



Universitat de Lleida

Biogènesi de centres Fe-S, dany al DNA i mecanismes de resposta en *Saccharomyces cerevisiae*

Jordi Pijuan Marquilles

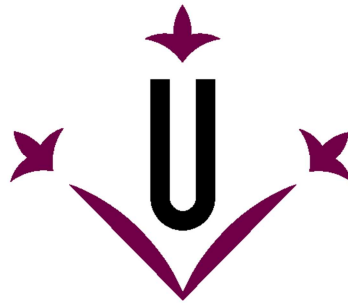
<http://hdl.handle.net/10803/365307>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT DE LLEIDA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES
DOCTORAT EN SALUT



Universitat de Lleida

**BIOGÈNESI DE CENTRES Fe-S, DANY AL DNA I
MECANISMES DE RESPOSTA EN *Saccharomyces
cerevisiae***

Memòria per optar al Grau de Doctor
per la Universitat de Lleida, presentada per

JORDI PIJUAN MARQUILLES

Els Directors de la Tesi

Dr. Enrique Herrero Perpiñán

Dra. Gemma Bellí Martínez

Al meu avi,

AGRAÏMENTS

En primer lloc volia agrair als meus directors de tesi, l'Enric Herrero i la Gemma Bellí, per introduir-me en el món de la recerca i guiar-me durant aquesta etapa d'aprenentatge i formació. Li agraeixo a l'Enric tots els coneixements i consells que m'ha transmès, la seva motivació, rigorositat i exigència crítica en el treball, així com les seves ganes i entusiasme per la ciència. Agrair-li a la Gemma la confiança i el temps que m'ha dedicat dia a dia, l'ensenyament d'un ampli ventall de tècniques, el raonament del perquè de les coses, la resposta a tots els dubtes sorgits durant aquest temps i per compartir les teves impressions, gràcies per tenir sempre un gran somriure i ser un referent a seguir. Agrair-li a la Celia Casas, tots els consells donats durant aquesta etapa i ensenyar-me a cuidar els petits detalls.

Agrair també a tota la "família" que ha passat per aquest laboratori, per ajudar-me i fer-me créixer com a persona:

A la Maria, per tots els consells i les bones estones que hem passat, per ajudar-me en tot i sempre amb un gran somriure, però sobretot per ser una gran amiga.

A la Judit, per totes les converses que hem tingut, la gran quantitat de temps passat dins i fora del laboratori, les curses fetes i les que ens queda per fer, la disposició d'ajudar-me sempre, i a pesar de molestar-te milers vegades quan estaves escrivint sempre tenies un somriure.

Al Carlos, per la teva amistat i les llargues converses sobre recerca que hem tingut durant aquests anys.

A l'Esther, per tota l'ajuda que hem vas donar i els grans somriures que mostraves cada matí que feien alegrar a tothom.

Al David, per tots els consells que hem vas donar, aquelles classes magistrals d'espores i "pitutos" (encara que ja saps que diuen que l'alumne sempre acaba superant el mestre)... per totes les llargues converses dins i fora del laboratori, que van des del món de la ciència fins al món del ciclisme.

A l'Andrés, per totes aquelles tardes al laboratori que hem passat, pels inicis en el món del Northern i l'ajuda proporcionada. Per una gran amistat i totes les maratons i "Cavalls del vent" que encara tenim pendents de fer.

A la Sílvia, per estar sempre al meu costat quan et necessito i ajudar-me en tot el possible, per aquestes apostes que fem i les que ens queda per fer, però sobretot perquè tu ets l'autèntica "organització".

A la Meri, per tota l'ajuda en Westerns, transformacions... aquí també hi ha part teva, gràcies per els gran moments i converses viscudes.

Gràcies a TOTS pels grans moments viscuts, les llargues estones i converses dins i fora del laboratori, els sopars, dinars i excursions... i sobretot per fer d'aquesta etapa un record inoblidable!

Finalment, volia fer un agraïment especial als meus pares i la meva "ina" que sempre es troba aquí quan la necessito, al padrí perquè encara que ja no pot acompanyar-me en aquesta etapa, se molt bé que estaria com ell deia "orgulls" i "content", pel seu suport incondicional, l'empenta, la inspiració i el recolzament que m'han donat sempre, perquè sense vosaltres això no hauria sigut possible. Gràcies!!!

GRÀCIES a TOTS per formar part durant aquesta etapa de la meva vida!!

RESUM

La biogènesi mitocondrial de centres Fe-S per la maquinària ISC i la citosòlica per la maquinària CIA són necessàries per múltiples processos cel·lulars, com per exemple diverses reaccions enzimàtiques, respiració, biosíntesi de cofactors, regulació de l'expressió gènica i metabolisme del DNA. En l'estudi present s'ha demostrat que defectes en diferents etapes de la biosíntesi mitocondrial i citosòlica de centres Fe-S causen un increment en la mutagènesi espontània i hipersensibilitat a agents genotòxics, acompanyat d'un increment en la formació de *foci* associats a Rad52 i un augment en la fosforilació de la histona γ -H2A, tots aquests fets indicatius de la presència de lesions constitutives al DNA i de inestabilitat genòmica. A més a més, defectes en la síntesi de centres Fe-S provoquen un retard en la progressió a través de la fase S del cicle cel·lular i l'activació constitutiva del *checkpoint* de dany al DNA. Aquest darrer estimula l'augment en l'activitat de la ribonucleòtid reductasa mitjançant la disminució dels nivells de l'inhibidor Sml1 i la redistribució citosòlica de les subunitats enzimàtiques Rnr2/4. Dependent de l'etapa danyada en la maquinària ISC s'activen diferents mediadors de senyalització per regular el *checkpoint*, convergint en comú en la quinasa Dun1. D'aquesta manera, les cèl·lules absents de la glutaredoxina Grx5, compromeses en la maquinària central de la biogènesi de centres Fe-S, mostren una activació de Dun1 independent de Mec1 i Rad53, que sí actuen en resposta a agents genotòxics. No obstant, quan està afectada una branca secundària de la biogènesi de centres Fe-S en mitocòndries per la manca d'Iba57, o bé quan està afectada la maquinària citosòlica CIA, l'activació de Dun1 depèn de Mec1. Les cèl·lules mancades de Grx5 mostren una forta dependència de la via de reparació post-replicativa de tolerància al dany al DNA lliure d'errors i de la via de recombinació homòloga per la supervivència cel·lular, sobretot després d'un dany addicional al DNA induït per agents genotòxics externs. Totes aquestes observacions demostren que és necessari activar les vies de senyalització de dany al DNA i els mecanismes de reparació una vegada està danyada la biogènesi de centres Fe-S, per tal de preservar la viabilitat cel·lular.

En paral·lel a la inestabilitat del genoma nuclear observada quan hi ha defectes en les diferents etapes de la maquinària ISC, s'ha demostrat també en aquest estudi una pèrdua constitutiva del DNA mitocondrial, i conseqüentment, defectes en la respiració i altres disfuncions mitocondrials, així com l'activació de la via de senyalització retrògrada. Exclusivament en el cas de les cèl·lules mancades d'Iba57, però no en d'altres proteïnes de la maquinària ISC, un increment de l'activitat de la ribonucleòtid reductasa permet el manteniment del DNA mitocondrial, i el rescat de la capacitat respiratòria i d'altres activitats mitocondrials.

RESUMEN

La biogénesis mitocondrial de centros Fe-S por la maquinaria ISC y la citosólica por la maquinaria CIA son necesarias en múltiples procesos celulares, como por ejemplo en diversas reacciones enzimáticas, respiración, biosíntesis de cofactores, regulación de la expresión génica y metabolismo del DNA. En el presente estudio se ha demostrado que defectos en diferentes etapas de la biosíntesis mitocondrial y citosólica de centros Fe-S causan un incremento en la mutagénesis espontánea e hipersensibilidad a agentes genotóxicos, acompañado de un incremento en la formación de *foci* asociados a Rad52 y un aumento en la fosforilación de la histona γ -H2A, todos estos hechos indicativos de la presencia de lesiones constitutivas en el DNA y de inestabilidad genómica. Además, defectos en la síntesis de centros Fe-S provocan un retraso en la progresión a través de la fase S del ciclo celular y la activación constitutiva del *checkpoint* de daño al DNA. Este último estimula el aumento de la actividad ribonucleótido reductasa mediante la disminución de los niveles del inhibidor Sml1 y la redistribución citosólica de las subunidades enzimáticas Rnr2/4. Dependiendo de la etapa dañada en la maquinaria ISC se activan diferentes mediadores de señalización para regular el *checkpoint*, convergiendo en la quinasa Dun1. De esta manera, las células carentes de la glutaredoxina Grx5, comprometidas en la maquinaria central de la biogénesis de centros Fe-S, muestran una activación de Dun1 independiente de Mec1 y Rad53, que sí actúan en respuesta a agentes genotóxicos. No obstante, cuando está afectada una subvía secundaria de la biogénesis de centros Fe-S en mitocondrias por la falta de Iba57, o bien, cuando está afectada la maquinaria citosólica CIA, la activación de Dun1 depende de Mec1. Las células ausentes de Grx5 muestran una fuerte dependencia de la vía de reparación post-replicativa de tolerancia al daño del DNA libre de errores y de la vía de recombinación homóloga para la supervivencia celular, sobre todo después de un daño adicional del DNA inducido por agentes genotóxicos externos. Todas estas observaciones demuestran que es necesario activar las vías de señalización de daño en el DNA y los mecanismos de reparación una vez está afectada la biogénesis de centros Fe-S, con el fin de preservar la viabilidad celular.

En paralelo a la inestabilidad genómica nuclear observada cuando hay defectos en las diferentes etapas de la maquinaria ISC, en este estudio se ha demostrado también una pérdida constitutiva del DNA mitocondrial, y consecuentemente, defectos en la respiración y otras disfunciones mitocondriales, así como la activación de la vía de señalización retrograda. Exclusivamente en el caso de las células carentes de Iba57, pero no de otras proteínas de la maquinaria ISC, el incremento de la actividad de la ribonucleótido reductasa permite el

mantenimiento del DNA mitocondrial, así como rescate de la capacidad respiratoria y de otras actividades mitocondriales.

SUMMARY

The mitochondrial and cytosolic Fe-S clusters biogenesis, performed by the ISC and CIA machinery, respectively, are required for multiple cellular processes, including diverse enzymatic reactions, respiration, biosynthesis of cofactors, gene expression regulation and DNA metabolism. In this work we demonstrate that defects at different stages of mitochondrial and cytosolic Fe-S clusters biosynthesis cause an increase of spontaneous mutagenesis and hypersensitivity to genotoxic agents, accompanied by an increment in Rad52-associated DNA repair foci and a hyperphosphorylated state of γ -H2A histone, altogether supporting the presence of constitutive DNA lesions and genomic instability. Furthermore, ISC deficiency elicits a delay in the progression of S phase in the cell cycle and constitutive activation of the DNA damage checkpoint. This last one stimulates the upregulation of the ribonucleotide reductase activity by promoting reduction of the levels of Sml1 inhibitor, as well as the cytosolic redistribution of the Rnr2/4 enzyme subunits. Depending on the impaired stage of the ISC machinery, different signalling pathway mediators contribute to regulate the checkpoint, converging in the Dun1 kinase. Thus, Grx5 glutaredoxin-minus cells, which are compromised at the core stage of ISC biogenesis, show a Mec1 and Rad53-independent Dun1 activation, in contrast to the response to genotoxic agents, where both Mec1 and Rad53 act as mediators. However, when the non-core ISC stage is compromised by the absence of Iba57, or when the cytosolic CIA machinery is affected, Mec1 is required to activate Dun1. Additionally, Grx5-less cells exhibit a strong dependence on the error-free post-replication repair and the homologous recombination pathways for cell survival, especially when external genotoxic agents induce additional DNA damage. Overall, it demonstrates that DNA damage signalling pathway and repair mechanisms are required to be activated upon Fe-S biogenesis impairment to preserve cell viability.

In parallel to the nuclear genome instability displayed when different ISC machinery stages are impaired, we also demonstrate in this work constitutive loss of mitochondrial DNA, and consequently, respiration defects and other mitochondrial dysfunctions, as well as the retrograde signalling pathway activation. Exclusively in the case of Iba57-less cells, but not in the absence of other ISC machinery proteins, an increase in the activity of ribonucleotide reductase enables the maintenance of mitochondrial DNA and rescues the respiratory capacity and other mitochondrial activities.

