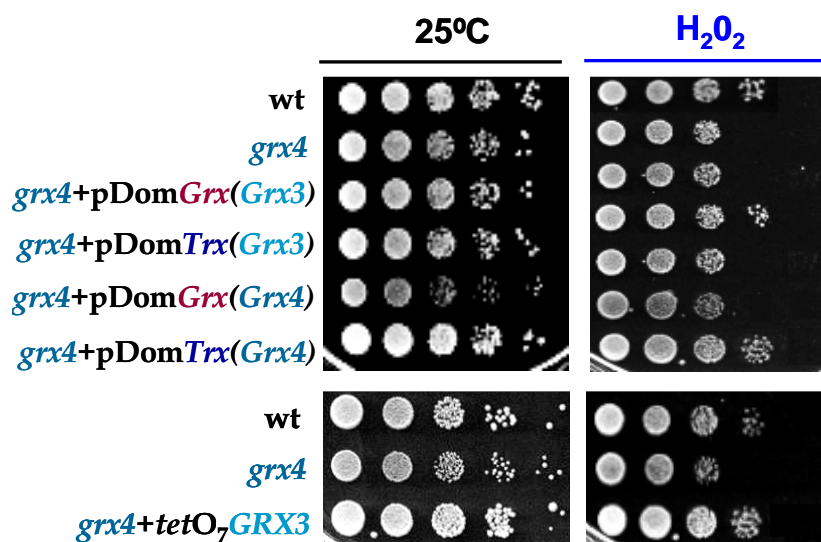


Figura 46- Assajos de viabilitat cel.lular en resposta estrès oxidatiu en el mutant *grx4* sobreexpressant Grx3 i els dominis *TRX* i *GRX* de Grx3 i Grx4. Soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Alíquotes de cada cultiu van ser recolectades i processades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 44.

En resum, els nostres resultats demostraven per primera vegada la participació dels dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 en els processos de polarització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.

15- L'absència de *GRX3*, *GRX4* i *SLT2* provoca letalitat sintètica en resposta a dany en la paret cel.lular i estrès oxidatiu.

En l'apartat 8 vam demostrar *in vivo* e *in vitro* l'interacció física entre Grx3, Grx4 i Slt2. Per aquest motiu, els experiments exposats en el següent apartat de Resultats tenen com objectiu caracteritzar la possible interacció genètica entre Grx3, Grx4 i Slt2.

Una primera aproximació, va ser realitzar assajos de viabilitat cel.lular en el triple mutant *grx3grx4slt2* davant els diversos agents que activaven la via *PKC1*, amb l'objectiu de caracteritzar si existia una letalitat sintètica entre Grx3, Grx4 i Slt2.

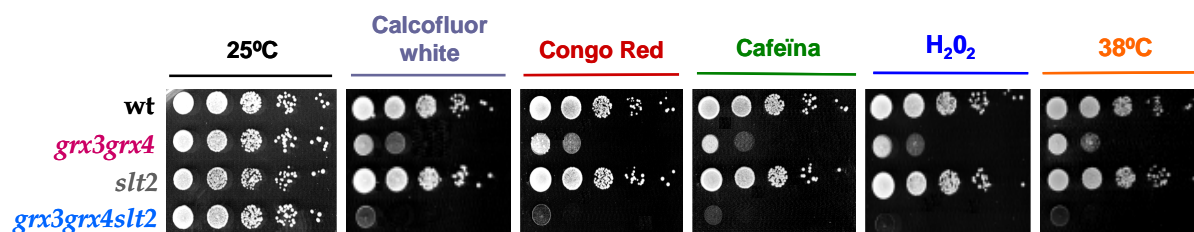


Figura 47- Letalitat sintètica del triple mutant *grx3grx4slt2* davant agents que causen estrès en la paret cel.lular i estrès oxidatiu. Cultius de la soca salvatge, el doble mutant *grx3grx4*, el mutant simple *slt2* i el triple mutant *grx3grx4slt2* van ser crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C fins a obtenir una OD₆₀₀ de 0,6. Posteriorment, alíquotes de cada cultiu van ser recolectades per realitzar diversos assajos de viabilitat cel.lular sota les mateixes condicions experimentals descrites en l'apartat 1.

Com es mostra en la Figura 47, l'absència simultània de *GRX3*, *GRX4* i *SLT2* induïa una clara letalitat sintètica en resposta a estrès en paret cel.lular i estrès oxidatiu, respecte a la sensibilitat cel.lular observada en el doble mutant *grx3grx4*.

Els anàlisis ultraestructurals de l'envolta cel.lular ens va mostrar defectes en l'estructura de la paret cel.lular del doble mutant *grx3grx4* (vegeu Figura 2). Per aquesta motiu, ens vam plantejar si la letalitat sintètica detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2* davant els diversos agents que danyaven la paret cel.lular i causaven estrès oxidatiu, era deguda a la presència de majors defectes estructurals en l'envolta cel.lular.

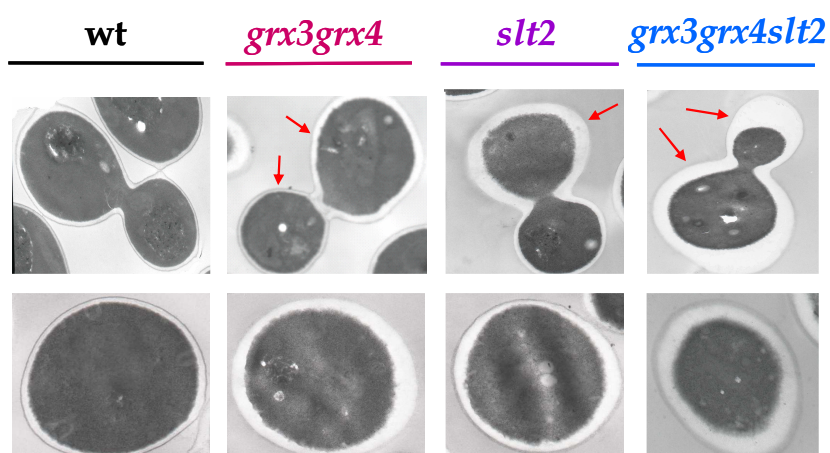


Figura 48- Modificacions ultraestructurals en la paret cel.lular. Cultius de la soca salvatge i els mutants *grx3grx4*, *slt2* i *grx3grx4slt2* van ser crescudes fins arribar a una OD₆₀₀ de 0,5-0,6 en medi mínim SD a 25°C. Posteriorment les mostres van ser processades i analitzades en el microscopi electrònic de transmissió (vegeu Materials i Mètodes, pàg.125)

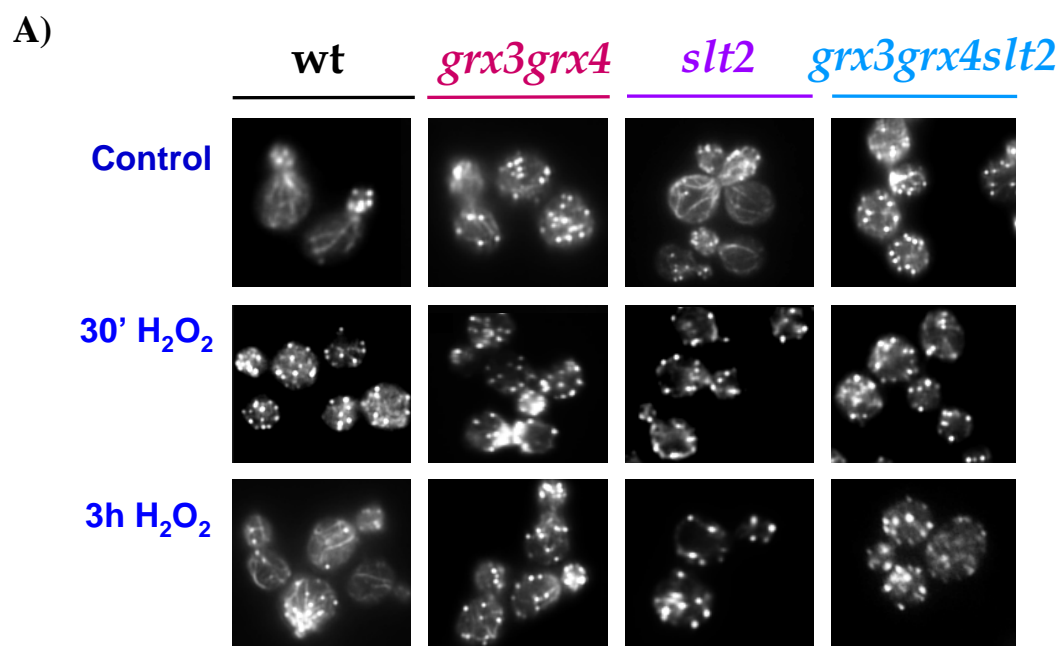
Com es detalla en la Figura 48, el triple mutant *grx3grx4slt2* presentava una major acumulació del polímer glucà tan en la paret cel.lular de la cèl.lula mare com de la cèl.lula filla, respecte a l'acumulació del polímer glucà detectada en la paret cel.lular dels mutants *slt2* i *grx3grx4*.

Aquestes dades guardaven relació amb la letalitat sintètica del triple mutant *grx3grx4slt2* en resposta a danys en la paret cel.lular i estrès oxidatiu. A més a més, també demostrava l'efecte additiu de Grx3, Grx4 i Slt2 en els mecanismes implicats en formació de la paret cel.lular.

16- Grx3 i Grx4 participen en els processos de polarització del citoesquelet d'actina independentment de Slt2.

Els experiments exposats a continuació tenen com objectiu aprofundir més en el paper funcional de Grx3, Grx4 i Slt2 en relació als processos de polarització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.

Per aquest motiu vam començar l'analitzant el citoesquelet d'actina del mutants *slt2* i *grx3grx4slt2*



B)

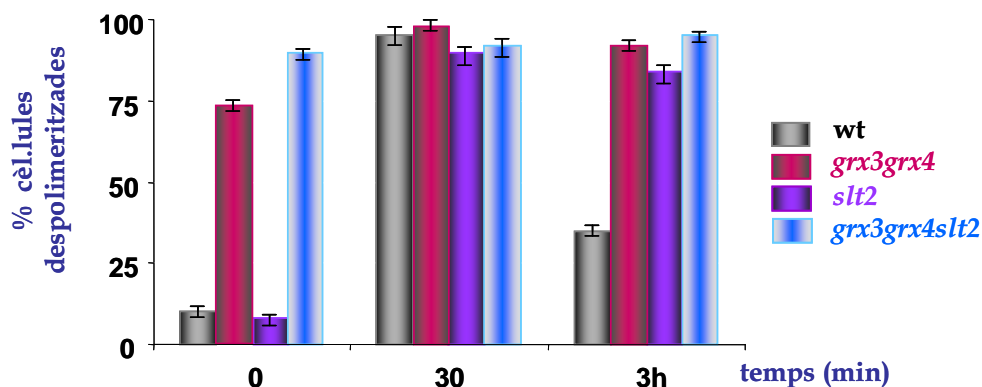


Figura 49- Organització del citoesquelet d'actina en el mutants *slt2* i *grx3grx4slt2*. Tincions d'actina amb Rodamina Faloidina de les soques descrites en la Figura van ser processades i analitzades sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 8.

Com es detalla en la Figura 49, el mutant *slt2* no presentava defectes en l'organització del citoesquelet d'actina en condicions normals. No obstant, a les 3 hores de tractament amb l'agent oxidant, el citoesquelet d'actina del mutant *slt2* continuava despolaritzat, observant un percentatge de cèl.lules despolaritzades similar al observat en el doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu (Figura 49B).

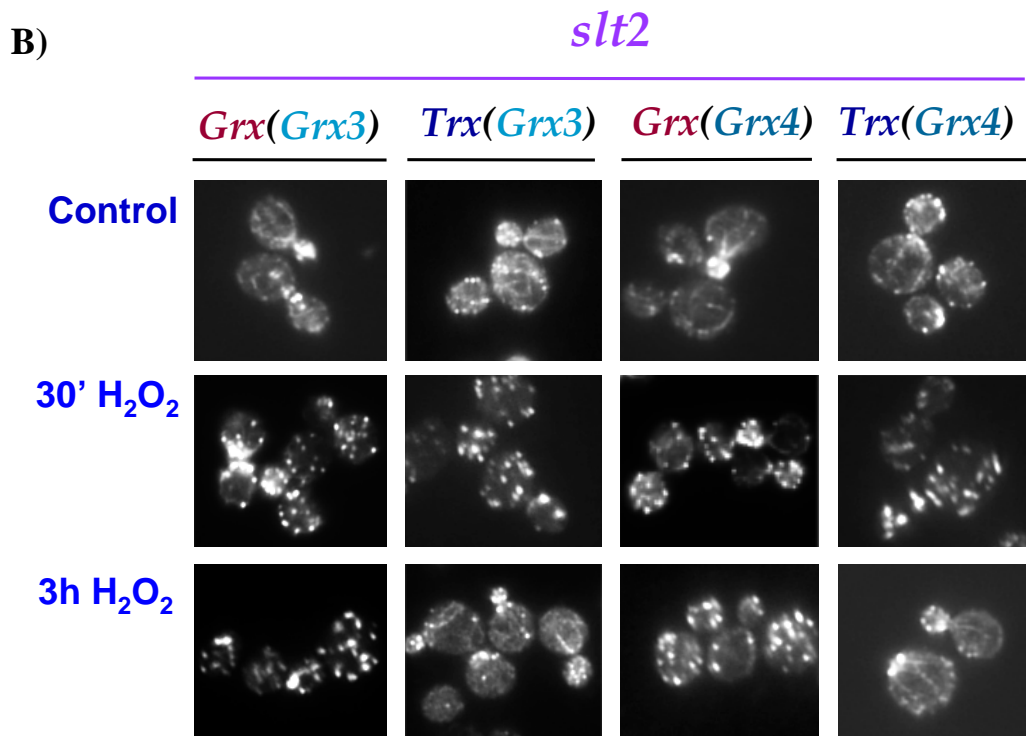
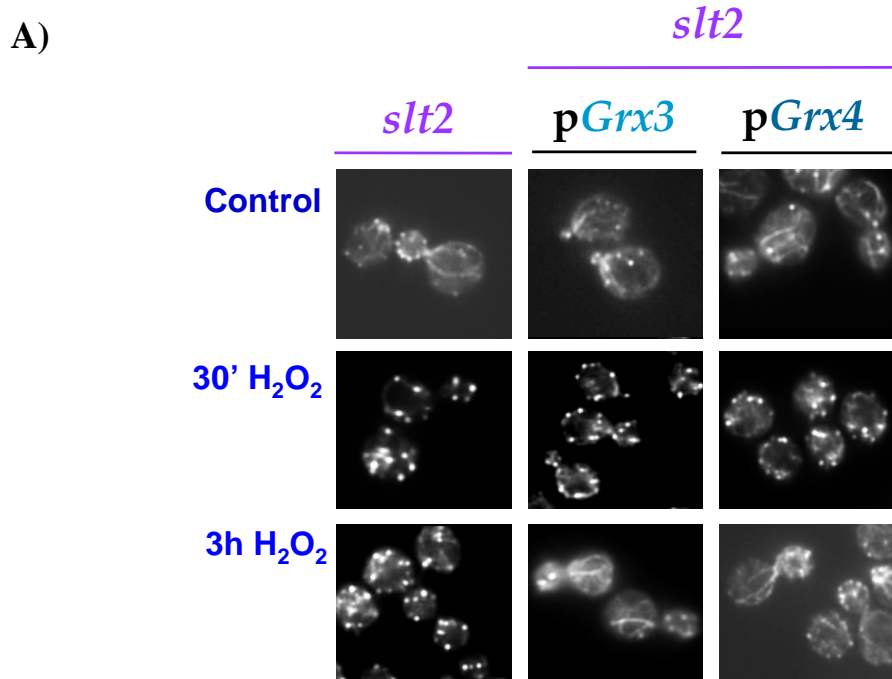
D'altra banda, l'absència simultànea de Grx3, Grx4 i Slt2 induïa una major despolarització del citoesquelet d'actina en condicions normals, contabilitzant un nombre de cèl.lules despolaritzades en el triple mutant *grx3grx4slt2* superior al detectat en el doble mutant *grx3grx4*. A més a més, com succeïa en els mutants *slt2* i *grx3grx4*, el citoesquelet d'actina continuava despolaritzat a les 3 hores de tractament amb el peróxid de hidrogen.

Aquests resultats ens van permetre realitzar les primeres caracteritzacions funcionals de Grx3, Grx4 i Slt2 en relació l'organització del citoesquelet d'actina:

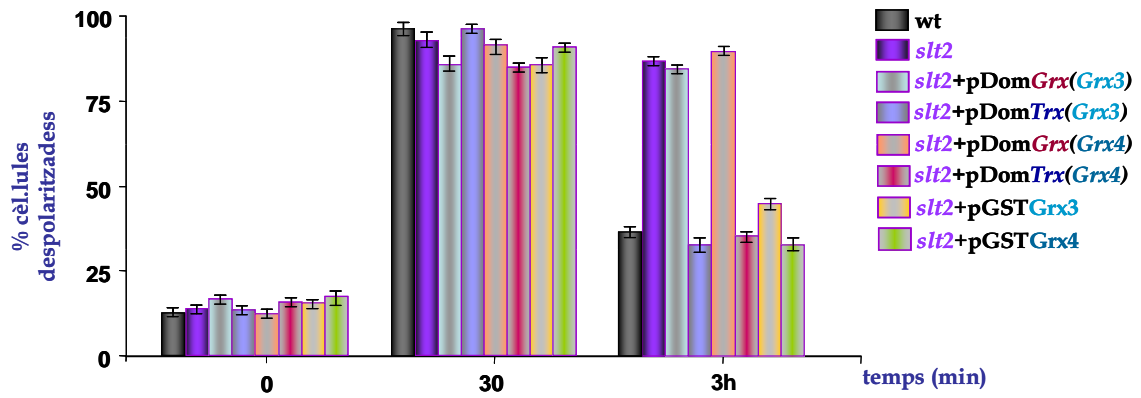
- Slt2 no participava en la polarització del citoesquelet d'actina en condicions normals. No obstant, Slt2 si era necessària en els mecanismes de repolarització del citoesquelet en resposta a estrès oxidatiu.
- L'absència simultània de Grx3, Grx4 i Slt2 presentava un efecte additiu sobre la polarització del citoesquelet d'actina tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu.

En els resultats obtinguts en l'apartat 14, demostravem que Grx3, Grx4 i els respectius dominis TRX participaven en els processos de polarització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.

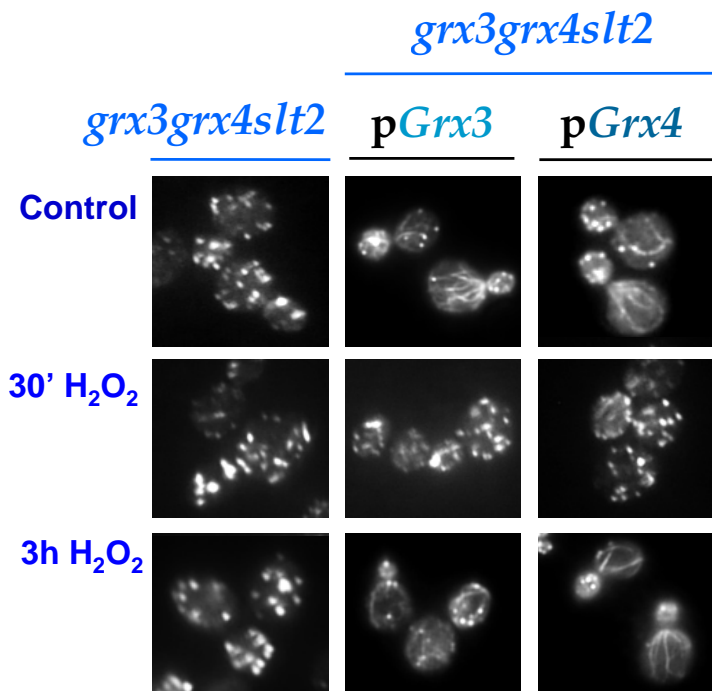
Amb l'objectiu de determinar si la funció que exercien Grx3 i Grx4 i els seus respectius dominis TRX sobre el citoesquelet d'actina era dependent de la via *PKC1*, vam analitzar l'efecte de les sobreexpressions de Grx3, Grx4 i la dels respectius dominis TRX i GRX sobre el citoesquelet d'actina en els mutants *slt2* i *grx3grx4slt2*.



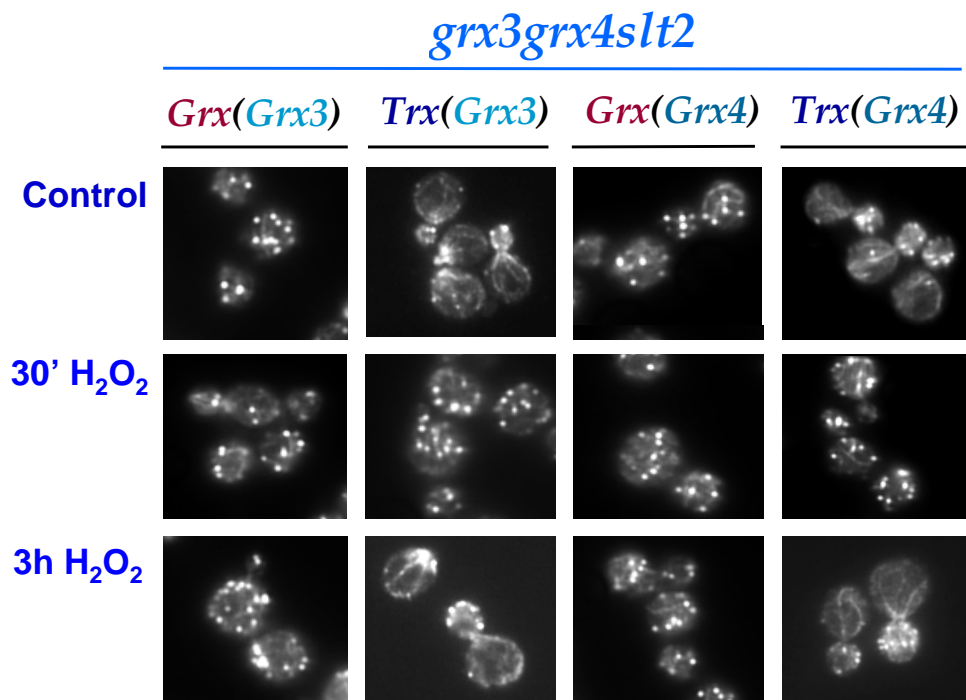
C)



D)



E)



F)

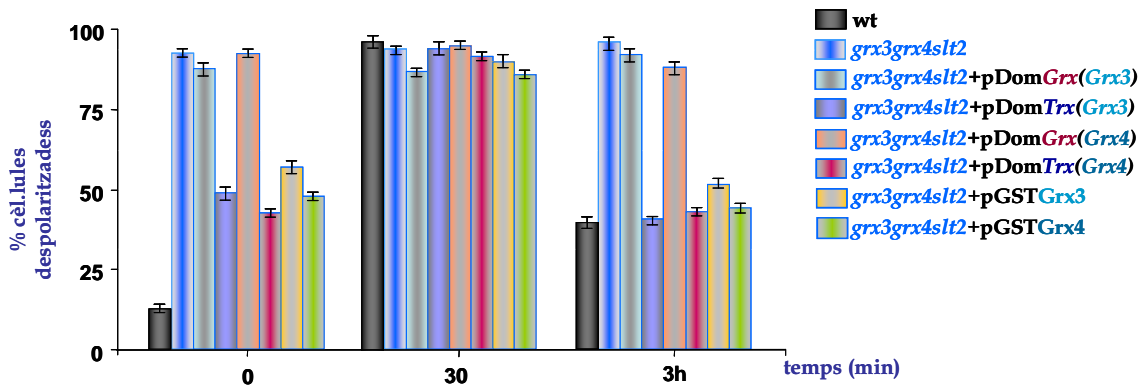
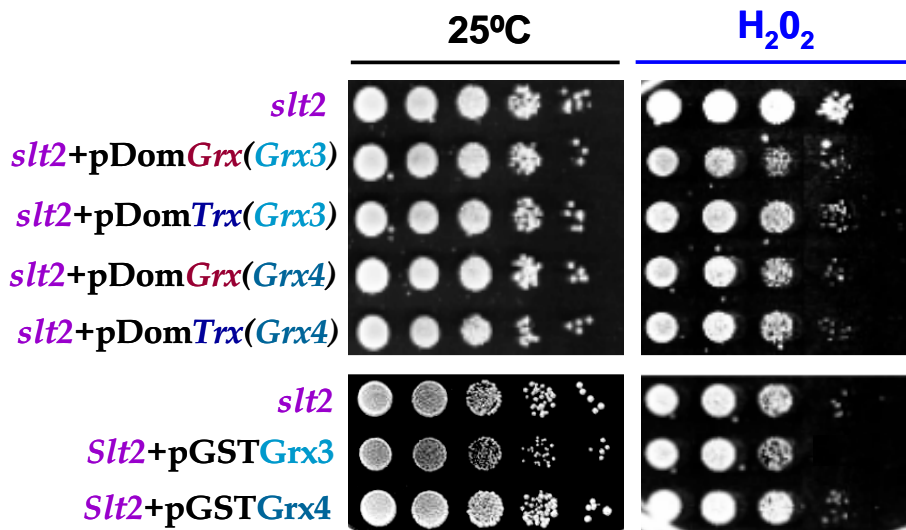


Figura 50- Grx3, Grx4 i els dominis *TRX* regulen la polarització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu independentment de l'activitat de *Slt2*. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser processades i analitzades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 43.

Com s'observa en la Figura 50, les sobreexpressions de Grx3, Grx4 i dels respectius dominis *TRX* restablen la polarització del citoesquelet d'actina del triple mutant *grx3grx4slt2* en condicions normals (Figures 50D, E i F). A més a més, també induïen la repolarització del citoesquelet d'actina en els mutants *slt2* i *grx3grx4slt2* en resposta a estrès oxidatiu (Figures 50A-F)

Finalment, per completar aquests anàlisis, les soques descrites prèviament van ser sotmeses a l'assaig de viabilitat cel.lular en resposta a peròxid d'hidrogen.

A)



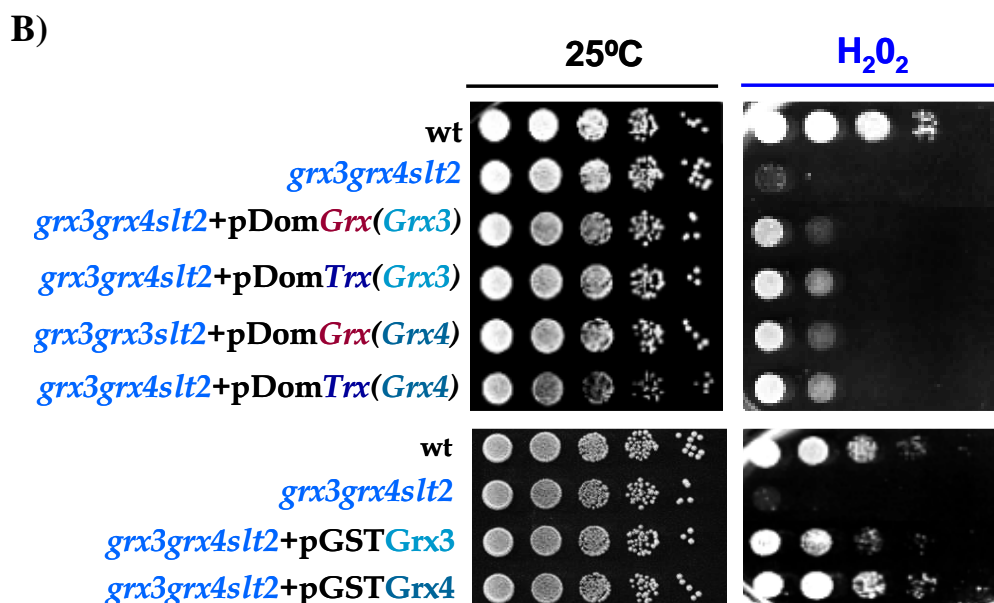


Figura 51- Assajos de viabilitat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu en els mutants *slt2* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant Grx3, Grx4 i els dominis *TRX*. Soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament, alíquotes de cada cultiu van ser recolectades per realitzar dilucions seriades que van ser replicades en plaques de medi mínim SD tractades amb 1mM de peròxid d'hidrogen. Les plaques van ser incubades a 30°C durant 3 dies.

Com es detalla en la Figura 51B, la sobreexpressió dels dominis *GRX* i *TRX* de Grx3 i Grx4 restablien parcialment la viabilitat cel.lular del triple mutant *grx3grx4slt2* en resposta a estrès oxidatiu. En aquest cas, la sobreexpressió dels dominis *GRX*, malgrat no restablir la polarització del citoesquelet d'actina, reduïen els nivells de ferro intracel.lular i com a conseqüència els nivells d'oxidació endògena present en el triple mutant *grx3grx4slt2* (com es demostrarà en el següent apartat). Aquest fet explicaria la viabilitat cel.lular detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant els dominis *GRX* en resposta a estrès oxidatiu.

A més a més, les sobreexpressions de Grx3 i Grx4 restablien la viabilitat cel.lular del triple mutant *grx3grx4slt2* en resposta a estrès oxidatiu als nivells de la soca salvatge. Aquest resultat podria explicar-se per la repolarització del citoesquelet d'actina (vegeu Figures 50D-F) més la reducció dels nivells d'oxidació endògena detectats en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant les proteïnes senceres Grx3 i Grx4 en resposta a estrès oxidatiu (vegeu el següent apartat).

En resum, aquests resultats ens van permetre concloure que Grx3 i Grx4 participaven en l'organització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu a través dels respectius dominis TRX, independentment de l'activitat de Slt2.

17-Anàlisi dels nivells d'oxidació intracel.lulars mitjançant l'assaig de detecció d'anions superòxid.

En l'apartat 9 vam demostrar, mitjançant l'assaig de detecció d'anions superòxid, que el doble mutant *grx3grx4* presentava una elevada oxidació endògena. A més a més, en l'apartat 7 vam mostrar que aquesta oxidació endògena causada per els elevats nivells de ferro intracel.lulars deguts a la hiperactivació d'Aft1 contribuïen parcialment als defectes en l'activació i en les funcions regulades per Slt2 en el doble mutant *grx3grx4*.

Per aquest motiu, l'objectiu d'aquest apartat de Resultats es determinar si els efectes sobre l'activació de Slt2, la viabilitat cel.lular i l'organització del citoesquelet d'actina detectats en diverses de les soques estudiades en aquest treball responien a canvis en els nivells d'oxidació intracel.lular.

Per duu a terme aquest estudi, van realitzar l'assaig de detecció de radicals superòxid intracel.lulars (O_2^-), com es detalla ampliament en l'apartat 9 de Resultats. Aquest assaig permet valorar de manera quantitativa els nivell d'oxidació endògena presents en els en les cèl.lules mitjançant l'agent dihidroetidi (DHE) (vegeu Materials i Mètodes, pàg.124).

Per confirmar que els elevats nivells de ferro intracel.lulars deguts a la hiperactivació d'Aft1 eren la causa de l'oxidació endògena que presentava el doble mutant *grx3grx4*, vam analitzar els nivells de radicals superòxid en les següents soques: soca salvatge i mutants *grx3grx4*, *aft1* i *grx3grx4aft1*.

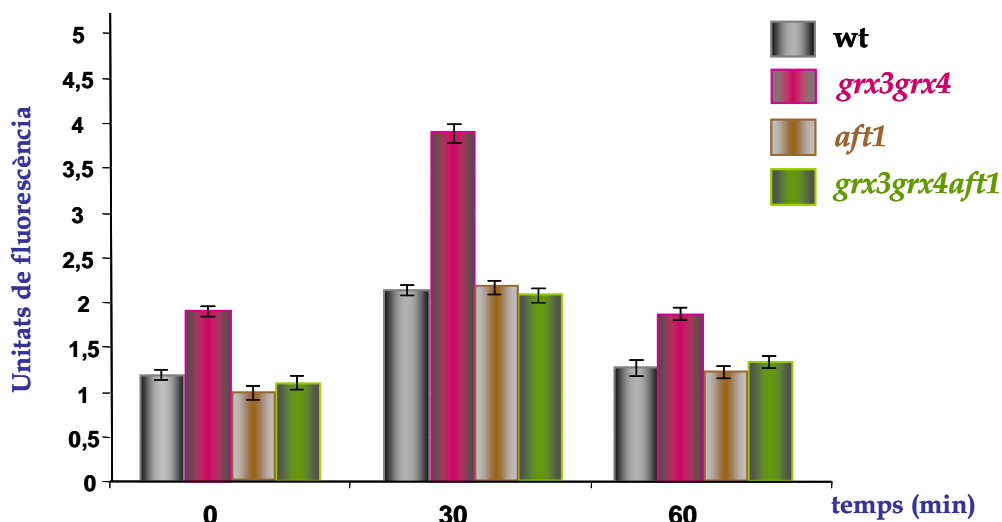


Figura 52- Assaig de detecció d'anions superòxid en els mutants *aft1* i *grx3grx4aft1*. Cultius de la soca salvatge i els mutants *aft1*, *grx3grx4* i *grx3grx4aft1* van ser crescudes en medi mínim SD fins arribar a una OD₆₀₀ de 0,5-0,6. Posteriorment van ser tractades amb peròxid d'hidrògen 1mM recolectant alíquotes després de 30 minuts i 1 hora de tractament amb l'agent oxidant. Les mostres van ser processades simultàniament per realitzar l'assaig de detecció d'anions superòxid amb dihidroetidi (DHE). La concentració final de DHE afegida en cadascuna de les mostres resuspeses en buffer PBS1x va ser de 5µg/ml. Els histogrames de barres representen en unitats de fluorescència la mitja de tres experiments realitzats independentment.

Com es detalla en la Figura 52, el doble mutant *grx3grx4* presentava majors nivells de radicals superòxid tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu, respecte als nivells detectats en la soca salvatge. No obstant, l'absència d'Aft1 en el doble mutant *grx3grx4* disminuïa significativament aquests nivells de radicals superòxid en ambdues condicions, restablint altre cop els nivells d'oxidació endògena presents en la soca salvatge.

Aquests resultats confirmaven que els elevats nivells de ferro intracel·lular com a conseqüència de la hiperactivació d'Aft1 deguda a l'absència simultània de Grx3 i Grx4 causaven oxidació intracel·lular.

Seguidament, vam caracteritzar els nivells de radicals superòxid en les següents soques: soca salvatge, mutants simples *grx3*, *grx4*, *slt2*, doble mutant *grx3grx4* i triple mutant *grx3grx4slt2*.

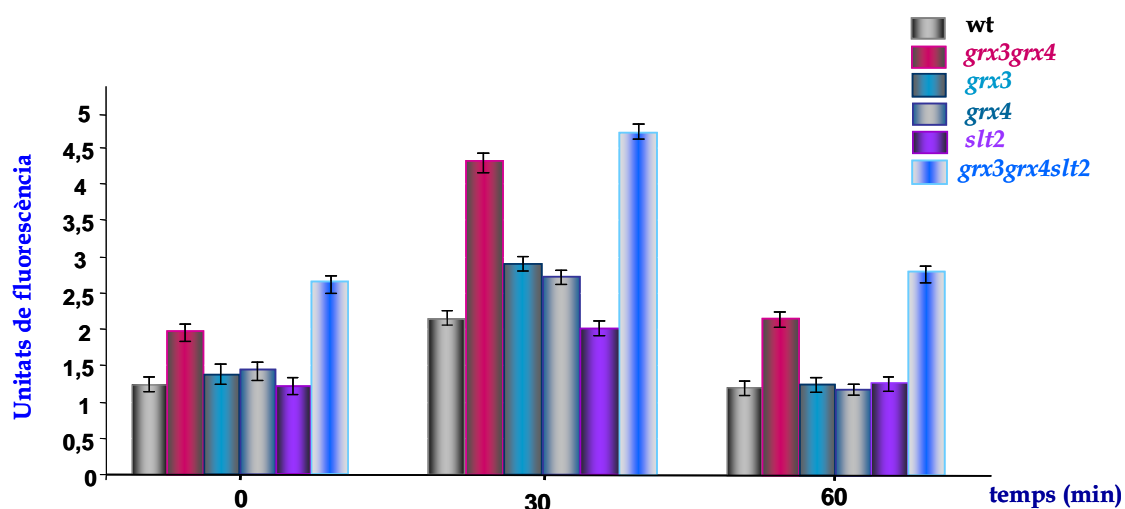


Figura 53- Assaig de detecció d'anions superòxid intracel.lular en els mutants *slt2* i *grx3grx4slt2*. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD fins arribar a una OD₆₀₀ de 0,5-0,6. Posteriorment van ser tractades amb peròxid d'hidrògen 1mM recolectant alíquotes després de 30 minuts i 1 hora de tractament amb l'agent oxidant. Les mostres van ser processades simultàneament per realitzar l'assaig de detecció d'anions superòxid. La concentració final de dihidroetidi (DHE) afegida en cadascuna de les mostres resuspeses en buffer PBS1x va ser de 5µg/ml. Els histogrames de barres representen en unitats de fluorescència la mitja de tres experiments realitzats independentment.

Com es mostra en la Figura 53, els mutants simples *grx3* i *grx4* presentaven uns nivells intracel.lulars de radicals superòxid similars als detectats en la soca salvatge, els quals eren incrementats amb l'absència simultània de Grx3 i Grx4, com es demostrava també en la Figura 52.