LLISTA D'ABREVIATURES

α-KGDH	α -cetoglutarat deshidrogenasa
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i> (Mòdul d'unió a ATP)
AcLi	Acetat de liti
ALPasa	<i>Alkaline phosphatase</i> (Fosfatasa alcalina)
Anti-DIG	Anti-digoxigenina
APasa	<i>Acid phosphatase</i> (Fosfatasa àcida)
ARE	<i>AU-Rich Element</i> (Element de seqüència ric en AU)
β-ME	β -mercaptoetanol
BER	<i>Base excision repair</i> (Reparació per escissió de base)
BIR	<i>Break-Induced Replication</i> (Replicació induïda per tall)
CIA	<i>Cytosolic Iron-Sulfur Assembly</i> (Acoblament de centres ferro-sofre citosòlics)
CPD	<i>Cyclobutane Pyrimidine Dimer</i> (Dímer de pirimidina ciclobutà)
DAPI	Diclorhidrat de 4'-6-diamidina-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfòxid
dNTPs	Desoxiribonucleòtids trifosfat
DO	Densitat òptica
DSB	<i>Double-Strand Break</i> (Tall de doble cadena)
FAD	Flavina Adenina Dinucleòtid
Fe-S	Centre ferro-sofre
FHA	<i>Fork-head associated</i> (Associat al cap de la forqueta)
FMN	Flavina mononucleòtid
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteïna fluorescent verda)
GRX	Glutaredoxina
GSH	Glutatió reduït
GSSG	Glutatió oxidat o diglutatió
H2A	Histona 2A
HAP	<i>Heme Activator Protein System</i> (Sistema proteic activador de hemo)
HR	<i>Homologous Recombination</i> (Recombinació homòloga)
HU	Hidroxiurea
IRE	<i>Iron Responsive Element</i> (Element de resposta al ferro)
ISC	<i>Iron Sulfur Cluster</i> (Centre ferro-sofre)
MMR	<i>Mismatch Repair</i> (Reparació d'aparellaments incorrectes)
MMS	Metil-metà-sulfonat
MRX	Complex de reparació Mre11-Rad50-Xrs2
mtDNA	DNA mitocondrial
NER	<i>Nucleotid excision repair</i> (Reparació per escissió de nucleòtids)
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> (Unió d'extrems no homòlegs)
NIF	<i>Nitrogen fixation specific</i> (Específic de fixació de nitrogen)
OXPHOS	Fosforilació oxidativa
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> (Antigen nuclear de cèl·lules proliferatives)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa

PDH	Piruvat deshidrogenasa
PEG	Polietilenglicol
PEO	<i>Progressive External Ophthalmoplegia</i> (Oftalmoplegia externa progressiva)
PI3	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
PRR	<i>Post-Replication Repair</i> (Reparació post-replicativa)
PVDF	Difluorur de polivinilidé
RE	Reticle endoplasmàtic
RI	Radiació ionitzant
RNR	Ribonucleòtid reductasa
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espècie reactiva de l'oxigen)
RPA	<i>Replication Protein A</i> (Proteïna A de replicació)
RTG	<i>Retrograde signalling</i> (Senyalització retrògrada)
SAM	S-adenosil-metionina
s.d.	Desviació estàndard
sdDNA	<i>Double-Stranded DNA</i> (DNA de cadena doble)
SDSA	<i>Synthesis-dependent strand-annealing</i> (Reassociació de cadenes dependent de síntesi)
SDS-PAGE	SDS-poliacrilamida
ssDNA	<i>Single-Stranded DNA</i> (DNA de cadena simple)
t-BOOH	Hidroperòxid de <i>ter</i> -butil
TCA	Àcid tricloroacètic
THF	Tetrahidrofolat
TLS	<i>Translesion synthesis</i> (Síntesi a través de lesió)
TM	Domini transmembrana
TRX	Tioredoxina
TS	<i>Template switching</i> (Canvi de plantilla)
UV	Radiació ultraviolada
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i> (Proteïna fluorescent groga)
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (Base nitrogenada de llevat)

I. INTRODUCCIÓ.....	1
1. BIOGÈNESI DELS CENTRES FERRO-SOFRE	3
1.1 Aspectes generals	3
1.2 Funcions biològiques de les proteïnes que contenen centres Fe-S	4
1.3 Biosíntesi de centres Fe-S en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.3.1 Síntesi dels centres Fe-S	6
1.3.2 Transferència dels centres Fe-S i maduració de proteïnes mitocondrials que contenen centres Fe-S	7
1.3.3 Formació de les proteïnes Fe-S citosòliques i nuclears	10
1.4 Característiques i funcions d'Iba57	12
1.5 Importància de la maquinària de síntesi mitocondrial de centres Fe-S en l'homeòstasi del ferro en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.6 Malalties humanes relacionades amb la biogènesi de centres Fe-S	16
2. SISTEMA GLUTAREDOXINA	17
2.1 Aspectes generals de les glutaredoxines	17
2.2 Classificació de les glutaredoxines	18
2.2.1 GRXs ditiòliques	19
2.2.2 GRXs monotiòliques	20
3. DANY AL DNA	21
3.1 Inestabilitat genòmica i la seva relació amb defectes en la funcionalitat mitocondrial	22
3.2 Cicle cel·lular	23
3.3 <i>Checkpoint</i> de dany al DNA en fase S	25
3.3.1 Senyalització i components de la via	25
3.3.2 L'enzim ribonucleòtid reductasa: estructura i funció	27
3.3.3 Regulació al·lostèrica de la ribonucleòtid reductasa	28
3.3.4 Regulació transcripcional dels gens <i>RNR1-4</i>	28
3.3.5 Localització subcel·lular de Rnr2 i Rnr4	30
3.3.6 Inhibició de la subunitat R1 (Rnr1) mitjançant Sml1	31
4. MECANISMES DE REPARACIÓ DE DANY AL DNA	34
4.1 Mecanisme de reparació de talls a la doble cadena (DSB)	34
4.1.1 Recombinació homòloga (HR)	35
4.1.2 Unió d'extrems no homòlegs (NHEJ)	37
4.2 Mecanisme de reparació post-replicativa (PRR)	38

4.2.1 Mecanisme propens a errors	38
4.2.2 Mecanisme lliure d'errors	39
4.3 Altres mecanismes de reparació	40
5. DNA MITOCONDRIAL	42
5.1 Aspectes generals	42
5.2 Classificació de les cèl·lules del llevat segons el DNA mitocondrial	43
5.3 Manteniment del genoma mitocondrial	44
5.4 Replicació del DNA mitocondrial en <i>S. cerevisiae</i>	45
II. OBJECTIUS	49
III. MATERIALS I MÈTODES	51
1. MICROORGANISMES UTILITZATS	53
1.1 Soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
1.2 Soques d' <i>Escherichia coli</i>	58
2. PLÀSMIDS	58
3. MEDIS DE CULTIU	60
4. CULTIU DE MICROORGANISMES	61
4.1 Criopreservació de cèl·lules a -80°C	62
5. ESTUDIS FENOTÍPICS DEL CREIXEMENT	62
5.1 Anàlisi del creixement microbià en medi sòlid	62
5.2 Anàlisi del creixement microbià en medi líquid	62
6. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR	63
6.1 Extracció de DNA genòmic de <i>S. cerevisiae</i>	63
6.2 Tècniques de DNA recombinant	64
6.2.1 Amplificació i clonació de gens	64
6.2.2 Substitució de promotors per recombinació homòloga	65
6.2.3 Marcatge amb els epítops YFP i GFP	65
6.2.4 Purificació de plàsmids a partir de cultius d' <i>E. coli</i>	66
6.2.4.1 Mètode de la "MINIPREP"	66
6.2.4.2 Mètode ràpid de la "JETPREP"	66
6.2.5 Transformació d' <i>E. coli</i>	66
6.2.6 Transformació de <i>S. cerevisiae</i>	66
6.3 Construcció de mutants nuls simples i múltiples de <i>S. cerevisiae</i>	67
6.4 Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant RT-PCR	68
6.4.1 Obtenció de mostres	68

6.4.2 Determinació del nombre de còpies de DNA mitocondrial mitjançant “Multiplex RT-PCR”	68
6.4.3 Anàlisi de dades	69
6.5 Anàlisi de l'expressió gènica per Northern blot	69
6.5.1 Obtenció de mostres	69
6.5.2 Extracció de RNA total	70
6.5.3 Síntesi de sondes de DNA marcades amb Digoxigenin-dUDP	71
6.5.4 Electroforesi en un gel de formaldehid-agarosa	72
6.5.5 Transferència a la membrana de niló i fixació amb rajos UV	72
6.5.6 Hibridació i rentats	73
6.5.7 Detecció per quimioluminescència	73
6.5.8 Quantificació de la imatge obtinguda	74
6.6 Anàlisi de proteïnes per Western blot	74
6.6.1 Obtenció de mostres (Mètode de la urea)	74
6.6.2 Extracció de proteïna (Mètode de la urea)	74
6.6.3 Obtenció de mostres (Mètode del TCA)	74
6.6.4 Extracció de proteïna (Mètode del TCA)	75
6.6.5 Electroforesi en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)	75
6.6.6 Transferència a una membrana de PVDF	76
6.6.7 Immunodetecció	76
6.6.8 Control de càrrega	77
6.6.9 Quantificació de la imatge obtinguda	78
7. TÈCNiques DE MICROSCOPIA	78
7.1 Detecció de Rad52 marcat amb YFP en <i>foci</i> associats al DNA	78
7.2 Immunolocalització de Rnr2	78
7.2.1 Obtenció de mostres	78
7.2.2 Immunofluorescència	79
8. SINCRONITZACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR I ANÀLISI PER CITOMETRIA DE FLUX .	81
8.1 Recollida de mostres	81
8.2 Tinció amb iodur de propidi i anàlisi de les mostres	81
9. ANÀLISI DE LA FRQÜÈNCIA DE MUTACIÓ ESPONTÀNIA	82
10. DETECCIÓ DELS NIVELLS DE FERRO INTRACEL·LULAR	82
10.1 Obtenció de mostres	82
10.2 Processament cel·lular i mesura dels nivells de Fe	83

11. QUANTIFICACIÓ DE MITOCÒNDRIES MITJANÇANT GFP I CITOMETRIA DE FLUX	84
12. QUANTIFICACIÓ DE COLÒNIES “PETITE”	84
13. AÏLLAMENT DE CLONS ESPECÍFICS A PARTIR D’UNA GENOTECA DE DNA DE <i>S. cerevisiae</i>	85
14. ANÀLISI ESTADÍSTIC MITJANÇANT EL PROGRAMA JPM 11	86
IV. RESULTATS	87
1. L’ABSÈNCIA DE LES PROTEÏNES IMPLICADES EN LA BIOGÈNESI DE CENTRES Fe-S CAUSA DANY CONSTITUTIU AL DNA I INESTABILITAT GENÒMICA	89
1.1 L’absència de les proteïnes mitocondrials Grx5 o Iba57 causa un increment de la taxa de mutacions espontànies	89
1.2 La manca de Grx5 o Iba57 causa nivells elevats de lesions constitutives en el DNA	90
1.3 Els mutants $\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i els afectats en altres components de la maquinària ISC presenten hipersensibilitat a agents genotòxics	94
1.4 L’absència de la proteïna Nbp35, involucrada en la maquinària CIA, causa lesions al DNA	96
2. L’ABSÈNCIA DE LES PROTEÏNES Grx5 O Iba57 CAUSA UN RETARD EN LA FASE S DEL CICLE CEL·LULAR	97
3. LA MANCA DE PROTEÏNES INVOLUCRADES EN LA MAQUINÀRIA ISC O CIA CAUSA UNA ACTIVACIÓ CONSTITUTIVA DEL CHECKPOINT DE DANY AL DNA	100
3.1 Els nivells de la proteïna Sml1 estan reduïts en absència de la funció de les maquinàries ISC o CIA	100
3.2 La degradació de Sml1 en el mutant $\Delta grx5$ depèn de les vies de degradació a través de la vacuola i del proteosoma 26S	104
3.3 La disrupció de <i>SML1</i> en el mutant $\Delta grx5$ no rescata el fenotip creixement ni la sensibilitat a agents genotòxics	105
4. CARACTERITZACIÓ DEL CHECKPOINT DE DANY AL DNA EN ELS MUTANTS $\Delta grx5$ I $\Delta iba57$	107
4.1 L’activació del <i>checkpoint</i> de dany al DNA en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ no depèn de la quinasa Tel1	107

4.2 La quinasa Mec1 participa la degradació de Sml1 en absència d'Iba57 o Nbp35 però no en absència de Grx5	108
4.3 La degradació de Sml1 és depenent de Dun1 en els mutants $\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i $tetO_{7-NBP35}$	109
4.4 La disminució dels nivells de Sml1 en absència de Grx5 o Iba57 és independent de la quinasa Rad53	111
4.5 La quinasa Chk1 és necessària per activar Dun1 en absència d'Iba57, però no en absència de Grx5	113
5. Rnr2 MOSTRA UNA REDISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR CITOPLASMÀTICA QUAN LA MAQUINÀRIA ISC O CIA ESTAN DANYADES	114
5.1 Dif1 regula la localització de Rnr2 en absència de Grx5 o Iba57	115
5.2 Redistribució subcel·lular de Rnr2 en absència de Grx5, Iba57 o Nbp35	116
5.3 La regulació de la sublocalització de Rnr2 mitjançant Wtm1 presenta diferències en absència de Grx5 o Iba57	118
5.4 Els nivells de mRNA de <i>RNR1-4</i> en absència de Grx5 o Iba57 no resulten afectats	122
6. LES VIES PRR I HR JUGUEN UN PAPER IMPORTANT EN ABSÈNCIA DE Grx5 ...	123
6.1 La via PRR és important per la supervivència dels mutants sense Grx5	123
6.2 El mecanisme HR està involucrat en la reparació de dany al DNA en absència de Grx5	126
7. LA MANCA DE PROTEÏNES INVOLUCRADES EN LA MAQUINÀRIA ISC CAUSA DISFUNCIÓ MITOCONDRIAL	127
7.1 L'absència de Grx5 o Iba57 causa l'activació de la via retrògrada de senyalització mitocòndria-nucli	127
7.2 Mutants en la maquinària ISC mostren una pèrdua del DNA mitocondrial i, conseqüentment, de la capacitat respiratòria	128
7.3 Els mutants de la maquinària ISC mantenen les mitocòndries	130
8. CERCA DE PROTEÏNES IMPLICADES EN EL MANTENIMENT DEL DNA MITOCONDRIAL EN ABSÈNCIA DE Grx5	132
8.1 En absència de Grx5, la proteïna Aco1, implicada en el manteniment del mtDNA presenta una nivells pràcticament nuls	132
8.2 La sobreexpressió d' <i>ACO1</i> en absència de Grx5 no ajuda a mantenir el mtDNA	133
8.3 Utilització d'una genoteca de sobreexpressió per cercar clons que mantinguin el mtDNA en absència de Grx5	137

9. LA SOBREEXPRESSIÓ DE <i>RNR1</i> PERMET EL MANTENIMENT DEL DNA MITOCONDRIAL I LA CAPACITAT RESPIRATÒRIA EN ABSÈNCIA D'<i>Iba57</i>	139
9.1 La sobreexpressió de <i>RNR1</i> rescata l'absència de mtDNA en el mutant $\Delta i ba57$	139
9.2 La sobreexpressió de <i>RNR1</i> no rescata la pèrdua del mtDNA en el mutant $\Delta grx5$	141
9.3 La sobreexpressió de <i>RNR1</i> no rescata la pèrdua del mtDNA en altres mutants de proteïnes mitocondrials relacionades amb centres [4Fe-4S]	142
9.4 L'increment dels nivells de dNTPs rescata la pèrdua del mtDNA en absència d' <i>Iba57</i>	143
9.5 La sobreexpressió de <i>RNR1</i> rescata els defectes en la síntesi de l'àcid lipoic i les auxotròfies per lisina i glutamat en el mutant $\Delta i ba57$	144
V. DISCUSSIÓ	147
VI. CONCLUSIONS	167
VII. BIBLIOGRAFIA	171
VIII. ANNEX	197

I. INTRODUCCIÓ

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* és una espècie eucariota unicel·lular utilitzada com a model idoni per estudis fisiològics, de biologia cel·lular i molecular. *S. cerevisiae* es caracteritza per tenir un cicle de vida relativament curt a causa d'un creixement cel·lular ràpid, permetent realitzar una gran varietat de mutacions en el seu genoma, i facilitant un gran ventall d'anàlisis fenotípics i funcionals, extrapolables a organismes multicel·lulars. Molts gens del llevat han demostrat tenir ortòlegs en el genoma humà, incloent gens causants de malalties. Diverses proteïnes humanes poden substituir els seus anàlegs de llevat, i per aquest propòsit s'han construït un gran nombre de plàsmids i soques mutants de llevat, per així estudiar una ampla varietat de processos cel·lulars. Tot això fa del llevat un model útil per l'estudi de fenòmens i processos cel·lulars trobats en organismes multicel·lulars.

Aquest model ha aportat grans avenços en estudis relacionats amb la inestabilitat genòmica, dany al DNA i mecanismes de reparació, disfunció mitocondrial i biogènesi dels centres ferro-sofre, entre altres (Díaz de la Loza et al., 2011; Stehling i Lill, 2013a; Taylor et al., 2005; Veatch et al., 2009; Xiao et al., 2000). Tots aquests aspectes de la biologia de la cèl·lula seran tractats en la present memòria.

1. BIOGÈNESI DELS CENTRES FERRO-SOFRE

1.1 Aspectes generals

Els centres ferro-sofre (Fe-S) són petits cofactors inorgànics que van ser descoberts en 1960 pel Dr. Helmut Beinert. Es troben en tots els regnes de la vida i són part de moltes proteïnes implicades en nombroses funcions i processos bioquímics (respiració, fotosíntesi i fixació de nitrogen, entre d'altres) (Lill i Mühlenhoff, 2008).

Els cofactors són components de baix pes molecular que s'uneixen de manera covalent o no covalent a una seqüència motiu en general conservada al llarg de l'evolució i ben definida. Hi ha dos tipus de cofactors, els orgànics i els inorgànics. Els cofactors orgànics inclouen varis nucleòtids, vitamines i composts de metalls orgànics. Els cofactors inorgànics més comuns inclouen ions metàl·lics (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , $Cu^{1+/2+}$, $Fe^{2+/3+}$) i s'uneixen en punts d'unió mononuclears (Beinert et al., 1997). Els centres ferro-sofre són probablement els cofactors inorgànics més versàtils i antics ja que poden participar en la transferència d'electrons,

INTRODUCCIÓ

catàlisi, estabilització de l'estructura de proteïnes i també com a sensors de processos reguladors (Lill et al., 2009).

Els centres Fe-S més simples químicament són els [2Fe-2S] en forma ròmbica i els de tipus [4Fe-4S] en forma cúbica, els quals contenen ferro en forma ferrosa i fèrrica ($Fe^{2+/3+}$) i sofre en forma de sulfur (S^{2-}). També hi ha els centres [3Fe-4S] que són una variant dels [4Fe-4S] on s'ha eliminat un ió de ferro. Els centres Fe-S s'uneixen com lligands a les proteïnes a través de la unió dels ions de ferro a residus de cisteïnes, histidines o també a través de lligands alternatius a serines, arginines o àcid aspàrtic (Meyer et al., 2008).

Com ja s'ha dit, les proteïnes que contenen els centres Fe-S estan involucrades en una ampla varietat de processos cel·lulars tals com reaccions enzimàtiques, respiració, biosíntesi de cofactors, regulació de l'expressió gènica i metabolisme de DNA-RNA (Lill i Mühlhoff, 2008). Es troben presents en la mitocòndria, citosol i nucli (**Figura 1**). No obstant, a pesar de que actualment es coneix un gran nombre de proteïnes que contenen centres Fe-S, continua sent molt difícil la seva predicció i reconeixement.

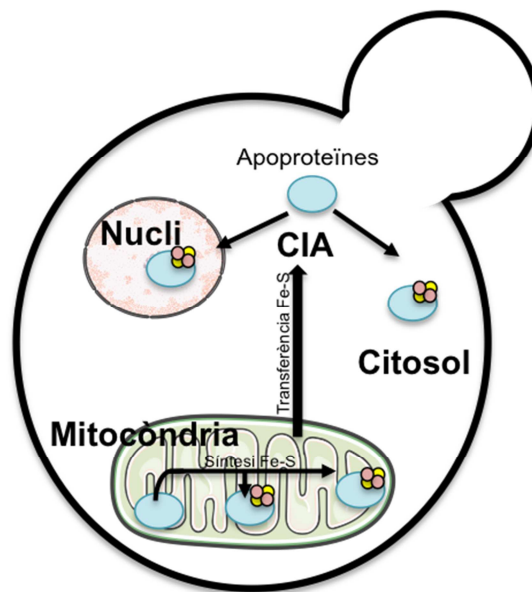


Figura 1. Esquema on es localitzen les proteïnes que contenen centres Fe-S en *S. cerevisiae*.

1.2 Funcions biològiques de les proteïnes que contenen centres Fe-S

Les funcions biològiques més comunes de les proteïnes que contenen centres Fe-S es poden dividir en tres grups: transferència d'electrons, catàlisi enzimàtica i regulació de l'expressió gènica. La primera funció es basa en la facilitat que tenen els ions de ferro a canviar d'estat

reduït a oxidat (Meyer et al., 2008). Així, les proteïnes Fe-S poden actuar com a excel·lents donadors i acceptors d'electrons en una gran varietat de reaccions biològiques. Un exemple serien les proteïnes Fe-S mitocondrials dels complexos I, II i III de la cadena respiratòria. La segona funció de catàlisi enzimàtica és deguda a la capacitat que tenen els centres Fe-S per coordinar lligands i així facilitar funcions enzimàtiques (Beinert et al., 2000; Frey i Magnusson, 2003; Rees et al., 2002). Per exemple, l'aconitasa mitocondrial forma part del cicle de l'àcid tricarboxílic i proporciona energia per la formació d'ATP. En l'aconitasa, un simple àtom de ferro del centre [4Fe-4S] facilita la reacció de deshidratació-hidratació que converteix de manera reversible el citrat a isocitrat, lligant el grup hidroxil del substrat (citrat) i activant aquest grup per la seva eliminació. Uns altres exemples serien els enzims dependents de S-adenosil metionina (SAM), biotina sintasa i lipoat sintasa, que s'uneixen a dos centres Fe-S cadascun. Es creu que un d'aquests grups es desmunta durant la formació dels productes de biotina i àcid lipoic, respectivament, servint així com un donador de sofre (Booker et al., 2007). La tercera funció és la detecció de les condicions ambientals o intracel·lulars per la regulació de l'expressió gènica. Un exemple d'aquesta funció seria el factor de transcripció bacterià SoxR, que percep l'estrès oxidatiu i s'activa en resposta al mateix, a través de l'oxidació d'un centre Fe-S (Hidalgo i Demple, 1996). Un altre exemple de regulació post-transcripcional de l'expressió gènica per centres Fe-S és la proteïna "*Iron Regulatory Protein 1*" (Irp1) en el citosol. En condicions de presència de ferro, Irp1 conté un centre [4Fe-4S] i funciona com una aconitasa. Quan la proteïna perd el centre Fe-S, en dèficit de ferro o en presència d'espècies reactives d'oxigen (ROS, per "*Reactive Oxygen Species*"), Irp1 s'uneix a mRNAs de proteïnes implicades en l'absorció de ferro o en el seu emmagatzematge i distribució en la cèl·lula. Aquests mRNAs contenen una seqüència específica, coneguda amb el nom de IRE (per "*Iron Responsive Element*"). Aquesta unió depenent si és en l'extrem 5' o 3' pot bloquejar la traducció o bé protegir el mRNA d'una degradació nucleolítica, conduint a un increment en la traducció (Volz et al., 2008; Walden et al., 2006; Wallander et al., 2006).

1.3 Biosíntesi de centres Fe-S en *Saccharomyces cerevisiae*

En tots els organismes eucariotes (excepte els fotosintètics) el sistema de síntesi de centres Fe-S es localitza en les mitocondries. En aquest orgànul es sintetitzen tan els centres Fe-S de les proteïnes mitocondrials com de les proteïnes citosòliques i nuclears (Stehling et al., 2014).

La maquinària de biosíntesi dels centres Fe-S està molt conservada al llarg de l'evolució, des d'organismes procariotes fins a eucariotes superiors, suggerint que els respectius gens

INTRODUCCIÓ

eucariotes són d'origen bacterià i es van adquirir abans de l'aparició dels eucariotes (Mühlenhoff i Lill, 2000). En concret, molts dels gens implicats en la síntesi dels centres Fe-S en les mitocòndries de *S. cerevisiae* són homòlegs dels gens bacterians *nif* (*Nitrogen Fixation Specific*) i *isc* (*Iron Sulfur Cluster*) (Zheng et al., 1998).

La formació de proteïnes que contenen centres Fe-S es pot dividir en tres etapes: síntesi dels centres Fe-S, transferència i maduració dels centres i síntesi i formació de les proteïnes Fe-S citosòliques i nuclears (mitjançant la maquinària de formació de proteïnes Fe-S citosòliques anomenada CIA, per "*Cytosolic Iron-Sulfur*") (Balk i Lill, 2004; Gerber i Lill, 2002; Mühlenhoff et al., 2003). La maquinària de síntesi mitocondrial de centres Fe-S és necessària per totes les proteïnes amb centres Fe-S, mentre que les funcions d'exportació dels centres i la maquinària CIA estan restringides a la formació i maduració de proteïnes Fe-S citosòliques i nuclears.

A continuació es detallaran les tres etapes en la biosíntesi de proteïnes amb centres Fe-S.

1.3.1 Síntesi dels centres Fe-S

La mitocòndria té un paper central en la síntesi i la maduració de proteïnes que contenen centres Fe-S. En aquest orgànul hi ha la maquinària de síntesi mitocondrial anomenada ISC (per "*Iron Sulfur Cluster*"), en la qual hi participen al menys 6 proteïnes. Aquest procés de biosíntesi de centres Fe-S es pot dividir bàsicament en dos subetapes: la síntesi "*de novo*" dels centres Fe-S en les proteïnes d'acoblament Isu1 i Isu2, i la transferència dels centres Fe-S des de les proteïnes d'acoblament fins les apoproteïnes, mitjançant la participació de xaperones i proteïnes intermèdies que s'uneixen als centres (Stehling i Lill, 2013a).

La primera etapa comença quan el ferro en forma de Fe^{2+} citosòlic és importat cap a la mitocòndria a través de les glutaredoxines (Grx) monotioliques que actuen com a donants de ferro i els transportadors de la membrana interna mitocondrial Mrs3-Mrs4, que utilitzen la força motriu de protons com a font de desplaçament per la membrana, per entrar el ferro a la mitocòndria (veure **Figura 2**) (Foury i Roganti, 2002; Li i Kaplan, 2004; Zhang et al., 2006).

Aleshores el complex cisteïna dessulfurasa Nfs1-Isd11 allibera sofre a partir d'una cisteïna que genera una alanina (en un residu cisteïna de Nfs1) i aquest sofre es redueix a sulfur (S^2), que serà el que necessitarà el centre Fe-S. Aquest sofre es transfereix al complex Isu1/2 que es troba present des dels bacteris fins als humans (Isu2 és present només en alguns fongs com el llevat i té una funció redundat amb Isu1). En aquest punt, en el complex d'acoblament Isu1/2 s'iniciarà la formació dels centres Fe-S a través de la participació de la proteïna Yfh1 (frataxina), la qual s'uneix al complex Isu1/2 i al ferro actuant com a donador de ferro, així com

amb la participació d'una cadena de transport electrònic que consta de NAD(P)H, ferredoxina reductasa (Arh1) i ferredoxina (Yah1) (**Figura 2**) (Sheftel et al., 2010; Shi, et al.,2012).

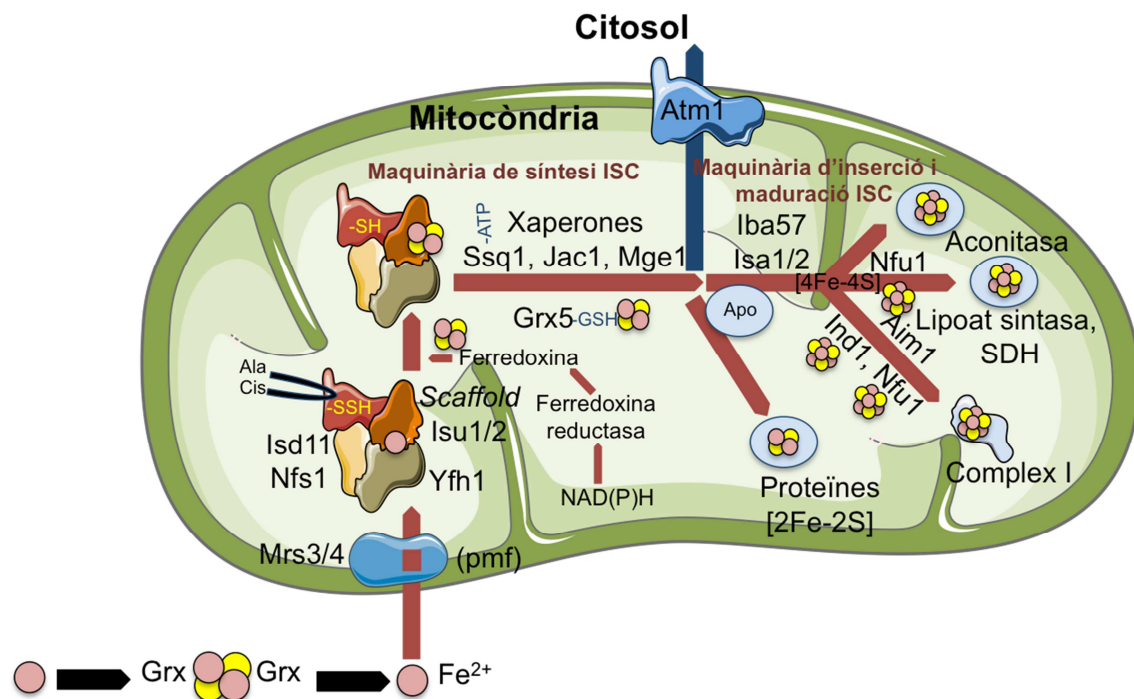


Figura 2. Esquema de la biogènesi de centres Fe-S en la mitocondria. Es mostra tots els component de la maquinària de síntesi dels centres Fe-S (ISC) i la maquinària de transferència, inserció i maduració dels centres Fe-S mitocondrials. [Adaptat de (Lill et al., 2012)].