En canvi, mentre que l'absència de Slt2 no produïa cap efecte sobre els nivells d'oxidació endògena presents en la soca salvatge, el triple mutant *grx3grx4slt2* presentava un major increment en els nivells d'oxidació endògena tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu, respecte als nivells detectats en el doble mutant *grx3grx4* en ambdues condicions.

Els resultats obtinguts en l'apartat 3 van demostrar que la sobreexpressió de quinasa Slt2 o l'al.lel hiperactiu *BCK1-20* restablien parcialment l'activació de la via *PKC1* i la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu. A més a més, restauraven completament la polarització del citoesquelet d'actina en aquest mutant.

Per aquest motiu, vam analitzar si les sobreexpressions d'aquestes quinases de la via *PKC1* estaven induïnt canvis en els nivells d'oxidació intracel.lulars en el doble mutant *grx3grx4*.

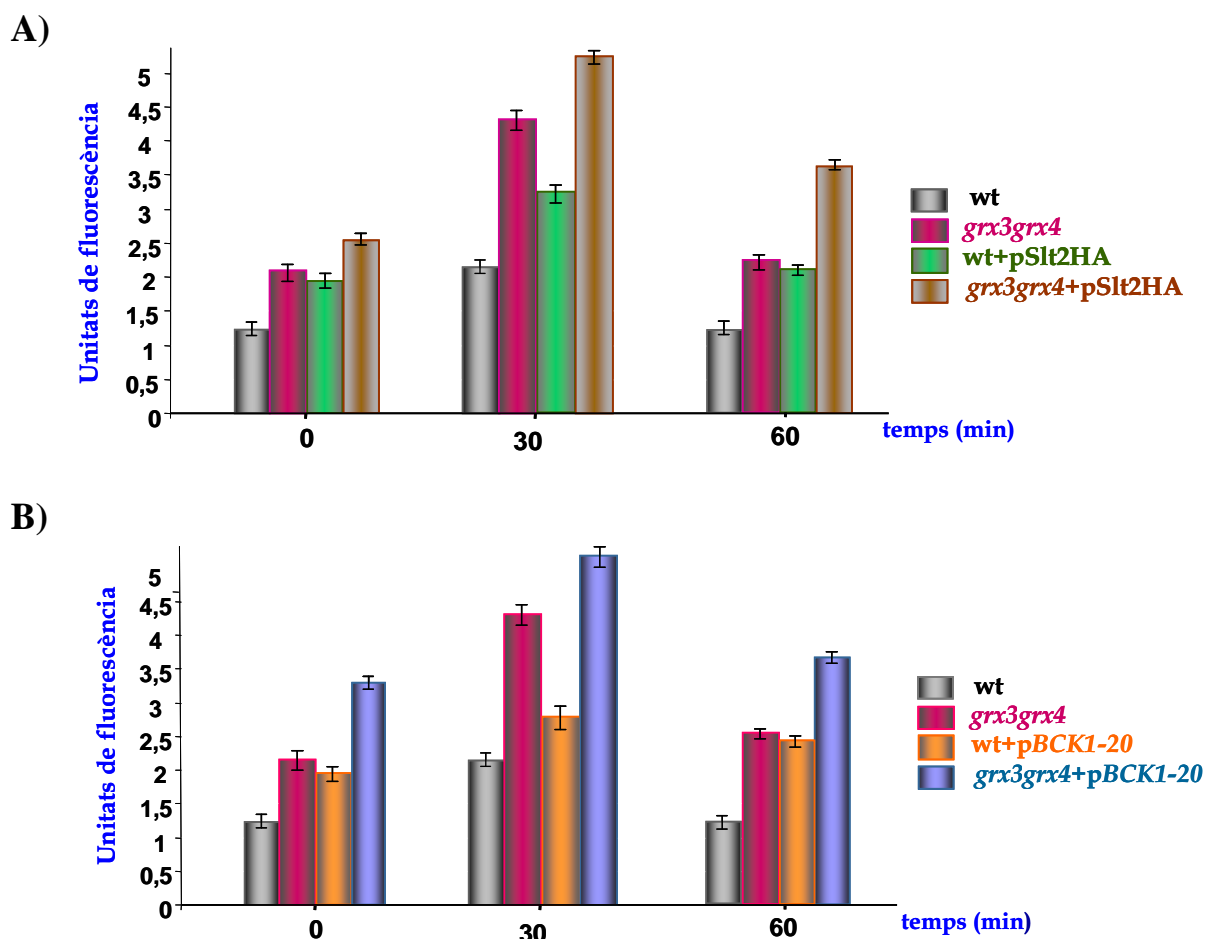


Figura 54- Assaig de detecció d'anions superòxid en soques sobreexpressant la proteïna Slt2 o amb l'al·lel hiperactiu *BCK1-20*. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser processades i analitzades sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 52. **(A)** Detecció de radicals superòxid sobreexpressant Slt2 en la soca salvatge i en el doble mutant *grx3grx4*. **(B)** Detecció de radicals superòxid en presència de l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* en la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4*.

Els resultats obtinguts representats en l'histograma de la Figura 54 mostraven que tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu, la sobreexpressió d'elements de la via *PKC1* com Slt2 (Figura 54A) o l'al·lel *BCK1-20* (Figura 54B), incrementaven significativament els nivells de radicals superòxid intracel·lulars tan en la soca salvatge com en el doble mutant *grx3grx4*.

Els nivells de radicals superòxid dels mutants *msg5*, *grx3msg5*, *grx4msg5* i *grx3grx4msg5*, també van ser analitzats:

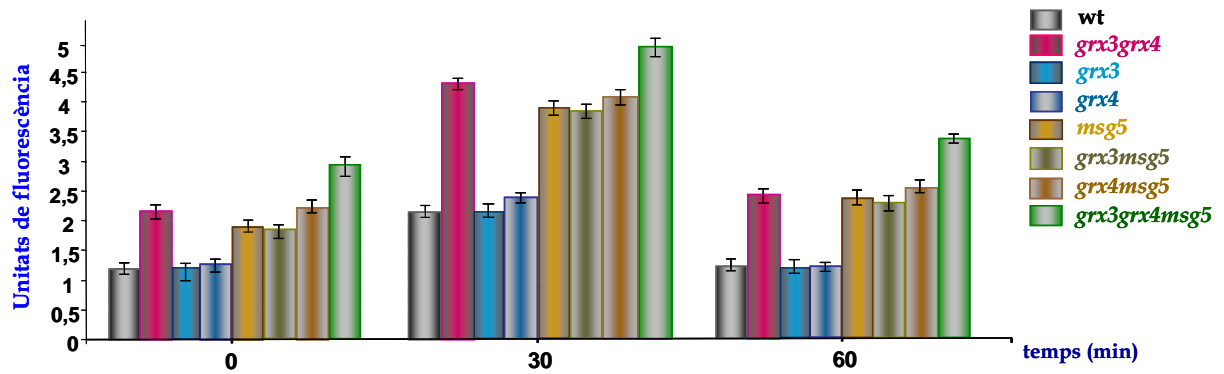


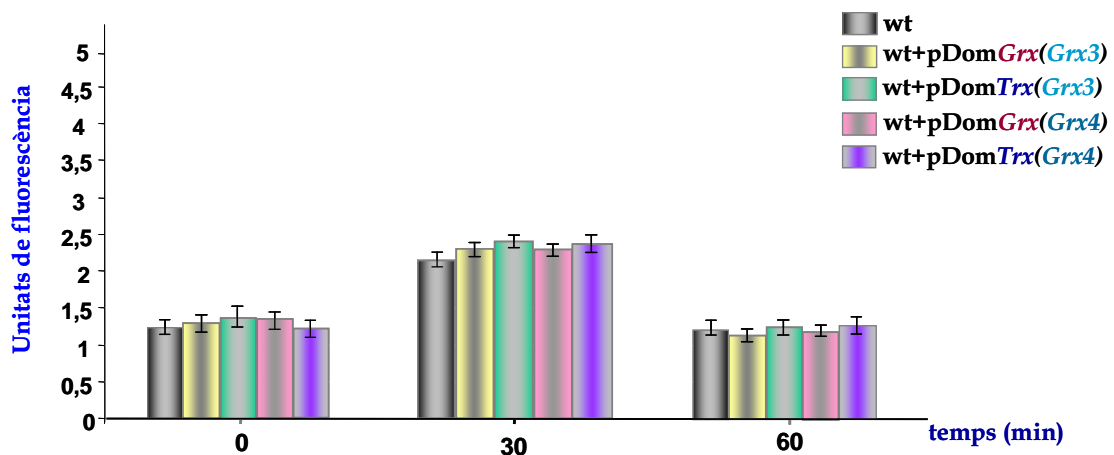
Figura 55- Assaig de detecció d'anions superòxid en soques mutades en la fostatasa *Msg5*. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser tractades i processades per detectar els nivells de radicals superòxid en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 52.

Com s'observa en l'histograma de la Figura 55, l'absència de *Msg5* en cadascuna de les soques analitzades induïa uns nivells basals de radicals superòxid més elevats que en les respectives soques control. Aquests elevats nivells d'oxidació endògena en condicions normals, podrien ser deguts als nivells basals d'activació de *Slr2* que presenten aquestes soques degut a l'absència de *Msg5* (vegeu Figura 25).

En resposta a estrès oxidatiu, els nivells de radicals superòxid incrementaven en totes les soques analitzades, restablint-se altre cop els nivells d'oxidació endògena detectats en condicions normals, després d'una hora de tractament amb el peròxid d'hidrogen.

Finalment, vam caracteritzar els nivells d'oxidació endògena en els mutants *grx4*, *grx3grx4* i triple mutant *grx3grx4slr2* sobreexpressant els dominis *GRX* i *TRX*.

A)



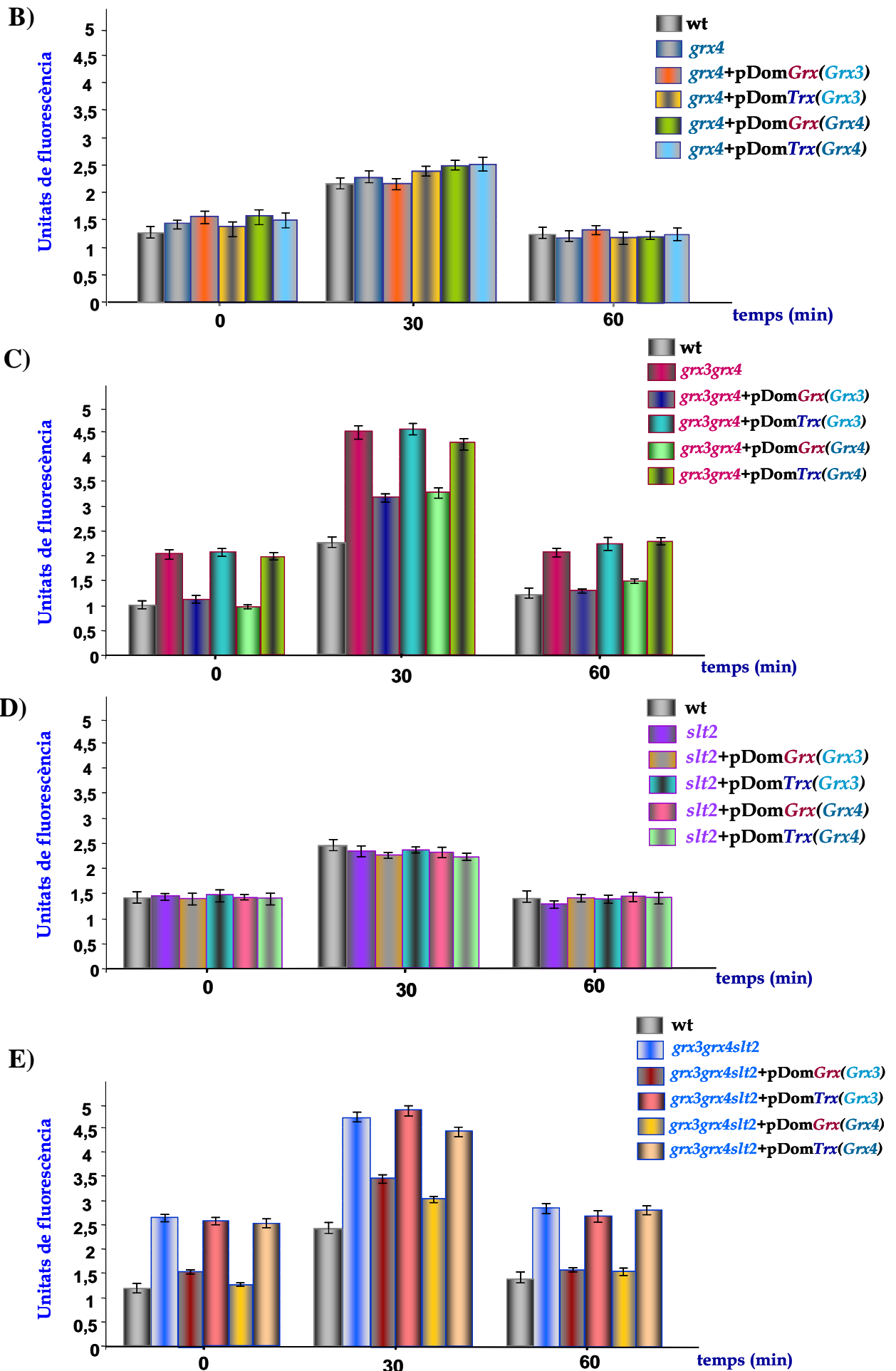


Figura 56- Detecció dels nivells de radical superòxid en els mutants *grx4*, *grx3grx4*, *slt2* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant els dominis *TRX* i *GRX* de *Grx3* i *Grx4*. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser tractades i processades per detectar els nivells de radicals superòxid en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 52. **(A)** Detecció de radicals superòxid sobreexpressant els dominis *TRX* i *GRX* en la soca salvatge. **(B)** en el mutant simple *grx4*. **(C)** en el doble mutant *grx3grx4*. **(D)** en el mutant simple *slt2* **(E)** i en el triple mutant *grx3grx4slt2*.

Com es detallen en cadascun dels histogrames representats en la Figura 56, la sobreexpressió dels dominis *TRX* tan en condicions normals com en resposta a estrès oxidatiu no alteraven els nivells de radicals superòxid de les respectives soques control.

En canvi, els dominis *GRX* reduïen els elevats nivells d'oxidació endògena presents en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*, fet consistent amb les dades publicades en Pujol *et al.*, (2006) on demostrem que els dominis *GRX* participen en la exportació d'Aft1, reduint-se els nivells de ferro intracel.lular causants de l'estrès oxidatiu endògen en absència de *Grx3* i *Grx4*.

En resum, dels resultats obtingudes mitjançant els anàlisis dels nivells d'anions superòxid intracel.lulars vam poguer extreure les següents conclusions:

- En condicions normals, l'absència de *Slt2* incrementava l'oxidació endògena present en el doble mutant *grx3grx4*.
- L'augment dels nivells basals de fosforilació de *Slt2*, degut a l'absència de *Msg5*, induïrien un increment en els nivells basals d'oxidació endògena.
- Mentre que els dominis *TRX* de *Grx3* i *Grx4* no provocaven canvis en els nivells d'oxidació intracel.lular dels mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*, l'exportació nuclear d'Aft1 per part dels dominis *GRX* disminuïen l'oxidació endògena present en aquests mutants.

-La sobreexpressió de *Slt2* o la hiperactivació de la via *PKC1* amb l'al.lel *BKC1-20* incrementaven la quantitat de radicals superòxid intracel.lulars en la soca salvatge i en el doble mutant *grx3grx4*. No obstant, en aquestes condicions d'elevada oxidació endògena, la fosforilació de *Slt2*, la viabilitat cel.lular i la organització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu eren restablerts en la soca salvatge i parcialment restablerts en el doble mutant *grx3grx4* (vegeu apartat 3 de Resultats).

Aquestes dades mostraven que en unes condicions d'estrès oxidatiu endògen, degudes a l'acumulació d'ions superòxid intracel.lulars, la cèl.lula era capaç de sobreviure sense ser detoxificada d'aquests radicals lliures, sempre i quan la via *PKC1* fos activada.

18- Grx3, Grx4 i Slt2 participen en la biogènesi vacuolar.

Els processos de secreció i d'endocitosi dins la cèl.lula són mecanismes bàsics per permetre el tràfic de molècules entre els diferents compartiments intracel.lulars, on la vacuola juga un paper clau com a orgànul que forma part d'aquestes vies de tràfic vesicular (Clemens *et al.*, 2008).

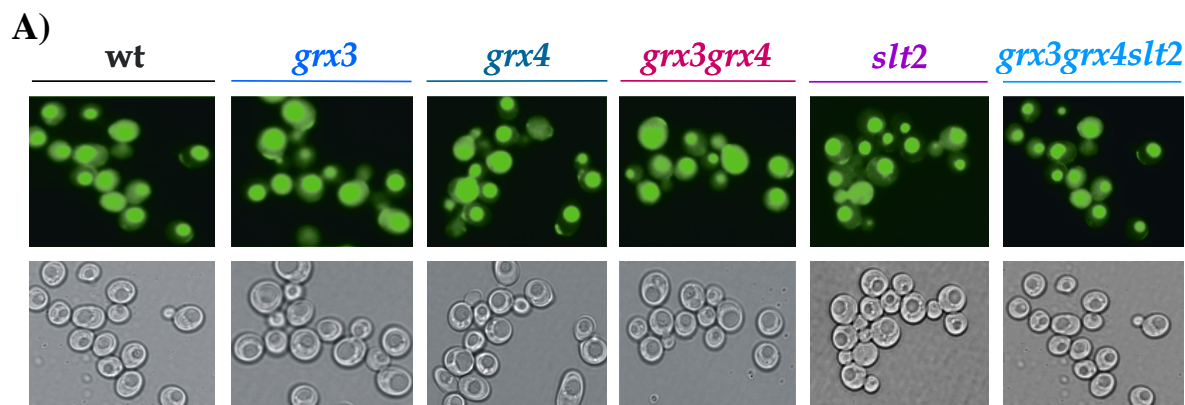
Corson *et al.*, (1999) van descriure que el mutant *sod1* presentaven fragmentació vacuolar degut a l'estrès oxidatiu endògen causat per l'acumulació de radicals superòxid.

D'acord amb aquests antecedents i amb els elevats nivells de radicals superòxid i en conseqüència d'estrès oxidatiu endògen presents en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*, els experiments detallats en aquests últims apartats de Resultats tenen com objectiu analitzar si existia una possible relació funcional entre Grx3, Grx4 i Slt2 i els processos implicats en la biogènesi vacuolar.

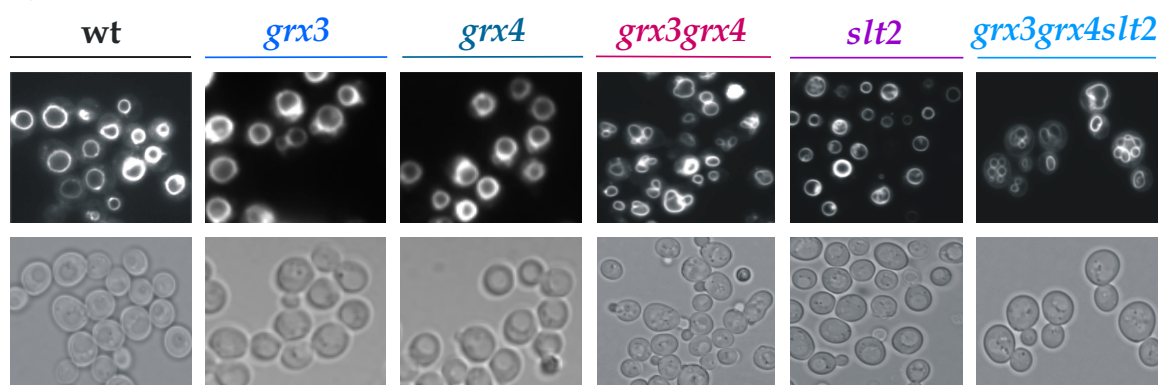
Per iniciar aquest estudi i determinar en condicions normals, possibles defectes en la biogènesi vacuolar en els mutants *grx3*, *grx4*, *slt2*, *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*, vam utilitzar de dos colorants d'ús habitual en els estudis d'endocitosi en *S. cerevisiae*: FM4-64 i Lucifer Yellow.

L'agent FM4-64 és un colorant lipofílic que es fixa i tenyeix la membrana de la vacuola per observar la seva morfologia i dinàmica (Vida i Erm, 1995).

El colorant Lucifer Yellow s'utilitza per detectar en la cèl.lula problemes en la fase fluida de l'endocitosi. Problemes en la correcta internalització de vesícules en la vacuola, es veuen reflexats amb defectes en la correcta internalització i acumulació del colorant Lucifer Yellow dins d'aquesta (Dulic *et al.*, 1991).



B)



C)

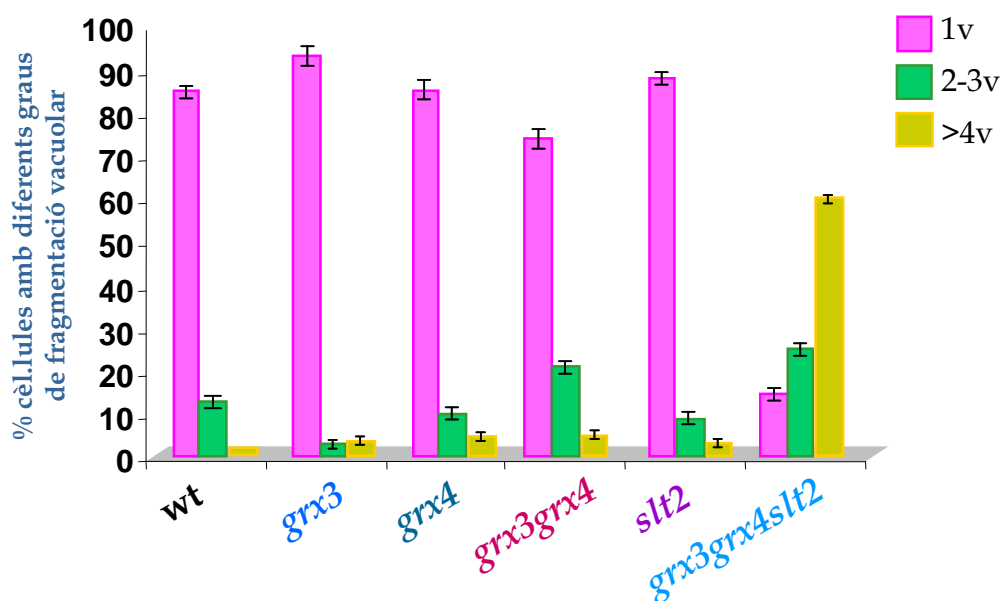


Figura 57- Estudis d'endocitosis i de la morfologia vacuolar mitjançant Lucifer Yellow i FM4-46. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a una OD₆₀₀ de 0,5-0,6. Alíquotes de cada cultiu van ser processades segons els protocols de Tinció amb Lucifer Yellow (A) i de Tinció amb FM4-64 (B) (vegeu Materials i Mètodes, pàg.123 i 124) Seguidament les mostres van ser visualitzades *in vivo* en el microscopi òptic de fluorescència (C) Els histogrames representen en % la població cel.lular de cada soca analitzada, classificada en tres grups segons el nombre de vacuoles presents en cada cèl.lula: 1v (cèl.lules que presenten una sola vacuola), 2-3v (cèl.lules que presenten 2 o 3 vacuoles) i >4v (cèl.lules que presenten 4 o més vacuoles). Els valors representen la mitja de tres experiments diferents.

Com es detalla en la Figura 57A, totes les soques analitzades presentaven una correcta internalització del colorant Lucifer Yellow dins de la vacuola. Aquests resultats mostraven que l'absència de Grx3, de Grx4 o de Slt2 no afectaven a la fase fluida dels processos endocítics.

No obstant, la tinció de la membrana vacuolar amb el colorant FM4-64 (Figura 57B) ens va revelar problemes en la morfologia vacuolar dels mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*:

La vacuola del doble mutant *grx3grx4* presentava una membrana de contorn arrugat respecte a la membrana vacuolar de contorn homogeni i uniforme observada en la soca salvatge.

D'altra banda, mentre que el mutant *slt2* no presentava problemes en la seva morfologia vacuolar, com succeïa en els mutants simples *grx3* i *grx4*, el triple mutant *grx3grx4slt2* presentava una clara fragmentació vacuolar, amb la presència de nombroses vacuoles, molt més petites però de contorn homogeni, com es detalla en els histogrames de la Figura 57C.

Aquests primers resultats ens indicaven que l'absència de Grx3 i Grx4 induïa defectes morfològics en la vacuola, mentre que l'absència simultànea de Grx3, Grx4 i Slt2 provocava fragmentació vacuolar.

Corson *et al.*, (1999) van descriure que l'acumulació de radicals superòxid en el mutant *sod1* induïria l'oxidació de proteïnes amb clusters Fe/S, alliberant grans quantitats de ferro dins la cèl.lula. Aquest ferro, en reaccionar amb el peròxid de hidrogen, generava via reacció de Fenton més espècies reactives d'oxigen com els radicals hidroxil (OH \cdot), que acaben danyant la vacuola induïnt fragmentació vacuolar.

Per analitzar si els defectes en les morfologies vacuolars detectats en els mutant *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* eren deguts als elevats nivells d'oxidació endògena, vam realitzar tres aproximacions:

1- Anàlisi de la morfologia vacuolar dels mutants *aft1* i *grx3grx4aft1*. Aquestes soques presenten nivells de ferro intracel.lular més baixos (Pujol *et al.*, 2006) i com a conseqüència menors nivells d'oxidació endògena (vegeu Figura 52).

2- Tractament amb el quelant de ferro, Ferrocina. La presència d'aquest agent químic redueix els nivells de ferro intracel.lular, recreant unes condicions d'oxidació endògena més baixes (Pujol *et al.*, 2006).

3- Tractament amb Mn⁺². Lapinskas *et al.*, (1995) van determinar que el mutant *pmr1*, mutant en una ATPasa de tipus B del aparell de Golgi, provocava un acumulació de manganés en el citosol el qual era capaç de capturar els radicals superòxid (O₂ \cdot^-) i reduir els

nivells d'oxidació endògena intracel.lular. Corson *et al*, (1999) també van demostrar que la presència de Mn^{+2} en el medi revertia la fragmentació vacuolar del mutant *sod1*.

1- En primer lloc, es va realitzar l'anàlisi *in vivo* de la morfologia vacuolar dels mutant *aft1* i *grx3grx4aft1* mitjançant l'assaig amb el colorant FM4-64.

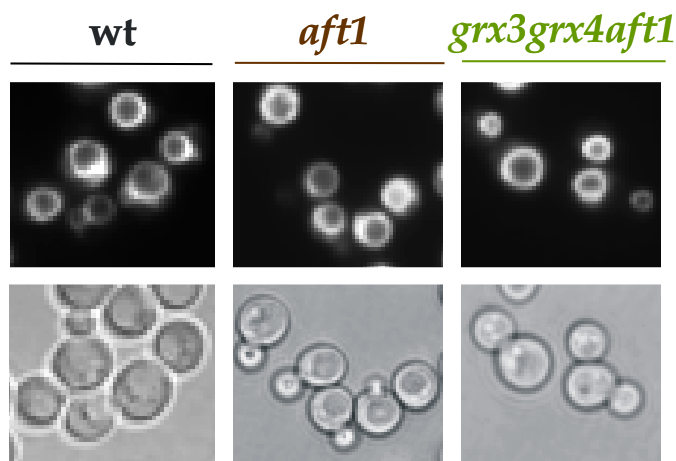


Figura 58- Estudi de la morfologia vacuolar dels mutants *aft1* i *grx3grx4aft1*. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes i tractades amb el colorant FM4-64 sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 57B.

1-Com es detalla en la Figura 58, els mutants *aft1* i *grx3grx4aft1*, no presentaven defectes en la morfologia vacuolar, observant un nombre de vacuoles per cèl.lula amb una morfologia vacuolar similars a les detectades en la soca salvatge. En aquestes condicions, els nivells de radicals superòxid en els mutants *aft1* i *grx3grx4aft1* eren més baixos que els nivells detectats en el doble mutant *grx3grx4* (vegeu Figura 52).

Aquest fet suggeria que l'estrès oxidatiu endògen degut a l'augment dels nivells de ferro intracel.lular causats per la hiperactivació d'Aft1 en absència simultània de Grx3 i Grx4, probablement era la causa de la morfologia vacuolar aberrant present en el doble mutant *grx3grx4*. Per demostrar-ho, el següent estudi va ser determinar la morfologia vacuolar dels mutant *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* en presència del quelant de ferro Ferrocina.

Cultius de la soca salvatge i dels mutants *slt2*, *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* van ser tractats durant 6 hores amb el quelant de ferro segons es detalla en la Figura 59.

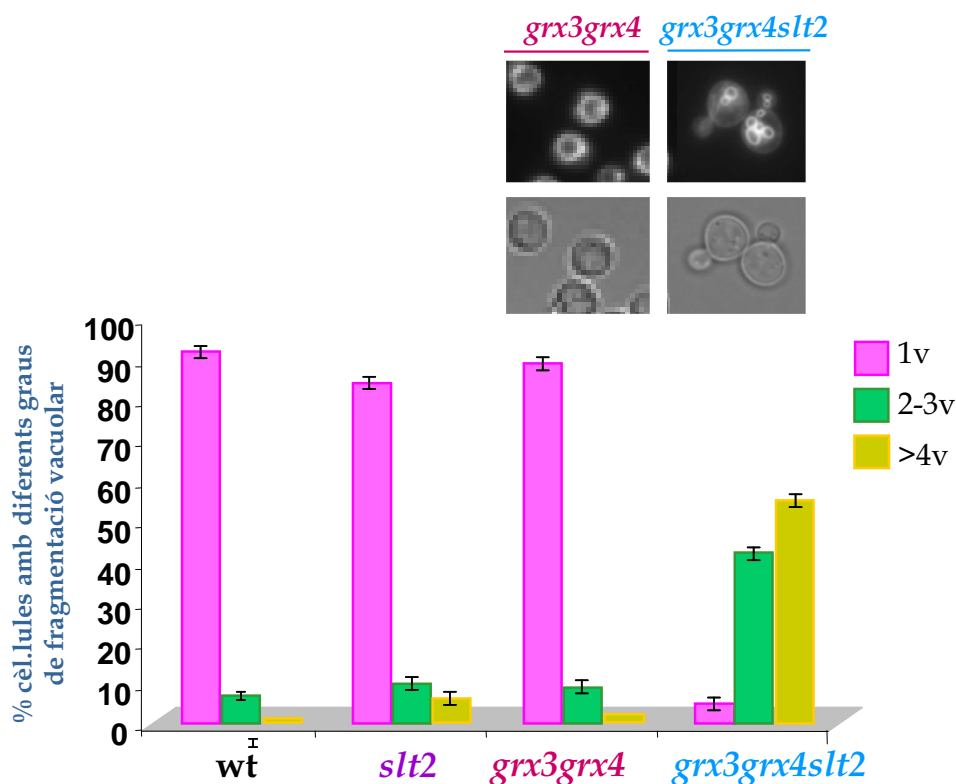


Figura 59- Estudi de la morfologia vacuolar en presència del quelant de ferro intracel.lular **Ferrocina**. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament els cultius van ser tractats amb 2mM de Ferrocina durant 6 hores. Acabat el tractament amb Ferrocina es van recolectar mostres que van ser ser processades i analitzades segons el protocol de tinció amb FM4-46.

2-Com s'observa en la Figura 59, la presència de Ferrocina en el medi restaurava la morfologia vacuolar present en el doble mutant *grx3grx4*, observant una vacuola similar a la de la soca salvatge i el triple mutant *grx3grx4aft1* (vegeu Figura 58). Aquestes dades eren consistents amb el fet que la Ferrocina reduïa els nivells de ferro intracel.lulars i per tant, recreava una situació de baixos nivells d'oxidació endògena.

D'altra banda, la reducció dels nivells de ferro intracel.lular no restablien la morfologia vacuolar del triple mutant *grx3grx4slt2*, contabilitzant un 55% de cèl.lules amb la de vacuola fragmentada (>4 vacuoles) respecte al 60% detectat en el triple mutant *grx3grx4slt2*.

3-Finalment, es va procedir a realitzar una tercera aproximació mitjançant la addició de ions Mn^{+2} en el medi de cultiu. Cultius de les soques descrites en la Figura 60 van ser crescudes en fase exponencial i seguidament exposades durant 2 hores a l'agent químic $MnSO_4$. En aquest cas, l'estudi es va completar amb l'assaig de detecció d'anions superòxid

per confirmar, que en les nostres condicions experimentals, els ions Mn^{2+} estaven disminuint els nivells de radicals superòxid (Archibald *et al.*, 1981, Chang *et al.*, 1989).

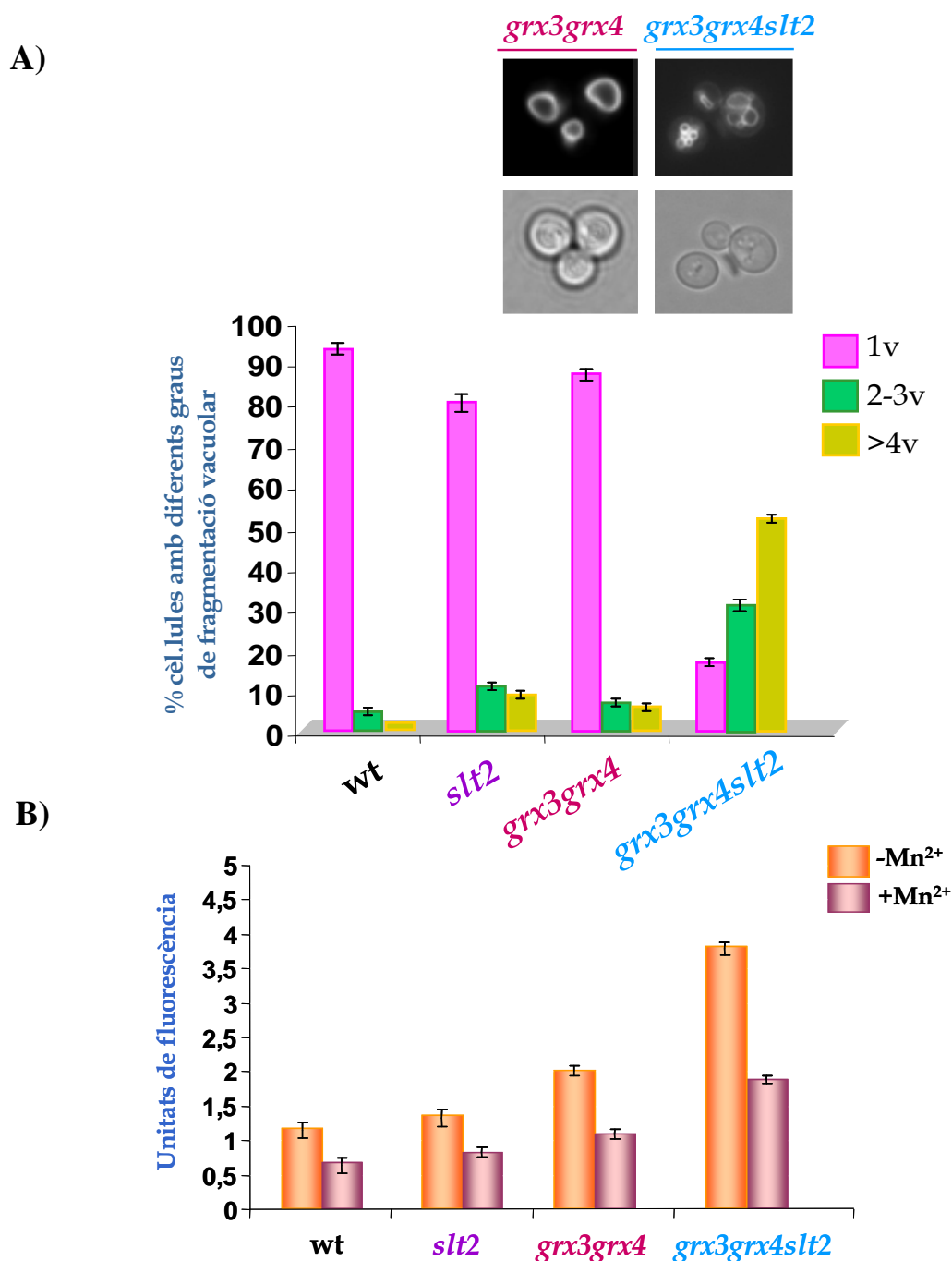


Figura 60- Estudi de la morfologia vacuolar i detecció d'anions superòxid en presència de $MnSO_4$. Cultius de les soques descrites en la Figura van créscudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Seguidament els cultius van ser tractats durant 2 hores amb 2mM de $MnSO_4$. Finalitzat el tractament, alíquotes de cada mostra van ser processades per determinar l'estructura morfològica de la vacuola **(A)** i paral·lelament realitzar l'assaig de detecció d'anions superòxid **(B)**.

Com s'observa en la Figura 60B, la disminució dels nivells de radicals superòxid intracel·lulars en presència de ions Mn^{+2} restablia completament la morfologia vacuolar del doble mutant *grx3grx4* (Figura 60A).