1.3.2 Transferència dels centres Fe-S i maduració de proteïnes mitocondrials que contenen centres Fe-S

Una vegada sintetitzat el centre Fe-S, s'inicia la segona etapa de la biogènesi, que implica la transferència del centre Fe-S des del complex Isu1/2 cap a les apoproteïnes i la respectiva maduració i formació de proteïnes mitocondrials amb centres Fe-S (Lill et al., 2012). En aquesta etapa estan implicades diverses proteïnes Fe-S i xaperones (en la **Taula 1** es resumeixen les proteïnes implicades en la síntesi, transferència i maduració de centres Fe-S mitocondrials). Aquesta segona etapa es pot subdividir en dos processos: (i) alliberament i transferència dels centres Fe-S units a Isu1/2, mitjançant proteïnes intermediàries que s'uneixen transitòriament al centre Fe-S, i (ii) inserció i maduració dels centres Fe-S dins de la cadena polipeptídica d'apoproteïnes específiques.

INTRODUCCIÓ

El primer procés és executat per un sistema de xaperones (Ssq1, Jac1 i Mge1) i la glutaredoxina monotiòlica Grx5, les quals pertanyen al sistema principal de transferència de centres Fe-S (**Figura 2**). Ssq1 interactua amb un segment petit però altament conservat d'Isu1 (LPPVK), i aquesta unió serveix per alliberar el centre Fe-S del complex Isu1/2, facilitant així la seva transferència. Això es gràcies a la participació de Jac1, co-xaperona que estimula la funció ATPasa de Ssq1, provocant-li un canvi conformacional i facilitant la unió d'aquest amb el centre Fe-S que conté Isu1/2. La glutaredoxina Grx5 també interacciona i s'uneix amb Isu1/2 i Ssq1. Estudis recents han demostrat que Grx5 rep el centre Fe-S del complex Isu1/2 (Uzarska et al., 2013), suggerint que Grx5 no té una funció de proteïna d'acoblament com es pensava anteriorment (Bandyopadhyay et al., 2008). Per altra banda, Mge1 actua com a factor d'intercanvi de nucleòtids facilitant el pas d'ADP a ATP i ajudant a dissociar Ssq1 d'Isu1/2. L'etapa final de transferència es duu a terme mitjançant Grx5, que juga un paper clau facilitant la integració dels centres Fe-S a les apoproteïnes, o bé d'altres proteïnes que participaran a la maduració i inserció de centres Fe-S a apoproteïnes específiques (veure **Figura 3**).

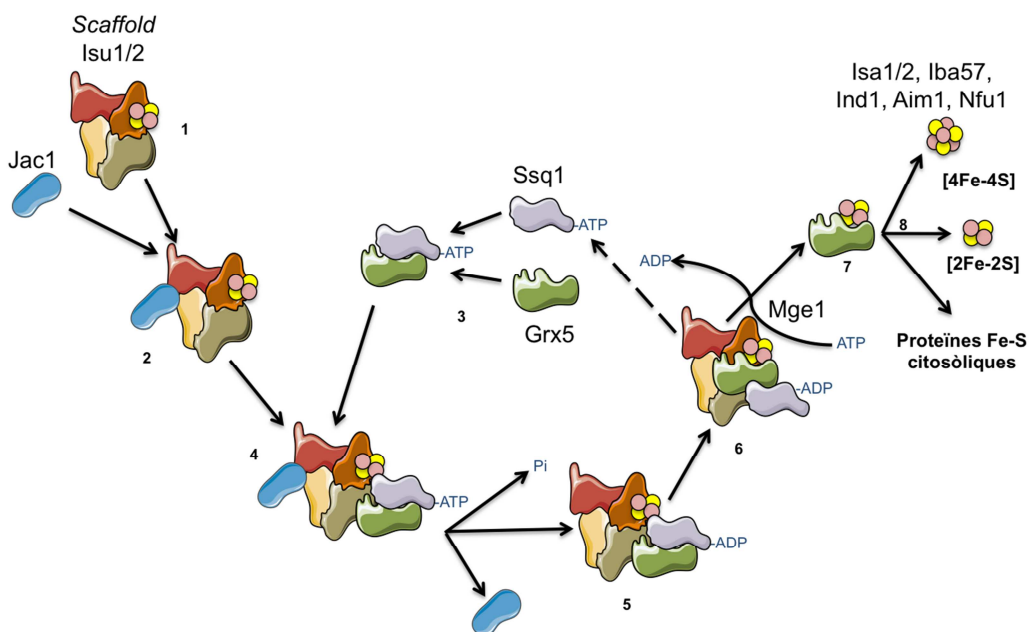


Figura 3. Esquema de la transferència de centres Fe-S des del complex d'acoblament Isu1/2 fins a les apoproteïnes, mitjançant el complex xaperona (Ssq1, Jac1, Mge1) i Grx5. 1) El centre Fe-S és sintetitzat en el complex Isu1/2. 2) La co-xaperona Jac1 s'uneix al complex i estimula la funció ATPasa de Ssq1. 3) Grx5 s'uneix a Ssq1. 4) Jac1 i Isu1 desencadenen un canvi conformacional del domini d'unió al pèptid de Ssq1, donant lloc a l'interacció del pèptid LPPVK d'Isu1 i Grx5. 5) Transport del centre Fe-S d'Isu1 a Grx5. 6) El factor d'intercanvi de nucleòtids Mge1 facilita el pas de ADP a ATP en Ssq1, conduint a una unió menys estable de Grx5 i Isu1, donant com a resultat la dissociació del complex Isu1-Ssq1-Grx5. 7 i 8) Grx5 facilita la unió del centre Fe-S a les apoproteïnes o a proteïnes encarregades de la maduració de centres Fe-S [Adaptat de (Uzarska et al., 2013)].

El mecanisme anterior és comú per totes les apoproteïnes, independentment del seu destí final i de les característiques dels centres Fe-S lligats a elles. En el procés d'inserció dels centres Fe-S dins d'algunes apoproteïnes específiques hi intervenen addicionalment unes proteïnes més especialitzades: Isa1, Isa2 i Iba57. Aquestes tres proteïnes estan involucrades en la maduració exclusiva dels centres [4Fe-4S] de la família aconitasa (Aco1, Lys4) i de proteïnes SAM-dependents: biotina sintasa (Bio2) i lipoat sintasa (Lip5) (**Figura 2**).

La **Taula 1** resumeix els components mitocondrials de la síntesi i transferència de centres Fe-S.

<i>S. cerevisiae</i>	Humà	Nom complet	Funció	[Fe-S]
Components de la maquinària de síntesi mitocondrial				
Nfs1	<i>NFS1</i>	Cisteïna dessulfurasa	Donador de sofre	-
Isd11	<i>ISD11</i>	Proteïna que interacciona amb la dessulfurasa	Estabilitza Nfs1	-
Arh1	<i>FDXR</i>	Ferredoxina reductasa	Ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	-
Yah1	<i>FDX2</i>	Ferredoxina	Transport d'electrons	[2Fe-2S]
Yfh1	<i>FXN</i>	Frataxina	Donador de ferro	-
Isu1, Isu2*	<i>ISCU</i>	Proteïna d'acoblament	Complex d'acoblament	[2Fe-2S]
Ssq1	<i>GRP75</i>	Xaperona Hsp70 mitocondrial	Transferència de centres Fe-S	-
Jac1	<i>HSC20</i>	Co-xaperona Hsp70 mitocondrial	Transferència de centres Fe-S	-
Mge1	<i>GRPE-L1/2</i>	GrpE mitocondrial	Intercanvi de nucleòtids	-
Grx5	<i>GLRX5</i>	Glutaredoxina 5	Transferència de centres Fe-S	[2Fe-2S] [4Fe-4S]
Components de la transferència mitocondrial				
Isa1, Isa2	<i>ISCA1, ISCA2</i>	Proteïnes de síntesi de centres Fe-S	Maduració dels centres [4Fe-4S]	-
Iba57 (Caf17)	<i>IBA57</i>	Proteïna que interactua amb el complex Isa	Maduració dels centres [4Fe-4S]	-
Nfu1	<i>NFU1</i>	Proteïna scaffold	Maduració de la lipoat sintasa i succinat deshidrogenasa	[4Fe-4S]
Ind1	<i>IND1 (NUBPL)</i>	Proteïna Fe-S (NADH-deshidrogenasa)	Maduració del complex respiratori I	[4Fe-4S]
Aim1	<i>BOLA3</i>	Proteïna que interactua amb la glutaredoxina	Maduració de la lipoat sintasa i succinat deshidrogenasa	-
Atm1	<i>ABC7</i>	Transportador ABC	Transport centres Fe-S al citosol	-

Taula 1. Components de la maquinària de síntesi, transport i maduració de centres Fe-S mitocondrials (ISC). (*present únicament en *S. cerevisiae* i en algun altre fong) [Adaptat de (Sheftel et al., 2010)].

INTRODUCCIÓ

Es coneix molt poc sobre les funcions d'Ind1, Aim1 i Nfu1 (essent altres proteïnes específiques en la maduració i inserció de centres [4Fe-4S]), però es pensa que la proteïna Ind1 és necessària per l'acoblament de centres Fe-S en el complex respiratori I. Nfu1 i Aim1 també participen en la maduració dels complexos respiratoris I i II i de la lipoat sintasa (**Figura 2**) (Lill et al., 2012; Stehling i Lill, 2013a).

1.3.3 Formació de les proteïnes Fe-S citosòliques i nuclears

Per dur a terme la biogènesi de proteïnes Fe-S citosòliques es necessària la maquinària de síntesi i de transferència mitocondrial (ISC) que genera el centre Fe-S i també la maquinària citosòlica de síntesi de centres Fe-S, anomenada CIA.

El procés s'inicia quan la maquinària de síntesi mitocondrial produeix un component que conté sofre (encara no conegut, que en la **Figura 4** s'indica com X-S) i el proporcionarà als centres Fe-S citosòlics i nuclears. L'exportació d'aquest component desconegut es realitza a través del transportador de membrana Atm1 (per "ATP binding cassette") des de l'interior de la matriu mitocondrial fins al citosol (Kispal et al., 1999; Pondarré et al., 2006; Teschner et al., 2010). Aquesta exportació necessita glutatió (GSH) i Erv1 (una oxidasa de grups sulfidril localitzada a l'espai intermembrana de la mitocòndria, que introdueix ponts disulfur al substrat).

En el citosol hi trobem la maquinària CIA, encarregada de la formació de proteïnes Fe-S citosòliques i nuclears, que està formada per un complex d'acoblament, Cfd1 i Nbp35, que formen una estructura heterotetràmica i són els encarregats de la síntesi dels centres Fe-S de tipus [4Fe-4S]. Aquesta reacció de síntesi necessita la proteïna Tah18 que conté FMN, NAD(P)H i un domini d'unió FAD, la qual interacciona amb Dre2. Aquest complex Tah18-Dre2 es pot considerar funcionalment similar a la ferredoxina mitocondrial.

Quan el centre Fe-S ja està sintetitzat pel complex CIA es requereix de la funció de les glutaredoxines monotioliques Grx3-Grx4 que uneixen transitòriament un centre [2Fe-2S], i aleshores Nar1 i el complex de transferència CIA (format per Cia1, Cia2 i Mms19) transporten el centres Fe-S cap a les apoproteïnes citosòliques i/o nuclears (**Figura 4**) (Balk et al., 2005; Gari et al., 2012; Stehling et al., 2013b).

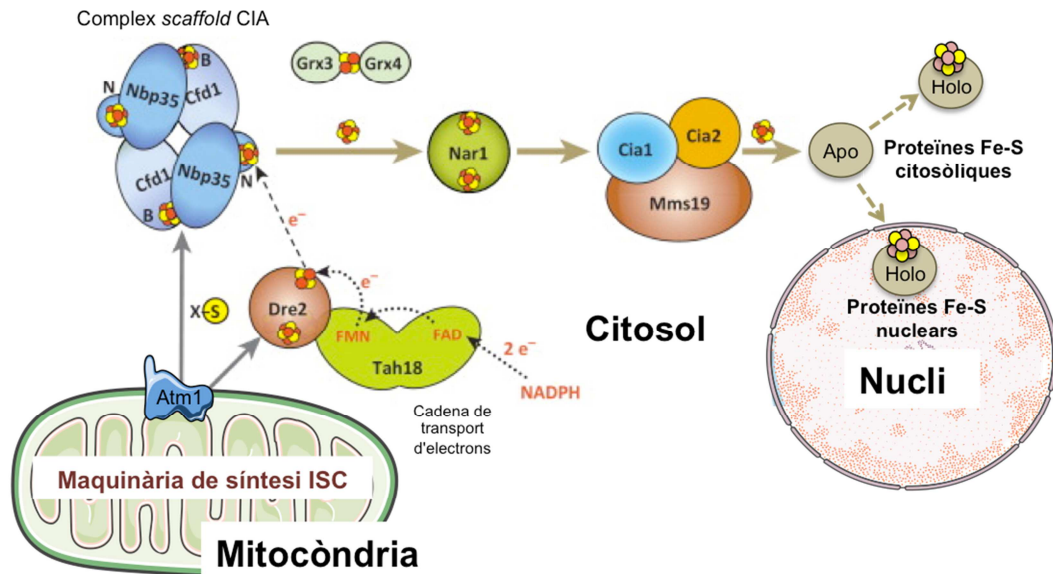


Figura 4. Esquema de la biogènesi de centres Fe-S en el citosol, mitjançant la maquinària CIA, i el transport dels centres Fe-S cap a proteïnes citosòliques i nuclears. [Adaptat de (Netz et al., 2014)].

En la **Taula 2** es resumeix totes les proteïnes implicades en la síntesi de centre Fe-S citosòlics i nuclears i que constitueixen la maquinària CIA.

<i>S. cerevisiae</i>	Humà	Nom complet	Funció	[Fe-S]
Components de la maquinària de síntesi citosòlica (CIA)				
Cfd1	<i>CFD1</i>	Proteïna 2 d'unió a nucleòtids	Complex d'acoblament	[4Fe-4S]
Nbp35	<i>NBP35</i>	Proteïna 1 d'unió a nucleòtids	Complex d'acoblament	[4Fe-4S]
Dre2	<i>CIAPIN1</i>	Inhibidor 1 de l'apoptosi induïda per citoquines	Acceptador d'electrons de NADPH-Tah18	[4Fe-4S] [2Fe-2S]
Tah18	<i>NDOR1</i>	Diflavina reductasa	Transferència d'electrons de NADPH a Dre2	-
Nar1	<i>IOP1</i>	Prelamina A nuclear	Transferència de centres Fe-S	[4Fe-4S]
Cia1	<i>CIA1</i>	Proteïna citosòlica d'acoblament de Fe-S	Transferència de centres Fe-S	-
Cia2	<i>CIA2B</i>	Proteïna citosòlica d'acoblament de Fe-S	Inserció de centres Fe-S a apoproteïnes	-
Mms19	<i>MMS19</i>	Proteïna que interacciona amb el complex CIA	Inserció de centres Fe-S a apoproteïnes	-

Taula 2. Components de la maquinària de síntesi (CIA) de centres Fe-S citosòlics [Adaptat de (Netz et al., 2014)].

Una gran quantitat de proteïnes citosòliques i nuclears que contenen centres Fe-S estan involucrades en processos cel·lulars bàsics com la biosíntesi d'aminoàcids i nucleòtids, traducció de proteïnes, síntesi i reparació de DNA i regulació dels telòmers. Per exemple: Rad3

INTRODUCCIÓ

(helicasa), encarregada d'obrir les cadenes durant la replicació del DNA; Ntg2 (DNA glicolsilasa), encarregada de separar la base nitrogenada de la pentosa per després col·locar la base correcta mitjançant l'ajut d'altres proteïnes; Pri2 (subunitat d'una DNA primasa), que intervé en la replicació del DNA; i la polimerasa ϵ , que està formada per quatre subunitats (Pol2, que és la subunitat que conté un centre Fe-S, Dpb2, Dpb3 i Dpb4) i és essencial per mantenir l'estabilitat genòmica a través del seu paper en la replicació i la reparació del DNA danyat.

1.4 Característiques i funcions d'Iba57

Iba57 (també anomenada Caf17) és una proteïna que es localitza en la matriu mitocondrial i que no es troba en la maquinària principal de síntesi de centres Fe-S, sinó que està implicada en el procés de maduració i d'inserció de centres Fe-S de tipus [4Fe-4S] en apoproteïnes específiques (veure l'apartat 1.3.2 de la **Introducció**). Interactua físicament amb els altres components d'inserció dels centres [4Fe-4S] Isa1 i Isa2 (**Figura 2**). D'aquesta manera té un paper clau en la maduració de les proteïnes Fe-S tipus aconitasa, homoaconitasa i tipus radical-SAM (biotina i lipoat sintasa) que catalitzen la inserció del sofre dins la destiobiotina, no essent necessària la seva presència per la maduració d'altres proteïnes Fe-S.

Es coneix molt poca informació sobre Iba57, però a continuació es detallarà les seves principals característiques i fenotips.

Els mutants Δ *iba57*, al igual que els Δ *isa1/2*, són viables però presenten una auxotròfia per glutamat i lisina, a causa d'un defecte específic en la maduració dels enzims Fe-S mitocondrials aconitasa i homoaconitasa. El nom inicial de la proteïna era Caf17, ja que presenta una seqüència homòloga a la família de proteïnes d'unió a tetrahidrofolat (THF), però estudis realitzats per Gelling et al. (2008) van confirmar que es tracta d'una proteïna relacionada amb la formació dels centres Fe-S. El seu nom significa "*Iron-sulfur cluster assembly factor for Biotin synthase and Aconitase*" i té un pes molecular de 57 kDa (Gelling et al., 2007). A més, el mutant nul presenta defectes en el manteniment del DNA mitocondrial i incapacitat per respirar (Gelling et al., 2007). A diferència dels components centrals de la maquinària ISC, la manca d'Iba57 no condueix a l'activació dels gens del reguló Aft1 (factor transcripcional involucrat en l'homeòstasi de ferro en *S. cerevisiae*, veure següent apartat) ni a la acumulació intracel·lular de ferro.

En aquesta memòria s'utilitzarà Iba57 com a model de proteïnes mitocondrials implicades en la maduració i inserció de centres [4Fe-4S].

1.5 Importància de la maquinària de síntesi mitocondrial de centres Fe-S en l'homeòstasi del ferro en *Saccharomyces cerevisiae*

El ferro és un micronutrient essencial per la majoria dels organismes vius, formant part d'un gran nombre de proteïnes fonamentals implicades en processos biològics. No obstant, el seu excés és perjudicial per la cèl·lula, i en quantitats molt elevades resulta tòxic. Així doncs, l'homeòstasi del ferro ha d'estar molt ben regulada.

La maquinària mitocondrial de síntesi i exportació de centres Fe-S juga un paper clau en la regulació de l'homeòstasi del ferro, tenint una gran importància en la captació d'aquest i la seva distribució i utilització intracel·lular (Kaplan i Kaplan, 2009; Lill i Mühlenhoff, 2008).

La interrupció de la síntesi i acoblament de centres Fe-S condueix a l'acumulació de ferro mitocondrial per dos possibles motius: (i) una senyal desconeguda amb centres Fe-S podria actuar com a detectora mitocondrial de ferro o ajudar a la funció d'aquest sensor, de manera que defectes en aquesta senyal marcarien nivells deficitaris de ferro per la cèl·lula, augmentant la mobilització de ferro citosòlic cap a la mitocòndria i incrementant la captació de ferro extracel·lular, i/o (ii) el ferro sortiria de la mitocòndria en forma de centres Fe-S de manera que si aquesta sortida es bloqueja quan s'interromp l'acoblament i la transferència dels centres Fe-S, aleshores els centres restarien atrapats a la mitocòndria.

S'ha descrit que varis mutants en la maquinària de síntesi mitocondrial de centres Fe-S incrementen la concentració de ferro en la mitocòndria, acompanyat d'un descens en la concentració de ferro citosòlic (Li et al., 2001; Rouault et al., 2012; Stehling i Lill, 2013a), per exemple els mutants *Δisu1*, *Δisu2*, *Δatm1*, *Δnfs1*, *Δssq1*, *Δjac1* i *Δgrx5*.

La regulació de l'homeòstasi del ferro en *S. cerevisiae* es dur a terme principalment per tres mecanismes: (i) els factors transcripcionals Aft1 i Aft2 són els principals factors que regulen i distribueixen el ferro intracel·lular en condicions de depleció d'aquest, (ii) a través d'un altre factor transcripcional, Yap5, que actua en condicions d'acumulació de ferro, i (iii) mitjançant les proteïnes d'unió a mRNA Cth1 i Cth2 (a la seva vegada membres del reguló del ferro controlat per Aft1/Aft2) que modifiquen els nivells post-transcripcionals dels seus mRNAs blanc.

INTRODUCCIÓ

En *S. cerevisiae* la primera resposta a la depleció de ferro és l'activació transcripcional d'una sèrie de gens permetent l'adquisició de ferro, mobilitzant el ferro emmagatzemat o mobilitzant altres metalls (Puig et al., 2005; Shakoury-Elizeh et al., 2004). En condicions limitants de ferro el reguló de ferro controlat per Aft1 i Aft2 (Aft1 majoritàriament controla l'expressió dels gens del sistema d'alta afinitat, mentre que Aft2 és més important en l'expressió dels gens involucrats en la distribució intracel·lular a pesar de tenir funcions solapades amb Aft1) s'activa induint la transcripció dels gens que formen el reguló (conjunt d'uns 25-30 gens) (Kaplan i Kaplan, 2009; Philpott i Protchenko, 2008). Aleshores Aft1 passa del citosol (on es troba en condicions de presència de ferro) al nucli, on reconeix i s'uneix a una seqüència consens anomenada *FeRE* present a la regió prèvia de la seqüència codificant dels gens del reguló. Aquest canvi de localització depèn de l'activitat de la maquinària de síntesi i exportació dels centres Fe-S mitocondrials (**Figura 5**). L'entrada al nucli d'Aft1 depèn de l'importina Pse1, que reconeix dos seqüències de localització nuclear d'Aft1, mentre que la sortida depèn de l'exportina nuclear Msn5.

A pesar que Aft1 és un dels factors transcripcionals millor estudiats en resposta al dèficit de ferro, la manera en que Aft1 rep la senyal de deficiència de ferro continua essent una incògnita. En condicions de suficiència de ferro una senyal desconeguda, possiblement un centre Fe-S, és transmesa al citosol a través de l'exportador mitocondrial Atm1. Aquesta senyal promou l'activació del factor transcripcional Yap5 i la formació d'un centre Fe-S que s'uneix a les glutaredoxines monotiolòques Grx3 i Grx4 formant un dímer, estructura que és reconeguda per Aft1, promovent la dissociació del DNA i el consegüent silenciament transcripcional dels gens del reguló del ferro (Pujol-Carrion et al., 2006; Ueta et al., 2012). En canvi, en condicions de deficiència de ferro o en cèl·lules que presenten defectes en la síntesi i exportació dels centres Fe-S mitocondrials, s'ha observat que el reguló està constitutivament actiu (Miao et al., 2011), probablement a causa d'una disminució del nombre de molècules Grx3/Grx4 unides a un centre Fe-S, el qual provoca una atenuació en la interacció entre les glutaredoxines i Aft1, fet que inhibeix la separació d'Aft1 del seus gens diana promovent així la transcripció d'aquests (Ueta et al., 2012).

Un altre mecanisme de regulació de l'homeòstasi del ferro implica el factor transcripcional Yap5, que és un membre de la família YAP de factors de transcripció tipus bZIP. Aquest factor té un domini d'unió a DNA mitjançant la seqüència consens TTAATA i un domini d'activació amb dues regions riques en cisteïnes, crítiques per la transcripció dependent del ferro (**Figura 5**). Yap5 regula la transcripció de *CUP1* (gen que codifica per la metalotioneïna), *GRX4*, *TYW1* (Li et al., 2011; Pimentel et al., 2012) i *CCC1*, un importador de ferro vacuolar induït en

condicions de depleció de ferro (Li et al., 2008). En condicions de privació de ferro el mRNA de *YAP5* es desestabilitza via Cth1/2 (Puig et al., 2005).

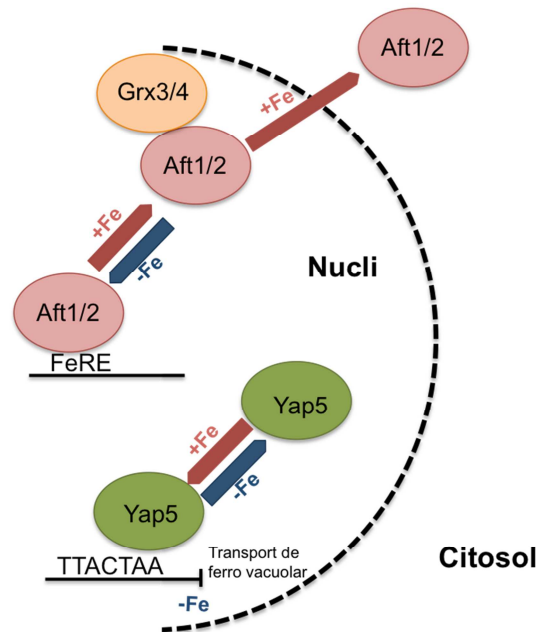


Figura 5. Mecanisme de regulació transcripcional del metabolisme del ferro en *S. cerevisiae*. La regulació de l'homeòstasi del ferro involucra factors transcripcionals. Els factors Aft1 i Aft2 s'activen en condicions de depleció de ferro, entrant al nucli i reconeixent una seqüència FeRE. En condicions de suficiència de ferro, el factor transcripcional Yap5 s'activa induint l'expressió d'alguns gens [Adaptat de (Lill et al., 2012)].