En canvi, la presència de ions Mn^{+2} tampoc restablia la morfologia vacuolar detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2*, obtenint un 52% de cèl·lules amb la vacuola fragmentada, valors similars als detectats en el triple mutant *grx3grx4slt2* en condicions normals (60%) i pràcticament iguals als valors obtinguts en presència de Ferrocina en el medi (55%)

En resum, aquests resultats ens van permetre obtenir les següents conclusions:

- La morfologia vacuolar aberrant del doble mutant *grx3grx4* era deguda a l'estrès oxidatiu endògen causat pels elevats nivells de ferro intracel·lular deguts a la hiperactivació d'Aft1
- La fragmentació vacuolar del triple mutant *grx3grx4slt2*, no era deguda ni als elevats nivells de ferro, ni als elevats nivells de radicals superòxid intracel·lulars. Les nostres dades més bé suggerien, que la causa de la fragmentació vacuolar era una funció comuna regulada conjuntament per Grx3, Grx4 i Slt2.

19- Caracterització de les funcions vacuolar en absència de Grx3, Grx4 i Slt2.

La fragmentació vacuolar detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2* recordava als mutants *vpt* (*vpt: vacuole protein targeting*), descrites per Banta *et al.*, (1988). Anys més tard, Raymond *et al.*, (1992) van determinar que els mutants *vps* de classe B (*vps: vacuole protein sorting*) també secretaven elevats nivells de Carboxipeptidasa Y madura (CPY).

La CPY és una glicoproteïna soluble que forma part del enzims hidrolítics localitzats dins la vacuola. La CPY es sintetitzada en reticle endoplasmàtic, es glicosilada en l'aparell de Golgi i finalment es processada en la seva forma madura i activa dins de la vacuola. Problemes en el tràfic i la maduració d'aquestes proteïnes vacuolars revelen defectes en les vies de secreció (Klionsky *et al.*, 1988).

D'acord amb aquests antecedents vam realitzar un primer anàlisi de la maduració de la carboxipeptidasa Y (CPY) per detectar possibles problemes en els processos de secreció relacionats amb la biogènesi vacuolar en el triple mutant *grx3grx4slt2*.

La forma vacuolar de CPY és la forma madura (M) de major mobilitat electroforètica i presenta un pes molecular de 61 KDa. La presència en l'aparell de Golgi de les formes immadures o no processades de la CPY presenten un pes molecular de 67-69 KDa i s'observen mitjançant un retard en la migració electroforètica. La presència de les formes immadures de la proteïna CPY és un indicatiu de problemes en els primers estadis de les vies de secreció (Klionsky *et al.*, 1988).

Cultius de la soca salvatge i els mutants *grx3grx4*, *slt2* i *grx3grx4slt2*, van ser crescudes en medi mínim SD fins arribar a fase exponencial per determinar les diferents formes electroforètiques de la proteïna vacuolar CPY. Els mutant *aft1* i *grx3grx4aft1* també van ser inclosos en aquest estudi per determinar si els elevats nivells de ferro intracel.lular causaven defectes en les vies de secreció.

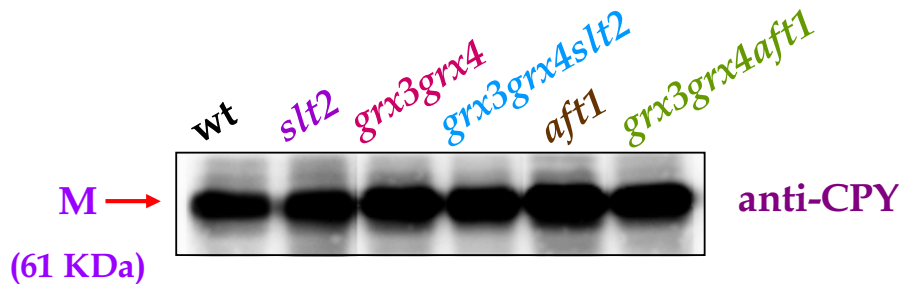


Figura 61- Anàlisi de la maduració de la carboxipeptidasa Y. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a fase exponencial. Extractes proteïcs obtinguts de cada soca van ser analitzats mitjançant Western blot per detectar les diferents formes de maduració de la Carboxipeptidase Y (CPY). La banda obtinguda correspon a la forma madura vacuolar de pes molecular 61KDa. Les condicions d'ús del anticòs monoclonal anti-CPY es troben detallades en Materials i Mètodes, pàg.121).

Com es detalla en la Figura 61, totes les soques analitzades presentaven nivells de CPY vacuolar madura (M) similars als nivells detectats en la soca salvatge.

Aquests resultats descartaven defectes en les vies secretores com a causa de la fragmentació vacuolar en el triple mutant *grx3grx4slt2*. A més a més, els nivells de CPY detectats en els mutants *aft1* i *grx3grx4aft1* demostraven que els elevats nivells de ferro intracel.lular i d'oxidació endògena, causants de la morfologia vacuolar aberrant en el doble mutant *grx3grx4*, no afectant a les vies de secreció.

Defectes en la morfologia vacuolar també afecten directament a les funcions vacuolars relacionades amb l'emmagatzemament de nutrients, l'homeòstasi del pH o la captura de metalls potencialment tòxics com els cations de Zinc.

La vacuola es responsable de l'emmagatzemament de metabòlits que serveixen com a reserva de nitrogen i fosfat en condicions extremes (Klionsky *et al.*, 1999). En condicions de dèficit de nutrients, com succeeix durant l'entrada a fase estacionaria, les hidrolases vacuolars s'encarreguen de reciclar, emmagatzemar i aportar els nutrients necessaris per fer front a aquesta situació (Achstetter, *et al.*, 1985 ; Teichert *et al.*, 1989).

Corson *et al.*, (1999) van suggerir que la disminució de la supervivència cel·lular del mutant *sod1* en condicions de dèficit de nitrogen, fosfat i aminoàcids era deguda a que una vacuola fragmentada no proporcionava reserves adequades per afrontar dites situacions.

Amb l'objectiu d'analitzar com estava afectada la funció vacuolar d'emmagatzematge de nutrients en el triple mutant *grx3grx4slt2*, cultius de la soca salvatge i dels mutants *grx3grx4*, *slt2*, *grx3grx4slt2*, *aft1* i *grx3grx4aft1* van ser crescudes en medi mínim d'esperulació per recrear unes condicions de dèficit de nutrients.

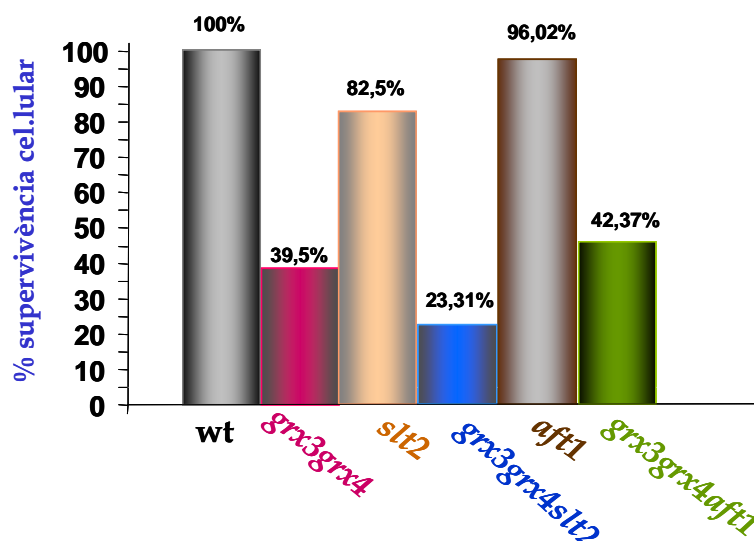


Figura 62- Estudi de la funció vacuolar relacionada amb l'emmagatzemament de nutrients.

Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C. Seguidament, 10^8 cèl.lules van ser rentades tres cops amb medi fresc d'esperulació i posteriorment transferides en el mateix medi de cultiu. Després del creixement en aquest medi d'esperulació durant 7 dies a 25°C, 500 cèl.lules de cada cultiu van ser plaquejades en plaques de medi ric YPD. Les plaques, realitzades per triplicat, es van deixar créixer durant 2-3 dies a 30°C. El nombre de colònies crescudes d'un total de 500 cèl.lules plaquejades van ser utilitzades com a mesura de supervivència cel·lular. L'histograma representa en % la supervivència cel·lular obtinguda com a mitja del nombre de colònies contabilitzades en les tres plaques.

Com s'observa en la Figura 62, el doble mutant *grx3grx4* presentava un 39,5% de viabilitat cel.lular en condicions de déficit de nutrients respecte al 100% detectat la soca salvatge. No obstant, el triple mutant *grx3grx4aft1* presentava un 42,3% de viabilitat cel.lular, percentatge similar al detectat en el doble mutant *grx3grx4*.

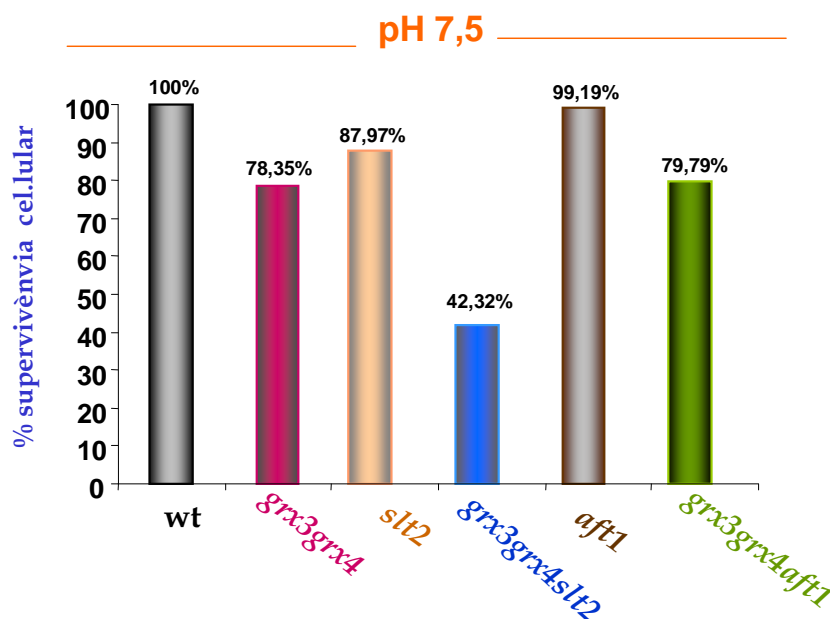
Aquestes dades mostraven que la morfologia vacuolar aberrant del doble mutant *grx3grx4* causada pels elevats nivells de ferro intracel.lular deguts a la hiperactivació d'Aft1, no afectaven a la funció vacuolar d'emmagatzemament de nutrients en el doble mutant *grx3grx4*.

D'altra banda, el triple mutant *grx3grx4slt2* presentava tan sols un 23% de viabilitat cel.lular, demostrant que la fragmentació vacuolar deguda a l'absència simultània de Grx3, Grx4 i Slt2, tenia efecte més greus en les funcions regulades per la vacuola.

L'homeostàsi del pH es un altre dels mecanismes ampliament regulats per la vacuola. Corson *et al*, (1999) van determinar que el mutant *sod1* presentava problemes en la regulació dels $[H^+]$ citosòlics quan aquests eren extremadament alts o baixos, suggerint que les sensibilitats cel.lulars del mutant *sod1* a canvis en els $[H^+]$ extracel.lulars eren degudes a que la fragmentació de la vacuola era incapaç de mantenir correctament l'equilibri en el pH intracel.lular davant aquests canvis.

Com es detalla en la Figura 63, cultius de la soca salvatge i dels mutants *grx3grx4*, *slt2*, *grx3grx4slt2*, *aft1* i *grx3grx4aft1* van ser crescudes en medi mínim SD a diferents pHs: pH bàsic de 7,5 i pH àcid de 2,5 amb l'objectiu de determinar com es veia afectada la funció vacuolar relacionada amb la regulació de l'homeòstasi del ferro.

A)



B)

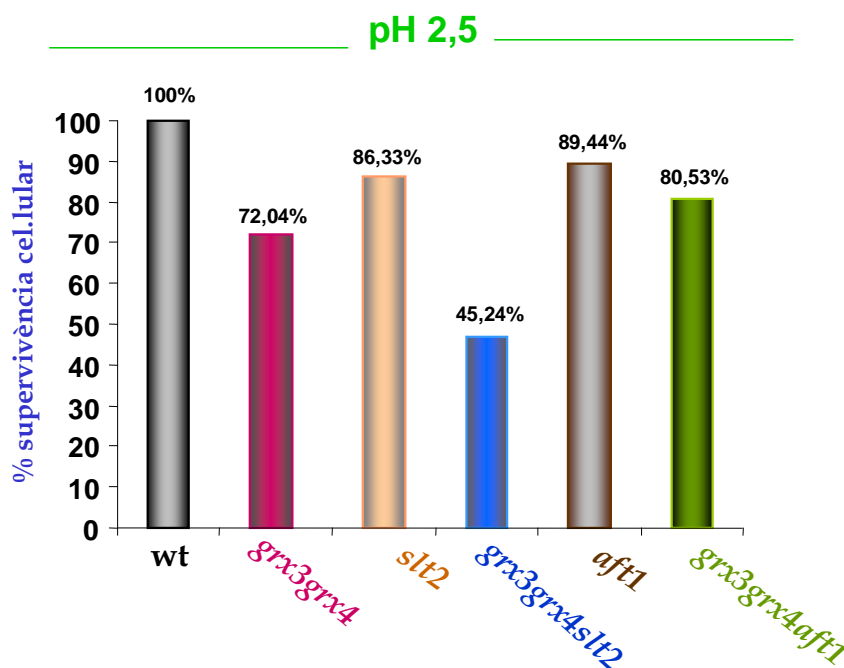


Figura 63- Estudi de la funció vacuolar relacionada amb l'homeòstasi del pH. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes exponencialment en medi mínim SD a 25°C. Els cultius van ser diluïts a una OD₆₀₀ de 0,06 i van ser transferits a medi mínim SD a pH bàsic de 7,5 (A) i a pH àcid de 2,5 (B). Cadascun dels cultius es van deixar créixer a 25°C fins al dia següent. 500 cèl.lules de cada cultiu crescuts en els diferents pHs van ser plaquejades per triplicat en plaques de medi ric YPD per fer el recompte de cèl.lules viables al cap de 2-3 dies de creixement a 30°C. El nombre de colònies cresques d'un total de 500 cèl.lules plaquejades van ser utilitzades com a mesura de la supervivència cel.lular. L'histograma representa en % la supervivència cel.lular de cada soca crescuda en els diversos pHs. Com a control, el 100% de creixement cel.lular es va obtenir en les soques cresques a un pH control de 5,2 (pH que presenta el medi SD en condicions normals).

Com es detalla en la Figura 63, tan a pH bàsic de 7,5 (A) com a pH àcid de 2,5 (B), el doble mutant *grx3grx4* presentava una viabilitat cel.lular lleugerament inferior (del 78 i 72% respectivament) respecte al 100% de viabilitat cel.lular detectada en la soca salvatge.

En aquest cas, l'absència d'Aft1 en el doble mutant *grx3grx4* també presentava uns % de supervivència cel.lular (79 i 80%) similars als detectats en el doble mutants *grx3grx4*

En canvi, la supervivència cel.lular detectada davant canvis en el pH extracel.lular era disminuïda considerablement fins a un 42-45% en el triple mutant *grx3grx4slt2*, respecte al 100% de viabilitat cel.lular de la soca salvatge.

Van Voorst *et al.*, (2006), van determinar que alteracions en les funcions vacuolars també provocaven defectes en el creixement cel.lular en fonts de carboni no fermentables

com l'etanol. Per aquest motiu, vam realitzar l'assaig de viabilitat cel.lular en presència de fonts de carboni no fermentables com el glicerol o el lactat.

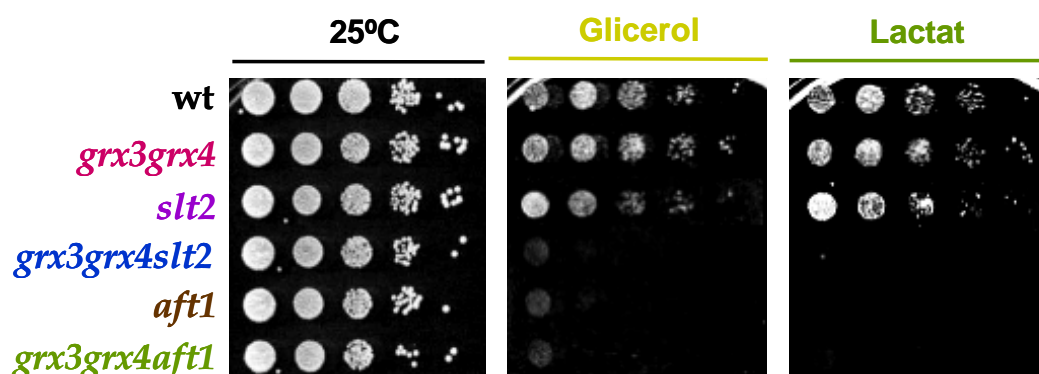


Figura 64- Viabilitat cel.lular en presència de fonts de carboni no fermentables. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C. Seguidament, dilucions seriades de cada cultius, van ser replicades en plaques de medi mínim SD suplementades amb glicerol o lactat com a font de carboni. Les plaques van ser incubades a 30°C durant 3 dies.

Com es mostra en la Figura 64, els mutants *aft1* i *grx3grx4aft1*, no creixien en les fonts de carboni no fermentables, glicerol i lactat.

El ferro forma part com a cofactor dels diferents citocroms que integren la cadena de transport d'electrons, procés fonamental durant la respiració (vegeu Introducció Capítol 1, pàg.37). Per aquesta raó, la disminució dels nivells de ferro intracel.lulars en el triple mutant *grx3grx4aft1* (Pujol *et al.*, 2006), podria explicar la sensibilitat cel.lular del triple mutant *grx3grx4aft1* en presència del fonts de carboni no fermentables que han de ser respirades, com el glicerol i el lactat. Pel contrari i seguint amb el mateix raonament, el fet que el doble mutant *grx3grx4* no presentés defectes en el creixement cel.lular en presència de glicerol i lactat, seria degut a que en absència de Grx3 i Grx4 els nivells de ferro intracel.lular eren més elevats degut a la hiperactivació d' Aft1 (Pujol *et al.*, 2006).

D'altra banda, el triple mutant *grx3grx4slt2* tampoc era viable en aquestes fonts de carboni no fermentables. Per descartar que aquesta sensibilitat cel.lular del triple mutant *grx3grx4slt2* fos conseqüència d'una desregulació en els nivells de ferro intracel.lular, com succeïa en el triple mutant *grx3grx4aft1* i confirmar que aquests defectes en el creixement en fonts de carboni no fermentables eren deguts a la fragmentació vacuolar, vam realitzar una estimació indirecta dels nivells basals de ferro intracel.lular presents en el triple mutant *grx3grx4slt2* mitjançant l'estudi dels nivells transcripcionals basals de *FET3* i de *FIT3*, transcrits regulats per Aft1 (Pujol *et al.*, 2006).

Per completar aquest estudi, també vam afegir en aquest assaig la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Slt2.

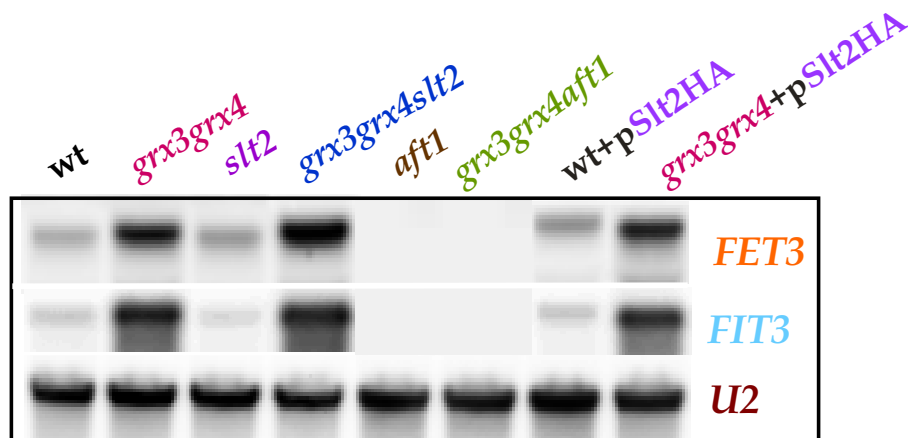


Figura 65- Anàlisi transcripcional del gens *FET3* i *FIT3*. Cultius de les soques salvatge, dels mutants *aft1*, *slt2*, *grx3grx4*, *grx3grx4aft1* i *grx3grx4slt2* i de la soca salvatge i el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Slt2 van ser crescuts en medi mínim SD a 25°C. Després de realitzar l'extracció de RNA total en mostres recolectades en fase exponencial, es van analitzar els nivells transcripcionals de *FET3* i de *FIT3* mitjançant Northern blot. *U2* va ser la sonda utilitzada com a control de carga.

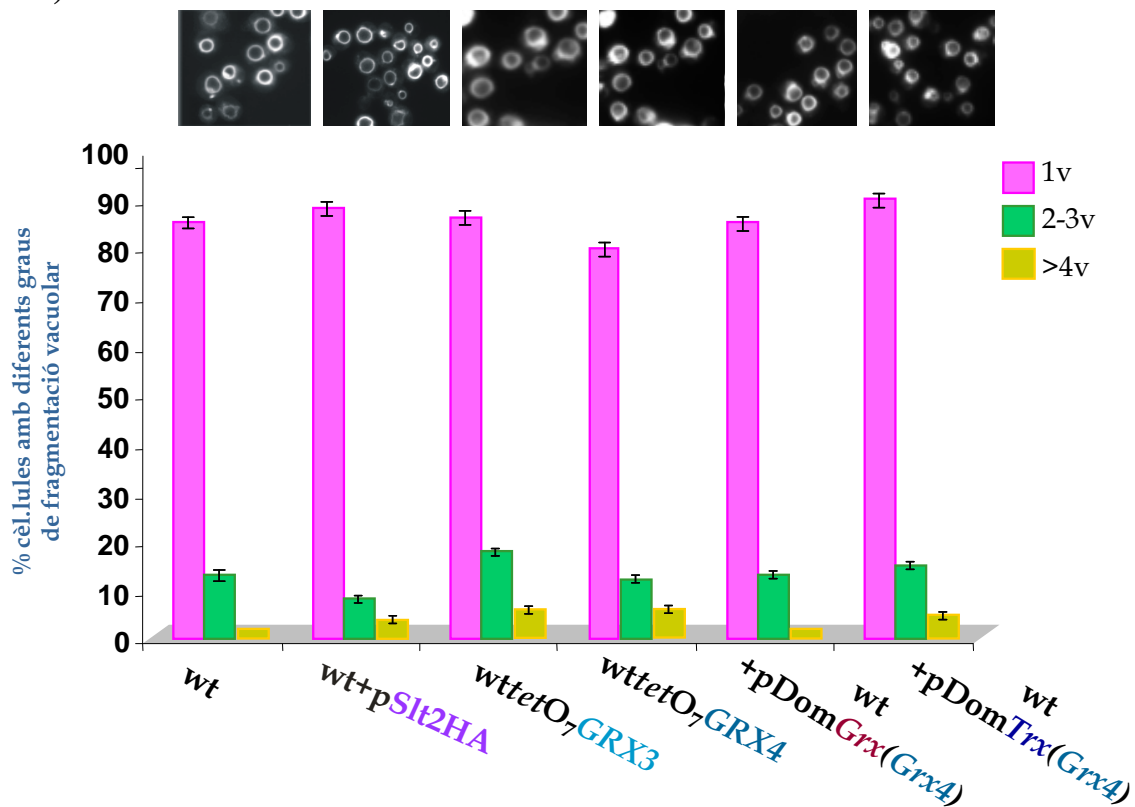
Com es detalla en la Figura 65, els elevats nivells transcripcionals de *FET3* i *FIT3* en el doble mutant *grx3grx4* no es veien alterats ni amb l'absència ni amb la sobreexpressió de Slt2. A més a més, ni l'absència ni la sobreexpressió de Slt2 produïa canvis en els nivells transcripcionals de *FET3* i *FIT3* detectats en la soca salvatge.

Aquestes dades demostraven que Slt2 no estava relacionat amb la funció d'Aft1 en la regulació de la homeòstasi del ferro.

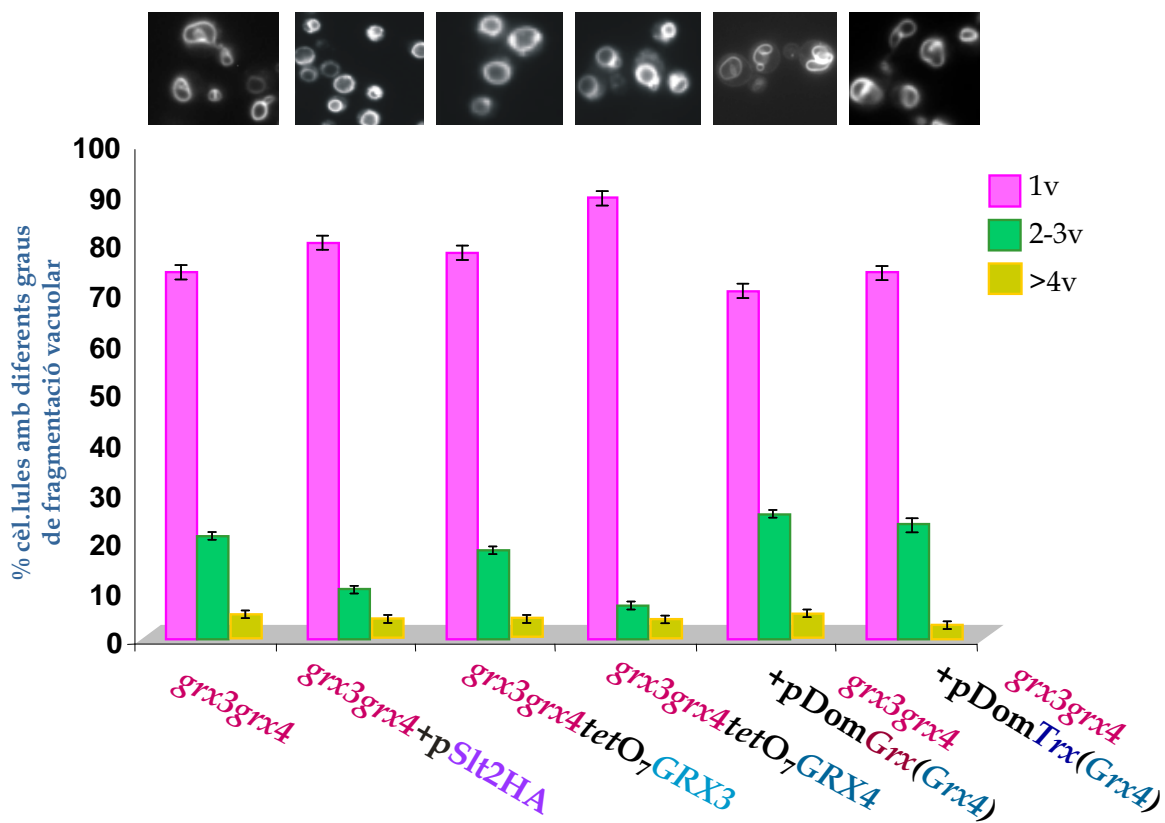
20- Estudi de la funció de Grx3, Grx4 i Slt2, en la biògenesi i les funcions vacuolars.

Per continuar amb la caracterització funcional de Grx3, Grx4 i Slt2 en la biogènesi vacuolar, vam realitzar un estudi tan de la morfologia vacuolar com de les diverses funcions regulades per la vacuola en les següents soques: soca salvatge i mutants *grx3grx4*, *slt2* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant Slt2, Grx3 i Grx4 i els dominis *GRX* i *TRX*. Per simplificar aquest estudi, només vam treballar amb els dominis *GRX* i *TRX* de Grx4, donat la redundància dels resultats obtinguts durant aquest treball amb la sobreexpressió dels dominis de Grx3.

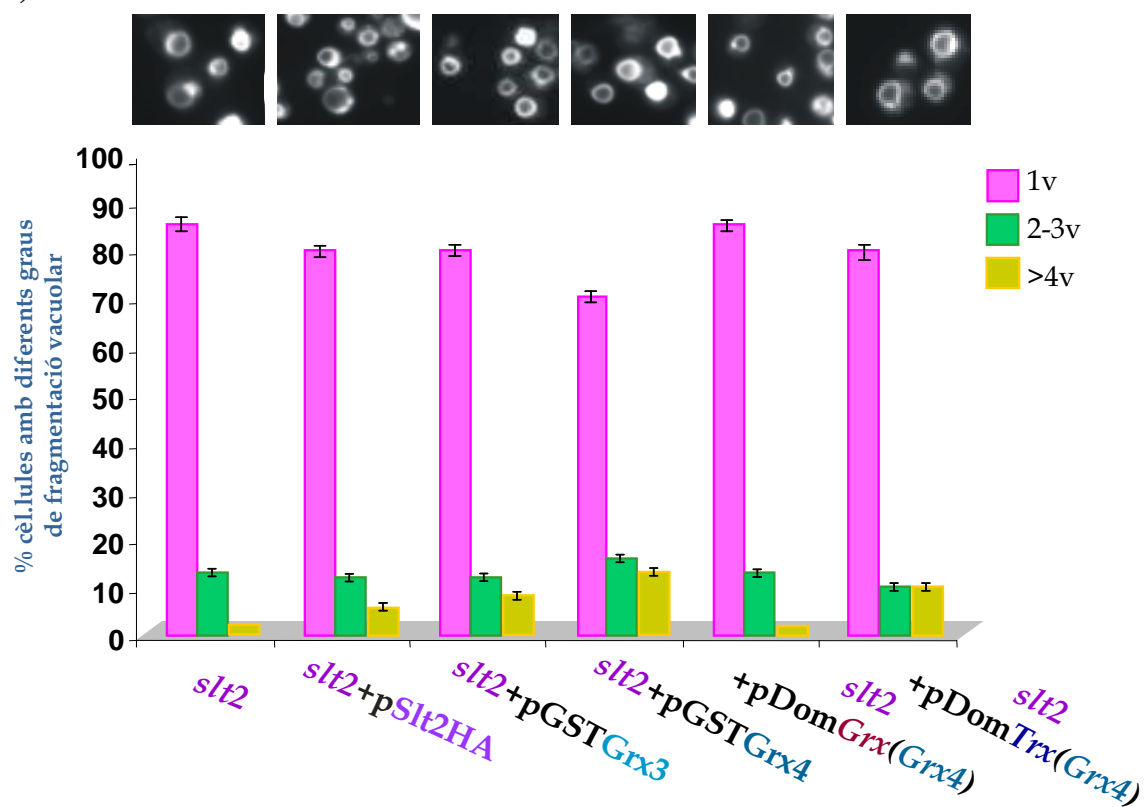
A)



B)



C)



D)

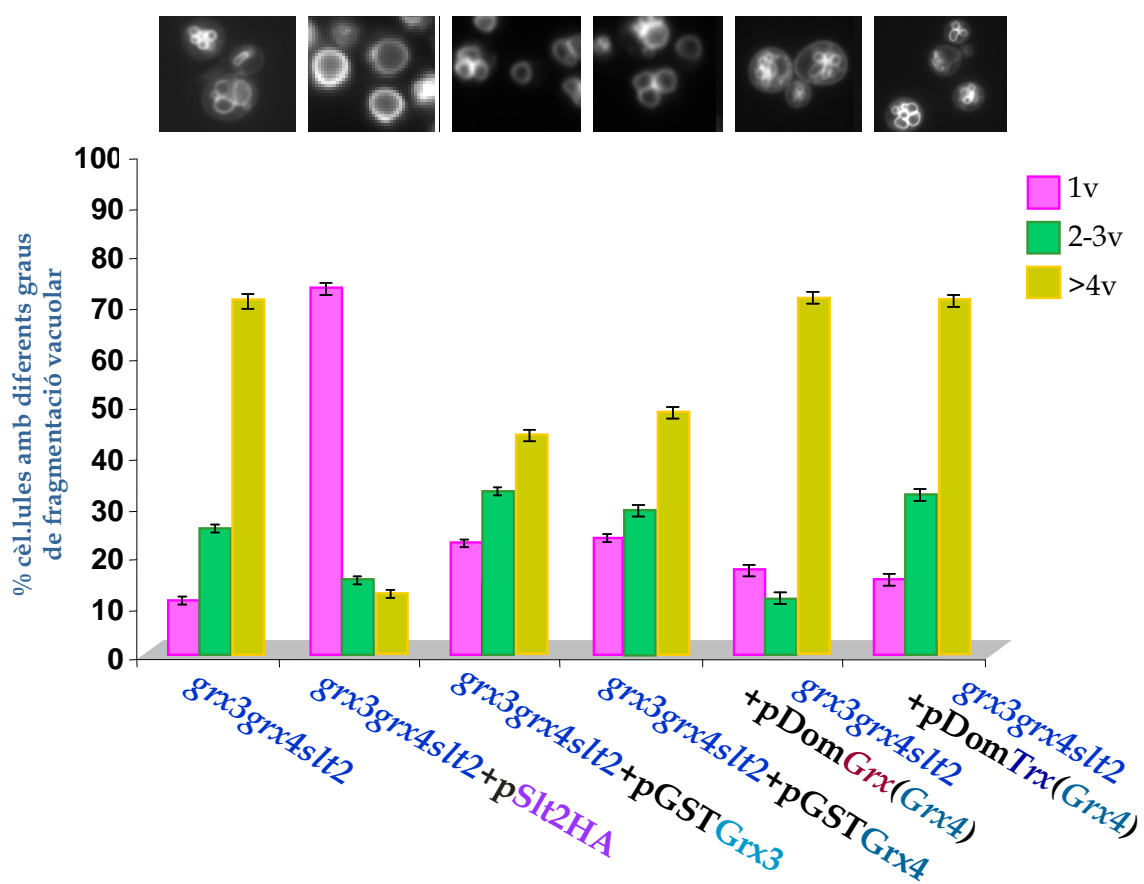


Figura 66- Anàlisi de la morfologia vacuolar mitjançant el colorant FM4-64. Soca salvatge **(A)**, doble mutant *grx3grx4* **(B)**, mutant *slt2* **(C)** i triple mutant *grx3grx4slt2* **(D)** sobreexpressant Slt2, Grx3, Grx4 i els dominis TRX i GRX de Grx4 respectivament van ser tractades sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figures 57B per visualitzar *in vivo* la morfologia vacuolar.

Com s'observa en Figura 66B, la sobreexpressió de Slt2, de Grx3 o de Grx4 en el doble mutant *grx3grx4* restablia completament la morfologia vacuolar detectada en la soca salvatge (Figura 66A)

En canvi, la sobreexpressió dels dominis GRX i TRX no restablien la morfologia vacuolar del doble mutant *grx3grx4*.

Aquests primers resultats ens van permetre obtenir les següents conclusions:

- La sobreexpressió de Grx3 i Grx4 disminuïen els nivells de ferro intracel.lulars en el doble mutant *grx3grx4* (Pujol *et al.*, 2006), condicions en les quals observavem un restabliment de la morfologia vacuolar. Aquest resultat i d'acord amb la morfologia vacuolar detectada en el triple mutant *grx3grx4aft1* (Figura 58) i en el doble mutant *grx3grx4* en presència de Ferrocina (Figura 59), confirmaven que la reducció dels nivells de ferro intracel.lulars eren una via per resoldre els defectes en l'estructura vacuolar del doble mutant *grx3grx4* causada per els elevats nivells de ferro deguts a la hiperactivació d'Aft1.

-La sobreexpressió de Slt2 restablia completament l'estructura vacuolar del doble mutant *grx3grx4*, malgrat no restablir els nivells de ferro intracel.lular (vegeu Figura 61). Aquestes dades demostraven que la sobreexpressió de Slt2, era una altra via per resoldre els defectes en l'estructura vacuolar del doble mutant *grx3grx4*, independentment dels nivells de ferro intracel.lulars causat per la hiperactivació d'Aft1.

D'altra banda, la sobreexpressió de Grx3 i Grx4 pràcticament no restablia la morfologia vacuolar del triple mutant *grx3grx4slt2* (Figura 66D).

En canvi, la sobreexpressió de Slt2 restablia completament la morfologia vacuolar en el triple mutant *grx3grx4slt2* als nivells de la soca salvatge (Figura 66C), en unes condicions on els nivells de ferro intracel.lular eren elevats (Figura 61).

Finalment, la sobreexpressió dels dominis GRX i TRX tampoc restablien la morfologia vacuolar del triple mutant *grx3grx4slt2*.

Un cop caracteritzades les morfologies vacuolars amb les sobreexpressions de Grx3, Grx4 i Slt2 en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*, els següents experiments tenien com a objectiu determinar com es veien afectades algunes de les funcions vacuolars en les mateixes condicions experimentals.

En primer lloc, cultius de la soca salvatge, del mutant *grx3grx4* i del mutant *grx3grx4* sobreexpressant Slt2 i els dominis GRX i TRX de Grx4 van ser crescuts en medi d' esporulació per recrear unes condicions de déficit de nutrients.