A més de l'activació dels factors transcripcionals Aft1, Aft2 i Yap5 per controlar l'homeòstasi del ferro les cèl·lules també utilitzen un mecanisme de degradació del mRNA de gens involucrats en l'homeòstasi i ús de ferro. Aquest mecanisme ve regulat per dues proteïnes de la família de les tristetraprolines humanes (hTTP) anomenades Cth1 i Cth2, per "Cysteine-Three Histidine 1 i 2", ambdues membres del reguló del ferro. En resposta a falta de ferro Aft1 i Aft2 s'activen reconeixent i unint-se a seqüències *FeRE* situades als promotors de *CTH1* i *CTH2* provocant una inducció de la seva expressió (Puig et al., 2005). Cth1 i Cth2 tenen dos dits de zinc en tàndem (TZF) del tipus CCCH, motiu que constitueix un domini d'unió a mRNA. Els membres d'aquesta família promouen la degradació ràpida de certes molècules de mRNA mitjançant el reclutament de la maquinària de degradació d'mRNAs a l'element ric en AU (ARE) localitzat en les regions 3'-UTR dels mRNAs blanc. Així, Cth1 i Cth2 disminueixen la vida mitjana d'mRNAs codificadors de proteïnes involucrades en l'emmagatzematge de ferro o en el seu consum. Cth1 s'expressa transitòriament en condicions de depleció de ferro, mentre que Cth2 ho fa de manera sostinguda (Pedro-Segura et al., 2008). Cth2 és responsable de

INTRODUCCIÓ

desestabilitzar 80 mRNAs codificants per proteïnes del metabolisme que requereixen ferro i oxigen, amb funcions cel·lulars que inclouen biosíntesi de grups hemo, biogènesi de centres Fe-S, subunitats de la citocrom oxidasa, o proteïnes que participen en l'emmagatzematge de ferro a la vacuola (Puig et al., 2005). En canvi, Cth1 desestabilitza preferentment mRNAs de proteïnes mitocondrials involucrades en processos dependents de ferro que participen en respiració o síntesi d'aminoàcids (Puig et al., 2008).

1.6 Malalties humanes relacionades amb la biogènesi de centres Fe-S

Un gran nombre de components de la biogènesi mitocondrial i citosòlica de centres Fe-S estan relacionats amb malalties i disfuncions humanes. Aquest és el cas de l'atàxia de Friedreich (*FRDA*), anèmia microcítica sideroblàstica (*GLRX5*), de mutacions en *IBA57* que causen miopatia i encefalopatia o miopatia amb intolerància a l'exercici (*ISCU*) (Sheftel et al., 2010).

D'aquestes la més comú és l'atàxia de Friedreich, desordre neurodegeneratiu causat per una deficiència funcional en la proteïna frataxina normalment com el resultat de la repetició del triplet GAA en el primer intró del gen *FXN* (Campuzano et al., 1996). Es caracteritza per una neurodegeneració espinocerebral progressiva, debilitat muscular, cardiomiopatia i disàrtria (alteracions motores) (Rouault et al., 2012).

L'anèmia microcítica sideroblàstica és causada per una mutació en el gen *GLRX5*. Aquesta malaltia consisteix en una afectació en el procés d'eritropoesis, de manera que la medul·la òssia produeix sideroblasts en forma d'anell que acumulen ferro (els sideroblasts són eritroblasts que contenen grànuls de ferritina). Un estudi amb pacients va apreciar que el gen *GLRX5* tenia una mutació (A294G) en el tercer nucleòtid del últim codó de l'exó 1 (*GLRX5*) (Camaschella et al., 2007).

Una mutació en el gen *ISCU* (homòleg humà d'*Isu1* en llevat) causa una malaltia esquelètica muscular heretada, comunament anomenada miopatia. Els pacients desenvolupen debilitat muscular, juntament amb acidosi induïda per exercici i mioglobinúria (orina vermella causada per la degeneració muscular i l'excreció de la mioglobina). En mostres musculars d'aquests pacients les activitats aconitasa i succinat deshidrogenasa es redueixen notablement, produint un increment de ferro mitocondrial (Sheftel et al., 2010).

Finalment un altre síndrome a destacar és causat per una mutació al gen *IBA57*, que provoca un síndrome metabòlic abans del naixement i és letal en la infància. Els símptomes observats

són insuficiència respiratòria, hipotonia severa, absència de reflexes, encefalopatia, microcefàlia congènita i miopatia (Bolar et al., 2013).

2. SISTEMA GLUTAREDOXINA

2.1 Aspectes generals de les glutaredoxines

Les glutaredoxines (GRXs) són tiol oxidoreductases que utilitzen el glutatió en la seva forma reduïda (GSH) per regular l'estat redox de determinades proteïnes. El mecanisme de reacció inclou també la glutatió reductasa, que recicla el glutatió oxidat (GSSG) que es produeix després de l'acció de les GRXs utilitzant $\text{NADPH} + \text{H}^+$ com a donador d'electrons (Herrero et al., 2010; Lillig et al., 2008).

L'estat redox de les proteïnes es pot veure afectat per l'acció de ROS generades metabòlicament o d'un estrès extern concret. L'estrès oxidatiu també causa danys en lípids i en àcids nucleics, de forma que resulta tòxic per la cèl·lula i es relaciona amb l'envelliment en organismes superiors (Cui et al., 2012). Aquests agents poden modificar fàcilment l'estat redox de les proteïnes, ja que els grups tiols de les cisteïnes (importants per al manteniment de l'estructura terciària i quaternària i pel funcionament de determinats centres actius) són molt susceptibles d'oxidar-se a àcid sulfènic, sulfínic o sulfònic, en aquest darrer cas de manera irreversible. Un mecanisme de protecció envers l'oxidació irreversible dels grups tiol és la glutatinationilació, que és la unió reversible de GSH a les cisteïnes per evitar que siguin modificades per ROS, i que està controlat per GRXs (Herrero et al., 2010). Controlar l'estat redox de proteïnes enfront l'estrès oxidatiu és clau per la cèl·lula, i per això aquesta disposa de diversos mecanismes com les tioredoxines (TRX) i les GRXs.

Les GRXs es troben presents al llarg de l'escala evolutiva de tots els organismes que contenen GSH (McFarlan et al., 1992). Tenen varies funcions, per exemple, actuar com a donants d'electrons (Holmgren et al., 1979), catalitzar la formació i la reducció de disulfurs mixtes entre tiols proteics i el GSH (Ruoppolo et al., 1997; Yoshitake et al., 1994), i intervenir en el metabolisme intracel·lular del ferro i en l'acoblament de centres Fe-S (Lill i Mühlhoff, 2006; Rodríguez-Manzanque et al., 2002), entre altres. Donada la importància d'aquests processos, les GRXs estan implicades en una diversitat de situacions fisiològiques i els seus defectes funcionals s'han relacionat amb malalties humanes, com ara alteracions en la defensa

INTRODUCCIÓ

immune, la hipertròfia cardíaca, la hipòxia-reoxigenació, la neurodegeneració i el desenvolupament del càncer (Lillig et al., 2008).

Les GRXS són una família proteica heterogènia, amb una gran diversitat estructural i funcional (Alves et al., 2009; Couturier et al., 2009a; Lillig et al., 2008). Totes tenen una estructura de plegament característica, amb 4 o 5 làmines- β flanquejades per 3 o més hèlix- α , anomenada “plegament tipus tioredoxina” per estar també present en les tioredoxines i en altres famílies proteiques. El centre actiu té 4 aminoàcids, amb la seqüència CxxC/S, i la seva posició està conservada dins del domini tipus tioredoxina.

2.2 Classificació de les glutaredoxines

Les GRXs s'han classificat en monotiòliques i ditiòliques, depenent del número de residus de cisteïna al motiu CxxC/S del centre actiu (**Figura 6**), encara que en plantes hi ha un major nombre de subfamílies a causa d'una major diversitat de seqüències en el centre actiu (Couturier et al., 2009a). Aquí considerarem només les GRXs presents en microorganismes i animals.

Les GRXs ditiòliques tenen un motiu CPY/FC (Li et al., 2010) i actuen a través d'un mecanisme d'acció que involucra els dos residus de cisteïna per reduir els disulfurs proteics. No obstant, per la desglutinationilació dels disulfurs mixtes entre les cisteïnes d'una proteïna i el GSH només és necessària la cisteïna que es troba en posició més N-terminal en el centre actiu (Bushweller et al., 1992). D'altra banda, les GRXs monotiòliques tenen el motiu CGFS, o altres variacions com CSYS i CPYS (Couturier et al., 2009b; Deponte et al., 2005; Mesecke et al., 2008a).

El nombre de GRXs presents a les cèl·lules varia segons l'espècie. Per exemple, en cèl·lules humanes hi ha 4 GRXs, dos ditiòliques (Grx1 i Grx2) i dos monotiòliques (Grx3 i Grx5) (Johansson et al., 2004; Lillig et al., 2005; Lönn et al., 2008; Su et al., 2005; Witte et al., 2000). Per altra banda, el llevat *S. cerevisiae* posseeix tres GRXs ditiòliques (Grx1/2/8) i cinc GRXs monotiòliques (Grx3-7) (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007; Lillig et al., 2008; Mesecke et al., 2008a; Mesecke et al., 2008b).

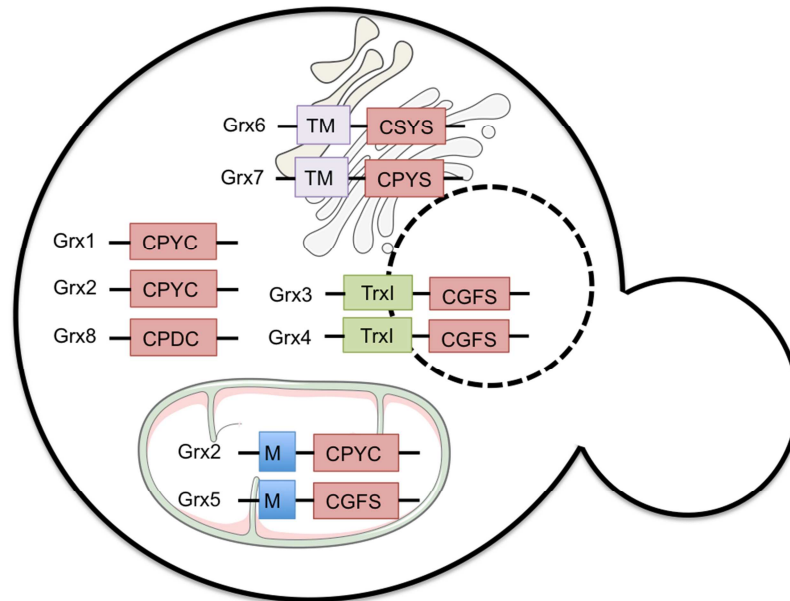


Figura 6. Esquema de la localització cel·lular de les 8 glutaredoxines presents en *S. cerevisiae*. En vermell es mostra el domini glutaredoxina amb els quatre aminoàcids del centre actiu. (M) indica que la proteïna té una seqüència senyal de localització mitocondrial, (TM) indica que la proteïna té un domini transmembrana i (TrxI) indica que la proteïna té un domini semblant a les tioredoxines. [Adaptat de (Lillig et al., 2008)].

2.2.1 GRXs ditiòliques

S. cerevisiae té tres glutaredoxines ditiòliques: Grx1, Grx2 i Grx8. Per una banda, Grx1 i Grx2 tenen un motiu CPYC al centre actiu i comparteixen un 64% d'identitat de seqüència (Luikenhuis et al., 1998). D'altra banda, Grx8 té un motiu CPDC inusual al centre catalític acompanyat d'uns residus adjacents més similars a les proteïnes TRXs que a les GRXs, i és per tant un bon candidat d'híbrid GRX/TRX (Eckers et al., 2009). L'estructura cristal·lina de Grx1 mostra el domini tipus TRX, amb quatre cadenes β centrals, tres antiparal·leles ($\beta 1$, $\beta 3$ i $\beta 4$) i la cadena $\beta 2$ paral·lela a l'adjacent $\beta 1$, embolcallades per cinc hèlix α (Yu et al., 2008), molt similar a Grx2 (Li et al., 2010).

Grx1 i Grx8 no tenen seqüència senyal i estan considerades proteïnes citosòliques (Eckers et al., 2009; Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007; Pedrajas et al., 2002), mentre que Grx2 està dirigida tant al citosol com a la mitocondria a causa d'un inici de traducció en fase alternatiu (Pedrajas et al., 2002). Així, la isoforma més curta de Grx2 es queda al citosol, i la més llarga es transloca a la matriu mitocondrial (Porrás et al., 2006). A la vegada, aquesta isoforma mitocondrial es pot processar per una peptidasa mitocondrial resultant en una forma soluble de la matriu

INTRODUCCIÓ

mitocondrial, o queda sense processar com a forma associada a la membrana mitocondrial externa.

Grx1 i Grx2 actuen reduint els grups tiol de cisteïnes essencials pel cycle catalític de determinats enzims. Així mateix, són enzims desglutinationilants, és a dir, són capaços de reduir eficientment els ponts disulfur mixtes entre el GSH i els grups SH proteics, ja sigui com a mecanisme protector de les proteïnes vers l'oxidació irreversible dels grups tiols, o per regular la funció proteica (Biswas et al., 2006; Ghezzi et al., 2005). Els mutants mancats d'una o ambdues GRXs són hipersensibles a agents oxidants com els peròxids o la menadiona (Luikenhuis et al., 1998).

2.2.2 GRXs monotioliques

Les glutaredoxines monotioliques comprenen Grx3, Grx4, Grx5, Grx6 i Grx7. Es poden dividir en dos subgrups, un grup format per Grx3-5 i l'altre per Grx6/7. El primer subgrup es caracteritza per tenir un centre actiu CGFS, mentre que el segon subgrup conté un centre actiu CSYS (Grx6) o CPYS (Grx7).

Les GRXs monotioliques Grx3 i Grx4 es localitzen al citosol i al nucli, a conseqüència d'un domini tipus TRX que tenen a l'extrem N-terminal (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007; Lopreiato et al., 2004; Molina et al., 2004; Mühlhoff et al., 2010), a més del domini GRX. Grx3 i Grx4 també estan involucrades en el metabolisme del ferro (Mühlhoff et al., 2010; Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006), ja que ambdues interaccionen amb el factor de transcripció Aft1, el qual respon als nivells de ferro (Bellí et al., 2004; Foury i Talibi, 2001; Hausmann et al., 2008) tal com es descriu en l'apartat 1.5 de la **Introducció**.