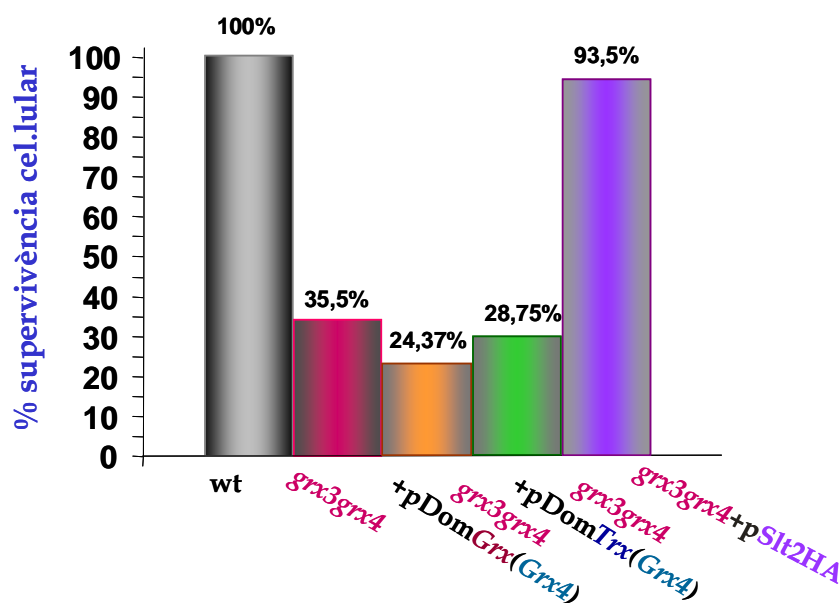


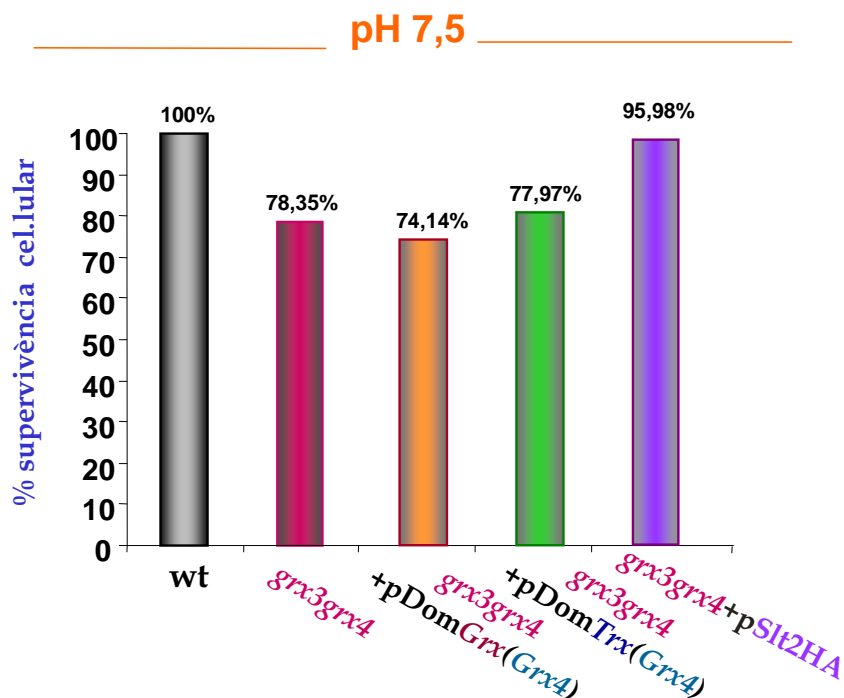
Figura 67- Estudi de la funció vacuolar relacionada amb l'emmagatzemament de nutrients. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes i analitzades sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 62.

Com es demostra en la Figura 67, el 24% i el 28% de supervivència cel.lular detectada en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant els dominis GRX i TRX, respecte al 35% de supervivència cel.lular detectada en el doble mutant *grx3grx4*, demostraven els que dominis TRX i GRX no restablien la supervivència cel.lular del doble mutant *grx3grx4* després d'una situació de déficit de nutrients. Aquest fet que es correlacionava amb l'estructura vacuolar aberrant observada en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant ambdós dominis (vegeu Figura 66B).

En canvi, la sobreexpressió de Slt2 augmentava la supervivència cel.lular del doble mutant *grx3grx4* pràcticament al 100% respecte a la soca salvatge, fet que es correlacionava amb el restabliment de la morfologia vacuolar (vegeu Figura 66B).

Resultats similars van ser observats en l'estudi de la funció vacuolar relacionada amb la homeòstasi del pH.

A)



B)

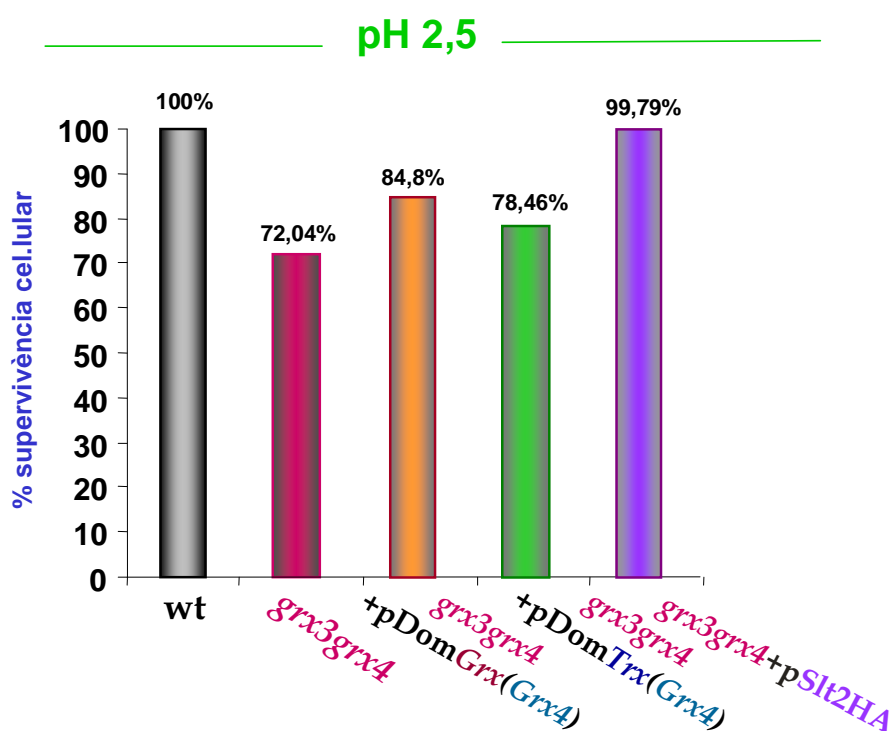


Figura 68- Estudi de la funció vacuolar relacionada amb l'homeòstasi del pH. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes i analitzades sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 63. (A) Tractament a pH bàsic de 7,5. (B) Tractament a pH àcid de 2,5.

Com s'observa en la Figura 68, mentre que les sobreexpressions de GRX i TRX no causaven cap efecte sobre la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* davant canvis en el pH extracel.lulars, la sobreexpressió de Slt2 restablia pràcticament el 100% de la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* en aquesta situació.

Per completar aquests estudis, també vam realitzar diversos assajos en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant Grx3, Grx4, Slt2 i el dominis GRX i TRX de Grx3 i Grx4.

En la Figura 64, vam demostrar que la fragmentació vacuolar present en el triple mutant *grx3grx4slt2* induïa defectes en el creixement amb fonts de carboni no fermentables com el glicerol o el lactat. Amb l'objectiu de confirmar que els dominis GRX i TRX de Grx3 i Grx4 presentaven funcions redundants i no restablien la morfologia vacuolar en el triple mutant *grx3grx4slt2*, vam decidir analitzar la viabilitat cel.lular d'aquestes soques en les mateixes condicions experimentals de creixement en glicerol i lactat.

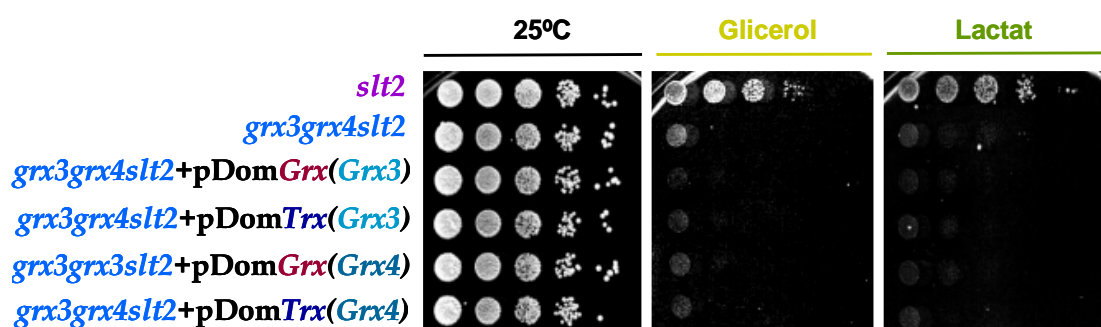


Figura 69- Viabilitat cel.lular en presència de fonts de carboni no fermentables. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes i analitzades en les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 64.

Com es mostra en la Figura 69, la sensibilitat cel.lular del triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant els dominis GRX i TRX de Grx3 i Grx4 en fonts de carboni no fermentables com el glicerol o el lactat, demostraven que els dominis GRX i TRX no restablien ni la morfologia ni les funcions vacuolars del triple mutant *grx3grx4slt2*. A més a més, demostravem les funcions redundants dels dominis de Grx3 en la biogènesi vacuolar respecte als dominis de Grx4.

D'altra banda, vam realitzar un exhaustiu assaig de viabilitat cel.lular en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant Grx3, Grx4 i Slt2 en diverses condicions d'estrès:

estrès oxidatiu amb 1mM de peròxid d'hidrogen, xoc tèrmic a 38°C, estrès en la paret cel.lular amb Congo Red (5,5µg/ml) i Calcofluor White (15µg/ml), creixement en fonts de carboni no fermentables: Glicerol i estrès alcalí a pH bàsic de 7,5.

En aquest estudi també vam afegir un tractament amb CaCl₂ 0,2M: la vacuola és el principal reservori d'ions Ca⁺² en el llevat (Halachmi *et al.*, 1989; Strayle *et al.*, 1999). Defectes en les funcions vacuolars poden induir un increment en els nivells de calci citosòlic i activar la transcripció gènica depenent de la Calcineurina, fosfatasa que regula l'homeòstasi del Calci. Gonzalez *et al.*, (2006) van observar que el mutant en la fosfatasa *ptc1* era sensible a elevats nivells de calci extracel.lular conseqüència de la fragmentació vacuolar que presentava aquest mutant.

Per aquest motiu i d'acord amb aquests antecedents, vam incloure el tractament amb CaCl₂ en aquest assaig de viabilitat cel.lular.

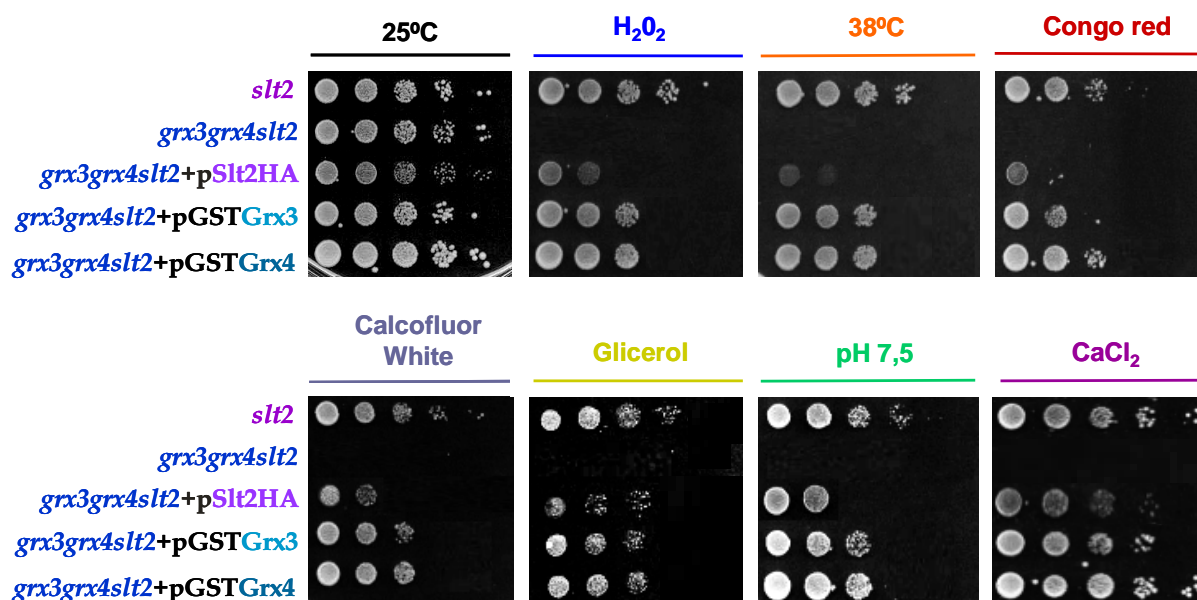


Figura 70- Assajos de viabilitat cel.lular en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant Grx3, Grx4 i Slt2. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25° fins arribar a fase exponencial. Seguidament es van realitzar dilucions seriades de cada cultiu que van ser replicades en plaques de medi mínim tractades amb els diversos agents descrits prèviament. Les plaques van ser incubades durant 3 dies a 30°C.

En la Figura 70, la sobreexpressió de Slt2 restablia parcialment la viabilitat cel.lular del triple mutant *grx3grx4slt2* en totes les condicions d'estrès analitzades, observant uns nivells de creixement cel.lular en placa similars als detectats en el doble mutant *grx3grx4* (com s'observarà més endavant en la Figura 74A). A més a més, les sobreexpressions de

Grx3 i Grx4 també restablien parcialment viabilitat cel·lular del triple mutant *grx3grx4slt2*. En aquets cas, els nivells de creixement cel·lular del triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant Grx3 i Grx4 eren majors que els detectats amb la sobreexpressió de Slt2.

21- Les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4 restauren la morfologia i les funcions vacuolar dels mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*.

La fragmentació vacuolar observada en el triple mutant *grx3grx4slt2*, recordava als mutants *vps* de la classe B segons Raymond *et al.*, (1992) i Bonangelino *et al.*, (2002).

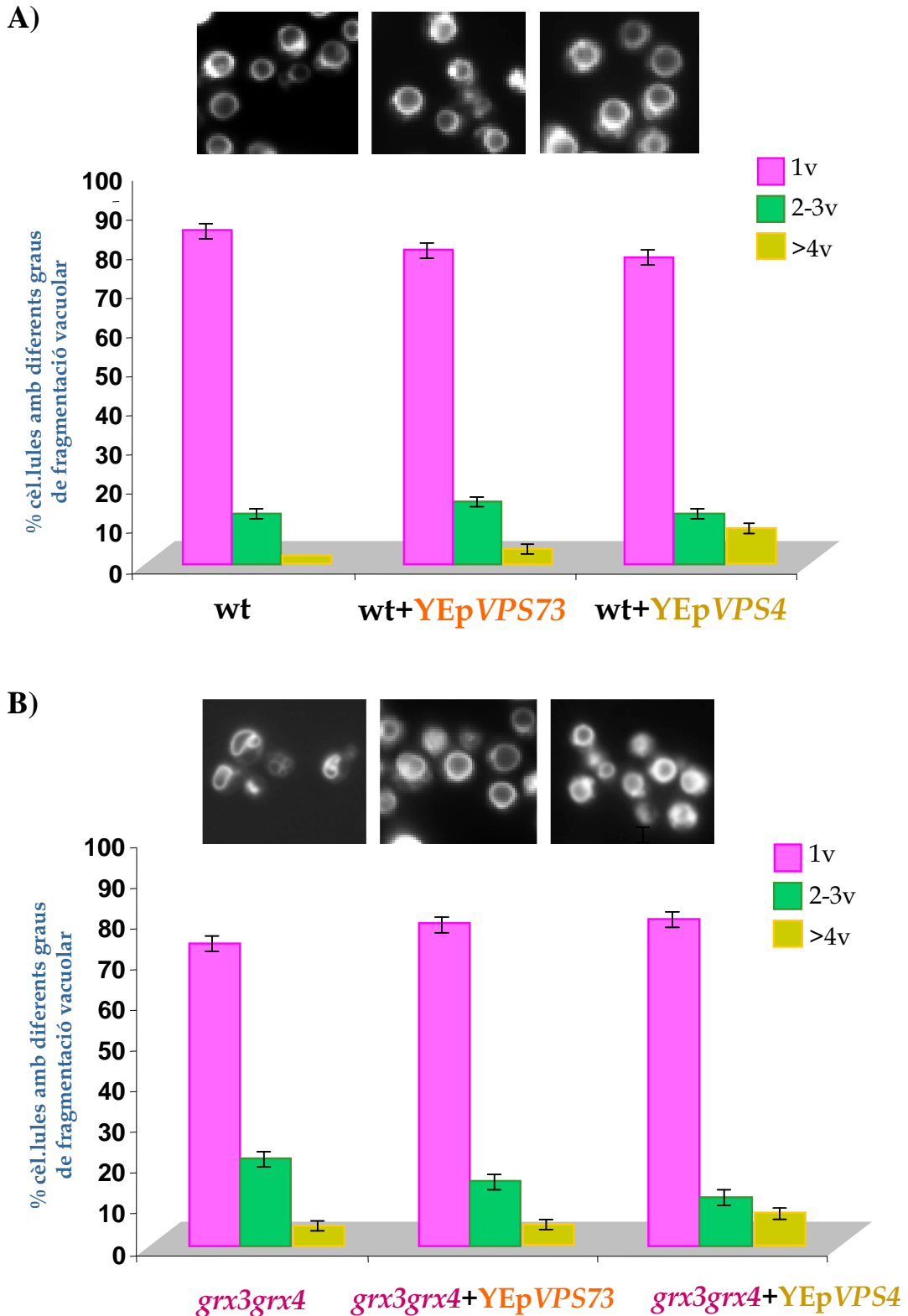
González *et al.*, (2006) van demostrar que la sobreexpressió de Vps73 (proteïna mitocondrial de funció desconeguda implicada en funcions vacuolars) revertia la fragmentació vacuolar detectada en el mutant *ptc1*. A més a més, Vps73 incrementava la viabilitat cel·lular d'aquest mutant davant agents que danyen la paret cel·lular, davant canvis en el pH extracel·lular o en presència d'elevades concentracions de ions Calci o Zinc, suggerint que la biogènesi vacuolar era una de les principals dianes regulades per la fosfatasa Ptc1.

D'acord amb aquests antecedents, els últims resultats descrits en aquest apartat detallaran l'efecte de les sobreexpressions de les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4 en la morfologia i en les funcions vacuolars dels mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*.

Per realitzar aquest anàlisi, vam comptar amb els plàsmids YEp195-*VPS73* i Yep195-*VPS4* proporcionats pel Dr. Antoni Casamayor del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (vegeu Materials i Mètodes, pàg.118).

Bonangelino *et al.*, (2002) van incloure el mutant *vps73* dins la classe B del mutants *vps*. D'altra banda, Vps4 codifica per una ATPasa vacuolar relacionada amb el cossos vesiculars. Raymond *et al.*, (1992), van classificar el mutant *vps4* dins la classe E. Els mutants *vps* de classe E es caracteritzaven per la presència d'un segon compartiment (que anomenaren compartiment de classe E) adjacent a la vacuola i que també acumulava proteïnes vacuolars. El mutant *vps4* també es caracteritza per secretar quantitats de CPY madura similars a les detectades en la soca salvatge, fenotip que també era visible en el triple mutant *grx3grx4slt2*.

Cultius de les soques salvatge, doble mutant *grx3grx4* i triple mutant *grx3grx4slt2* van ser transformats amb els plàsmids prèviament descrits. Seguidament, vam realitzar una primera observació de la morfologia vacuolar mitjançant el colorant FM4-64 en condicions normals.



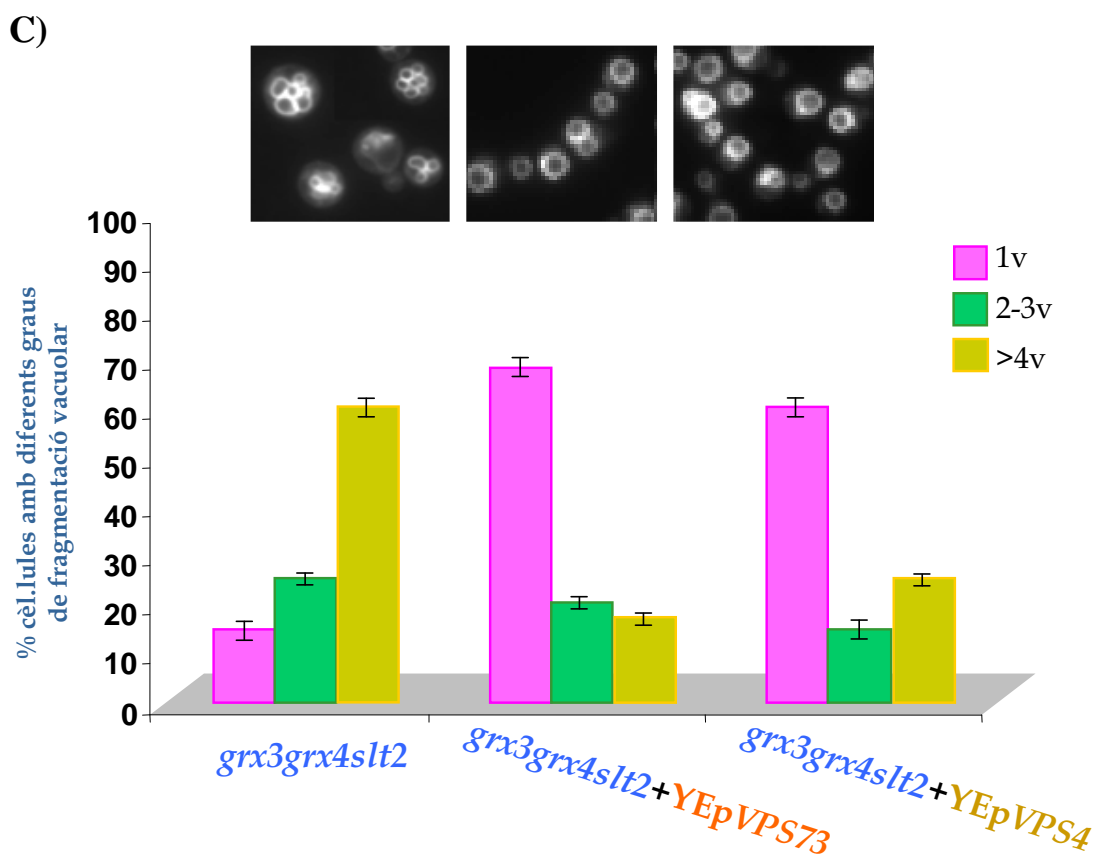


Figura 71- Estudi de la morfologia vacuolar en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant les proteïnes Vps73 i Vps4. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes i tractades amb el colorant FM4-64 sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 57B.

Com s'observa en la Figura 71B i C, la sobreexpressió de les proteïnes Vps73 i Vps4 revertien completament la morfologia vacuolar aberrant del mutant *grx3grx4* i la fragmentació vacuolar del mutant triple *grx3grx4slt2*, donant lloc a una vacuola de contorn homogeni com la observada en la soca salvatge (Figura 71A).

Donat que la sobreexpressió de les proteïnes Vps revertien la morfologia vacuolar aberrant causada per l'estrès oxidatiu endògen en el doble mutant *grx3grx4*, vam analitzar si aquestes proteïnes vacuolars estaven produïen canvis en els nivells d'oxidació endògena.

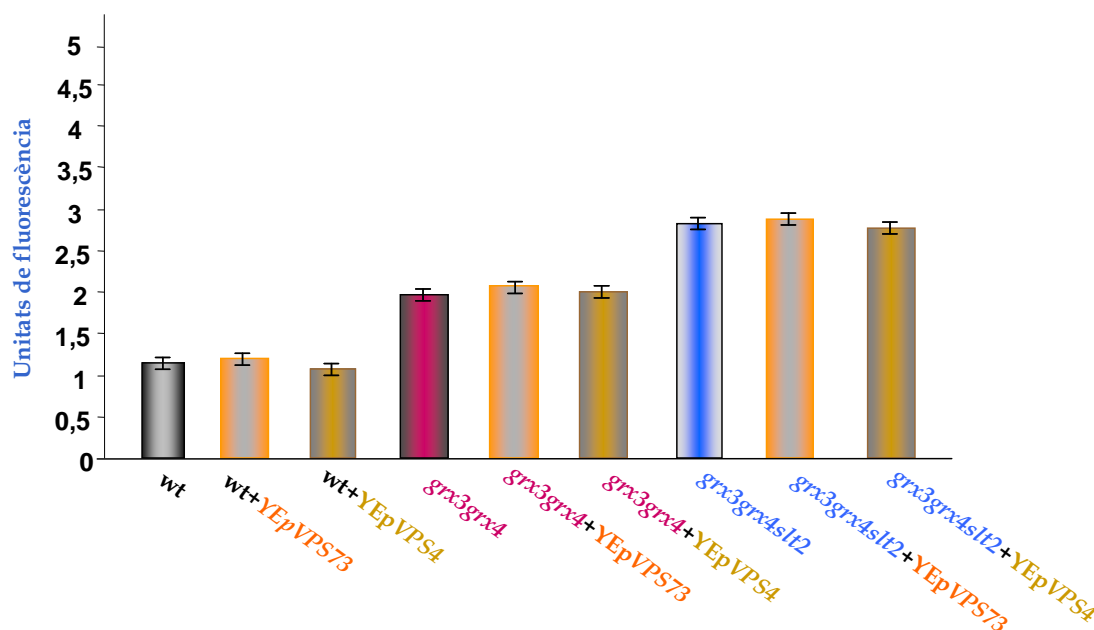


Figura 72- Detecció dels nivells de radicals superòxid en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant les proteïnes Vps73 i Vps4. Cultius de les soques detallades en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25°C fins arribar a una OD₆₀₀ de 0,5 -0,6. Seguidament, es va realitzar l'assaig de detecció de radicals superòxid segons s'indica en la Figura 52.

Com es detalla en la Figura 72, mitjançant l'anàlisi de detecció d'anions superòxid en condicions normals, les sobreexpressions de Vps73 o de Vps4 no produeixen canvis en els elevats nivells d'oxidació endògena detectats en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*.

22- En condicions normals, la sobreexpressió de les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4 restauren la polarització del citoesquelet d'actina en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*.

Isgadarova *et al.*, (2007) van demostrar la fusió de les membranes vacuolars com a mecanisme per catalitzar la polarització de l'actina. D'acord amb aquests resultats i donat que les proteïnes Vps73 i Vps4 restablen la morfologia vacuolar del triple mutant *grx3grx4slt2*, vam decidir analitzar l'organització del citoesquelet d'actina en condicions normals en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant Vps73 i Vps4.

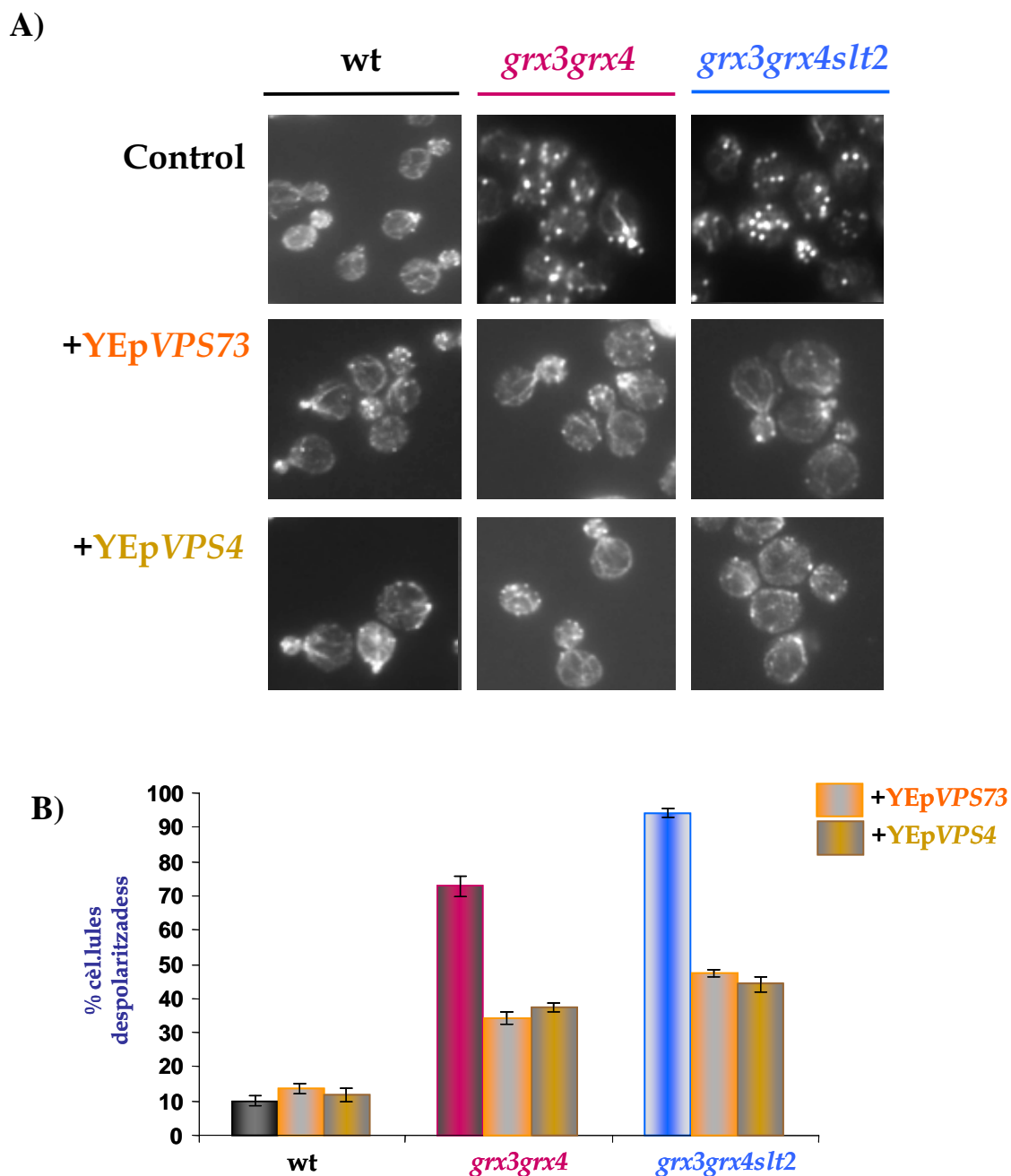
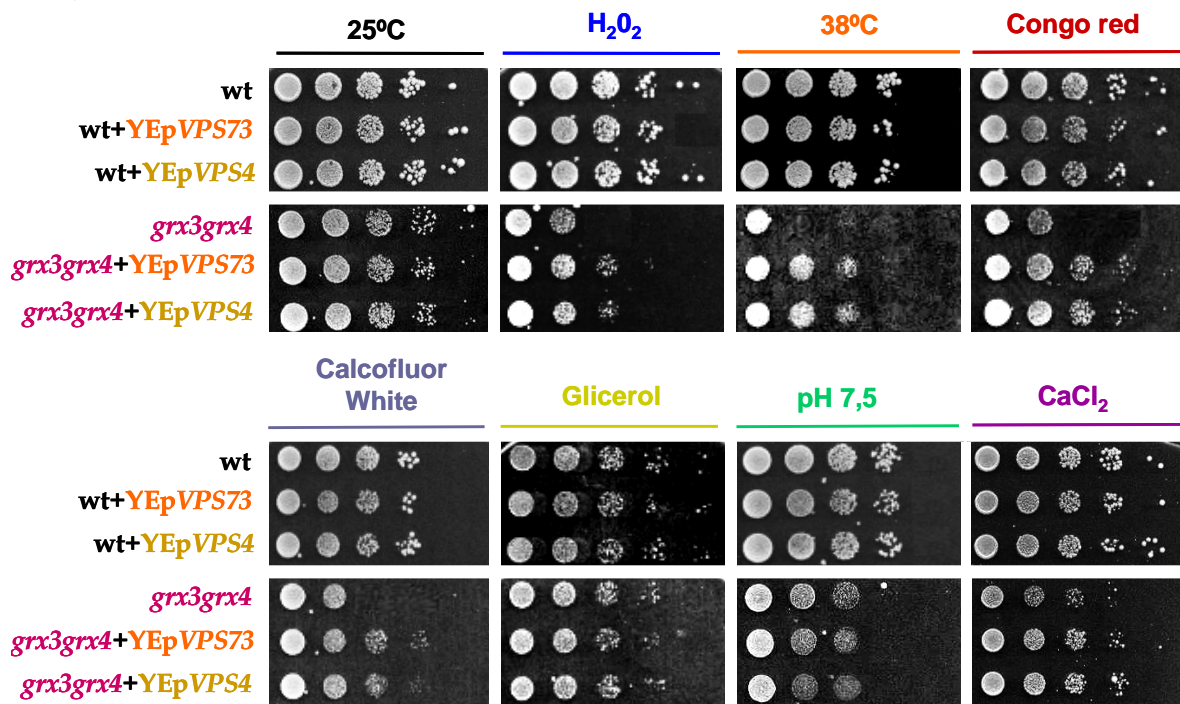


Figura 73- Anàlisi del citoesquelet d'actina en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant les proteïnes Vps73 i Vps4. Cultius en fase exponencial de les soques descrites en la Figura van ser processades per realitzar l'assaig de Tinció d'actina segons el protocol descrit en Material i Mètodes pàg.123).

Els resultats obtinguts després de la tinció d'actina amb Rodamina Faloidina (Figura 73A) i detallats en els histogrames de barres (Figura 73B) demostraven que la sobreexpressió de les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4 restablien la polarització del citoesquelet d'actina dels mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* en condicions normals.

Finalment, vam completar aquest estudi realitzant assajos de viabilitat cel·lular en els mutant *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant Vps73 i Vps4 sota les mateixes condicions experimentals descrites en la Figura 70.

A)



B)

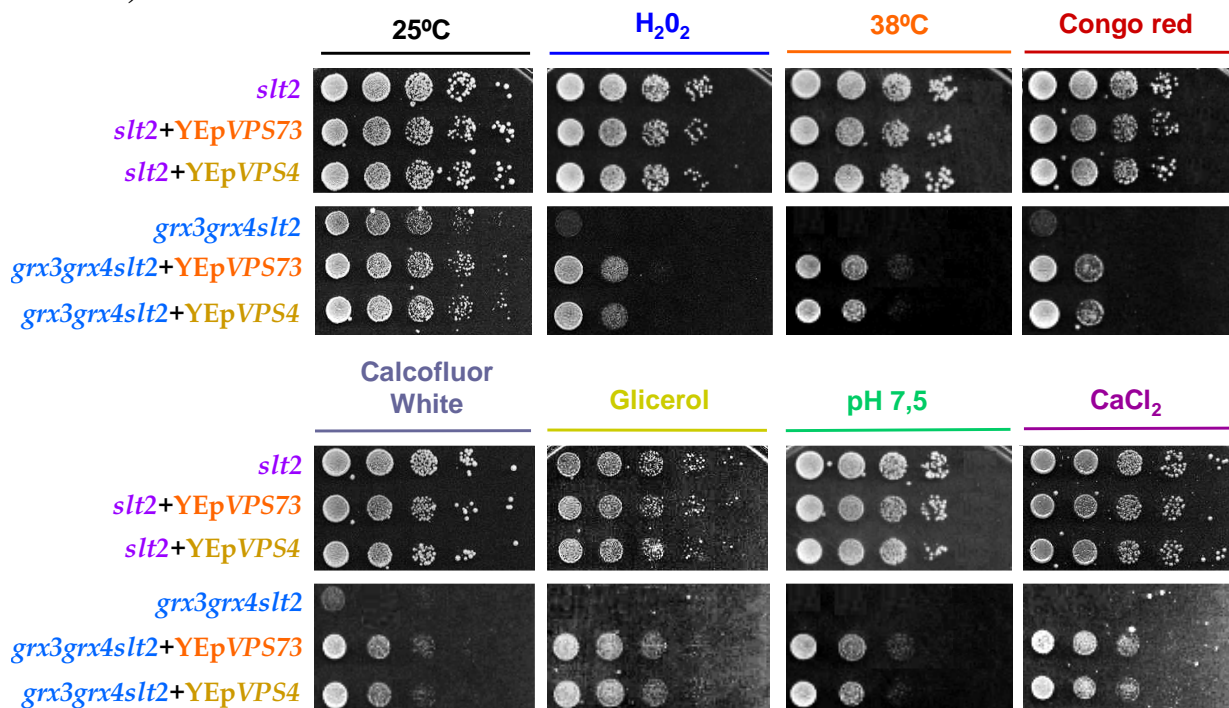


Figura 74- Assajos de viabilitat cel.lular en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant les proteïnes Vps73 i Vps4. Cultius de les soques descrites en la Figura van ser crescudes en medi mínim SD a 25° fins arribar a fase exponencial. Seguidament es van realitzar dilucions seriades de mostres recolectades en fase exponencial i replicades en plaques de medi mínim tractades amb els diversos agents descrits en la Figura 70. Les plaques van ser incubades durant 3 dies a 30°C. **(A)** Assajos de viabilitat cel.lular en la soca salvatge i en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Vps73 i Vps4 **(B)** Assajos de viabilitat cel.lular en el mutant simple *slt2* i en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant Vps73 i Vps4.

Aquests assajos de viabilitat cel.lular en van aportar els següents resultats:

-La sobreexpressió de les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4 restablien parcialment la viabilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* en resposta a l'estrès oxidatiu causat pel peròxid d'hidrogen i en resposta a estrès tèrmic de 38°C, mentre que restablien la viabilitat cel.lular en resposta a agents que danyaven la paret cel.lular, com el Congo Red i la Cafeïna, als nivells de la soca salvatge. (Figura 74A).

- Les sobreexpressions de Vps73 o Vps4 no revertien la sensibilitat cel.lular del doble mutant *grx3grx4* a pH bàsic de 7,5.

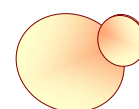
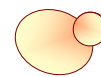
-El creixement en fonts de carboni com el glicerol o la presència de elevats nivells extracel.lular d'ions calci no afectaven a la viabilitat cel.lular del mutant *grx3grx4*.

D'altra banda, com es mostra en la Figura 74B, les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4 restablien parcialment la viabilitat cel.lular del triple mutant *grx3grx4slt2* en totes les situacions d'estrès analitzades, detectant uns creixements cel.lulars en placa similars als observats en el doble mutant *grx3grx4* (Figura 74A).

En resum, els resultats obtinguts amb les sobreexpressions de les proteïnes Vps73 i Vps4, suggerien que la fragmentació vacuolar detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2* en condicions normals podria ser deguda a una funció comuna sobre la biogènesi vacuolar regulada simultàniament per Grx3, Grx4 i Slt2 a través de al menys les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4.

Així doncs, les nostres dades mostrarien per primera vegada una relació funcional entre les glutaredoxines Grx3, Grx4 i la quinasa Slt2 de la via *PKC1* en la biogènesi vacuolar.

4.5- DISCUSSION



En aquest segon Capítol de la present Tesi doctoral es presenta per primera vegada la caracterització funcional de les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 en relació a la regulació de la via d'integritat cel.lular o via *PKC1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la resposta cel.lular davant estrès oxidatiu

Antecedents:

1) L'interès per estudiar la relació funcional entre Grx3 i Grx4 i els elements que formen part de la via d'integritat cel.lular en *S.cerevisiae*, va sorgir al observar que en les cèl.lules linfocitàries T del sistema immunitari humà s'havia descrit una glutaredoxina monotiolica, la proteïna PICOT (*PKC-interacting-cousin of tioredoxin*). Els dominis *GRX* i *TRX* de la proteïna PICOT presentaven una elevada homologia seqüencial amb els dominis *GRX* i *TRX* de les glutaredoxines Grx3 i Grx4.

Els antecedents bibliogràfics descriuen que la glutaredoxina monotiolica humana PICOT regula negativament la funció de la proteïna quinasa *PKC-θ* humana en resposta a estrès oxidatiu (Isakov *et al.*, 2000; Witte *et al.*, 2000).

2) Estudis publicats en el nostre laboratori van demostrar que la via *PKC1* s'activava en resposta a estrès oxidatiu i que mutants en components de la via *PKC1*, com *rom2* o *pkc1*, suprimien l'activació de Slt2 en resposta a dit estrès. Conseqüència d'aquest fet era la sensibilitat cel.lular dels mutants *rom2* i *pkc1* a agents oxidants com el peròxid de hidrogen o la diamida (Vilella *et al.*, 2005).

3) En les dades publicades en Pujol *et al.*, (2006) vam demostrar que el doble mutant *grx3grx4* també presentava sensibilitat cel.lular en resposta a l'estrès oxidatiu causat pel peròxid d'hidrogen o el tert-butil hidroperòxid.

A més a més, l'absència de fosforilació de Slt2 en resposta a peròxid d'hidrogen en el doble mutant *grx3grx4* (resultats mostrats en aquest segon capítol) i les dades publicades per Hirota *et al.*, (2000), on descrivien la relació funcional entre glutaredoxines i quinases integrants de vies de senyalització cel.lular en eucariotes superiors, evidenciaven cada cop més la possible relació funcional entre Grx3 i Grx4 i l'activació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

D'acord amb totes aquestes dades, en el següent apartat discutirem els mecanismes amb els quals proteïnes detoxificadores com les glutaredoxines Grx3 i Grx4 de *S. cerevisiae* regulen l'activitat i les funcions de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

-Participació de Grx3 i Grx4 en l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

En *S. cerevisiae* l'activació de la via d'integritat cel·lular és necessària durant la biogènesi de la paret cel·lular tan en períodes de creixement polaritzat com en resposta a estrès (Garcia *et al.*, 2004). Problemes en la biogènesi de la paret cel·lular desemboquen en fenotips de termosensibilitat (Harrison *et al.*, 2004), sensibilitat a agents que danyen la paret cel·lular (Jung *et al.*, 2002) i sensibilitat davant estrès oxidatiu (Vilella *et al.*, 2005). Si aquesta sensibilitat cel·lular és una conseqüència de defectes estructurals en la paret cel·lular, aquests fenotips són restaurats en presència de l'agent osmoregulador sorbitol.

En el doble mutant *grx3grx4* la via *PKC1* no s'activava en resposta a estrès oxidatiu i presentava sensibilitat cel·lular en resposta a peròxid d'hidrogen. Malgrat que el doble mutant *grx3grx4* presentava defectes estructurals en l'envolta cel·lular, la presència de sorbitol en el medi no restablí la viabilitat cel·lular del doble mutant *grx3grx4* davant agents que causaven dany en la paret cel·lular (com el Calcofluor White, el Congo Red, la Cafeïna o un xoc tèrmic a 38°C), ni davant del dany oxidatiu causat per el peròxid de hidrogen. Aquest fet descartava els problemes estructurals de la paret cel·lular com a causa de la sensibilitat del doble mutant *grx3grx4* davant els diversos estímuls que activaven la via *PKC1*.

En la literatura està ampliament descrit com l'estrès oxidatiu afecta directament a les biomolècules de la cèl·lula com són les proteïnes, repercutint negativament en les seves estructures i les seves funcions (Halliwell i Gutteridge, 1991; Auroma *et al.*, 1991). L'absència simultània de Grx3 i Grx4 induïa la hiperactivació d'Aft1, factor transcripcional encarregat de regular l'homeòstasi del ferro (Pujol *et al.*, 2006). Com a conseqüència de la desregulació d'Aft1, s'acumulaven elevats nivells de ferro dins la cèl·lula que generaven estrès oxidatiu endògen, com ho demostraven els elevats nivells de radicals superòxid detectats en el doble mutant *grx3grx4*. La delecció d'*AFT1* en el doble mutant *grx3grx4* reduïa les elevades quantitats de radicals superòxid intracel·lulars als nivells d'una soca salvatge i restablí parcialment la fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu. En

aquestes condicions, el parcial restabliment de la viabilitat cel·lular davant agents que danyaven la paret cel·lular o causaven estrès oxidatiu i la parcial polarització del citoesquelet d'actina en el triple mutant *grx3grx3aft1*, demostraven que l'estrès oxidatiu endògen causat per la desregulació d'Aft1 en el doble mutant *grx3grx4* no era la principal causa dels defectes en la correcta activació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu, si bé contribuïa parcialment a aquest fet.

Van Drogen *et al.*, (2002) van demostrar que Slt2 era necessària durant el creixement polaritzat de la cèl·lula i que es localitzava en la regió del septe durant la citoquinesi. Problemes en l'activació de la via *PKC1* implicaven defectes en els mecanismes relacionats amb la biògenesi de la paret cel·lular com és la síntesi de quitina en septe durant la citoquinesi (Versele *et al.*, 2005), on les septines com la proteïna Cdc11 jugaven un paper clau en aquest procés (Bertin *et al.*, 2008). Els defectes observats en la correcta localització subcel·lular de Slt2 i de la septina Cdc11 en el septe del doble mutant *grx3grx4* aportaven més dades sobre l'existència de problemes en les funcions regulades per la via *PKC1*. A més a més, el parcial restabliment de la fosforilació de Slt2 i de la viabilitat cel·lular davant agents que causaven dany oxidatiu quan sobreexpressavem Slt2 o quan utilitzavem l'al·lel hiperactiu *BCK1-20* en el doble mutant *grx3grx4*, confirmaven que Grx3 i Grx4 eren necessàries per la correcta activació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

- Regulació transcripcional de *SLT2* i de *PST1* per Grx3 i Grx4 en resposta a estrès tèrmic i estrès oxidatiu.

La via *PKC1* media la resposta davant dany en paret cel·lular mitjançant la regulació de dos factors transcripcionals: Rlm1 (Jung *et al.*, 2002) i Swi4/Swi6 (Ki-Young *et al.*, 2008). Rlm1 s'encarrega de la transcripció de gens que codifiquen per proteïnes necessàries durant la síntesi i la reparació de l'envolta cel·lular en resposta a dany en la paret (Jung and Levin, 1999). Entre aquests gens s'hi troba *PST1*, gen que codifica per una proteïna de paret cel·lular de la família de les proteïnes GPI (*glicosil fosfatidil inositol*) (Pardo *et al.*, 2004).

En resposta a dany en la paret cel·lular, apareixia un retard en la transcripció gènica de *SLT2* i dels gens regulats per Rlm1, com *PST1* en absència simultània de Grx3 i Grx4. No obstant, en aquestes condicions la fosforilació de Slt2 no es veia afectada. Els defectes en la correcta activació transcripcional de *PST1* en resposta a dany en la paret cel·lular,

podrien contribuir a la causa de la termosensibilitat a 38°C i de la sensibilitat cel.lular davant Calcofluor White, Congo Red i Cafeïna del doble mutant *grx3grx4*. A més a més, podria ser el motiu pel qual l'agent osmoregulator sorbitol no restablía la viabilitat cel.lular davant aquests agents que causaven dany en la paret cel.lular.

En resposta a estrès oxidatiu, el mutant simple *grx4* presentava baixos nivells de fosforilació de Slt2 i la transcripció de *SLT2* i de *PST1* no era induïda respecte a la soca salvatge i el mutant simple *grx3*. En canvi, en el doble mutant *grx3grx4* Slt2 no era fosforilada i la transcripció de *SLT2* i de *PST1* no era activada ni en condicions normals ni en resposta a estrès oxidatiu. L'activació de Slt2, a banda de regular el factor transcripcional Rlm1, també regular la seva pròpia transcripció (Garcia *et al*, 2004). Aquest fet suposava un problema alhora de determinar si la regulació de Slt2 per Grx3 i Grx4 es duïa a terme a nivell transcripcional o a nivell postraduccional. Per aquest motiu, per eliminar l'efecte de la possible regulació transcripcional i poguer estudiar separatament l'efecte sobre l'activació de Slt2, vam substituir el promotor endògen de *SLT2* pel promotor regulable *MET*. En aquestes condicions, els nivells transcripcionals de *SLT2* es mantenien iguals en totes les soques analitzades. En aquesta situació, els baixos nivells de fosforilació de Slt2 en el mutant *grx4* i l'absència de fosforilació de Slt2 en el doble mutant *grx3grx4*, demostravem que Grx3 i Grx4 regulaven l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu a nivell postraduccional.

El mutant simple *grx4* presentava baixos nivells de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu, presentant parcial viabilitat cel.lular davant peròxid d'hidrogen. A més a més, presentava una parcial polarització del citoesquelet d'actina en resposta a dit estrès. D'altra banda, la fosforilació de Slt2, la viabilitat cel.lular i la polarització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu en el triple mutant *grx3grx4aft1* eren similars als detectats en el mutant simple *grx4*. D'acord amb aquestes dades i el fet que el triple mutant *grx3grx4aft1* presentés uns nivells de radicals superòxid similars als del mutant simple *grx4*, demostrava que l'oxidació endògena generada pels elevats nivells de ferro intracel.lular deguts a la hiperactivació d'Aft1 en absència simultània de Grx3 i Grx4, eren la causa de la no inducció de Slt2, de la elevada despolarització del citoesquelet d'actina i de la major sensibilitat cel.lular en el doble mutant *grx3grx4* en resposta a estrès oxidatiu.

D'acord amb aquestes dades i donat que el mutant simple *grx3* no presentava defectes en l'activació de Slt2, sino que era l'absència de Grx4 la causa dels defectes en la correcta fosforilació de Slt2, vam concloure que Grx4 era la principal glutaredoxina encarregada de regular l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.

D'altra banda, la sobreexpressió de Grx4 en la soca salvatge potenciava l'activació transcripcional de *SLT2* en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu, dada que es correlacionava amb un augment en la viabilitat cel·lular de la soca salvatge sobreexpressant Grx4 en resposta a peròxid d'hidrogen. Aquest increment en la transcripció de *SLT2* no es correlacionava amb un augment en la fosforilació de Slt2 ni amb un augment en els nivells transcripcionals de *PST1*, demostrant que la sobreexpressió de Grx4 en la soca salvatge regulava positivament la via *PKC1* a nivell transcripcional. La sobreexpressió de Grx4 en la soca salvatge sota el promotor exògen *MET*, no provocava un augment en els nivells transcripcionals de *SLT2* resposta a estrès oxidatiu, resultat que demostrava que la sobreexpressió Grx4 actuava directament sobre el promotor de *SLT2*. A més a més, la sobreexpressió de Grx4 no augmentava els nivells transcripcionals de *PST1*, dada que demostrava que Grx4 no actuava sobre altres promotors regulats per Rlm1, com *PST1*, sino que es tractava d'una regulació específica sobre Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

En canvi, la sobreexpressió de Grx3 en la soca salvatge inhibia la fosforilació de Slt2 i disminuïa la transcripció gènica de *SLT2* en resposta a estrès oxidatiu, resultats que guardaven relació amb un augment en la sensibilitat cel·lular de la soca salvatge sobreexpressant Grx3 en resposta a peròxid d'hidrogen. Sota el promotor exògen *MET*, la sobreexpressió de Grx3 en la soca salvatge induïa la fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu. Aquesta dada demostrava que la sobreexpressió de Grx3 actuava directament sobre el promotor de *SLT2*, exercint un efecte inhibitori sobre l'activació transcripcional de *SLT2* en resposta a estrès oxidatiu. La sobreexpressió de Grx3 no disminuïa els nivells transcripcionals de *PST1*. Aquesta dada demostrava que Grx3 tampoc no actuava sobre altres promotors regulats per Rlm1, sino que aquesta regulació també era específica sobre Slt2 en resposta a estrès oxidatiu, com succeïa amb Grx4.

- Mecanisme de regulació de l'activació de via *PKC1* per Grx3 i Grx4 en resposta a estrès oxidatiu.

Les quinases i les fosfatases són proteïnes que regulen els nivells de fosforilació de Slt2 i en conseqüència l'activació de la via *PKC1* en resposta als diversos estímuls rebuts (Schmelze *et al.*, 2002; Casamayor *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2005). La fosforilació de Slt2 detectada amb la sobreexpressió de les quinases *BCK1-20* o Slt2 en el doble mutant *grx3grx4* en condicions oxidatives, descartava que el paper de Grx3 i Grx4 sobre la via *PKC1* fos a través de inhibir l'activitat de les quinases reguladores de Slt2. Per aquest motiu,

vam decidir analitzar la participació de l'activitat fosfatasa com a causa de l'absència de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu en el doble mutant *grx3grx4*.

Recentment, Fox *et al.*, (2007) han demostrat que Sdp1 i Msg5, dues fosfatases d'especificitat dual classificades dins la família de les WH fosfatases, eren activades en presència d'agents oxidants. L'absència d'activació de Slt2 en el doble mutant *grx4sdp1* descartava a la fosfatasa Sdp1 com a medidora de la defosforilació de Slt2 en condicions oxidatives en el mutant *grx4*. En canvi, la fosforilació de Slt2 detectada en el doble mutant *grx4msg5*, demostrava que Msg5 era la fosfatasa que defosforilava Slt2 en el mutant *grx4* en resposta a estrès oxidatiu. A més a més, el doble mutant *grx4msg5* restablí els nivells transcripcional de *SLT2* i de *PST1*, la viabilitat cel·lular i la organització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu del mutant *grx4*. Totes aquestes dades ens van permetre elaborar un model on Msg5 regularia negativament a Slt2 en absència de Grx4.

Flandez *et al.*, (2004) van descriure *in vitro* que Msg5 interaccionava amb Slt2 i reduïa els nivells basals de fosforilació de la quinasa. La defosforilació de Slt2 detectada durant la sobreexpressió de la fosfatasa Msg5 en la sota salvatge en presència de peròxid d'hidrogen, però no a 38°C, demostraven que Msg5, a banda de regular els nivells basals de fosforilació de Slt2, també defosforilava a Slt2 específicament en resposta a estrès oxidatiu.

D'altra banda, Msg5 defosforilava i inactivava la quinasa Fus3 que forma part de la via de resposta a feromones (Doi *et al.*, 1994). L'absència de fosforilació de Fus3 en el mutant *grx4* en resposta a peròxid de hidrogen i restablerta a nivells del mutant *msg5* en el doble mutant *grx4msg5*, reforçava més el model proposat en el qual en absència de Grx4, Msg5 estava més activada en resposta a estrès oxidatiu.

Flandez *et al.*, (2004) van demostrar *in vitro* la dissociació del complex entre Msg5 i Slt2 com a mecanisme per regular la fosforilació de Slt2 en resposta a estrès tèrmic. L'increment de l'interacció entre Msg5 i Slt2 en el mutant *grx4* en resposta a peròxid d'hidrogen era consistent amb la major activitat fosfatasa de Msg5 sobre Slt2 detectada en absència de Grx4 i en conseqüència amb els baixos nivells de fosforilació de Slt2 que presentava el mutant *grx4* en resposta a estrès oxidatiu. Donat que Msg5 no interaccionava físicament ni amb Grx3 ni amb Grx4, les nostres dades apuntaven a que en absència de Grx4 s'afavoria l'accés de la fosfatasa Msg5 a Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

D'acord amb aquesta hipòtesi, l'absència de fosforilació de Slt2 i en conseqüència, l'absència de transcripció de *SLT2* i de *PST1* i la elevada sensibilitat cel·lular observada en

el triple mutant *grx3grx4msg5* en resposta a estrès oxidatiu, suggerien un mecanisme més complex que implicava la funció de la glutaredoxina Grx3 en el model de regulació de la fosforilació de Slt2 per part de Grx4 a través de Msg5 en resposta a estrès oxidatiu.

Una possible explicació de les diferències en la fosforilació de Slt2 entre els mutants *grx4msg5* i *grx3grx4msg5*, podria ser deguda a una qüestió estequiometria en relació al nombre de molècules de Slt2 doblement fosforilades que l'anticòs p44/42 era capaç de detectar en resposta a estrès oxidatiu. En absència simultània de Grx3 i Grx4, els nivells de proteïna total Slt2 eren molt més baixos que les nivells detectats en el mutant *grx4*. A més a més, els nivells de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu eren comparativament més baixos que els nivells detectats en resposta a dany en la paret cel·lular, fet que dificultava encara més la detecció de la fosforilació de Slt2 en una situació de baixos nivells de proteïna Slt2. El restabliment de la fosforilació de Slt2 augmentant el nombre de molècules de Slt2 i hiperactivant la via *PKC1* en el triple mutant *grx3grx4msg5* demostraven aquesta hipòtesi. No obstant, en aquestes condicions el triple mutant *grx3grx4msg5* presentava una nivells de fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu més baixos que els nivells detectats en els dobles mutants *grx3msg5* i *grx4msg5*. Aquestes dades demostraven que en absència de Grx4, Grx3 era necessària per la fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.

D'acord amb aquest hipòtesi, la fosforilació de Slt2 observada en el mutant *grx3*, podria ser deguda a l'efecte redundat que presenten Grx3 i Grx4 en resposta a estrès oxidatiu (Pujol *et al.*, 2006). En el mutant *grx3*, Grx4 assumiria tota la funció d'activació de Slt2. No obstant, en el mutant *grx4*, Grx3 no era capaç d'assumir completament les funcions regulades per Grx4. Una possible explicació podria ser deguda a la defosforilació que Msg5 provocava sobre Slt2 en absència de Grx4. La conseqüència d'aquest fet seria un desequilibri en la fosforilació de Slt2, produint com a efecte final uns baixos nivells de fosforilació de Slt2 en el mutant *grx4* en resposta a estrès oxidatiu.

L'estudi dels possibles models d'interacció entre Grx3, Grx4 i Slt2 mitjançant el programa informàtic *Swiss Model* i en col·laboració amb Dr. Rui Alves, membre del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina de Lleida, van determinar que els dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 potencialment podrien interaccionar amb el domini catalític N-terminal de Slt2, concretament per la regió situada entre els aminoàcids 100 i 200 on es localitzaven els residus fosforilables treonina 190 i tirosina 192 del centre actiu. Aquestes dades eren consistents amb les interaccions físiques detectades *in*

in vivo entre Slt2 i els dominis TRX de Grx3 i Grx4 i amb el fet que els dominis TRX activessin la fosforilació de Slt2 en els mutants *grx4* i *grx3grx4* en resposta estrès oxidatiu.

En conclusió, l'augment de l'interacció entre Msg5 i Slt2 en absència de Grx4 en resposta a estrès oxidatiu i l'interacció entre els dominis TRX de Grx3 i Grx4 i el domini N-terminal de Slt2 que incloïa el centre actiu de la quinasa, ens permetia proposar el següent model de regulació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu per part de Grx3, Grx4 i Msg5: Grx3, Grx4 i Slt2 estarien formant un complex dins del nucli. Dins d'aquest complex, la glutaredoxina Grx4 regularia positivament l'activació de la quinasa Slt2 en resposta a estrès oxidatiu impedit l'accés de la fosfatasa Msg5 al centre actiu de Slt2 i evitant així la seva defosforilació. No obstant, per permetre la correcta fosforilació de Slt2, Grx4 requeriria de l'activitat de Grx3, fent imprescindible la funció cooperativa d'ambdues glutaredoxines per regular, mitjançant els seus respectius dominis TRX, la correcta fosforilació de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu. No obstant, el mecanisme precís amb el qual es duu a terme aquest procés, encara no està caracteritzat

– Organització del citoesquelet d'actina per Grx3, Grx4 i Slt2.

Les dades publicades en el nostre laboratori per Vilella *et al.*, (2005), van demostrar que la quinasa Pkc1 era necessària per la ràpida repolarització dels cables d'actina i pel restabliment de la polaritat del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu. Concretament, en l'article recentment publicat en FEMS Yeast Research (Pujol i Bonet *et al.*, 2009) demostrem que la profilina Pfy1, una proteïna necessària per l'ensamblatge del cables d'actina, necessitava la funció de Pkc1 per ensamblar correctament els cables d'actina i reorganitzar el citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu.

L'absència de repolarització del citoesquelet d'actina detectada en el mutant *slt2* en resposta a peròxid d'hidrogen, però no en condicions normals, demostraven per primera vegada que altres components de la via *PKC1* com Slt2, participaven en la correcta reorganització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu.

D'altra banda, el mutant *grx3* no presentava defectes en la correcta polarització del citoesquelet d'actina, mentre que el mutant *grx4* presentava una parcial despolarització del del citoesquelet en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu respecte a la soca salvatge. Per aquest motiu, vam concloure que la elevada desorganització del citoesquelet d'actina detectada en el doble mutant *grx3grx4* era deguda principalment a l'absència de

Grx4. A més a més, aquestes dades mostraven el paper rellevant de Grx4 en els processos de polarització del citoesquelet d'actina.

No obstant, la elevada despolarització del citoesquelet detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2* en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu respecte al doble mutant *grx3grx4*, demostrava que totes tres proteïnes, Grx3, Grx4 i Slt2, participaven activa i conjuntament en l'organització del citoesquelet d'actina. La repolarització del citoesquelet en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu detectada en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Slt2 i en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant les proteïnes senceres Grx3 i Grx4, confirmaven aquesta hipòtesi. A més a més, la reorganització del citoesquelet d'actina detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant els dominis TRX de Grx3 i Grx4 demostraven més concretament, el paper directe dels dominis TRX de Grx3 i Grx4 sobre els processos que regulen l'organització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu. Finalment, demostravem que aquesta funció dels dominis TRX sobre el citoesquelet d'actina la duïen a terme independentment de l'activitat de Slt2. Aquestes dades també guardaven relació amb la major activació de la via *PKC1* en els mutants *grx4* i *grx3grx4* sobreexpressant els dominis TRX de Grx3 i Grx4 i amb el restabliment de la viabilitat cel.lular detectada en els mutants *grx4*, *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* sobreexpressant els dominis TRX en resposta a estrès oxidatiu.

No obstant, la sobreexpressió dels dominis GRX de Grx3 i Grx4 restablien la viabilitat cel.lular dels mutants *grx4*, *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* malgrat no contribuir en l'activació de la via *PKC1* ni en la reorganització del citoesquelet d'actina en condicions normals ni resposta a estrès oxidatiu. Una possible explicació d'aquest fet podria ser deguda a que, tal i com vam publicar en Pujol *et al.*, (2006), els dominis GRX de Grx3 i Grx4 regulaven l'exportació nuclear d'Aft1 com a mecanisme per disminuir els nivells de ferro intracel.lulars. Com a conseqüència d'aquest procés, es produïa un descens en els nivells de radicals superòxid i en conseqüència la disminució de l'estrès oxidatiu endògen present en els mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2*.

En resum, els nostres resultats ens permeten demostrar les diferències funcionals entre els dominis GRX i TRX de Grx3 i Grx4 en condicions oxidatives: mentre que els dominis GRX participen en la regulació de l'homeòstasi del ferro a través del factor transcripcional d'Aft1 (Pujol *et al.*, 2006), els dominis TRX participen en l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu i en la organització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.

Delley *et al.*, (1999) van demostrar que una hiperactivació de la via *PKC1* causava despolarització de l'actina. Més tard, Harrison *et al.* (2001) van demostrar l'efecte contrari, on la desorganització del citoesquelet d'actina era l'estímul que activava la via *PKC1*. Fins l'actualitat, ambdós mecanismes que relacionen l'activació de la via *PKC1* i la desorganització del citoesquelet d'actina estan acceptats. Per aquest motiu, es fa difícil diferenciar si la despolarització del citoesquelet indueix la fosforilació de Slt2 i si aquest fet és necessari per la viabilitat cel·lular o si pel contrari, una hiperactivació de la via indueix una despolarització del citoesquelet d'actina que produiria a la llarga efectes deterèris en la cèl·lula.

La repolarització del citoesquelet d'actina i la viabilitat cel·lular en resposta a estrès oxidatiu detectada en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant l'al·lel *BCK1-20*, demostraven que no sempre la hiperactivació de la via *PKC1* era la causa de la despolarització del citoesquelet d'actina i de la pèrdua de viabilitat en la cèl·lula.

D'altra banda, la reorganització del citoesquelet d'actina detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant *Grx3*, *Grx4* o els seus respectius dominis *TRX*, mostraven una situació on la reorganització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu es realitzava independentment de la fosforilació de Slt2. A més a més, en aquestes condicions el restabliment de la viabilitat cel·lular del triple mutant *grx3grx4slt2* en resposta a peròxid d'hidrògen, demostraven que en certes situacions de reorganització del citoesquelet d'actina no era necessària l'activitat de Slt2 per mantenir la viabilitat cel·lular.

En resum, nosaltres aportem dades que suggereixen que no sempre és l'activació de Slt2 qui indueix la desorganització del citoesquelet d'actina. Els nostres resultats demostraven que en algunes situacions, sembla ser primer la desorganització del citoesquelet d'actina qui senyalitza la fosforilació de Slt2 i en conseqüència l'activació de la via *PKC1*.

– Funció reparadora de la via *PKC1* en condicions oxidatives.

L'increment en els nivells basals de fosforilació de Slt2 en absència de *Msg5*, anava acompanyada d'un augment en els nivells de radicals superòxid respecte als nivells detectats en la soca salvatge, fet que es correlacionava amb la major sensibilitat cel·lular del mutant *msg5* en resposta a estrès oxidatiu. Aquestes dades guardaven relació amb els resultats publicats en Flandez *et al.*, (2004) que suggerien que la sensibilitat cel·lular del mutant *msg5* a

Congo Red era deguda a la hiperactivació de Slt2 en condicions basals. A més a més, la elevada sensibilitat cel·lular observada en el mutant *msg5* hiperactivant la via amb l'al·lel *BCK1-20* en resposta a peròxid d'hidrogen, evidenciava una situació on els elevats nivells basals d'activació de Slt2, incrementats per una hiperactivació exògena de la via *PKC1*, resultaven deletèris per la cèl·lula.

La sobreexpressió de Slt2 o l'al·lel *BCK1-20* incrementava els nivells d'oxidació endògena de la soca salvatge, tal i com ho demostraven els elevats nivells de radicals superòxid. En aquestes condicions, els nivells transcripcionals de *FET3* i de *FIT3* en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Slt2 eren igual d'elevats que els nivells detectats en el doble mutant *grx3grx4*. Per aquest motiu, els elevats nivells de ferro intracel·lular deguts a la hiperactivació d'Aft1 i el augment del metabolisme respiratori, conseqüència de la hiperactivació de la via *PKC1*, podrien ser la causa dels majors nivells d'oxidació endògena detectats en el doble mutant *grx3grx4* en condicions de hiperactivació de la via amb l'al·lel *BCK1-20* o sobreexpressant Slt2. Malgrat tot, en aquestes condicions d'oxidació endògena, el al·lel *BCK1-20* o la sobreexpressió de Slt2 restablien la viabilitat cel·lular i la organització del citoesquelet d'actina del doble mutant *grx3grx4*.

Aquestes dades demostraven el paper reparador de la via *PKC1* en condicions oxidatives, donat que l'activació de la via *PKC1* es feia necessària per mantenir la viabilitat cel·lular i la polarització del citoesquelet d'actina en una situació on la cèl·lula no era detoxificada dels elevats nivells d'ions superòxid o dels elevats nivells de ferro intracel·lular que causaven aquest estrés oxidatiu.

– Paper funcional de Grx3, Grx4 i Slt2 en la biogènesi vacuolar.

Els processos d'exocitosi i d'endocitosi dins la cèl·lula són mecanismes bàsics per permetre el tràfic de molècules entre els diferents compartiments intracel·lulars. La vacuola del llevat, equivalent al lisosoma de les cèl·lules eucariotes superiors, és un dels orgànuls clau que forma part d'aquestes vies de tràfic vesicular (Clemens *et al.*, 2008).

La fragmentació vacuolar detectada en el triple mutant mutant *grx3grx4slt2* amb el colorant FM4-64, respecte a la vacuola homogènia que presentaven la soca salvatge i els mutants simples *slt2*, *grx3* i *grx4*, suggeria que Grx3, Grx4 i Slt2 participaven conjuntament en la biogènesi vacuolar.

La fragmentació vacuolar en el triple mutant *grx3grx4slt2*, recordava als mutants en proteïnes vacuolars *vps* de classe B descrites per primera vegada per Banta *et al.*, (1988). Anys més tard, Bonangelino *et al.*, (2002) va determinar que alguns mutants *vps* de classe B presentaven defectes en la correcta maduració de la glicoproteïna soluble Carboxipeptidasa Y (CPY) que forma part dels enzims hidrolítics localitzats dins de la vacuola. Com moltes altres proteïnes vacuolars, la CPY es sintetitza en el reticle endoplasmàtic, es glicosila en l'aparell de Golgi i finalment es processa en la seva forma madura i activa dins de la vacuola. La presència de formes immadures de la proteïna CPY indicava problemes en els primers estadis de les vies de secreció (Robinson *et al.*, 1988). No obstant, la presència de la forma vacuolar madura CPY en el triple mutant *grx3grx4slt2* descartava els defectes en les vies de secreció com a causa de la fragmentació vacuolar detectada amb l'absència simultània de Grx3, Grx4 i Slt2.

L'estudi de l'endocitosi amb el colorant Lucifer Yellow es una altra eina senzilla per observar microscòpicament defectes en la biogènesi vacuolar (Nevalainen *et al.*, 1991; Wada *et al.*, 1992). Aquest colorant penetra dins la cèl.lula mitjançant vesícules endocítiques i es transportat a l'interior de la vacuola presuntament via endosomes (Diezmar, 1985). Per aquest motiu, problemes en la fase fluida de l'endocitosi tenien com a conseqüència defectes en la internalització del colorant Lucifer Yellow dins de la vacuola. No obstant, la correcta acumulació de Lucifer Yellow dins de la vacuola del triple mutant *grx3grx4slt2* també descartava defectes en les vies d'endocitosi com a causa de la fragmentació vacuolar.

Corson *et al.*, (1999) van descriure que el mutant en la proteïna detoxificadora de radicals superòxid *sod1*, presentava fragmentació vacuolar degut a l'estrès oxidatiu endògen causat per l'acumulació de radicals superòxid dins de la cèl.lula.

D'una banda, la presència d'una vacuola uniforme i de contorn homogeni en el triple mutant *grx3grx4aft1* demostrava que la desregulació d'Aft1 era la causa de la morfologia vacuolar aberrant observada en el doble mutant *grx3grx4*. Aquesta conclusió era reforçada pel fet de que la sobreexpressió de Grx3 i Grx4 restablia la morfologia vacuolar del doble mutant *grx3grx4*, degut a la disminució dels elevats nivells de ferro intracel.lulars (Pujol *et al.*, 2006). A més a més, el restabliment de la morfologia vacuolar del doble mutant *grx3grx4*, mitjançant la recreació d'una situació de baixos nivells de ferro intracel.lular amb el quelant de ferro Ferrocina (Pujol *et al.*, 2006) o amb la reducció dels nivells de radicals superòxid, a través de l'addició en el medi d'ions Mn^{+2} (Lapinskas *et al.*, 1995) confirmaven aquest fet.

D'altra banda, la sobreexpressió de Slt2 restablia completament la morfologia vacuolar del doble mutant *grx3grx4*. No obstant, els nivells transcripcionals de *FET3* i de *FIT3* en el doble mutant *grx3grx4* sobreexpressant Slt2 eren igual d'elevats que els nivells detectats en el doble mutant *grx3grx4*, fet que demostrava que la sobreexpressió de Slt2 en aquest cas no restablia els elevats nivells de ferro intracel·lular i d'oxidació endògena del doble mutant *grx3grx4*. Aquestes dades demostraven que una altra via per compensar els defectes en la biogènesi vacuolar del doble mutant *grx3grx4*, independentment dels nivells del ferro intracel·lular i dels radicals superòxid, era a través de Slt2.

En resum, les nostres dades demostraven l'existència de dues vies per solucionar els defectes en la biogènesi vacuolar presents en el doble mutant *grx3grx4* com a conseqüència de l'oxidació endògena causada per l'acumulació de ferro intracel·lular deguda a la hiperactivació d'Aft1: d'una banda, mitjançant la reducció d'aquests nivells de ferro intracel·lulars que causaven dany en la vacuola. D'altra banda, mitjançant la sobreexpressió de Slt2, fet que demostrava el paper reparador de Slt2 en la biogènesi vacuolar en condicions d'estrès oxidatiu endògen causats per els elevats nivells de ferro intracel·lulars.

Problemes en la biogènesi vacuolar afecten directament a les funcions vacuolars relacionades amb l'emmagatzemament de nutrients (Teichert *et al.*, 1989; Klionsky *et al.*, 1990), l'homeòstasi del pH (Banta *et al.*, 1988; Nishi *et al.*, 2002; Kane *et al.*, 2006), l'homeòstasi del Calci (Strayle *et al.*, 1999; Clements *et al.*, 2008) o el creixement en fonts de carboni no fermentables (Van Voorst *et al.*, 2006).

En el doble mutant *grx3grx4*, la pèrdua del 60% de la viabilitat cel·lular en una situació de dèficit de nutrients o la reducció en un 30% de la supervivència cel·lular en presència de canvis en el pH extracel·lular, eren restablerts amb la sobreexpressió de Slt2 pràcticament als nivells de la soca salvatge. Aquestes dades eren consistents amb el restabliment de la morfologia vacuolar del doble mutant *grx3grx4* per part de Slt2 i demostrava que problemes en la correcta biogènesi vacuolar tenien com a conseqüència defectes en las funcions vacuolars. A més a més, reforçaven encara més la hipòtesi sobre la funció reparadora de Slt2 en la biogènesi i en les funcions vacuolar en condicions d'estrès oxidatiu endògen causat per l'acumulació de ferro intracel·lular

En el triple mutant *grx3grx4slt2* presentava una elevada pèrdua de la viabilitat cel·lular en condicions de dèficit de nutrients de gairebé el 80%, respecte a la pèrdua del 60% detectada en el doble mutant *grx3grx4*. A més a més, la viabilitat cel·lular del triple mutant *grx3grx4slt2* davant canvis en el pH extracel·lular era reduïda un 55% respecte a la

reducció del 30% observada en el doble mutant *grx3grx4*. Aquestes dades demostraven que la fragmentació vacuolar causada per l'absència simultània de Grx3, Grx4 i Slt2 provocava efectes més greus sobre les funcions vacuolars que el simple dany vacuolar causat pels elevats nivells de ferro intracel·lular deguts a l'absència de Grx3 i Grx4. A més a més, les sobreexpressions de Grx3, Grx4 i Slt2 restablien en part la morfologia i de les funcions vacuolars del triple mutant *grx3grx4slt2* relacionades amb el creixement en fonts de carboni no fermentables com el glicerol i el lactat, davant els nivells d'ions Ca^{+2} extracel·lulars, en presència d'agents que danyaven la paret cel·lular, com el Congo Red o el Calcofluor White o que causaven estrès oxidatiu, com el peròxid d'hidrogen. Tot plegat, reforçava la nostra hipòtesi inicial sobre una funció comuna regulada per Grx3, Grx4 i Slt2 en els processos implicats en la biogènesi vacuolar.

Gonzalez *et al.*, (2006) vam observar que el mutant en la fosfatasa *ptc1* presentava fragmentació vacuolar i que la sobreexpressió de la proteïna vacuolar Vps73, proteïna mitocondrial de funció desconeguda implicada en funcions vacuolars, restablia la morfologia vacuolar del mutant *ptc1* als nivells de la soca salvatge. Com a conseqüència d'aquest fet, es restablia la viabilitat cel·lular del mutant *ptc1* davant agents que causaven dany en paret cel·lular com el Congo Red, el Calcofluor White o la Cafeïna, en resposta a canvis en els nivells de Ca^{+2} extracel·lulars, en presència de metalls pesats com els ions Zinc o en presència de pH alcalí. Aquestes dades suggerien que la biogènesi vacuolar era una de les principals dianes regulades per la fosfatasa Ptc1.