Per altra banda, la GRX monotiolica Grx5 és una proteïna que es localitza exclusivament a la matriu mitocondrial (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002). A nivell funcional, la pèrdua de Grx5 comporta defectes de creixement en medi mínim, hipersensibilitat a agents oxidants externs i hipercarbonilació proteica, fets que indiquen dany oxidatiu (Rodríguez-Manzaneque et al., 1999). La seva funció principal és participar en el mecanisme de biogènesi dels centres Fe-S (tal com es descriu en l'apartat 1.3.2 de la **Introducció**). També, en absència de Grx5 s'activa el reguló del ferro a través de Aft1, ocasionant una acumulació intracel·lular d'ions de ferro i una disminució de l'activitat dels enzims que contenen centres Fe-S, com l'aconitasa o el succinat deshidrogenasa (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007; Rodríguez-Manzaneque et al., 2002). Així, els defectes de creixement d'un mutant mancat de Grx5 poden ser deguts a la necessitat d'enzims que contenen centres Fe-S per la biosíntesi de determinats aminoàcids i altres

possibles factors de creixement, mentre que la susceptibilitat a determinats oxidants pot ser a causa de tenir unes condicions basals oxidants (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007).

Així doncs, les GRXs monotioliques Grx3 i Grx4 difereixen significativament de la Grx5 mitocondrial, tot i que tenen funcions reguladores interrelacionades respecte a l'expressió genètica dependent de ferro al nucli i que influencien la disponibilitat intracel·lular d'ions de ferro per processos biosintètics (Deponte et al., 2013).

En aquesta memòria s'utilitzarà la glutaredoxina Grx5 com a model d'estudi en relació a la inestabilitat genòmica, a causa de la seva implicació en la maquinària mitocondrial de síntesi de centres Fe-S.

Pel que fa a les glutaredoxines Grx6 i Grx7, s'encarreguen de mantenir l'estat redox de proteïnes de la via secretora. Grx6 es troba entre les vesícules del RE i l'aparell de Golgi, mentre que Grx7 es troba a les vesícules de l'aparell de Golgi, ambdues amb el domini GRX encarat al lumen d'aquests orgànuls i unides a la membrana per un domini TM de l'extrem N-terminal (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008). Estudis recents han demostrat el paper de Grx6 en el manteniment de l'homeòstasi intracel·lular del calci (Puigpinós et al., 2015).

3. DANY AL DNA

Mantenir l'estabilitat del genoma es crucial pel correcte creixement i funcionament de les cèl·lules i la seva supervivència. La integritat genòmica d'un organisme està constantment canviant a causa de modificacions en el DNA. Així s'estima que cada dia es produeixen desenes de milers de lesions al DNA en cèl·lules humanes (Jackson i Bartek, 2009). Aquestes lesions poden bloquejar la replicació i transcripció del genoma, i si no es reparen o es reparen de manera incorrecta poden donar lloc a mutacions o aberracions genòmiques a gran escala, amenaçant la viabilitat cel·lular o del organisme. La causa pot vindre per fonts exògenes, com la radiació ultraviolada (UV), radiació ionitzant (RI) o agents cancerígens, o per fonts endògenes com errors en la replicació o productes de metabolisme cel·lular com ROS. La capacitat per fer front eficaçment al dany al DNA induït per aquestes fonts és crucial per la supervivència cel·lular i el manteniment de la integritat del genoma.

3.1 Inestabilitat genòmica i la seva relació amb defectes en la funcionalitat mitocondrial

S'entén com inestabilitat genètica un estat cel·lular alterat on es produeixen mutacions, reordenacions, delecions i inversions en el genoma de la cèl·lula. Això és conseqüència d'una gran varietat de causes com l'acumulació de ROS, mutacions en proteïnes necessàries per replicar el DNA o reparar el dany causat en aquest, variacions en el nombre de cromosomes a causa d'errors en la maquinària de segregació dels cromosomes, disfunció mitocondrial o altres alteracions genètiques com hiperrecombinació o la pèrdua d'heterozigosi (Aguilera i García-Muse, 2013). Aquestes alteracions genètiques són inicialment causades per múltiples talls en la cadena simple de DNA (ssDNA) o per talls en la doble cadena de DNA (DSBs) generats com a conseqüència d'una disfunció en la replicació.

Per tal de mantenir l'estabilitat genòmica les cèl·lules tenen mecanismes de control incloent la replicació al DNA, així com vies de senyalització i reparació del DNA, que coordinen el metabolisme del DNA amb la progressió del cicle cel·lular. Si els mecanismes de reparació fallen i el cicle cel·lular continua es van acumulant mutacions que poden arribar a ser greus i comprometre la viabilitat de la cèl·lula. Aquests mecanismes estan evolutivament conservats, de manera que els resultats dels estudis en cèl·lules de llevat són en bona mida extrapolables a organismes superiors.

S'ha demostrat que alteracions mitocondrials que afecten a la síntesi i distribució de centres Fe-S estan relacionades amb inestabilitat en el genoma nuclear (Díaz de la Loza et al., 2011; Veatch et al., 2009). En aquests estudis es va detectar alts nivells de dany al DNA a causa de la pèrdua del DNA mitocondrial (mtDNA), que porta a una pèrdua del potencial de membrana mitocondrial i la deficient importació de proteïnes mitocondrial codificades en el genoma nuclear, tenint com a conseqüència defectes en l'importació de ferro a la mitocòndria, en la síntesi de centres Fe-S (**Figura 7**) i en l'exportació d'aquests al citosol (Veatch et al., 2009).

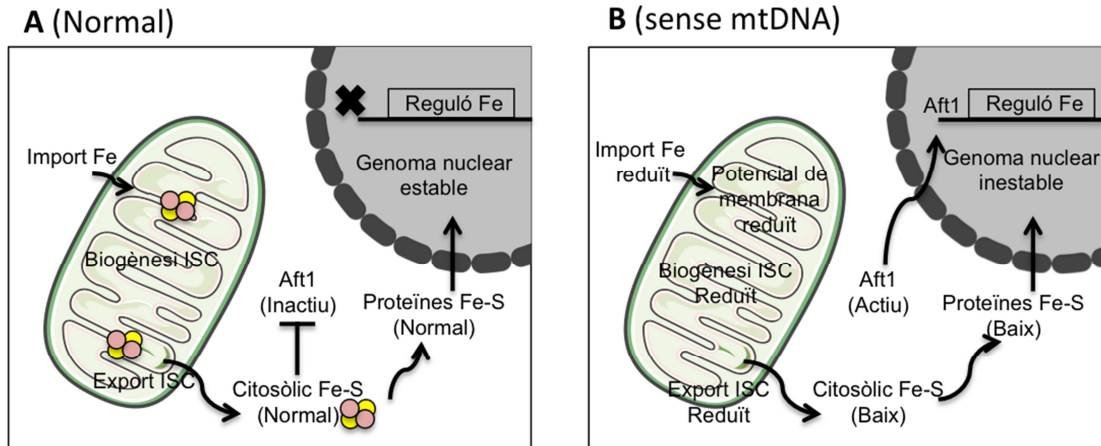


Figura 7. Model explicatiu de la inestabilitat genòmica nuclear a conseqüència de la pèrdua del DNA mitocondrial. A) En cèl·lules normals, el ferro es emmagatzemat en els centres Fe-S de la mitocondria, i alguns centres Fe-S són exportats al citosol mitjançant la maquinària CIA. Els centres Fe-S citosòlics inhibeixen la inducció del reguló del ferro (Aft1) i són necessaris per les funcions de les proteïnes que mantenen la integritat del genoma nuclear. B) En cèl·lules que han perdut el DNA mitocondrial, el potencial de membrana mitocondrial és reduït, comprometent la importació del Fe, la síntesi i l'exportació de centres Fe-S, el qual provoca una inducció del reguló de ferro i inestabilitat genòmica [Adaptat de (Veatch et al., 2009)].

En d'altres estudis s'ha observat que en soques mutants per proteïnes implicades en la biogènesi de centres Fe-S, per exemple en la xaperona Zim17 que col·labora amb Ssq1, augmenta la freqüència de recombinació i de mutació espontània causant una severa inestabilitat genòmica (Díaz de la Loza et al., 2011).

3.2 Cicle cel·lular

La replicació i la propagació de la informació genètica es de suma importància per la viabilitat i l'estabilitat cel·lular a nivell genòmic. Per aquest motiu, les cèl·lules han desenvolupat un complex cicle cel·lular, estrictament controlat i coordinat per transmetre la informació genètica sense errors.

En *S. cerevisiae*, igual que en totes les cèl·lules eucariotes, el cicle cel·lular mitòtic consta de quatre fases cícliques: G1 (fase "Gap 1"), S (síntesi del DNA), G2 (fase "Gap 2") i M (divisió nuclear, mitosi), seguit per la citocinesi (**Figura 8**). Al final de la fase G1, quan les cèl·lules han assolit una grandària crítica i disposen de nutrients suficients, passen a una pre-etapa anomenada *START* (on es decideix si s'inicia la divisió cel·lular o no). Aleshores la cèl·lula entra a la fase S, on es replicarà el genoma. Una vegada replicat el DNA, la cèl·lula entra en fase G2

INTRODUCCIÓ

on es prepara per l'entrada en mitosi. Ja en fase M els cromosomes es segreguen i la cèl·lula s'acaba dividint en dos. Hi ha dues fase de vital importància, la fase S, on es realitzarà la duplicació dels cromosomes, i la fase M, on es segregaran els cromosomes. En el cicle cel·lular hi ha dos etapes per coordinar i controlar la transició i el període de temps del procés: una en la transició G1/S i l'altra entre la fase G2 i M (Morgan et al., 1995).

En *S. cerevisiae* hi ha tres punts de control del cicle cel·lular (*checkpoints*) que actuen en tres etapes diferents del cicle (**Figura 8**). El primer *checkpoint* es localitza en la fase G1, promou el retard o aturada de les cèl·lules en el període de transició entre G1/S, just abans del *START*, per tal d'evitar que les cèl·lules que contenen algun error o mutació puguin comprometre de manera irreversible totes les etapes del cicle cel·lular. Aquest *checkpoint* atura les cèl·lules i dona temps per reparar els errors del DNA, per així poder entrar en fase S i replicar-se (Gerald et al., 2002; Siede et al., 1996, 1994). No obstant, algunes aberracions al DNA, com alquilacions al mateix, no activen el *checkpoint* en fase G1, permetent a les cèl·lules entrar a fase S.

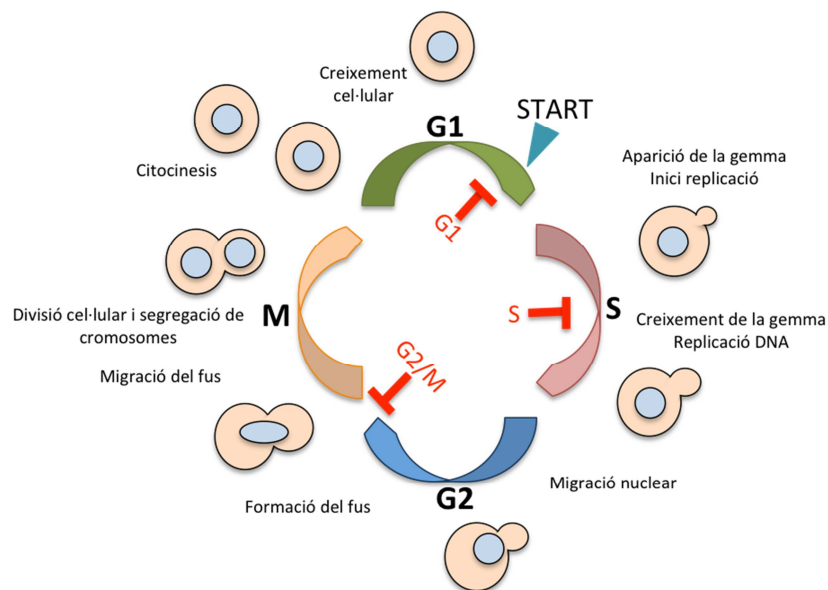


Figura 8. Esquema del cicle cel·lular en *S. cerevisiae* i els *checkpoints* del DNA (indicats en vermell). Cada etapa del cicle s'acompanya amb una il·lustració del estat de la cèl·lula i les funcions corresponents a l'etapa en que es troba [Adaptat de (Finn et al., 2012)].

Un altre punt de control és el *checkpoint* de dany al DNA en fase S, que s'activa quan la integritat de les forquetes de replicació està compromesa, garantint que els mecanismes de reparació de dany al DNA arreglin els errors i així es pugui realitzar de manera completa i correcta la replicació abans que les cèl·lules entrin en mitosis (Harper i Elledge, 2007).

Finalment, el tercer punt de control és el *checkpoint* en fase G2/M, que atura les cèl·lules entre la metafase i l'anafase, evitant que les cèl·lules que tenen dany al DNA progressin (Lowndes i Murguía, 2000). Si el dany al DNA es pot reparar de manera ràpida, no és necessari induir una aturada al cicle cel·lular. No obstant, quan el dany no es repara en un període curt de temps s'activa el *checkpoint* i s'atura la progressió cel·lular (Harrison i Haber, 2006).

3.3 *Checkpoint* de dany al DNA en fase S

3.3.1 Senyalització i components de la via

En presència de dany al DNA, d'un estrès replicatiu o quan les forquetes de replicació estan compromeses, s'activa el mecanisme de *checkpoint* de dany al DNA. Aquest és un mecanisme de vigilància i supervivència que coordina diferents aspectes del metabolisme cromosòmic juntament amb la progressió del cicle cel·lular, responent a diferents tipus de lesions al DNA. L'activació d'aquest mecanisme condueix a una parada o alentiment de la progressió del cicle per tal d'activar els mecanismes de reparació de dany al DNA i estabilitzar les forquetes de replicació (Harper i Elledge, 2007; Lee et al., 2008).