Bonangelino *et al.*, (2002) van classificar el mutant *vps73* dins de la classe B de mutants en proteïnes vacuolars (*vps*). Els mutants *vps* de classe B es caracteritzaven per presentar fragmentació vacuolar, fenotip que recordava la morfologia vacuolar detectada en el triple mutant *grx3grx4slt2*. D'altra banda, la proteïna Vps4, ATPasa vacuolar relacionada amb els cossos vesiculars, estava inclosa dins de la classe E dels mutants *vps* (Raymond *et al.*, 1992). Els mutants *vps* de classe E es caracteritzaven per la presència d'un segon compartiment adjacent a la vacuola (que anomenaren compartiment de classe E) on també s'acumulaven proteïnes vacuolars. A més a més, els mutants *vps* de classe E com *vps4*, també es caracteritzaven per secretar quantitats de carboxipeptidasa Y (CPY) madura similars a les detectades en la soca salvatge, fenotip que també era visible en el triple mutant *grx3grx4slt2*.

En condicions normals, les sobreexpressions de Vps73 i Vps4 restablien completament la morfologia vacuolar del doble mutant *grx3grx4* i la del triple mutant

grx3grx4slt2. Com a conseqüència d'aquest fet, les viabilitats cel·lulars dels mutants *grx3grx4* i *grx3grx4slt2* davant agents que danyaven la paret cel·lular i causaven estrès oxidatiu o davant els diversos estressos relacionats amb la biogènesi vacuolar, com canvis en el nivells de Ca^{+2} o de pH extracel·lular o la presència de glicerol en el medi, també eren restablertes amb la sobreexpressió de Vps73 i Vps4.

La morfologia vacuolar del triple mutant *grx3grx4slt2* no era restablerta ni amb la reducció dels elevats nivells de ferro intracel·lular, com es demostrava amb la presència en el medi del quelant de ferro Ferrocina o amb la sobreexpressió de Grx3 i Grx4, ni amb la disminució dels elevats nivells de radicals superòxid, com es demostrava amb la presència en el medi d'ions Mn^{+2} . Aquestes dades mostraven que l'oxidació endògena no era causa de la fragmentació vacuolar en absència simultània de Grx3, Grx4 i Slt2. A més a més, la sobreexpressió de Slt2 i de les proteïnes Vps73 i Vps4 restablien la morfologia vacuolar, malgrat no disminuir els elevats nivells d'oxidació endògena presents en el triple mutant *grx3grx4slt2*, dades que confirmava l'anterior hipòtesi.

En resum, les dades mostraven que l'augment en els nivells de ferro intracel·lular o l'increment en els nivells de radicals superòxid no eren la causa de la fragmentació vacuolar en el triple mutant *grx3grx4slt2*. Més bé, les nostres dades suggerien que la causa de la fragmentació vacuolar era deguda a una funció comuna regulada per Grx3, Grx4 i Slt2 a través de almenys les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4.

-Funció dels dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 en relació al citoesquelet d'actina i la biogènesi vacuolar.

Les vies de transport vesicular i el citoesquelet d'actina són mecanismes estretament relacionats (Bryant *et al.*, 1998). El restabliment de la morfologia vacuolar acompanyada d'una repolarització del citoesquelet d'actina en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant Slt2 o les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4 guardava relació amb les dades publicades per Isgandarova *et al.*, (2007) on demostraven que la fusió de les membranes vacuolars era el mecanisme precursor per induir la polimerització de l'actina.

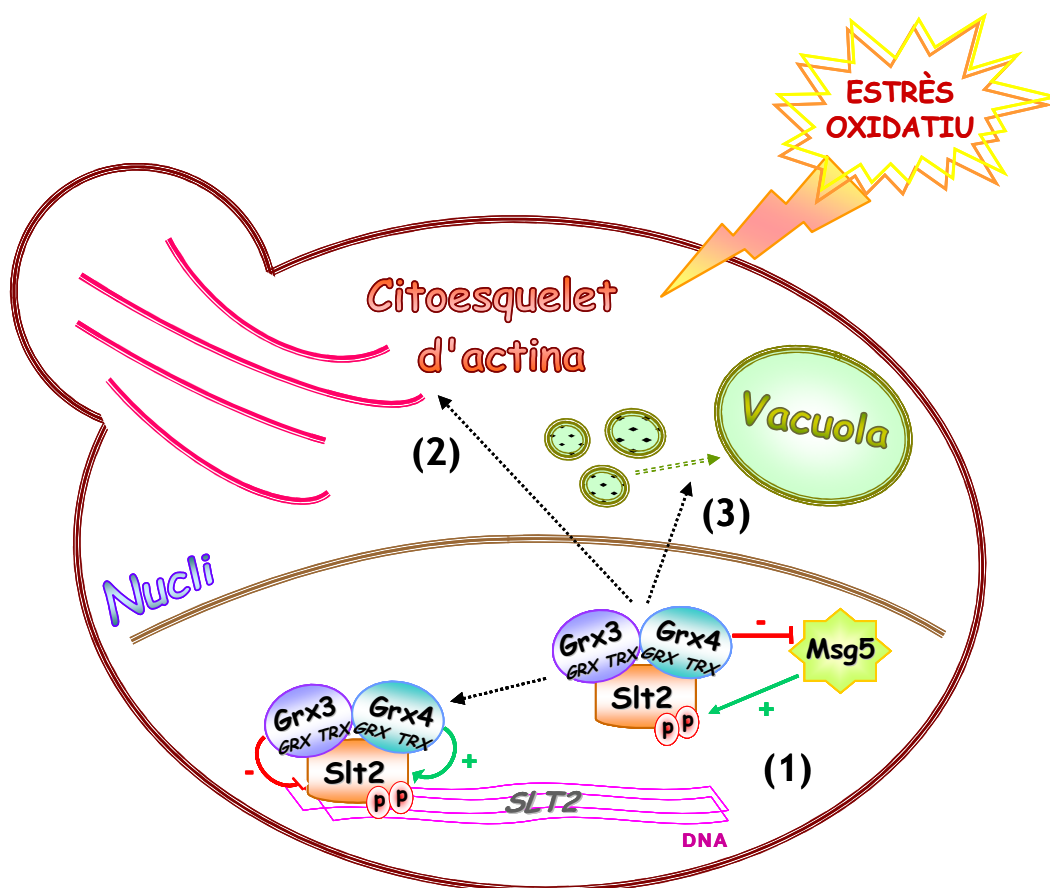
No obstant, la sobreexpressió dels dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 no restablien l'estructura vacuolar ni les funcions vacuolars relacionades amb el creixement cel·lular en condicions de dèficit de nutrient o davant canvis en el pH extracel·lular del doble mutant

grx3grx4. A més a més, la morfologia vacuolar i les funcions vacuolars relacionades amb el creixement cel·lular en presència de glicerol i lactat tampoc era restablertes en el triple mutant *grx3grx4slt2* sobreexpressant els dominis TRX. No obstant, els dominis TRX restablien la polarització del citoesquelet d'actina en els mutants *grx3grx4* i *grx4grx4slt2*. Aquestes dades demostraven que els dominis TRX de Grx3 i Grx4 restauraven el citoesquelet d'actina independentment de l'activitat de Slt2 i de la biogènesi vacuolar.

Les dades publicades per Isgandarova *et al*, (2007) també demostraven, mitjançant inhibidors de les proteïnes Rab/SNARE implicades en els primers passos d'anclatge i d'unió de les membranes vacuolars, que la polimerització de l'actina es realitzava de manera independent a la fusió de les membranes vacuolars en els primers estadis de la biogènesi vacuolar. D'acord amb aquesta observació, la causa de la repolarització del citoesquelet d'actina per part dels dominis TRX independentment de la biogènesi vacuolar, podria ser deguda a que la funció reparadora del domini TRX sobre el citoesquelet d'actina es duïa a terme al menys en els primers estadis de la biogènesi vacuolar, on l'organització del citoesquelet d'actina i la biogènesi vacuolar eren mecanismes independents.

En el següent esquema es representen les principals conclusions extretes en aquest segon Capítol de la present Tesis Doctoral en relació a:

- La regulació de la via *PKC1* per Grx3 i Grx4 en resposta a estrès oxidatiu.
- La regulació de Grx3, Grx4 i Slt2 en l'organització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.
- La funció de Grx3, Grx4 i Slt2 en la biogènesi vacuolar en condicions normals.



(1) En resposta a estrès oxidatiu, les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 regulen la quinasa Slt2 dins del nucli a través dels següents mecanismes:

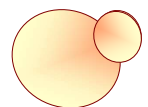
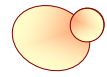
- Grx4 regula la fosforilació de Slt2 inhibint directa o indirectament l'activitat fosfatasa de Msg5 sobre Slt2.

- Grx3 i Grx4, juntament amb Slt2, regulen els nivells transcripcionals de *SLT2*.

(2) Grx3, Grx4 i Slt2 participen en l'organització del citoesquelet d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu. No obstant, els dominis *TRX* de Grx3 i Grx4 podrien participar en aquesta funció independentment de l'activitat de Slt2

(3) En condicions normals Grx3, Grx4 i Slt2 presenten una funció comuna sobre la biogènesi vacuolar.

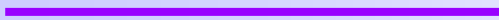
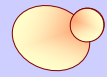
4.6- CONCLUSIONS



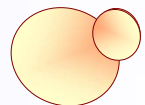
Les conclusions extretes dels resultats presentats en aquest segon Capítol són les següents:

1. Grx3 i Grx4 són dues glutaredoxines monotioliques necessàries per la correcta fosforilació de Slt2 i la consegüent activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu.
2. L'absència simultània de Grx3 i Grx4 genera un estrès oxidatiu endògen causat per l'augment dels nivells de ferro intracel·lulars com a conseqüència de l'activació constitutiva d'Aft1. No obstant, aquesta no és la principal causa que provoca els defectes en l'activació i en les funcions regulades per la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu en el doble mutant *grx3grx4*.
3. Grx3, Grx4 interaccionen amb Slt2 en el nucli a través dels dominis *TRX* i *GRX* respectivament.
4. Grx3 i Grx4, al contrari del que succeeix amb Aft1, no regulen la localització nucli-citoplasmàtica de Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.
5. Grx3 i Grx4 regulen l'activació de la via *PKC1* en resposta a estrès oxidatiu a través dels respectius dominis funcionals *TRX*.
6. La sobreexpressió de Grx3 en la soca salvatge provoca sensibilitat cel·lular davant estrès oxidatiu, a més a més d'inhibir els nivells transcripcionals de *SLT2* en resposta a dit estrès.
7. La sobreexpressió de Grx4 en la soca salvatge confereix resistència cel·lular davant estrès oxidatiu, a més a més de potenciar els nivells transcripcionals de *SLT2* en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.
8. Msg5, fosfatasa d'especificitat dual, defosforila Slt2 en condicions d'estrès oxidatiu.

9. Grx3 i Grx4 no interaccionen físicament amb Msg5, però en absència de Grx4 s'augmenta la interacció *in vivo* entre Msg5 i Slt2 en resposta a estrès oxidatiu.
10. La regulació de Slt2 per part de Grx3 i Grx4 és principalment a nivell postraduccional: presentem un model on Grx4 regula la fosforilació de Slt2, cooperativament amb Grx3, impedit que la fosfatasa Msg5 tingui accés a Slt2 i la defosforili en resposta a estrès oxidatiu.
11. Slt2 participa en la repolarització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu.
12. Grx3 i Grx4 participen en la organització del citoesquelet d'actina a través dels respectius dominis TRX en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu, independentment de la funció de Slt2.
13. L'activació de la via PKC1 és necessària per mantenir l'integritat cel.lular en una situació d'estrès oxidatiu endògen, on la cèl.lula no és detoxificada ni dels elevats nivells de ferro intracel.lulars, deguts a la hiperactivació d'Aft1 en absència de Grx3 i Grx4, ni dels elevats nivells de radicals superòxid, generats per la hiperactivació de la via PKC1 com a conseqüència d'un augment en el metabolisme respiratori.
14. L'estrès oxidatiu endògen causat per l'increment en els nivells de ferro intracel.lulars degut a l'activació constitutiva d'Aft1 en absència simultània de Grx3 i Grx4, provoca morfologies aberrants en la vacuola i alteren algunes funcions relacionades amb la biogènesi vacuolar.
15. Els dominis TRX de Grx3 i Grx4 participen en la organització del citoesquelet d'actina independentment dels mecanismes implicats en la biogènesi vacuolar en condicions normals
16. Ni l'increment en els nivells de ferro intracel.lulars, ni l'augment en els radicals superòxid són la causa de la fragmentació vacuolar del triple mutant *grx3grx4slt2*. Aquest fenotip correspondria a una funció comuna regulada per Grx3, Grx4 i Slt2 a través de al menys les proteïnes vacuolars Vps73 i Vps4.



5- ANNEX



5.1- INTRODUCCIÓ.

En aquest Annex es presenta l'article recentment publicat en FEMS Yeast Research sobre l'estudi de la quinasa Pkc1 de la via d'integritat cel.lular i la profilina Pfy1 en relació als processos de repolarització del citoesquelet d'actina i en la supervivència cel.lular en resposta a estrès oxidatiu.

Una de les novetats d'aquest treball ha estat l'ús *in vitro* de la tècnica de FRAP, que ens va permetre analitzar el mecanisme de polimerització de l'actina utilitzant extractes proteïcs totals de *S.cerevisiae* i actina purificada de múscul de conill.

Amb aquest assaig demostrem que Pfy promou l'ensamblatge dels monòmers d'actina en condicions d'estrès oxidatiu, mentre que Pkc1 indueix aquesta polimerització de l'actina i la supervivència cel.lular en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu. A més a més, presentem resultats que suggereixen la relació funcional entre Pkc1 i Pfy en els processos de polimerització del citoesquelet d'actina, mecanisme necessari per l'adaptació cel.lular en resposta a estrès oxidatiu.

5.2- ANTECEDENTS I OBJECTIUS.

5.2.1-ANTECEDENTS:

Resultats publicats en el nostre grup d'investigació van demostrar que en resposta a estrès oxidatiu, els cables d'actina eren transitòriament dessensamblats i desorganitzats en "patches", distribuïts aleatòriament per tot el citoplasma (de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002). Més tard, Vilella *et al.*, (2005) van descriure el paper antioxidant de Pkc1, al determinar que aquesta quinasa de la via d'integritat cel.lular era necessària per la ràpida repolarització dels cables d'actina i per la restauració de la polaritat del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu, fet que induïa un increment en la viabilitat cel.lular en resposta a dit estrès.

Dong *et al.*, (2003) van descriure que la via *PKC1* estava relacionada amb l'estabilitat del polarisoma i la senyalització de formines i profilines per induir la formació de cables d'actina en resposta a estímuls específics.

Estudis preliminars en el nostre laboratori van suggerir que la sobreexpressió de la profilina Pfy1 en la soca salvatge presentava funcions antioxidants similars a les descrites en Pkc1, donat que Pfy1 augmentava la viabilitat cel.lular i restaurava la polimerització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu.

5.2.2-OBJECTIUS:

1. Caracteritzar la funció de Pkc1 i Pfy1 en els processos de polimerització del citoesquelet d'actina i en la viabilitat cel.lular en resposta a estrès oxidatiu.

2. Desenvolupar un assaig *in vitro* mitjançant la tècnica de FRAP que ens permeti determinar l'activitat polimeritzadora de l'actina (ensamblatge de monòmers d'actina) en presència d'extractes proteics totals de *S.cerevisiae* i actina purificada de múscul de conill.

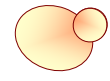
3. Identificar la possible relació funcional entre Pkc1 i Pfy1 en els processos de polimerització de l'actina en resposta a estrès oxidatiu.

5.3- CONCLUSIONS.

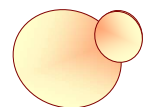
1. Pkc1 i Pfy1 incrementen la supervivència cel.lular davant estrès oxidatiu com a conseqüència de les funcions que realitzen per mantenir l'integritat estructural dels cables d'actina i per permetre la reorganització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès oxidatiu.

2. Pfy1 conserva la capacitat d'activar la polimerització de l'actina independentment de Pkc1, però Pfy1 necessita la funció de Pkc1 per ensamblar els cables d'actina i reorganitzar el citoesquelet en resposta a estrès oxidatiu.

3. Pkc1 requereix de la funció de Pfy1 durant la formació dels cables d'actina en condicions normals i en resposta a estrès oxidatiu.



5.4- ARTICLE 2



Two proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: Pfy1 and Pkc1, play a dual role in activating actin polymerization and in increasing cell viability in the adaptive response to oxidative stress

Nuria Pujol¹, Carmel Bonet^{2*}, Felip Vilella¹, Mima I. Petkova¹, Angel Mozo-Villarías² & Maria Angeles de la Torre-Ruiz¹

¹Department de Ciències Mèdiques Bàsiques-IRBLleida, Faculty of Medicine, University of Lleida, Lleida, Spain; and ²Department de Medicina Experimental, Faculty of Medicine, University of Lleida, Lleida, Spain

Correspondence: Maria Angeles de la Torre-Ruiz, Department de Ciències Mèdiques Bàsiques-IRBLleida, Faculty of Medicine, University of Lleida, Montserrat Roig no. 2, 25008 Lleida, Spain. Tel.: +34 973 702 410; fax: +34 973 702 426; e-mail: madelatorre@cmb.udl.cat

*Deceased.

Received 9 May 2009; revised 31 July 2009; accepted 5 August 2009.

DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00565.x

Editor: Andrew Alspaugh

Keywords

actin cytoskeleton; oxidative stress; Pkc1; profilin; FRAP; actin polarization.

Introduction

Yeast cells maintain their shape, budding processes and internal organization by tightly regulating the actin cytoskeleton organization and the general cell integrity. To achieve this, there must be a very well-organized coordination between several signal transduction pathways and the dynamics of the actin cytoskeleton. In *Saccharomyces cerevisiae*, actin cytoskeleton is organized into microscopic structures called filaments, which are assembled into patches that cluster into the expanding bud, and into cables that are extended throughout the axis of growth of the mother cell (Adams & Pringle, 1984). Actin cables are required for correct polarized cell growth as they function as tracks to transport organelles, secretory vesicles and mRNAs to the nascent bud (Drubin, 1991; Schott *et al.*, 2002). Yeast actin cables are assembled *in vivo* by formins (Feierbach & Chang, 2001; Evangelista *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2002b). The lack of functional formins is reflected in the absence of actin cables

Abstract

In this work, we show that the proteins Pkc1 and Pfy1 play a role in the repolarization of the actin cytoskeleton and in cell survival in response to oxidative stress. We have also developed an assay to determine the actin polymerization capacity of total protein extracts using fluorescence recovery after photobleaching techniques and actin purified from rabbit muscle. This assay allowed us to demonstrate that Pfy1 promotes actin polymerization under conditions of oxidative stress, while Pkc1 induces actin polymerization and cell survival under all the conditions tested. Our assay also points to a relationship between Pkc1 and Pfy1 in the actin cytoskeleton polymerization that is required to adapt to oxidative stress.

(Evangelista *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2002a); therefore, and in accordance with this, the activation of formins leads to the enrichment of cable structures inside cells. Formins also integrate signalling pathways with the control of actin polarity. Both *S. cerevisiae* formins Bnr1p and Bni1p are targets of Rho1 and Rho4 and they also interact with profilin to regulate the organization of the actin cytoskeleton (Imamura *et al.*, 1997).

Profilin is an actin-binding protein found in all the eukaryotic cells studied so far. In budding yeast, profilin is encoded by the *PFY1* gene. Cells without functional Pfy1 are large, abnormal and form buds at random sites and frequently accumulate more than one nucleus in the mother cell (Haarer *et al.*, 1990). In *pfy1* mutants, the actin cytoskeleton is altered, actin cables are not detectable and patches are distributed both in the mother and in the daughter cell (Haarer *et al.*, 1990). Profilin was characterized as an inhibitor for the polymerization of actin monomers (Carlsson *et al.*, 1977). However, in budding yeast, formins

interact with profilin and this interaction is required for the assembly of actin cables (Haarer *et al.*, 1990; Evangelista *et al.*, 2002). The current knowledge fits a model in which formins are activated by Rho1 to nucleate actin filaments through the activity of profilin, and formin–profilin-dependent actin nucleation is mediated by an Arp2/3-independent mechanism (Sagot *et al.*, 2002a, b; Zigmond, 2004). Romero *et al.* (2004) also provide a rationale showing that profilin is required in the assembly of actin cables. These authors show a model that accounts for nucleation of filaments from formin–profilin–actin. They observe that the barbed-end-bound formin–profilin–actin complex accelerated actin filament elongation. Carlier *et al.* (2007), in a recent review, comment as to how the actin–profilin complex can associate with filament barbed ends to participate in their assembly. If all the barbed ends are capped, profilin sequesters actin due to its high affinity for G-actin.

Budding yeast have six Rho GTPases (Cdc42 and Rho1-5) that play a role in several cellular functions related to the reorganization of the actin cytoskeleton and budding processes (Hall, 1994; Cid *et al.*, 1995; Takai *et al.*, 1995; Tanaka & Takai, 1998). Rho1 is necessary for formin activation at high temperatures, acting through the protein kinase C, Pkc1 (Dong *et al.*, 2003). Both Rho1 and Pkc1 are elements of the PKC1-MAPK pathway (cell integrity pathway). Rho1 activates Pkc1, which in turn activates an MAPK module (Levin, 2005). The upper elements of the cell integrity pathway are involved in the organization of the actin cytoskeleton upon cell wall stress (Delley & Hall, 1999), Pkc1 being the major effector for Rho1 signalling to the actin cytoskeleton.

Oxidative stress is a consequence of aerobic life and causes cellular damage to various macromolecules (Ames *et al.*, 1993). Actin is one of the targets of oxidative stress (Farah & Amberg, 2007). In general, in response to oxidative stress, actin cables are transiently disassembled and depolarized into patches (de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002; Vilella *et al.*, 2005). Once the stress is overcome, cells have to resume growth, and for this process, actin polarization has to be reorganized. Pkc1 plays an important role in promoting actin cable repolarization and restoration of the actin cytoskeleton polarity in response to oxidative stress (Vilella *et al.*, 2005). In this study, we also demonstrate that Pkc1 is essential for survival from oxidative stress and also that its overexpression significantly improves cell viability. However, Pkc1 function is dispensable for signalling depolarization from cables to patches under these specific stress conditions.

In this study, we describe a novel role for profilin in cell survival and in the reorganization of actin cables in response to oxidative stress. We also show a methodological approach by studying actin assembly in the presence of total protein extracts used as polymerization seeds. This technique con-

sists of *in vitro* polymerization of actin in the presence of small amounts of the cell extracts under study. The presence of small amounts of these extracts in an actin solution may change the ability of actin to polymerize by facilitating the formation of small oligomers that act as nuclei or polymerization precursors that may help to accelerate the kinetics or the extent of polymerization or both (Mozo-Villarias & Ware, 1984). (This can be considered analogous to a crystallization process using crystal seeds.) Or conversely, the association of cell extracts with actin monomers may inhibit the nucleation of actin, slowing the formation of filaments. The detection of actin filaments is followed by the technique of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP); see Materials and methods).

By means of this technique, we describe a function for Pkc1 and Pfy1 in actin nucleation and polymerization; in particular, we find a function for Pfy1 in actin nucleation specifically in response to oxidative stress.

Materials and methods

Yeast strains and gene disruptions

We used the wild-type CML128 and *pkc1* strains already described in de la Torre *et al.* (2002). *PFY1* was disrupted by the one-step disruption method using the kanMX4 module (Wach *et al.*, 1994).

The plasmid pPkc1 was constructed as described by de la Torre-Ruiz *et al.* (2002). Plasmid pPfy1 was constructed as follows: the *PFY1*-coding sequence was obtained from genomic DNA by PCR and directionally cloned into PmeI and PstI sites in the vector pCM265. Plasmid pCM265 is centromeric and contains the tetO7 promoter and is tagged in the C-terminal with three copies of HA (Garí *et al.*, 1997).

Preparation of total protein extracts

Cell cultures were exponentially grown in synthetic defined (SD) minimum medium supplemented with the required amino acids up to $A_{600\text{ nm}}$ 0.6. Treatment with hydrogen peroxide (H_2O_2) was performed as indicated using a final concentration of 1 mM H_2O_2 . Cells were collected at time intervals as indicated in each figure, to be processed for actin staining or be processed for FRAP experiments. In general, we collected 25 mL of each cell culture in 50-mL sterile tubes previously cooled at 4 °C, subsequently filtered through 22- μm Millipore filters. Cells retained in the filters were washed with 100 mM Tris buffer, pH 8.4, precooled at 4 °C. Washed cells were collected in 1 mL of Tris buffer and then centrifuged at 200 g for 1 min. Supernatants were discarded and the pellet was resuspended in 100 μL Tris buffer containing protease inhibitors. All manipulations were performed at 4 °C. An equivalent volume of glass beads was added and cells were broken in the Ribolyser. After

breakage, 100 μL Tris buffer was added to each sample, and the final suspension was centrifuged at 200 g for 1 min. We collected 50 μL from the supernatants into cooled Eppendorfs, which were subsequently kept on ice. We quantified the total amount of protein in each total extract using the Bio-Rad D_C Protein Assay kit. We then used 25 ng of total protein in a final volume of 1 μL (in 100 mM Tris, pH 8.4, at 4 $^\circ\text{C}$) to be added to 250 μL rabbit muscle actin for seeding experiments with FRAP.

Actin staining

Cells growing exponentially at 25 $^\circ\text{C}$ were stained with rhodamine-phalloidin as described before (Torres *et al.*, 2002).

Actin purification and labelling

G-actin from rabbit muscle acetone powder was obtained and purified using the method of Pardee & Spudich (1982) and stored at 0 $^\circ\text{C}$ as F-actin pellets. A fluorescent derivative of actin, designated as IAF-actin, was obtained by labelling actin with the photobleachable molecule 5-iodoactamidofluorescein (5-IAF) using the method of Wang & Taylor (1980) (labelling molecules were from Molecular Probes, Leiden, the Netherlands). In preparation for the experiments, actin was dialysed against buffer G (2 mM Tris/HCl, 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM ATP and 0.5 mM 2-mercaptoethanol) at pH 8.0. In all seeding experiments, actin was kept at 10 μM . Aliquot samples (1000 μL) of rabbit muscle actin were polymerized in the presence of 1 μL (seed) of treated and untreated yeast protein extracts described above. Polymerization of actin was achieved by adding Mg^{2+} to 0.75 mM. These values allow the time course of polymerization to be within the temporal resolution of the FRAP apparatus.

FRAP

The FRAP methodology and apparatus used in our experiments are described elsewhere (Bonet *et al.*, 2000 and literature cited therein). To summarize briefly, the sample under study (labelled with adequate photobleachable fluorophore) is illuminated by a weak reference beam from a laser source through a grating (Ronchi Ruling, Edmund Scientific) on the sample. The resulting fluorescence is then monitored as baseline. At a given moment, a brief, intense illumination is projected on the sample through the grating, leaving a temporal pattern of alternating bleached and nonbleached stripes on the sample. The grating is then translated at a constant speed through the reference beam to produce a moving pattern on the specimen. A modulation of fluorescence emission is produced as the bleached pattern and the moving illumination fall into and out of phase. The resulting photocurrent contains an ac component whose frequency is

determined by the spacing and velocity of the grating. If the labelled species has a single diffusion coefficient, then the photocurrent, $F(t)$, decays by diffusion in the exponential form: $F(t) = F(0)\exp(-DK^2t)$ where D is the translational diffusion coefficient, K is the wave vector of the grating and $F(0)$ is the fluorescence intensity monitored at time 0. If there are several hydrodynamically distinct labelled species, then the photocurrent will be a sum of exponentials, with each exponential weighted by the fraction of the total label incorporated into that species. Previous studies of actin assembly using FRAP have made use of the fact that F-actin filaments have a considerably lower diffusion coefficient than monomers and can therefore be characterized by this technique, because the photobleaching recovery due to filaments occurs on a longer time scale than that due to monomers. By changing the Ronchi Ruling spacing and the microscope objective, one can change the K -value, which allows the observation of diffusion coefficients of very different orders of magnitude. Our apparatus allows the detection of diffusion coefficients ranging from 10^{-6} to 10^{-11} $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. In a normal experiment, using a low value of K (Ronchi Ruling of 50 lines cm^{-1} , $\times 10$ objective, K in the range 300–400 cm^{-1}), we measured the diffusion coefficient of high-mobility species, D_{HM} (G-actin or small oligomers, in the order of 10^{-7} – 10^{-8} $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), and the fraction of low-mobility samples, f_{LM} (present in the solution as actin filaments). In all FRAP experiments, labelled actin made up for 1% of the total actin ($< 0.2 \mu\text{M}$) before the addition of Mg^{2+} in order to initiate polymerization. All measurements were performed at 20 $^\circ\text{C}$. For every single experimental session involving polymerization of actin, measurements of the diffusion coefficient of monomeric actin was systematically carried out, before any actin polymerization. Using the adequate 'window' (a combination of Ronchi Ruling spacing and microscope objective) as described above, the diffusion coefficient of G-actin was measured in order to prevent the presence of filaments or small oligomers, which would be indicative of defective depolymerization of actin before any seeding experiment. G-actin diffusion coefficient determinations yielded expected values.

Using the adequate 'window', analysis of the fluorescence recovery curves with time yielded the determination of the relative contributions of both high- and low-mobility components of the resulting actin filaments (designated as f_{HM} and f_{LM} , respectively). In the present study, low-mobility contributions were measured and plotted in the seeding experiments. Samples were confined in cuvettes (VitroCom, NJ) with dimensions 20 mm \times 2 mm \times 0.2 mm. Supporting this description, Fig. 1 shows a typical experiment in which f_{LM} is obtained.

In the experiments described below, small amounts of cell extracts were incubated in G-actin solutions by mixing in Eppendorfs at proportions of 1 : 1000 of extract : actin (v/v).

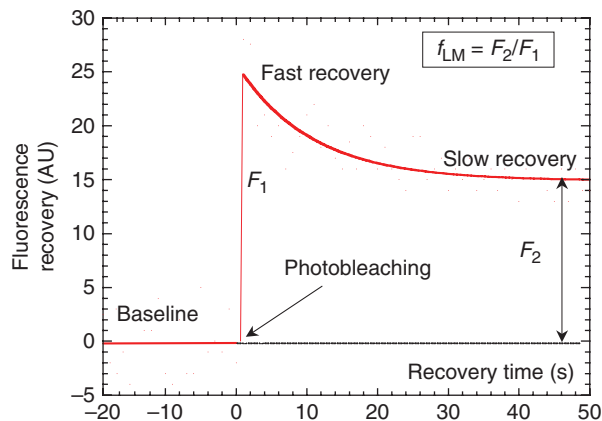


Fig. 1. Schematics of a typical FRAP trace and parameters associated. The experiment starts with a baseline followed by a short and intense laser beam that photobleaches the sample (see Materials and methods). The recovery curve contains a fast and a slow phase due to differences in size of G-actin (fast phase) and F-actin (slow phase). As an example and in order to better illustrate the interpretation of our technique, the fast phase would correspond to the part of the curve included between the values 0 and 25 s of recovery time, whereas the slow phase corresponds mostly to the rest of the recovery. The relative proportion of slow filaments, described in terms of f_{LM} , which represents the fraction of the low-mobility actin (see text), can be obtained either by fitting both curves to two exponentials, or more crudely, from the ratio F_2/F_1 .

Incubation was performed before polymerization. These extracts act as ‘seeds’ of polymerization of actin, as they may promote (or inhibit) the fast assembly of a few actin monomers of actin, acting as the nucleus of polymerization.

Methylene blue staining

Cells were grown in SD plus sorbitol (0.8 mM) and subsequently stressed with 1 mM H_2O_2 for 6 h. The cell suspension was mixed with methylene blue to a final concentration of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ and incubated for 5 min at room temperature (Smart *et al.*, 1999). Dead, blue-coloured cells were scored. We counted 1000 cells per sample. Each experiment was repeated three times. Mean values, together with the corresponding SD, are represented in the diagram plotted in Fig. 4.

Results

Profilin enhances cell viability and the formation of actin cables in response to H_2O_2 treatment

In a previous study, we demonstrated that *in vivo* overexpression of Pkc1 was able to induce early actin cable repolarization in response to the depolarization caused by the oxidative stress (Vilella *et al.*, 2005). This effect was also accompanied by a remarkable increase in cell viability (Vilella *et al.*, 2005). Profilin overexpression increases cell viability and induces an early reorganization of the actin cytoskeleton in response to oxidative conditions.

We also observed that in wild-type cultures treated with H_2O_2 (1 mM) for 8 h, there was an accumulation of cells with abnormal morphology: rounded cells with two buds that represent 30% of the total population. Some of these cells contained two nuclei in the mother cell (57% of this group). In addition, there was another group of cells abnormally large and round, with wide necks (15%). Because actin organization is one of the main targets of oxidative stress, we hypothesized that these morphological phenotypes could be attributable to a loss of actin function. More precisely, cells defective in profilin show phenotypes similar to those described above (Haarer *et al.*, 1990).

In vegetative growing cells, the actin cytoskeleton is organized in cables, which are polarized to the cell bud, and patches, which are concentrated mainly in the growing bud. As we have already described, one of the effects caused by oxidative stress in live cells is the transient depolarization of the actin cytoskeleton, which consist of the loss of visible actin cable structures and a random distribution of actin cables throughout the cell. Depolarization after a lag period has to be followed by repolarization or reorganization of the actin cytoskeleton in cable structures, leading to the resumption of cell growth.

In *S. cerevisiae*, formins and profilin are the actin-binding proteins responsible for the formation and maintenance of actin cable structures. Therefore, we decided to investigate whether, in addition to Pkc1 protein, profilin played a role in the response to oxidative stress through the remodelling of the actin cytoskeleton. To initiate this study, we used two different approaches: on the one hand, we deleted *PFY1*, and on the other, we constructed a vector overexpressing Pfy1 under the tetO7 promoter, fused in frame to HA in the C-terminal. We grew cells, wild type and wt+pPfy1, to the log phase and treated the cultures with 1 mM H_2O_2 up to 6 h. We collected samples every hour to be processed for the observation of their actin cytoskeleton under a fluorescence microscope and also in order to perform viability assays.

Wild-type cells presented a normal polarized cytoskeleton in samples collected from logarithmic cultures. Upon oxidative treatment with H_2O_2 , the actin cytoskeleton became depolarized, actin cables disappeared and actin patches were randomly distributed inside the cells. After 2 h of continuous exposure to the oxidizing agent, we started to detect an increasing population of cells with a wild-type actin cytoskeleton organized in cables and patches (Fig. 2b).

Pfy1 overexpression induced a fast and early actin repolarization, indicating that increasing levels of Pfy1 induced the actin cytoskeleton reorganization from patches to cable structures upon 1 mM H_2O_2 treatment (Fig. 2a). Cable structures were clearly identified in some cells overexpressing Pfy1 (24%) after 2 h of exposure to the oxidizing agent, as compared with wild-type cells, in which actin cable structures are microscopically visible (26%) after 3 h of

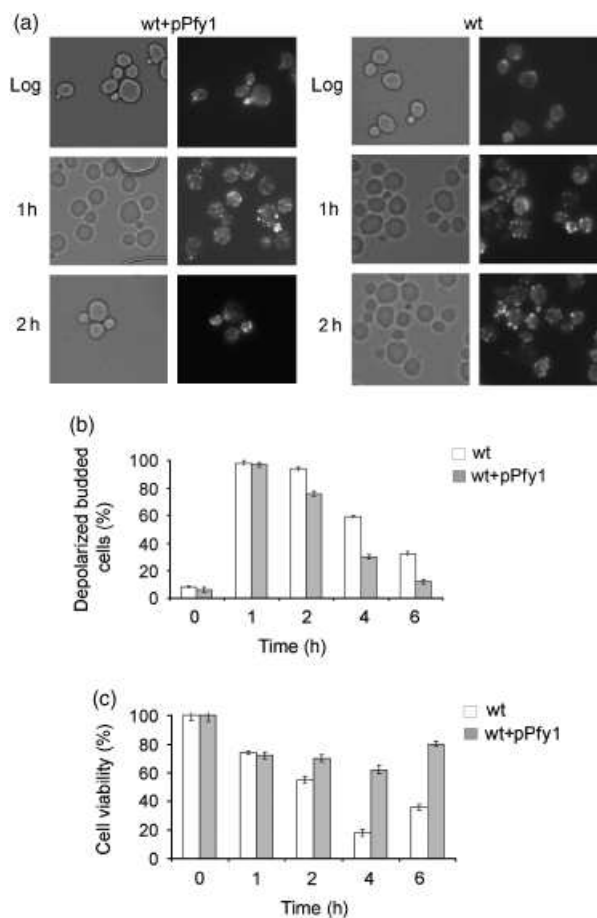


Fig. 2. Actin polarity and cell survival in response to oxidative stress in wild-type (wt) cells and in wt cells overexpressing Pfy1. wt cells and wt cells transformed with a plasmid harbouring Pfy1 were grown to logarithmic phase and then treated with 1 mM H₂O₂, samples were collected for analysis: (a) actin cytoskeleton organization; (b) percentage of polarized cells; (c) cell survival. We calculated the total number of cells using a COULTER Ztm Series (particle count and size analyser) and recorded the number of viable cells, by counting isolated colonies after plating aliquots from each culture in SD selective medium at the indicated times. Time 0 correspond to OD_{600nm} 0.6.

treatment (Fig. 2a and b). These results are similar those obtained in our previous study (Vilella *et al.*, 2005), in which we found that 35% of wild-type cells overexpressing Pkc1 were repolarized and, consequently, the actin cytoskeleton presented a wild-type organization in cables and patches upon 2 h of 1 mM H₂O₂ exposure. We also tested cell viability in order to ascertain whether Pfy1 overexpression also ameliorated cell survival as occurred in Pkc1. We observed that Pfy1 overexpression also increased the cell viability substantially in response to oxidative treatment in wild-type cells (Fig. 2c).

The experiments shown in the present and in a previous study (Vilella *et al.*, 2005) were performed in order to

observe the actin cytoskeleton structure microscopically. They revealed that overexpression of both Pkc1 and Pfy1 induced an early and efficient reorganization of the actin cytoskeleton in cable structures in cells treated with H₂O₂, similar to what we described previously with the Pkc1 protein. In view of our results, we conclude that Pfy1 plays a role in promoting cell survival and actin cable organization and repolarization in response to oxidative stress.

It is known that the cell integrity pathway is involved in establishing the polarisome and in signalling to formins and profilin in order to induce actin cable formation in response to specific stimuli (Dong *et al.*, 2003). We also considered whether Pkc1 and Pfy1 could be functionally related in processes that orchestrate actin remodelling in the context of the oxidative stress response.

To study all these processes in depth, we designed a number of experiments in order to ascertain whether Pkc1 or Pfy1 are essential in the actin repolarization process that occurs upon H₂O₂ treatment. In the *pkc1* mutant, cells presented a normal actin organization when grown logarithmically (similar to wild-type cells). However, after H₂O₂ treatment, *pkc1* cells lacked any visible actin cable structure, depolarized and did not recover the cable structure and normal polarity throughout the entire experiment (Fig. 3a). The mutant *pkc1* significantly loses viability when exposed to H₂O₂ (Vilella *et al.*, 2005). These cells die without any detectable restoration of their actin cytoskeleton (data not shown). It could be asked whether profilin overexpression would restore actin cable organization and cell viability in the absence of Pkc1. To explore this possibility, we transformed *pkc1* mutants with a plasmid bearing profilin under the *tetO₇* promoter and repeated the experiment, as shown in Fig. 3a. We observed that overexpression of Pfy1 did not restore actin cable formation or cell viability in the *pkc1* mutant (Fig. 3a–c).

We next decided to analyse the behaviour of *pfy1* mutant cells in the oxidative stress response. The absence of Pfy1 function had a significant effect on the actin cable organization, as already described (Haarer *et al.*, 1990). Therefore, the *pfy1* mutant does not present visible actin cables. However, patches were polarized in the growing bud and the actin septum was also visible (Fig. 4, log). Upon H₂O₂ treatment in *pfy1* cells, we also detected a general disorganization of the actin cytoskeleton (Figs 4 and 2h), as described in the other strains shown in Figs 3 and 4. Interestingly, we observed that *pfy1* cells were unable to repolarize the actin cytoskeleton even after 6 h of exposure to H₂O₂ (Figs 4 and 6h). We next transformed *pfy1* mutant cells with a plasmid bearing Pkc1 also under the *tetO₇* promoter in order to check whether Pkc1 function could induce the formation of actin cables in the absence of Pfy1 function. We could determine that Pkc1 overexpression did not restore actin cable organization either in logarithmically growing *pfy1*

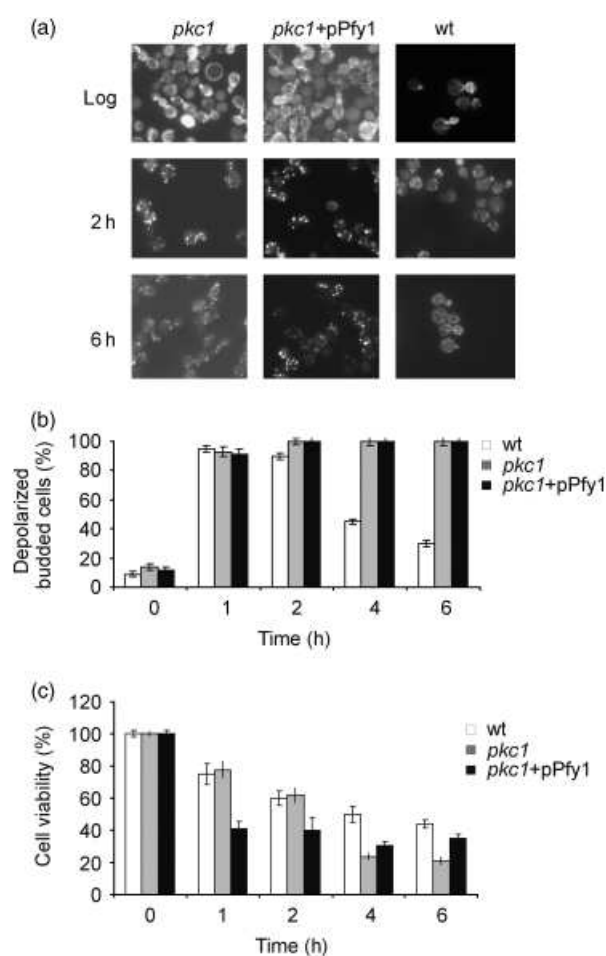


Fig. 3. Actin polarity and cell survival in response to oxidative stress in wild-type (*wt*), *pkc1* cells and in *wt* cells overexpressing Pkc1. This experiment was carried out as described in Fig. 2a, with the exception that cultures were grown in SD+the cell wall stabilizer sorbitol 0.8 M to avoid cell lysis in the *pkc1* mutant. Actin organization observed in the fluorescence microscope upon phalloidin staining. (b) Cell survival, calculated as in Fig. 2.

cells or upon oxidative stress (Fig. 4). Moreover, in the oxidative stress response, Pkc1 overexpression did not restore the normal actin organization observed in untreated *pfy1* cells.

Profilin function was not required for cell viability in response to H₂O₂, because a *pfy1*-mutant strain did not lose viability upon peroxide treatment (Fig. 4b). We also observed that the *pkc1* mutant lost viability significantly in response to H₂O₂ treatment (as described in Vilella *et al.*, 2005). In addition, overexpression of Pkc1 in the *pfy1* mutant interfered with cell growth, as illustrated in Fig. 4b and c, where it can be clearly observed that Pkc1 overexpression increased cell mortality on *pfy1* cells, whereas it diminished mortality in *wt* cells, in accordance with the rest of our observations. Conversely, overexpression of Pfy1

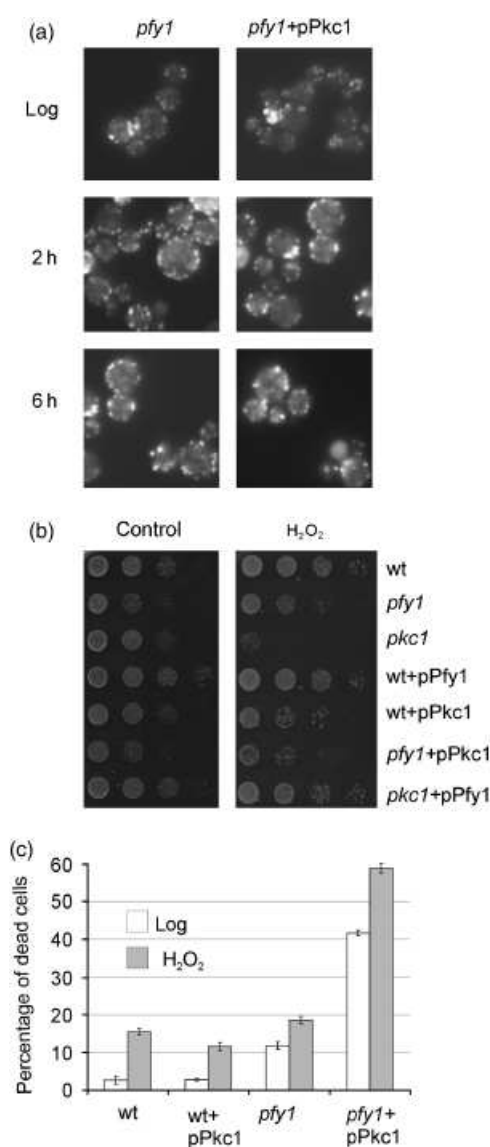


Fig. 4. (a) Actin cytoskeleton organization in response to oxidative damage in *pfy1* cells and in the *pfy1* mutants transformed with pPkc1. The experimental procedure was carried out as in Figs 2 and 3. (b) Cell survival in exponentially growing cells and in response to oxidative stress. Exponential cultures of wild-type (*wt*), *pkc1*, *pfy1*, *wt+pPkc1*, *wt+pPfy1*, *pkc1+pPfy1* and *pfy1+pPkc1*, growing in SD sorbitol (0.8 M) at 30 °C, were serially diluted and plated onto control plates or plates containing H₂O₂ 1 mM. Sorbitol, as a cell wall stabilizer was added to the plates to avoid cell lysis in the *pkc1* mutant. (c) Mortality of *wt*, *wt+pPfy1*, *pfy1* and *pfy1+pPkc1* strains grown to exponential phase in SD+sorbitol (white square, log) and subsequently treated with 1 mM H₂O₂ for 6 h (grey square H₂O₂).

partly restored the loss of viability of the *pkc1* mutant treated with H₂O₂, as can be observed in Fig. 4b. These results indicate that Pkc1 and Pfy1 are genetically related in the oxidative stress response.

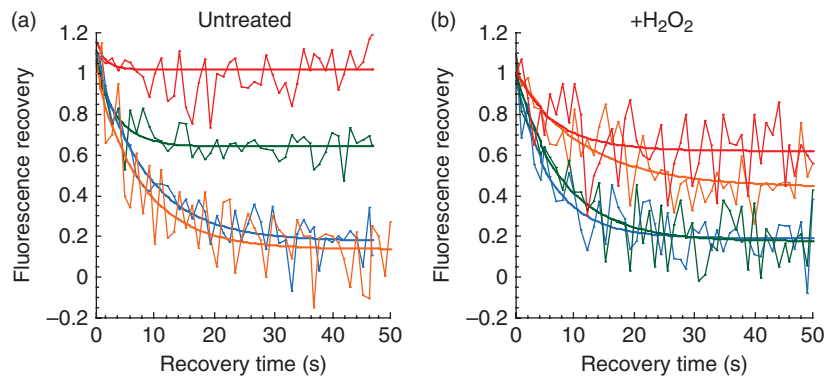


Fig. 5. Some examples of fluorescence recovery curves of actin samples seeded with whole cell extracts (see Materials and methods). These curves represent fluorescence recovery of actin samples seeded with untreated (a) and treated (b) total protein extracts. Curves shown here were obtained about 15 min after polymerization was started by addition of Mg^{2+} . Thin lines are experimental values. Thick lines are fits of the experimental values to a combination of two exponentials. This fit provides the relative amounts of polymerized and unpolymerized actin in this particular moment of the polymerization. In both (a) and (b), blue curves represent actin samples seeded only with the buffer used to prepare total protein extracts (control). Green curves correspond to actin seeded with wild-type (wt) protein extracts. Red curves show actin samples seeded with wt+pPkc1. Orange curves are actin samples seeded with wt+pPfy1. Blue and orange curves in (a) and blue and green curves in (b) show that little or no significant actin polymerization has yet taken place because only fast components are visible. Red curves and green curve in (a) and orange curve in (b) show that these extracts are capable of accelerated actin polymerization because they show a large proportion of slow component (which corresponds to the following parts of each of the curves: from 4 s till the end for red curve in (a), from 6 s for green curve in (a) and from 12 s for both red and orange curves in (b)). In all samples the proportion of slow component, f_{LM} increases to a steady-state value when polymerization is complete (50 min after addition of Mg^{2+}).

Our results also suggest that both Pkc1 and Pfy1 are essential to restore actin cable integrity structures and the actin cytoskeleton organization in response to oxidative stress. However, Pkc1 plays additional roles in the oxidative response precluding cell viability.

Pkc1 and Pfy1 play a positive and activating role in the biological assembly of the actin cytoskeleton that occurs in the oxidative stress response

The next question that arose from this study was whether both Pkc1 and Pfy1 proteins played any role in the actin assembly processes and in particular in the response to oxidative stress. In order to answer these questions, we decided to develop an *in vitro* assay based on FRAP techniques using purified muscle actin and total protein extracts from *S. cerevisiae*, as described in Materials and methods. We measured the actin polymerization rate under the influence of seeds composed of different protein extracts: wild type, *pkc1*, *pfy1*, *pkc1* overexpressing pPfy1, *pfy1* overexpressing pPkc1, wild type+pPkc1 and wild-type+pPfy1. The purpose of this assay is to determine which of these extracts acts as polymerization enhancers, by promoting the nucleation of actin monomers, or polymerization inhibitors, by preventing the initial association of monomers. Figure 5 shows a representative example of fluorescence recovery curves after samples were partially photobleached with a short high-intensity laser pulse, 15 min after addition of Mg^{2+} . These recovery curves were fitted to a combination of two exponentials, in order to

reveal the relative amounts of G- and F-actin (denoted as f_{HM} , f_{LM} : high-mobility and low-mobility fractions, respectively) present in each sample at this particular time point of the polymerization (see Materials and methods). We have chosen curves corresponding to extract samples that reflect clear differences in their respective actin polymerization capacity. In Fig. 5a, we show the following results: (1) wild-type protein extracts are able to actively polymerize actin, thus validating our assay; (2) the overexpression of Pkc1 produces a fast and full actin polymerization as well as long actin filaments in cells unstressed or stressed oxidatively; (3) the overexpression of Pfy1 does not increase actin polymerization in untreated cells growing logarithmically; conversely, it has an effect of lowering the rate of actin polymerization (however, this does not seem to interfere with the steady-state actin of the cytoskeleton organization, as observed upon actin staining with phalloidin, in Fig. 2). Of all the protein extracts obtained from samples previously treated with H_2O_2 , only those corresponding to wt+pPfy1, wt+Pkc1 and *pkc1*+pPfy1 (not shown, but equivalent to the values obtained with *pkc1*+pPfy1) retained a significant and similar actin polymerization capacity (Fig. 5b).

The amount of polymerized actin (f_{LM}) in the presence of the buffer used to prepare total protein extracts was taken as a reference for normalization in each experiment. Averaging values of f_{LM} through several experiments, histograms of relative amounts of polymerized actin were obtained (Fig. 6) for actin samples seeded with different cell extracts.

We observed several interesting effects. First, when we used wildtype, untreated protein extracts, we observed a

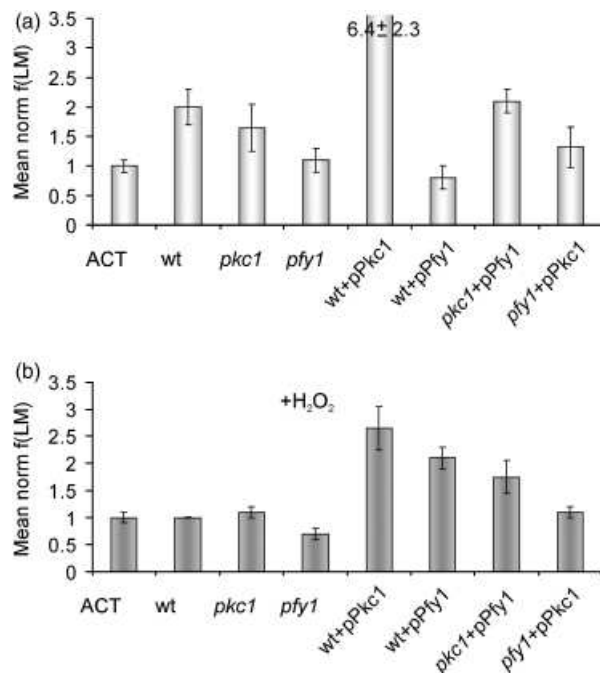


Fig. 6. Average proportion of polymerized muscle actin (f_{LM}) seeded with different cell extracts at the end of the polymerization process (steady state). These values were normalized to that of unseeded actin (ACT). Cell extracts were obtained from different strains: wild type (wt), *pkc1*, *pfy1*, lacking or overexpressing either Pkc1 or Pfy1 proteins. Normalized histograms represent the average contribution of low-mobility filaments of three different experiments. (a) f_{LM} values of polymerized actin, determined in untreated logarithmically growing cells. (b). Same as in (a), in cells exposed to 1 mM H₂O₂ for 1 h at 25 °C. ACT, control unseeded sample, and contains monomeric actin but lacks the cell extract.

twofold increment in polymerizing actin with respect to the monomeric actin not seeded with protein extracts and used as control (Fig. 6a). We repeated this assay three times and demonstrated that these differences were statistically significant. Therefore, these results validated our *in vitro* assay.

When we analysed protein extracts from cells growing exponentially, we observed that in the *pfy1* mutant, the actin polymerization capacity was impaired compared both with wild-type and *pkc1* protein extracts (which presented a similar actin polymerization activity; Fig. 6a). Interestingly, overexpression of Pkc1 in untreated wild-type cells significantly increased the ability of cells to polymerize muscle actin. However, the overexpression of Pkc1 did not increase the ability of *pfy1* cells to nucleate monomeric actin in cells growing exponentially, meaning that Pfy1 function is essential for Pkc1 to induce actin polymerization. We also observed that overexpression of Pfy1 reduced the ability of protein extracts from untreated cells to polymerize actin, leading to f_{LM} values even lower than those determined in the control sample containing unseeded actin (ACT) (Fig. 6a).

Upon peroxide treatment, we observed that in all the backgrounds tested, the actin cytoskeleton became disorganized (Vilella *et al.*, 2005 and Figs 2–4). This actin disorganization that occurs in response to oxidative stress has also been documented in response to other stresses (see Discussion). Apparently, all the strains tested present a similar actin organization in the first 2 h of response to oxidative stress when stained with phalloidin: namely, actin cables disappear and the actin cytoskeleton becomes organized in patches randomly distributed in the cell. However, microscopic observation of the transient cable disappearance does not provide total information about actin polymerization activity during the lag period that occurs upon oxidative treatment. During this period, cells repair their structures and become adapted to the stress, and then they resume cell growth. However, those mutants that do not have the required protein functions die. In order to explore this observation, we measured the capacity to polymerize actin in protein extracts obtained from the different strains upon 1 h of treatment with H₂O₂ 1 mM. We chose these conditions because (1) the majority of cells were depolarized in all the strains used in this study and (2) in all the strains tested, there was no significant loss of viability during this period of treatment. Under these conditions, we quantified actin polymerization values in wild-type and *pkc1* strains, similar to those determined in control unseeded samples (ACT in Fig. 6a and b). This means that in these strains, the H₂O₂ treatment, under our experimental conditions (1 h upon H₂O₂ treatment), induced a loss of polymerization capacity as compared with untreated samples (Fig. 6a and b). We did not observe any substantial change in *pfy1* protein extracts treated with H₂O₂ as compared with the untreated ones. However, in the wild-type strain overexpressing Pkc1, we detected a significant capacity to polymerize actin in total protein extracts treated with 1 mM H₂O₂ for 1 h. In these cells, the ability of Pkc1 to activate actin polymerization was still significantly higher than that determined for untreated wild-type cells (Fig. 6a and b).

These results indicate that Pkc1 plays an important and active role in actin nucleation both under normal conditions and in response to oxidative stress. Profilin overexpression does not increase actin polymerization capacity in untreated wild-type cells. Surprisingly, wild-type extracts overexpressing Pfy1 showed a high capacity to polymerize actin in protein extracts previously treated with H₂O₂, similar to that measured in protein extracts overexpressing Pkc1 under the same experimental conditions (Fig. 6b). These results suggest that in response to oxidative stress, Pfy1 overexpression favours the polymerization of muscle actin, giving rise to a rapid assembly of long actin filaments.

Pfy1 overexpression did restore the polymerization capacity of muscle actin nearly to wild-type levels in *pkc1* protein extracts that were previously treated with H₂O₂

(compare the f_{LM} value of 1.75 in Fig. 6b vs. the value 2 determined in wild-type untreated protein extracts; see Fig. 6a). Nevertheless, Pkc1 overexpression in the absence of Pfy1 function was unable to induce actin polymerization in response to oxidative stress (Fig. 6b).

These results suggest that both Pkc1 and Pfy1 proteins play an important role in organizing and assembling the actin cytoskeleton in the oxidative stress response. This technique allowed us to observe more in detail the roles that profilin plays in the adaptive response to oxidative stress. Thus, while profilin still conserved the capacity to activate actin polymerization independently of Pkc1 function, Pfy1 requires Pkc1 in order to assemble the macroscopic actin filaments that constitute a correct polymerized actin cytoskeleton.

Discussion

In this study, we demonstrate that both Pkc1 and Pfy1 proteins are important to induce actin polymerization in response to oxidative stress. We previously described how Pkc1 played an important role in cell survival and in the repolarization of the actin cytoskeleton upon oxidative stress (Vilella *et al.*, 2005). In the present study, we have also characterized new roles for *PFY1* in the oxidative stress response as follows: Pfy1 improves cell survival and promotes the early actin cytoskeleton repolarization and cable formation.

In unstressed cells growing exponentially, the overexpression of profilin did not induce actin polymerization but rather interfered with that process. Under conditions of adaptation to oxidative stress, the overexpression of Pfy1 induced the early reorganization of the actin cytoskeleton as evidenced by the early formation of actin cables in wt+pPfy1 cells treated with H₂O₂, and also by the significant activation of the actin polymerization. Under these circumstances, Pfy1 might increase the rate of elongation at filament barbed ends, where the formins, Bnr1 and Bni1 assemble these filaments, as reported previously by several authors (Romero *et al.*, 2004; Moseley & Goode, 2005; Kovar *et al.*, 2006).

PFY1 is an actin-binding protein, and, together with formins Bni1 and Bnr1, plays an important role in the actin filament assembly and in the maintenance of the actin cytoskeleton integrity (Moseley & Goode, 2005). These authors have described a suitable model for regulation of actin cable assembly in which actin cables are nucleated by formin Bni1 using profilin and Bud6-bound actin subunits as substrates. Bni1 activity may be regulated through interactions with other proteins: Cdc42, Rho1-4, Bud6, profilin and other factors. Dong *et al.* (2003) have previously reported that Rho1 signals to activate formins and profilin

through Pkc1, in order to polarize actin cables under conditions of high temperature.

In the absence of either Pkc1 or Pfy1 proteins, we do not observe actin cable restoration upon oxidative stress during the course of our experiment (6 h upon H₂O₂ treatment). In addition, neither the overexpression of Pkc1 in *pfy1* strain nor the overexpression of Pfy1 in *pkc1* strain restored actin cable formation upon H₂O₂ treatment. Therefore, our results indicate that both Pkc1 and Pfy1 are required to induce a rapid actin reorganization and actin cable formation upon oxidative stress. Another common feature of both proteins of special relevance from an adaptive point of view is that they both increase the cellular tolerance to oxidative stress. Whether or not this function is directly connected to the reorganization of the actin cytoskeleton deserves future investigations.

In this study, we develop an *in vitro* assay in order to quantify the capacity of total protein extracts to nucleate and polymerize actin from rabbit muscle. The aim of this approach is to keep most enzymatic activities and processes similar to those occurring *in vivo*. By developing this assay, we have also determined a new function for Pkc1 in the process of actin nucleation, apart from the already described role for Pkc1 in the process of actin reorganization and cable production upon oxidative stress (Vilella *et al.*, 2005). We also show data demonstrating that actin assembly can be stimulated by increasing the number of Pkc1 molecules under all the conditions tested: logarithmically growing cells and cells previously treated with an oxidizing agent. The *in vitro* polymerization experiment we developed in the present study allowed us to make further observations. In unstressed wild-type cells growing exponentially, Pfy1 overexpression did not induce actin polymerization, rather interfered with that process. We still do not have a certain explanation for this observation, but we could speculate that the effect we observe might be due to the fact that profilin could be restricting actin monomer addition to filament barbed ends or blocking addition to pointed ends, following the discussion suggested by Pollard & Cooper (1984).

Profilin has several effects on actin. It is known that Pfy1 reduces *in vitro* spontaneous actin nucleation and nucleation mediated by the Arp2/3 complex (Machesky *et al.*, 1999). In the present study, we also show that in exponentially growing cells, the overexpression of Pfy1 becomes rate limiting for actin assembly, in accordance with some other authors (Laurent *et al.*, 1999; Loisel *et al.*, 1999; Marchand *et al.*, 1995).

In the oxidative stress response, we can conclude that the overexpression of profilin efficiently induces actin polymerization in wild-type cells. However, the overexpression of Pfy1 is sufficient to activate actin polymerization, but not actin cable formation in the *pkc1* mutant. This means that profilin requires Pkc1 function to form actin cables, and

conversely, Pfy1 needs Pkc1 to reorganize the actin cytoskeleton in the oxidative stress response.

Wolven *et al.* (2000) reported that profilin promotes actin filament dynamics *in vivo* through its ability to catalyse nucleotide exchange on actin. Sagot *et al.* (2002a, b) have demonstrated with purified profilin that this protein induced a dose-dependent stimulation of actin assembly in the presence of Bni1-mini. They also observed that the main effect of profilin was to shorten the lag phase of polymerization. This group proposes that the stimulatory effect of profilin on actin nucleation requires the ability of profilin to bind to actin and polyproline motifs in Bni1-mini. Binding of profilin to proline-rich ligands, such as formins, has been proposed to promote actin assembly at specific membrane sites (Lew, 2002). These models have been constructed with purified proteins. At present, and according to this discussion, it seems to be accepted that the effect that profilin could be exerting in actin nucleation and the organization of the actin cytoskeleton might be dependent on other interacting proteins. This could be the explanation for the different effects we observe in the *in vitro* assay when profilin is overexpressed. It could be possible that in the oxidative stress response, some profilin interacting proteins are activated or repressed differentially, thus precluding the nucleation activity of the profilin under these conditions. This hypothesis deserves to be analysed in future studies.

Here, we show data demonstrating that using total protein extracts, we can detect actin polymerization activity. Our assay complements the *in vivo* assay, providing us with additional information. Upon H₂O₂ treatment, there is a transient depolarization of the actin cytoskeleton, which is reflected in the loss of actin cables and the presence of actin patches randomly distributed throughout the cell. The sole observation in the microscope of actin depolarization from cables to patch structures does not inform accurately about the actin polymerization activity in this sample. In this respect, our assay allowed us to determine differential actin polymerization activities in different situations (exponential growth or 1 h upon H₂O₂ treatment in this study) in which some of the different backgrounds tested presented a similar actin organization upon observation in the microscope. According to this, all the strains treated with H₂O₂ for 1 h presented a similar actin structure in random patches, whereas the samples collected from cultures growing exponentially presented a common organization of the actin cytoskeleton in cables and patches, with the exception of the *pfy1* mutant, as described in results. Following this reasoning, we were able to distinguish different actin polymerization activities between *pfy1* and *pfy1* extracts overexpressing Pkc1; hence, we only determine a significant activity in *pfy1*+Pkc1 extracts (Fig. 5 and 6) despite the fact that at the time points selected for the experiments, both strains presented an undistinguishable actin organization in

patches (Fig. 4). This is the case for wild-type cells overexpressing Pkc1 in stressed or unstressed cells, as compared with wild-type extracts. Another important datum obtained from our *in vitro* assay was the determination of the increase in actin polymerization activity in wild-type extracts overexpressing Pfy1 upon H₂O₂ treatment, as compared with wild-type extracts. Hence, by means of our assay, we also demonstrate that Pfy1 works by assembling actin filaments under conditions of oxidative stress.

Another interesting finding obtained from this study is that Pkc1 does not activate actin assembly in the absence of profilin function. Nevertheless, profilin is able to induce actin nucleation (but not actin cable formation) in the absence of Pkc1 in response to oxidative stress. These observations seem to indicate that for this function, Pfy1 does not require Pkc1. Moreover, Pfy1 overexpression rescues *pkc1* loss of viability in response to oxidative stress, but in the presence of sorbitol. The necessity of a cell wall stabilizer for this suppression indicates that Pfy1 does not rescue the cell wall problems caused by the absence of Pkc1 function, but specifically others, probably related to the inability to repolymerize actin in the oxidative stress response. Significantly, and supporting this model, Pkc1 overexpression causes cell toxicity in the *pfy1* mutant under conditions of oxidative stress. We suggest that in terms of the process of actin filament assembly in response to oxidative stress, Pkc1 might be signalling to Pfy1.

The data presented here also suggest that Pkc1 might be signalling to Pfy1 in that Pfy1 requires Pkc1 activation in order to assemble actin cables in response to oxidative treatment. Both proteins Pkc1 and Pfy1 are essential for cable construction in the adaptive response to oxidative stress.

We propose that Pkc1 could be required to activate formins and then profilin in order to assemble actin filaments in the adaptive response to oxidative stress. However, other independent roles for either Pkc1 or Pfy1 proteins are not discarded in the processes governing actin remodelling. This is a possible model that agrees with that previously reported by Dong *et al.* (2003) in response to heat shock. We could also hypothesize that under oxidative stress conditions, the activation of Pfy1 binding to formins may occur. Further investigations in our group and in others will hopefully answer these questions.

The novelty of our study also consists of a method to polymerize actin in the presence of total cell extracts, providing us with an integrated overview of the actin nucleation processes that occur inside cells.

Acknowledgements

This work was supported by grants BFU2006-362 and BIO2007-67904-02-01 from the MEC (Spanish

Government). Both N.P. and M.I.P. were supported by fellowships from the Generalitat de Catalunya (Spain).

Authors' contribution

N.P. and C.B. contributed equally to this work.

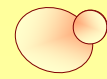
Dedication

The authors wish to pay tribute to Carmel Bonet, who passed away before this manuscript was published.

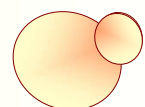
References

- Adams AE & Pringle JR (1984) Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **98**: 934–945.
- Ames B, Shigenaga M & Hagen T (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *P Natl Acad Sci USA* **90**: 7915–7922.
- Bonet C, Ternent D, Maciver SK & Mozo-Villarias A (2000) Rapid formation and high diffusibility of actin-cofilin cofilaments at low pH. *Eur J Biochem* **267**: 3378–3384.
- Carlier MF, Hertzog M, Didry D, Renault L, Cantrelle FX, Van Heijenoort C, Knossow M & Guittet E (2007) Structure, function, and evolution of the b-thymosin/WH2 (WASP-Homology2) actin-binding module. *Ann NY Acad Sci* **1112**: 67–75.
- Carlsson L, Nystrom LE, Sundkvist I, Markey F & Lindberg U (1977) Actin polymerisation is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol* **115**: 465–483.
- Cid VJ, Durán A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C & Sánchez M (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**: 345–386.
- de la Torre-Ruiz MA, Torres J, Ariño J & Herrero E (2002) Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 33468–33476.
- Delley PA & Hall MN (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* **147**: 163–174.
- Dong Y, Pruyne D & Bretscher A (2003) Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of RHO signalling in yeast. *J Cell Biol* **147**: 163–174.
- Drubin DG (1991) Development of cell polarity in budding yeast. *Cell* **65**: 1093–1096.
- Evangelista M, Pruyne D, Asmberg DC, Boone C & Bretscher A (2002) Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol* **4**: 32–41.
- Farah ME & Amberg DC (2007) Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *Mol Biol Cell* **4**: 1359–1365.
- Feierbach B & Chang F (2001) Roles of the fission yeast formin for3 in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* **11**: 1656–1665.
- Gari E, Piedrafita L, Aldea M & Herrero E (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 837–848.
- Haarer BK, Lillie SH, Adams AEM, Magdolen V, Bandlow W & Brown SS (1990) Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol* **110**: 105–114.
- Hall A (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 31–54.
- Imamura H, Tanaka K, Hihara T, Umikawa M, Kamei T, Takahashi K, Sasaki T & Takai Y (1997) Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **16**: 2745–2755.
- Kovar DR, Harris ES, Mahaffy R, Higgs HN & Pollard TD (2006) Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* **124**: 423–436.
- Laurent V, Loisel TP, Hasrbeck B, Wehman A, Grobe I, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB & Carlier MF (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **144**: 1245–1258.
- Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol R* **69**: 262–291.
- Lew DJ (2002) Formin' actin filament bundles. *Nat Cell Biol* **4**: E29–E30.
- Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D & Carlier MF (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**: 613–616.
- Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC & Hall METD (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *P Natl Acad Sci USA* **96**: 3739–3744.
- Marchand JB, Moreau P, Paoletti A, Cossart P, Carlier MF & Pantaloni D (1995) Actin based movement of *Listeria monocytogenes*: actin assembly results from the local maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface. *J Cell Biol* **130**: 331–343.
- Moseley JB & Goode BL (2005) Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem* **280**: 28023–28033.
- Mozo-Villarias A & Ware BR (1984) Distinctions between mechanisms of cytochalasin D activity for Mg²⁺ and K⁺ induced actin assembly. *J Biol Chem* **259**: 5549–5554.
- Pardee JD & Spudich JA (1982) Purification of muscle actin. *Meth Cell Biol* **8**: 271–289.
- Pollard TD & Cooper JA (1984) Quantitative analyses of the effector of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* **23**: 6631–6641.
- Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D & Carlier MF (2004) Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**: 419–429.

- Sagot I, Rodal AA, Moseley J, Goode BL & Pellman D (2002a) An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* **4**: 626–631.
- Sagot I, Klee SK & Pellman D (2002b) Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol* **4**: 42–50.
- Schott D, Huffaker T & Bretscher A (2002) Microfilaments and microtubules: the news from yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**: 564–574.
- Smart K, Chambers K, Lambert I & Jenkins C (1999) Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *J Am Soc Brew Chem* **57**: 18–23.
- Takai Y, Sasaki T, Tanaka K & Nakanishi H (1995) Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* **20**: 227–231.
- Tanaka K & Takai Y (1998) Control of the reorganisation of the actin cytoskeleton by Rho family small GTP-binding proteins in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 112–116.
- Torres J, Di Como CJ, Herrero E & de la Torre-Ruiz MA (2002) Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem* **277**: 43495–43504.
- Vilella F, Herrero E, Torres J & de la Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem* **280**: 9149–9169.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R & Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793–1808.
- Wang YL & Taylor DL (1980) Preparation and characterization of a new molecular cytochemical probe: 5-iodoacetamidofluorescein-labeled actin. *J Histochem Cytochem* **28**: 1198–1206.
- Wolven AK, Belmont LD, Mahoney NM, Almo SC & Drubin DG (2000) *In vivo* importance of actin nucleotide. *J Cell Biol* **150**: 895–903.
- Zigmond S (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 99–105.



6- BIBLIOGRAFIA



.Adamo, J.E., Rossi, G., Brennwald, P. (1999). The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Mol. Biol. Cell.* 10, 4121-4133.

.Adachi, T., Pimentel, D.R., Heibeck, T., Hou, X., Lee, Y.J., Jiang, B., Ido, Y., Cohen, R.A. (2004). S-glutathionylation of ras mediates redox-sensitive signalling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 279, 29857-29862.

.Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., Nyström, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science.* 299, 1751-1753.

.Alarcon, C.M., Heitman, J., Cardenas, M.E. (1999). Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Mol .Biol. Cell.* 8, 2531-46.

.Alic, N., Higgins, V.J., Dawes, I.W. (2001). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* gene that is required for G₁ arrest in response to the lipid oxidation product linoleic acid hydroperoxide. *Mol. Biol. Cell.* 10, 1801-1810.

.Andrews. B.J., Herskowitz, I. (1989). Identification of a DNA binding factor involved in cell-cycle control of the yeast HO gene. *Cell,* 57, 21-29.

.Antonsson, B., Montessuit, S. , Friedli, L., Payton, M.A., Paravicini, G. (1994). Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* *PKC1* gene product. *J.Biol.Chem.* 269, 16821-16828.

.Archibald, F.S. and Friedovich, I. (1981). Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bact.* 145, 442-451.

.Archibald, F.S. and Friedovich, I. (1981). Manganese, superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bact.* 146, 928-936.

.Achstetter, T and Wolf, D.H. (1985). Proteinases, proteolysis and biological control in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1, 139-157.

.Ariño, J. (2002). Novel protein phosphatases in yeast. *Eur J. Biochem.* 269, 1072-1077.

.Aruoma, O., Halliwell, B.(1998). Molecular biology of free radicals in humans disease. Saint Lucia: OICA International.

.Arvinder, S., Severence, S., Kaur, N., Wiltsue, W., Kosman, D.J. (2006). Assembly, activation and trafficking of the Fet3p, Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 281, 6317-6327.

.Ausubul, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. (1989). Current protocols in Molecular biology. Wiley-Interscience, New York, N.Y.

.Babichev, Y and Isakov, N (2001). Tyrosine phosphorylation of PICOT and its translocation to the nucleus in response of human T cells to oxidative stress. Adv. Exp. Med. Biol. 495, 41-45.

.Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Cahng, M., Andrews, B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. Mol. Cell. Biol. 21, 6515-6528.

.Banta, L. M., Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Emr, S.D. (1988). Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. J. Cell. Biol. 107, 1369-1383.

.Bar, E.E., Ellicott, A.T., Stone, D.E. (2003). G-beta-gamma recruits Rho1 to the site of polarized growth during mating in budding yeast. J. Biol. Chem. 278, 21798-21804.

.Belmont, L.D., Patterson, G.M., Drubin, D.G. (1999). New actin mutants allow further characterization of the nucleotide binding cleft and drug binding sites. J.Cell. Sci. 112 (Pt 9), 1325-1336.

.Bertin, A., Michael, A., Mc Murray, Patricia Grob, Sang-Shin Park, Galo Garcia, Ill, Insiyyah Patanwala, Ho-Leung, Ng, Tom Alber, Jeremy Thomer, Eva Nogales. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 105, 8274-8279.

- .Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C., Millar, R.J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* 16, 1324-1336.
- .Blaiseau, P.L., Lesuisse, E., Camadro, J.M. (2001). Aft2, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J.Biol.Chem.* 276, 34221-34226
- .Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., Parker, L. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 755-767
- .Briviba, K., Klotz, L. O., Sies, H. (1997). Toxic and signalling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol. Chem.* 378, 1259-1265.
- .Bryant, N.J., Stevens, T.H. (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol. and Mol. Biol. Reviews.* 62, 230-247.
- .Buehrer, B.M., Errede, B. (1997). Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* 17, 6517-6525.
- .Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J.L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 131: 1-87.
- .Cabib, E., Drgonova, J., Drgon, T. (1998). Role of small G protein in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 307-333.
- .Cabib, E., Roh, D.H., Schmidt, M., Crotti, L.B., Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J.Biol.Chem.* 276, 19679-19682.
- .Carmel-Harel and O., Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* response to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 439-461.

- .Casamayor, A., Torrance, P.D., Kobayashi, T., Thorner, J., Alessi, D.R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.* *9*, 186-197.
- .Casas, C. Aldea, M., Espinet, C. Gallego, C., Gil, R., Herrero, E. (1997). The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* *13*, 621-637.
- .Caviston, J.P., Longtime, M., Pringle, J.R. Bi, E. (2003). The role of Cdc42p-GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol. Biol. Cell.* *14*, 4051-4066.
- .Chae, H.Z., Chung, S.J., Rhee, S.G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* *269*, 27670-27678.
- .Chang, E.C. and Kosman, D.J. (1989). Intracellular Mn(II)-associated superoxide scavenging activity protects Cu, Zn superoxide dismutase –deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. *J. Biol. Chem.* *264*, 12172-12178.
- .Chant, J. (1999). Cell polarity in yeast. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* *15*, 365-391.
- .Chakravarthi, S., Jessop, C.E., Bulleid, N.J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* *7*, 271-275.
- .Chernova, T.A., Allen, K.D., Wesoloski, L.M., Shanks, J.R., Chernoff, Y.O., Wilkinson, K.D. (2002). Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool. *J. Biochem.* *278*, 52102-52115.
- .Cid, V.J., Cenamor, R., Sanchez, M., Nombela, C. (1998) A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene *BEM2* of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Mol. Microbiology.* *144*, 25-36.
- .Clemens, W.O., Christoph, T.A., Meiringer and Christian Ungermann. (2008). Yeast vacuole fusion. *Landes Bioscience* *4*, 5-19.

- .Clotet, J., Gari, E., Aldea, M., Ariño, J. (1999). The yeast ser/thr phosphatases Sit4 and Ppz play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2408-2415.
- .Cobb, M.H. (1999). MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol.* 71, 479-500.
- .Cohen, T.J., Lee, K., Rutkowski, L.H., Strich, R. (2003). Ask10p mediates the oxidative stress-induced destruction of the *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p. *Eukaryot. Cell.* 2, 962-970.
- .Cohen, T.J., Mallory, M.J., Strich, R., Yao, T.P. (2008). The Hos2p/Set3p deacetylase complex signals secretory stress through the Mpk1 cell-integrity pathway. *Eucaryotic Cell.* 7, 1191-1199.
- .Collister, M., Didmon, M.P., MacIsaac, F., Satrk, M.J., MacDonald, N.Q., Keyse, S.M (2002). YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S.cerevisiae*. *FEBS.* 527, 186-192.
- .Corson, L.B., Folmer, J., Strain, J.J., Culotta, V.C., Cleveland, D.W. (1999). Oxidative stress and iron are implicated in fragmenting vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae* lacking Cu,Zn-superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 39, 27590-27596.
- .Courel, M., Lallet, S., Camadro, J.M., Blaiseau, P.L. (2005). Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6760-6721.
- .Coyle, J.T. and Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative discords. *Science.* 262, 689-695.
- .Creighton, T.E. (1992). Protein folding. Up the kinetic pathway. *Nature.* 356, 194-195.
- .Culotta V.C., Joh, H.D., Lin, S.J., Slekar, K.H., Starin, J. (1995). A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J.Biol.Chem.*, 270, 29991-29997.

.Dancis, A., R. D. Klausner, A.G., Hinnebusch, J.G. Barriocanal (1990). Genetic evidence that ferric reductase is required for iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* 10, 2294-2301.

.Dancis, A., Roman, D.G., Anderson, G.J., Hinnebusch, A.G., Klausner, R. D. (1992) Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Aca. Sci.* 89,3869-3873.

.Dancis, A., Yun, D.S., Haile, D., Askwith, C. Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J. Klausnes, R.D. (1994). Molecular characterization of cooper transport protein in *Saccharomyces cerevisiae*: an unexpected role for cooper in iron transport. *Cell.* 76, 393-402.

.Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E., Gustin, M.C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 30157-30161.

.de Bettignies, Brathe, C., Morel, C., Peypouquet, P.F., Doignon, F., Crouzet, M. (1999). *RGD1* genetically interacts with *MID2* and *SLG1*, encoding two putative sensors for cell integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15, 1719-1731.

.de la Torre-Ruiz, M. A., Torres, J., Ariño, J., Herrero, E. (2002). Sit4 required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 33468-733476

.Demple, B. (1998). A bridge to control. *Science.* 279, 1655-1656.

.Delley, P.A. and Hall, M.N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J. Cell. Biol.* 147, 163-174.

.de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., Klis, F.M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology.* 146, 2121-2132.

.De Silva, D.M., C.C.Askwith, D.Eide, Kaplan, J (1995). The *FET3* gene product required for affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J. Biol. Chem.* *270*, 1098-1101.

.Diezmar, E.M. and Hall, M. N. (2005). The expanding TOR signalling network. *Current Opinion in Cell Biology.* *17*, 158-166.

.Dix, T.A., Aikens, J. (1993). Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem. Res. Toxicol.* *6*, 2-18.

.Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C.A., Eide, D.J. (1994). The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *269*, 26092-26099.

.Draculi, T., Dawes, I.W., Grant, C.M., (2000). A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* *36*, 1167-1174.

.Drees, B.I., Sundin, B., Brazeau, E., Caviston, J.P., Chen, G.C., Guo, W., Kozminski, K.,G., Lau, M.W., Moskow, J.J., Tong, A., Schenkam, L.R., McKenzie, A., Brennwald, P., Longtine, M., Bi, E., Chan, C., Novick, P., Boone, C., Pringle, J.R., Davis, T.N., Fields, S., Drubin, D.G. (2001). A protein interaction map for cell polarity development. *J.Cell.Biol.* *154*, 549-571.

.Drgonova, J., Drgon, T., Roh, D.H., Cabib, E. (1996). The GTP-binding protein Rho1p is required for cell cycle progression and polarization of the yeast cell. *J. Cell.Biol.* *146*, 373-387.

.Doi, K., Gartner,A. Ammerer, G., Errede, B., Shinkawa, H., Sugimoto, K., Matsumoto K.(1994). MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* *13*, 61-70

.Dong, Y., Pruyne, D., Bretscher, A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signalling in yeast. *J.Cell. Biol.* *161*, 1081-1092.

.Dulic , V., Egerton, M., Elguindi, I., Raths, S., Singer, B., Riezman, H. (1991). Yeast endocytosis assays. *Methods Enzymol.* *194*, 697-710.

.Dutil, E.M., Toker, A., Newton, A.C. (1998). Regulation of conventional protein Kinase C isozymes by phosphoinositide-depnedent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* *8*, 1366-1375.

.Eide, D., Davis-Kaplan, S., Jordan, I., Slipe, D., Kaplan, J. (1992). Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. The ferrioreductase and Fe (II) transporter are regulated independently. *J. Biol. Chem.* *267*, 20774-20781.

.Eitzen, G., Thorngren, N., Wickener, W. (2001). Rho1p and Cdc42p act after Ypt7 to regulate vacuole docking .*EMBO J.* *20*, 5650-5656.

.Elion, E.A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 573-581.

.Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C., Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3- independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell. Biol.* *4*, 260-269.

.Evangelista, M., Zigmonds, S., Boone, C. (2003). Formins: signalling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell. Sci.* *116*, 2603-2611.

.Fernandes, A.P. and Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutatione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal* *6*, 63-74.

.Fernandes, H., Roumanie, O., Claret, S., Gatti, X., Thoraval, D., Doignon, F., Crouzet, M. (2006). The Rho3 and Rho4 small GTPase interact functionally with Wsc1p, a cell surface sensor of the protein kinase C cell-integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* *152*, 695-708.

.Flandez, M., Cosano, I.C., Nombela, C., Martin., H., Molina, M. (2004). Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 11027-11034.

.Flattery-O'Brien, J.A. and Dawes, I.W. (1998). Hydrogen peroxide causes *RAD9* dependent cell cycle arrest in G₂ in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G₁ arrest independent of *RAD9* function. *J. Biol. Chem.* 273, 8564-8571.

.Flint, D.H., Tuiminello, J.F., Emptage, M.H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxid. *J.Biol.Chem.* 268, 22369-22376.

Flint, D.H., Tuiminello, J.F., Emptage, M.H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxid. *J.Biol.Chem.* 268, 22369-22376.

.Frankel, A.D and Kim, P.S. (1991). Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. *Cell.* 65, 717-719.

.Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Jijyo, M., Takahashi K., Shimizu, K., Takai, Y. (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol.Cell.* 9, 1221-1233.

.Fox, G.C., Shafiq, M., Briggs, D.C., Knowles, P., Collister, M., Didmon, M.J., Makrantonis, V., Dickinson, R.J., Hanrahan, S., Totty, N., Stark, M.J.R., Keyse, S.M., Mc Donald, N.Q. (2007). Redox-mediated substrate recognition by Sdp1 defines a new group of tyrosine phosphatases. *Letters.* 447, 487-492.

.Gallego, C., Garí, E., Colomina, N., Herrero, E., Aldea, M. (1997). The Cln3-cyclin is down regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J.* 16, 7196-7206.

.Gan, Z.R. (1991). Yeast thioredoxin genes. *J.Biol.Chem.* 266, 1692-1696.

.Garcia-Gimeno, M.A., Muñoz, I., Ariño, J., Sanz, P. (2003). Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol. Chem.* 278, 47744-47752.

.Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodríguez-Pena, J.M., Francois, J., Nombela, C., Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 15183-15195.

.Gardner, R.G. and Hampton, R.Y. (1999). A 'distributed degron' allows regulated entry into the ER degradation pathway. *EMBO J.* 18, 5994-6004.

.Gardner, R.G. Nelson, Z.W., Gottschling, D.E. (2005). Degradation- mediated protein quality control in the nucleus. *Cell.* 120, 803-815.

.Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13, 837-848.

Georgatsou, E. and Alexandraki, D. (1994). Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell. Biol.* 14, 3065-3073.

.Girard, P.M., Boiteux, S. (1997). Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie.* 79, 559-66.

.Gladfelter, A.S., Bose, I., Zyla, T.R., Brades, E.S.G., Jew, d.J. (2002). Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *J.Cell. Biol.* 156, 315-326.

.Grant, C. M., Perrone, G., Dawes, I.W. (1998). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 893-898.

.Grant, C.M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.* *39*, 533-541.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* *219*, 1-14

.Gray, J.V., Ogas, J.P., Kamda, Y., Stone M., Levin, D.E., Herskowitz, I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* *16*, 4924-4937.

.Goldschmidt-Clermont, P.J., Furman, M.I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V.T., Pollard, T.D. (1992). The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell.* *3*, 1015-1024.

.Goldstein, A.L. and McCusker, J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *15*, 1541-1553

.González, A., Ruiz, A., Serrano, R., Ariño, J., Casamayor, A. (2006). Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C Family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1. *J. Biol. Chem.* *281*, 35057-35069.

.Guarente, L. (1983). Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* *101*. 181-191.

.Gulli, M.P. and Meter, M. (2001). Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev.* *15*, 365-379.

.Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K. (1998). MAP Kinase pathways in the *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 1264-1300.

.Guo, W., Tamanoi, F., Novick, P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell. Biol.* *3*, 353-360.

.Hahn, J.S. and Thiele, D.J. (2002). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J.Biol.Chem.* 277, 21278-21284.

.Halachmi, D., and Eilam, Y. (1989). Cytosolic and vacuolar Ca²⁺ concentrations in yeast cells measured with the Ca²⁺ sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS lett.* 256, 55-61.

.Hall, A. (1998). RhoGTPase and the actin cytoskeleton. *Science.* 279, 509-514

.Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984). Free radicals, lipid peroxidation and cell damage. *Lancet* 2: 1095.

.Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.

.Harrison, J.C., Bardes, E.S., Ohya, Y., Lew, D.J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat. Cell. Biol.* 3, 417-420.

.Harrison, J.C., Zyla, T.R., Bardes, E.S., Lew, D.J. (2004). Stress-specificity activation mechanisms for the “cell integrity” MAPK pathway. *J.Biol. Chem.* 279, 2626-2622.

.Harting, A. and Ruis, H. (1986). Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* *CIT1* gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase. *T. Eur. J. Biochem.* 160, 487-490.

.Hasset, R. F. and Romeo, A. M., Kosman, D.J. (1998). Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Role of dioxygen and Fe. *J. Biol. Chem.* 273, 7628-7636.

.Heitman, J., Movva, N.R., Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 253, 905-909.

.Helene Martin-Yken, Adilia Dagkessamanskaia, Fadi Basmaji, Arnaud Lagorce and Jaen Francois. (2003). The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Sachbaromyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 49, 23-35.

.Helliwell, S.B., Schmidt, A., Ohya, Y., Hall, M.N. (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* 8, 1211-1214.

.Hentze, M. W., Mucckenthaler, M.U., Andrews, N.C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 117, 285-397

.Herrero, E., de la Torre-Ruiz, M.A. (2007) Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci.* 64 , 1518-1530.

.Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K, Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 3633-3638.

.Hirota, K., Matsui, M., Murata, M., Takashima, Y., Shi Cheng, F., Itoh, T., Fukuda, K., Jungi, Y. (2000). Nucleoredoxin, glutaredoxin and thioredoxin differently regulated NF-kB, AP-1 and CREB activation in HEK293 cells. *Biochem. and Biophysic. Res. Commun.* 274, 177-182.

.Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 2275-2279.

.Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu. Rev.Bichem.* 54, 237-271.

.Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J.Biol.Chem.* 264, 13963-13966.

.Holmgren, A. (1990). Glutaredoxin: structure and function. In glutathione: metabolism and physiological functions (edited by J.Vina). Boca Raton: CRC Press, pp. 146-154.

.Holmgren, A. and Aslund, F. (1995). Glutaredoxin. *Methods. Enzymol.* 252, 283-292.

.Hosotani, T., Koyama, H., Uchino, M., Miyakawa, T., Tsuchiya, E. (2001). PKC1, a protein kinase C homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, participates in microtubule function through the yeast EB1 homologue, BIM1. *Genes Cells*. 6, 775-788.

.Hughes, V., Muller, A., Stark, M.J., Cohen, P.T. (1993). Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* in response to osmotic stress. *Eur J. Biochem*. 216, 269-279.

.Imlay, J.A. and Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 266, 6957-6965.

.Imlay, J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol*. 57, 395-418

.Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N., Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase in yeast. *Mol. Cell. Biol*. 19, 8344-8352.

.Irie, K., Takase, M., Lee, K.S., Levin, D.E., Araki, H., Matsumoto, K., Oshima, Y. (1993). MKK1 and MKK2 which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol*. 13, 3076-3083.

.Isgandarova, S., Jones, L., Forsberg, D., Loncar, A., Dawson, J., Tedrick, K., Gary Eitzen, G. (2007). Stimulation of actin polymerization by vacuoles via Cdc42p-dependent signalling. *J. Biol. Chem*. 282, 30466-30475.

.Isakov, N., Witte, S., Altman, A. (2000). PICOT-DH: highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. *Trends Biochem. Sci*. 25, 537-539.

.Izquierdo, A., Casas, C., Mühlhoff, U., Herrero, E. (2008). Yeast Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eucariotic cell*. 7, 1415-1426.

- Jacoby, J.J., Nilius, S. M., Heinisch, J. J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Mol.Gen.Genet.* 258, 148-155.
- Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 14, 1511-1527.
- Jimenez-Sanchez, M., Cid, V.J., Molina, M. (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J. Biol.Chem.* 282, 31174-31185
- Ji-Sook Hahn and Dennis J. Thiele. (2002). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress inducible Sdp1 dual phosphatase. *J. Biol. Chem.* 277. 21278-21284.
- Jung, U.S. and Levin, D.E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 34, 1949-1057.
- Jung, U.S., Sobering, A.K., Romeo, M. J., Levin, D.E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1p cell wall integrity MAP kinase. *Mol. Microbiol.* 46, 781-789.
- Kahlos, K., Zhang, J., Block, E.R., Patel, J.M. (2003). Thioredoxin restores nitric oxide-induced inhibition of protein kinase C activity in lung endothelial cells. *Mol and Cel. Biochem.* 254, 47-54.
- Kaiser, C., Michaelis, S. Mitchell, A. (1994). *Methods in yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., Levin, D.E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 9, 1559-1571.

.Kamada, Y., Qadota, H., Piton, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y., Levin, D.E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol.Chem.* 271, 9193-9196.

.Kane, P.M. (2006). The where, when and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 177-191.

.Ketela, T., Green, R, Busey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* 181, 3330-3340.

.Ki-Young, K., Cosano, I.C., Levin, D. E., Molina, M., Martín, H. (2007). Dissecting the transcriptional activation function of the cell wall integrity MAP kinase. *Yeast.* 24, 335-342.

.Ki-Young, K., Truman, A.W., Levin, D.E. (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol. Cel. Biol.* 28, 2579-2589.

.Klionsky, D.J., Herman, P.K., Emr, S.D. (1990). The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. *Microbiol .Rev..* 54, 266-292.

.Klis, F.M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10, 851-869.

Krause, S.A. and Gray, J.V. (2002). The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12, 588-593.

.Kumánovics, A., Chen, O., Liangtao,L., Dustin, B., Adkins, E., Huilan, L., Dingra, N. N., Outten, C.E., Keller, G., Winge, D., Ward, D., Kaplan, J. (2008). Identification of *FR11* and *FR12* as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J. Biol. Chem.* 283, 10276-10286.

.Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., Hall, M.N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell.* 73, 585-596.

.Kurooka, H., Kato, K., Minoguchi, S., Takahashi, Y., Ikeda, J., Habu, S., Osawa, N., Bucherg, A.M., Moriwaki, K., Shisa, H., Honjo, T. (1997). Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics* 39, 331-339.

.Kuster, G.M., Pimental, D.R., Adachi, T., Ido, Y., Brenner, D.A., Cohen, R.A., Liao, R., Siwik, D.A., Colicci, W.S. (2005). Alpha- adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated via thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on RAS. *Circulation*. 111, 1192-1198.

.Lapinskas, P.J., Cunningham, K.W., Fen Liu, X., Fink, G.R., Culotta, V.C. (1995). Mutations in *PMR1* suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol. Cell Biol.* 15, 1382-1388.

.Laran, T., Jensen and Culotta V.C. (2002). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FET4* by oxygen and iron. *J. Mol. Biol.* 318, 251-260.

.Lee, K.S. and Levin, D.E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell Biol.* 12, 172-182.

.Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K., Levin, D.E. (1993a). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 13, 3067-3075.

.Lee, K.S., Hines, L.K., Levin, D.E. (1993b). A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol. Cell Biol.* 13, 5843-5853.

.Lee, J.H., Kimi, K., Park, E.H., Ahn, K., Lim, C-J. (2007). Expression, characterization and regulation of a *Saccharomyces cerevisiae* monothiol glutaredoxin (Grx6) gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. and Cells*. 24, 316-322

.Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M., Thormner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S.cerevisiae* cell cycle. *Cell*. 62, 213-224.

.Levin, D.E., Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J.Cell. Biol.* 116, 1221-1229.

.Levin, D.E. (2005). Cell wall integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 262-291.

.Li, L. Chen, O.S., McVey, D., Kaplan, J. (2001). *CCC1* is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 29515- 2919.

.Lill, R. and Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 457-486.

.Lipke, P.N. and Ovalle, R. (1999). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J.Bacteriol.* 180, 3735-3740.

.Lopreiato, R., Facchin, S., Sartori, G, Arrigorni, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L.A., Carignani, G. (2004). Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and Grx4 glutaredoxin. *Biochem. J.* 377, 392-405.

.Lowndes, N.F., Johnson, A.L., Johnston, L.H. (1991). Coordination of expression of DNA synthesis genes in budding yeast by a cell-cycle regulated trans factor. *Nature.* 350, 247-250.

.Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W., Grant, C.M. (1997) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species . *Mol. Biol. Cell* 9, 1081-1091.

.Lum, P.Y., Armour, C.D., Stepaniants, S.B., Cavet, G., Wolf, M.K., Butler, J.S., Hinshaw, J.C., Garnier, P., Prestwich, G.D., Leonardson, A., Garret-Englele, P., Rush, C.M., Bard, M., Schimmack, G., Phillips, J.W., Roberts, C.J., Shoemaker, D.D. (2004). Discovering

modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell*. 116, 121-137.

.Lyer, V.R., Horak, C.E., Scafe, C.S., Botstein, D., Snyder, M., Brown, P.O. (2001). Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature*. 409, 533-538.

.Madden, K., Sheu, Y.J., Baetz, K., Andrews, B., Snyder, M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science*. 275, 1781-1784.

.Madden, K. and Snyder, M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 687-744.

.Massé, E. and Arguin, M. (2005) Ironing out the problem: new mechanism of iron homeostasis. *TRENDS in Biochem. Sci.* 30,462-468

.Marcoux, N., Cloutier, S., Zakrzewska, E., Charest P.M., Bourbonnais, Y., Pllota, D. (2000). Suppression of the profiling-deficient phenotype by the RHO2 signalling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 156, 579-592.

.Marín, M.J., Flández, M., Bermejo, C., Arroyo J., Martín, H., Molina, M. (2008). Different modulation of the outputs of yeast MAPK-mediated pathways by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5. *Mol. Genet. Genomics*. 281, 345-359.

.Martin, H., Arroyo, J., Sanchez, M., Molina, M., Nombela, C. (1993). Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees. *Mol. Cell. Genet.* 241, 177-184.

.Martin, J.L., (1995). Thioredoxin- a fold for all reasons. *Structure*.3, 245-250

.Martin, H., Rodriguez-Pachon, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signalling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 275, 1511-1519.

.Martín, H., Flández, M., Nombela, C., Molina, M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.* 58, 6-16.

.Mattison, C.P., Spencer, S.S., Kresge, K.A., Lee, J., Ota, I.M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7651-7660.

.Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B., Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5671-5681.

.McCord. (2003). Oxidative stress related disease-overview, critical reviews of oxidative stress and ageing. World Scientific Publishing

.McFarlan, S.C., Terrell, C.A., Hogenkamp, H.P. (1992). The purification, characterization and primary structure of a small redox protein *Methanobacterium thermoautotrophicum*, an archaeobacterium. *J. Biol. Chem.* 267, 10561-10569.

.Mellor, H and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332 (Pt 2), 281-292.

.Mesecke, N., Spang, A., Deponte, M., Herrmann, J.M. (2008). A novel group of glutaredoxins in the *ais*-golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol. Biol. Cell.* 19, 2673-2680

.Michael, P. Weiner Gina, L. Costa. (1995). Rapid PCR site-directed mutagenesis. Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California. 92037.

.Mitchell, P.J. and Tijan, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.

.Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., Miyakawa, T. (1998). Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature.* 392, 3003-3006.

- .Molina, M.M., Bellí, G., de la Torre-Ruiz, M.A., Rodríguez- Manzanaque, M.T., Herrero, E. (2004). Nuclear monothiolic glutaredoxin of *Saccharomyces cerevisiae* can function as a mitochondrial glutaredoxin. *J.Biol.Chem.* 279, 51923-51930.
- .Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N, Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 22, 4815-4825.
- .Muller, E.G. (1991). Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 266, 9194-9202.
- .Muller, E.G. (1996). A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol. Biol.Cell.* 7, 1805-1813
- .Nagaraj, S., Rajendram, A., Jackson, C.E., Longtine, M.S. (2008). The role of nucleotide binding in septin-septin interaction and septin localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5120-5137.
- .Neilands, J.B. (1990). Molecular biology and regulation of iron acquisition by *Escherichia coli* K-12. En B. H. Iglewski and V.L.Clark (eds). *Molecular basis of Bacterial Pathogenesis*, pp. 205-223. Academic Press. San Diego, USA.
- .Nevalainen, L.T and Makarow, M. (1991). Uptake of endocytic markers into mitotic yeast cells. *FEBS Letters.* 282, 16-169.
- .Nishi, T. and Forgac, M. (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 94-103.
- Nittis, T., and Gitlin, J. (2002). The copper-iron connection: hereditary aceruloplasminemia. *Semin. Hematol.* 39, 282-289.
- .Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Cono, H., Umikawa, M., Mino, A., Takai, Y. (1995). A downstream target of Rho1 small GTP-binding protein is a homolog of

protein kinase C, which leads to activation of the Map kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14, 5931-5938.

.Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Ruthford, J.C., Lill, Roland, Dennis, R.W. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 281, 17661-17669.

.Orlean, P. (1997). Biogenesis of yeast wall and surface components in the molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. J. R. Pringle, J.R. Broach and E.W. Jones eds Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Pp. 229-362.

.Orr, J.W., Newton, A.C. (1994) Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. J.Biol.Chem. 269, 27715-27718.

.Outten, C.E. and Cullota, V.C. (2004). Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* *GRL1* gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase. J. Biol. Chem. 279, 7785-7791.

.Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEFPs) for the Rho1p small GTPbinding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 15, 2196-2207.

.Paravicini, G., Friedly, L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast *PKC1* pathway: Pkc1 interacts with a component of the MAP kinase cascade. Mol. Gen. Genet. 251, 682-691.

.Pardo, M., Monteoliva, L., Vázquez, P., Martínez, R., Molero, G., Nombela, C., Gil, C. (2004). *PST1* and *ECM33* encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. Microbiology. 150, 4157-4170.

.Parent, S.A., Nielsen, J.B., Morin, N., Chrebet, G., Ramadan, N., Dahl, A.M., Hsu, M.J., Bostian, K.A., Foor, F. (1993). Calcineurin-dependent growth of a F. J. Gen. Microbiol. 139, 2973-2984.

- .Payne, S. M. and K. M. Lawlor (1990). Molecular studies on iron acquisition by non-*Escherichia coli* specie. En B.H. Iglewski and V.L.Clark (eds). Molecular basis of Bacterial Pathogenesis, pp. 205-223. Academic Press. San Diego, USA
- .Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.A., Wright, A.P., Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 274, 6366-6373.
- .Pedrajas, J.R., Porras, P., Martinez-Galisteo, E., Padilla, C.A., Miranda-Vizuete, A., Barcena, J.A. (2002). Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed *in vivo* and localize to different subcellular compartments. *Biochem. J.* 364, 617-623.
- .Perez, P. and Calonge, M.T. (2002). Yeast protein kinase C. *J. Biochem.* 132, 513-517.
- Philip B. and Levin, D.E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signalling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol.Cell.Biol.* 21, 271-280.
- .Porras, P., Padilla, C.A., Krayl, M., Voos,W., Bárcena, J.A. (2006). One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxins 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 281, 16551-16562.
- .Posas, F., Casamayor, A., Ariño, J. (1993). The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett.* 31, 282-286.
- .Posas, F., Camps, M., Ariño, J. (1995). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13036-13041.
- .Powis, G. and Montfort, W.R. (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 41, 261-95.
- .Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. II. The role of the cortical actin cytoskeleton. *J.Cell. Sci.* 113, 571-585.

.Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., Bretscher, A. (2004). Mechanism of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20, 559-591.

.Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B., Levin, D.E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3969-3976.

.Puig, S., Askeland, E., Thiele, D.J. (2005) Coordinated remodelling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell.* 120, 99-110.

.Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., Stevens, T.H. (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a pevacuolar compartment in class E *vps* mutants. *Mol. Biol. Cell.* 3, 1389-1402.

.Rietsch, A. and Beckwith, J. (1998). The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu.Rev, Genet.* 32, 163-184.

Riezman, H. (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell.* 40, 1001-1009.

.Roberts, C.J., Nelson, B., Marton, M.J., Stoughton, R., Meyer, M.R., Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H., Walker, W.L., Hughes, T.R., Tyers, M., Boone, C., Friend, S.H. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by matrix of global gene expression profiles. *Science.* 287, 873-880.

.Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M., Erm, S.D. (1988). Protein sorting in yeast: isolation of mutants defective in the processing and sorting of multiple vacuolar hydrolases. *Mol.Cell. Biol.* 8, 4936-4948

.Robinson, N.G., Guo, L., Imai, J., Toh-E, A., Matsui, Y., Tamanoi, F. (1999). Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3580-3587.

.Rodríguez-Manzanaque, M.T., Ros, J., Cabiscol, E., Sorribas, A., Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *19*, 8180-8190.

.Rodríguez-Manzanaque, M.T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., Herrero E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulphur enzymes. *Mol. Biol. Cell*. *13*, 1109-1121.

.Rodríguez-Navarro, S., Llorente, B., Rodríguez-Manzanaque, M.T., Ramne, A., Uber, G., Marchesan, D, Dujon, B, Herrero, E., Sunnerhagen, P., Pérez-Ortín, J.E. (2002). Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6. *Yeast*. *19*, 1261-1276.

.Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A. , Bussey, H. (1994). Characterization of the yeast (1-6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell. Biol.* *127*, 567-579.

.Roumanie, O., Weinachter, C., Larrieu, L., Crouzet, M., Doignon, F. (2001). Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 Rho GAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *506*, 149-156.

.Roumanie, O., Wu, H., Molk, J.N., Rossi, G., Bloom, K., Brennwald, P. (2005) Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex. *J Cell Biol.* *170*, 583-599

.Roy, C. N. and Andrews, N.C. (2001). Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum.Mol.Genet.* *10*, 2181-2186

.Ruiz-Herrera, J. and Martinez-Espinoza, A.D. (1999). Chitin biosynthesis and structural organization *in vivo*. *EXS.* *87*, 39-53.

.Rutherford, J.C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P.O., Winge, D.R. (2001). A second iron. regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* *98*, 14322-14327.

.Rutherford, J.C., Jaron, S., Winge, D.R. (2003). Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J.Biol.Chem.* 278, 27636-27643.

.Rutherford, J.C. and Bird, A. J.(2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell.*3, 1-13.

.Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., Pellman, D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. cell. Biol.* 4, 626-631.

.Santoro, N. and Thiele, D.J.. (1997). Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast stress response.* (S. Hohman and P.W.H. Mager eds) Georgetown, Texas. Landes Publ.pp. 171-211.

.Schmelze, T., Helliwell, S.B., Hall, M.N. (2002). Yeast protein kinase and Rho1 exchange factor Tus1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol. Cell.Biol.* 22, 1329-1339.

.Schmidt A., Bickle, M., Beck, T., Hall, M.N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog Tor2 activates Rho1 and Rho2 via the exchange factor Rom2. *Cell.* 88, 531-542

.Schmidt, A. and Hall, M.N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev.Cell.Dev. Biol.* 14, 305-338.

.Schimtz, A., Schmelze, T., Hall, M.N. (2002). The Rho1-GAPs Sac7, Bem2 and Bag7 control distinct Rho1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 45, 1433-1441.

.Serrano, R., Humberto, M., Casamayor, A., Ariño, J. (2006). Signaling alkaline pH stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J.Biol. Chem.* 281, 39785-39795.

.Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, B., Kono, K., Minemura, Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T., Ohya, Y. (2002). Dissection of upstream regulatory

components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 162, 663-676.

.Sharma,K.G., Sharma, V., Bourbonloux, A., Delrot, S., Bachhawat, A., K. (2000). Glutathione depletion leads to delayed growth stasis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of partially overlapping role for thioredoxin. *Curr. Genet.* 38, 71-77.

.Smits, G.J., Kapteyn, J.C., Van Den, E.H., Lis, F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 348-352.

.Soler, M., Plovins, A., Martin, H., Molina, M., Nombela, C. (1995). Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and *in vivo* interactions with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol. Microbiol.* 17, 833-842.

.Spizzo, T., Byersdorfer, C., Duesterhoef, S., Eide, D. (1997). The yeast *FET5* gene encodes a FET-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol.Gen.Genet.* 5, 547-556.

.Stadtman, E.R. and Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218.

.Stavela, L., Hall, A., Orlow, S.J. (2004). Oxidative stress activates *FUS1* and *RLM1* transcription factor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 15, 5574-5582.

.Storz, G., Christman, M.F., Sies, H., Ames, B.N. (1987). Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 8917-8921.

.Strayle, J., Pozzan, T., Rudolph, H.K. (1999). Steady-state free Ca(2+) in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump Pmr1. *EMBO.*18, 4733-4737.

.Symons, M. and Settleman, J. (2000) Rho1 family GTPases: more than simple switches. Trends Cell Biol. 10, 415-419

.Teichert, U., Mechler, B., Muller, H., Wolf, D.H. (1989). Lysosomal(vacular) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation and cell survival. J.Biol. Chem. 264, 16037-16045.

.Toledano, M.B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., Azevedo, D. (2003). Oxidative stress responses in yeast, pp. 241-303. En Topics in Current Genetis, Vol.1, Yeast Stress Responses (S. Hohman and P.W.H. Mager eds). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

.Torres, L., Martin, H., Garcia-Saez, M. I., Arroyo, J., Molina, M., Sanchez, M, Nombela, C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. Mol. Microbiol. 5, 2845-2854.

.Torres, J., Di Como, C.J., Herrero, E., de la Torre- Ruiz, M.A. (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamicin-sensitive Tor function in budding yeast. J. Biol. Chem. 277, 43495-43504.

.Trotter, E.W. and Grant, C.M. (2003). Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione- glutataredoxin and thioredoxin systems. EMBO. 4 ,184-188.

.Trotter, E.W. and Grant, C.M. (2005). Overlapping roles of the cytoplasmatic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell. 4, 392-400.

.Tu, B.P., Weissman, J.S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. J. Cell. Biol. 164,341-346

.Ueta, R., Fukunaka,A., Yamaguchi-Iwai,Y. (2003). Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Biol.Chem. 278, 50120-50127.

- .Ueta, R., Fujiwara, N., Kazuhira, I., Yamaguchi, I.(2007). Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *18*, 2980-2990.
- .Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield. T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., Rothberg, J.M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. *403*, 623-627.
- .Van Drogen, F. and Matthias, P. (2002). Spa2 functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Current Biology*.*12*; 1698-1703
- .Van Voorst,F., Houghton-Larsen, J.,Jonson, L., Kielland-Brant, M.C.,Brant, A.. (2006). Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress.*Yeast*.*23*, 351-359.
- .Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.. S.A.* *94*, 13804-13809.
- .Versele, M. and Thomer, J. (2005). Some assembly required: Yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell. Biol.*, *15*, 414-424.
- .Vida, T.A.and Emr, S.D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrana dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell. Biol.* *128*, 779-792.
- .Vilella, F., Alves, R., Rodriguez-Manzanaque, M.T., Bellí, G. Swaminarhan, S., Sunnerhagen, P., Herrero, E. (2004). Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comp. Func. Gen.* *5*, 328-341.
- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., de la Torre-Ruiz, M.A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J.Biol.Chem.* *280*, 9149-9159.

.Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.

.Wada, Y., Ohsumi, Y., Anraku, Y. (1992). Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of two classes of *vam* mutants. *J. Biol. Chem.* 267, 18665-18670.

.Watanabe, M., Chen, C.Y., Levin, D.E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homologs with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J. Biol. Chem.* 269, 16829-16836.

.Watanabe, Y., Irie, K., Matsumoto, K. (1995). Yeast *RLM1* encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1p (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5740-5749.

.Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2615-2623.

.Watson, J.A., Rumsby, M.G., Wolowacz, R.G. (1999). Phage display identifies thioredoxin and superoxide dismutase as novel protein kinase C-interacting proteins: thioredoxin inhibits protein kinase C-mediated phosphorylation of histone. *J. Biochem.*, 343, 301-305.

.Whitehead, I.P., Campbell, S., Rossman, K.L., Der, C.J. (1997). Dbl family proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1332, 21-23.

.Widman, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143-180.

.Winkelman, G., D. Van der Helm, Neilands, J. B. (1987). Iron transport in microbes, plants and animals. VCH Verlagsgesellschaft. New York, USA.

- .Witte, S., Villalba, M., Bi, K., Liu, Y., Isakov, N., Altman, A. (2000). Inhibition of the c-Jun N-terminal Kinase/ AP-1 and NF- κ B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain.
- .Xiao, L., Pimental, D.R., Wang, J., Singh, K., Colucci, W.S., Sawyer, D.B. (2002). Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in α_1 -adreno-receptor signalling in adult rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282, C926-C934.
- .Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., Klausner, R. D. (1995). *AFT1*: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 1231-1239.
- .Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., Klausner, R. D. (1996). Iron-regulated DNS binding by the AFT1 protein controls in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15, 3377-3384.
- .Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 18914-18918.
- .Yang, H.C. and Pon, L.A. (2002). Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S.A.* 99, 751-756.
- .Yoshida, S., Ikeda, E., Uno, I., Mitsuzawa, H. (1992). Characterization of a staurosporine- and temperature-sensitive mutant *stt1*, of *Saccharomyces cerevisiae*: *STT1* is allelic to *PKC1*. *Mol. Gen. Genet.* 231, 337-344.
- .Zagarese, H. E., Diaz, M., Pedrozo, F., Ferrano, M., Cravero, W., Tratrotti, B. (2001). Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. *J. Photochem. Photobiol.* B61, 35-45.
- .Zarrov, P., Mazzoni, C., Mann, C. (1996). The Slt2 (Mpk1) Map kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* 15, 83-91.
- .Zu, T., Verna, J., Ballester, R. (2001). Mutations in *WSC1* genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.* 266, 142-155.