Els components centrals del *checkpoint* de dany al DNA en *S. cerevisiae* són dues quinases de la família de les fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3), concretament Tel1 (ATM en humans) i Mec1 (ATR en humans) (Andreson et al., 2010; Nyberg et al., 2002) (**Figura 9**). Una vegada s'ha produït el dany al DNA, té lloc la unió d'un complex sensor a la zona del DNA afectada pel dany. Aleshores aquest complex recluta i activa Mec1, i inicia una complexa regulació en cascada de diverses quinases (Harper i Elledge, 2007). Mec1 reconeix un motiu en les quinases transductores Chk1 i Rad53 (Chk2 en humans) promovent l'activació i la fosforilació d'aquestes (Berens i Toczyski, 2012; Schwartz et al., 2003; Segurado i Diffley, 2008) mitjançant dues vies paral·leles, la via de replicació dependent de Mrc1 o la via de dany al DNA dependent de Rad9 (Hoch et al., 2013). La quinasa Rad53 interacciona a través dels seus dominis FHA ("Fork Head-Associated") amb Rad9, afavorint la seva autofosforilació (De la Torre-Ruiz et al., 1998; Sweeney et al., 2005). L'activació i hiperfosforilació de Rad53 promou un retard o aturada del cicle cel·lular, per facilitar l'actuació dels mecanismes de reparació, l'estabilització de les forquetes de replicació i la regulació transcripcional (Branzei i Foiani, 2005). En el cas de l'estabilització de les forquetes de replicació, la hiperfosforilació de Rad53 promou la fosforilació de Sld3, essent aquesta una proteïna essencial en l'inici de la replicació del DNA, conduint a un bloqueig de la replicació (Lopez-Mosqueda et al., 2010). Els mutants nuls $\Delta mec1$

INTRODUCCIÓ

i *Δrad53* són inviables a causa dels baixos nivells de dNTPs (desoxiribonucleòtids trifosfat), que provoquen una gran quantitat de mutacions i reordenaments espontanis (Myung et al., 2001). Una vegada hiperfosforilat, Rad53 activa la quinasa Dun1, mitjançant el seu domini disfosfotreonina que reconeix el domini FHA de Dun1 i provoca la fosforilació de varis residus i la activació de Dun1 (Chen et al., 2007; Hammet et al., 2000; Schwartz et al., 2003). A diferència de Mec1 i Rad53, la quinasa Dun1 no és essencial, encara que juga un paper fonamental en el control de les respostes a dany al DNA (De la Torre Ruiz i Lowndes, 2000; Zhao i Rothstein, 2002). Així, la quinasa Dun1 participa en el control de la ribonucleòtid reductasa (RNR), enzim que catalitza “*de novo*” el pas limitant de la biosíntesi dels dNTPs. La RNR consta de dos subunitats (R1 i R2) i els seus components estan codificats per quatre gens *RNR1-4* (més informació en l’apartat 3.3.2 de la **Introducció**). La regulació de l’activitat de RNR per Dun1 es fa a través de tres mecanismes (**Figura 9**): i) augmentant la transcripció dels gens *RNR*; ii) regulant la correcta localització subcel·lular de la subunitat petita R2, i iii) induint la degradació de l’inhibidor de la subunitat gran R1 de la RNR, Sml1, tot això amb l’objectiu final de mantenir els nivells adequats de dNTPs, ja que un desequilibri en aquests nivells implicaria un augment en la taxa de mutació i inclús la mort cel·lular (Chabes et al., 2003).

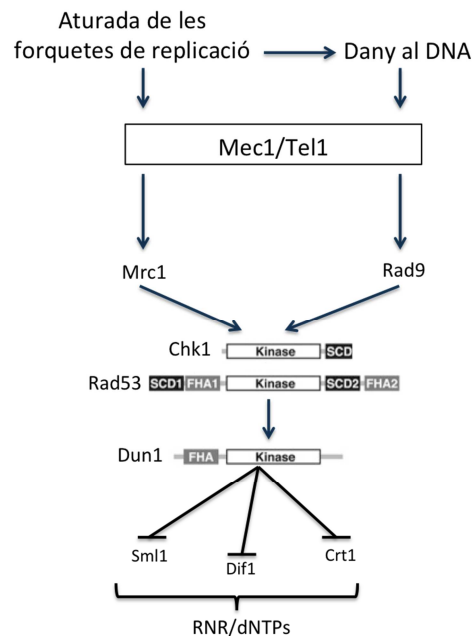


Figura 9. Esquema dels components principals del *checkpoint* de dany al DNA [Adaptat de (Hoch et al., 2013)].

3.3.2 L'enzim ribonucleòtid reductasa: estructura i funció

Tots els organismes eucariotes necessiten tenir una concentració adequada i equilibrada de dNTPs per tal de garantir una correcta replicació del DNA (durant el cicle cel·lular) i la seva reparació, i així mantenir l'estabilitat del genoma.

L'enzim RNR es troba des de procariontes fins a eucariotes i s'encarrega de catalitzar la reducció de ribonucleòtids a desoxiribonucleòtids, proporcionant d'aquesta manera els components bàsics requerits per la biosíntesi "de novo" del DNA (Sanvisens et al., 2013).

En funció de la naturalesa del radical utilitzat en la catàlisi i del tipus d'estructura que forma les RNRs, aquestes es poden classificar en tres classes I/II/III (Jordan i Reichard, 1998). No obstant, a pesar de les diferències en les seqüències dels aminoàcids, les tres classes presenten característiques estructurals molt semblants, suggerint un origen evolutiu comú (Kolberg et al., 2004). En organismes eucariotes la classe dominant és la I, que està formada per dues subunitats R1 o α_2 i R2 o β_2 . La subunitat R1, també anomenada subunitat gran (90 kDa), conté un lloc catalític i dos punts d'unió a efectors al·lostèrics que determinen la preferència pel substrat i l'activitat. La subunitat R2, també anomenada subunitat petita (45 kDa), conté un centre difèrric (Fe-O-Fe) que és el responsable de la generació i el manteniment d'un radical tirosil (Y[•]) necessari per la catàlisi enzimàtica (Sanvisens et al., 2013). Alguns agents químics com la hidroxidreurea (HU) poden inhibir l'activitat RNR mitjançant la destrucció del radical tirosil (Nyholm et al., 1993).

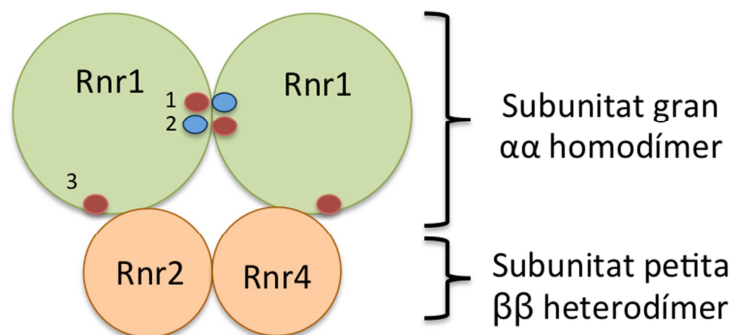


Figura 10. Esquema de les subunitats de la ribonucleòtid reductasa (RNR) de *S. cerevisiae*. (1) indica el lloc catalític, (2) indica el lloc al·lostèric d'activitat (A), (3) indica el lloc al·lostèric específic (S).

En *S. cerevisiae* la RNR és codificada per quatre gens: dos codifiquen la subunitat gran (*RNR1* i *RNR3*) i dos més codifiquen la subunitat petita (*RNR2* i *RNR4*). La subunitat gran és un homodímer ($\alpha\alpha$) Rnr1, mentre que la subunitat petita està formada per un heterodímer ($\beta\beta$) compost per dos proteïnes Rnr2 i Rnr4 (**Figura 10**). A diferència de la resta d'eucariotes, en el

INTRODUCCIÓ

llevat només el monòmer β (o proteïna Rnr2) del heterodímer ($\beta\beta$) de la subunitat petita conté el radical tirosil i el centre difèrric (Huang i Elledge, 1997; Perlstein et al., 2005; Sanvisens et al., 2013). La proteïna Rnr3 no és essencial, essent una forma homòloga de Rnr1. Els seus nivells d'expressió són molt baixos encara que quan manca Rnr1 pot substituir funcionalment a aquesta.

3.3.3 Regulació al·lostèrica de la ribonucleòtid reductasa

En la fase S del cicle cel·lular es produeix la replicació del DNA. En condicions normals la cèl·lula disposa d'una quantitat suficient de dNTPs per replicar el seu DNA, però quan els nivells de dNTPs són molt elevats o no estan equilibrats causen elevades taxes de mutació (Hofer et al., 2012).

Amb l'objectiu d'evitar un excés de dNTPs durant aquesta fase S, els organismes eucariotes regulen l'activitat del enzim RNR mitjançant un mecanisme de regulació al·lostèrica. Cada subunitat α conté un lloc catalític i dos llocs al·lostèrics, anomenats també lloc específic (S) i lloc d'activitat (A), respectivament (**Figura 10**). El lloc d'activitat (A) al·lostèrica controla el total de l'activitat enzimàtica, actuant com un interruptor que controla l'inhibició per dATP i l'activació per ATP. Per altra banda, el lloc específic (S) determina quin substrat es redueix en el lloc catalític. D'aquesta manera la unió a ATP i dATP promou la reducció de UDP i CDP, la unió a dTTP promou la reducció de GDP i la unió a dGTP promou la reducció d'ADP (Ingemarson i Thelander, 1996; Kashlan i Cooperman, 2003; Rofougaran et al., 2008). Aquest tipus de regulació promou que hi hagi un equilibri dels quatre tipus de dNTPs (Chabes et al., 2003). Aquest mateix estudi de Chabes et al. (2003) mostra que durant la fase G1, quan els nivells d'expressió dels gens RNR són baixos i l'activitat del enzim és reduïda, també ho és la concentració de dNTPs. En canvi, en fase S quan s'indueix la transcripció dels gens RNR, l'activitat de l'enzim augmenta i també ho fan els nivells de dNTPs.

3.3.4 Regulació transcripcional dels gens *RNR1-4*

Un dels tres mecanismes que utilitza Dun1 per controlar l'enzim RNR en presència de dany al DNA o d'un agent causant d'estrès genotòxic (aparat 3.3.1 de la **Introducció**) és l'augment dels nivells de mRNAs de *RNR1-4* (Sanvisens et al., 2011, 2014).

En presència de dany al DNA, l'activació de les quinases del *checkpoint* i en concret Dun1, promou la hiperfosforilació de Crt1, provocant l'alliberació del complex repressor Crt1-Ssn6-Tup1 dels promotors dels gens *RNR2-4* i induint així un increment en la transcripció dels gens *RNR2*, *RNR3* i *RNR4* (Huang et al., 1998). En condicions d'absència de dany al DNA, el complex

repressor Crt1-Ssn6-Tup1 reconeix i s'uneix a elements *X-box* (seqüències de DNA de 13 nucleòtids situades a l'extrem 5'UTR) dels gens *RNR2-4* i en reprimeix la seva transcripció (Fu i Xiao, 2006; Huang et al., 1998; Malavé i Dent, 2006; Sanvisens et al., 2011). D'aquesta forma, en presència d'un estrès genotòxic, els nivells de transcripció del mRNA de *CRT1* augmenten, però una vegada reparat el dany, la senyal d'activació proporcionada per les quinases Mec1-Rad53-Dun1 disminueix i es torna ràpidament a l'estat de repressió transcripcional de *CRT1* (Sanvisens et al., 2013).

El nivell d'inducció dels gens *RNR2*, *RNR3* i *RNR4* en resposta a un dany al DNA o un agent genotòxic no és el mateix (Elledge i Davis, 1987). En presència de HU, que com ja s'ha dit en l'apartat 3.3.2 de la **Introducció** és un compost inhibidor de la RNR, o metil-metà-sulfonat (MMS), agent alquilant que metila bases nitrogenades del DNA (en posició *N₇-desoxiguanina* i *N₃-desoxiadenina*), s'ha apreciat que *RNR2* s'indueix aproximadament 25 vegades, *RNR4* ho fa unes 10 vegades i en el cas de *RNR3* (amb nivells d'expressió molt baixos en absència de dany al DNA) s'indueix entre 200 i 300 vegades (Elledge i Davis, 1987; Huang i Elledge, 1997).

A més a més, hi ha dos mecanismes que també regulen els nivells transcripcionals dels gens de la RNR. Un d'ells és dependent d'oxigen, està format pel repressor Rox1 i Mot1 (Klinkenberg et al., 2006) i regula *RNR2-4*. L'altre actua a través del factor transcripcional Irx1, i en aquest cas s'utilitza un mecanisme independent de la quinasa Dun1 i el repressor transcripcional Crt1, però dependent de Mec1 i Rad53. Irx1 regula exclusivament l'expressió de *RNR1* (Tsaponina et al., 2011). És més, tant en condicions normals com en resposta a dany al DNA, l'expressió de Rnr1 i el manteniment dels dNTPs depèn en gran part d'*IRX1*. En el mutant *Δirx1* els nivells de Rnr1 són baixos, però arriben a ser encara inferiors en presència de dany al DNA, al contrari que passa en una soca salvatge. Això provoca un augment dels nivells de Rnr3 i 4 per contrarestar l'efecte a causa de l'activació del *checkpoint* via Mec1-Rad53-Dun1 (Tsaponina et al., 2011).

La regulació transcripcional dels gens RNR produeix un canvi en l'activitat de la RNR durant el cicle cel·lular. Per exemple, els nivells de mRNA de *RNR1* presenten unes grans fluctuacions al llarg del cicle cel·lular, arribant als nivells màxims al final de l'etapa G1 i durant els primers compassos de la fase S. En canvi, durant quasi bé tota la fase S i G2 es troben quasi absents, indicant una baixada dràstica dels nivells de mRNA al iniciar-se la síntesi del DNA (Mazumder et al., 2013).

3.3.5 Localització subcel·lular de Rnr2 i Rnr4

Un altre mecanisme per regular l'activitat de la RNR en presència de dany al DNA o al llarg del cicle cel·lular es dona mitjançant la localització de les subunitats R1 i R2 de la RNR. En condicions normals, sense estrès o dany al DNA, la subunitat R1 és localitzada al citosol, mentre que la subunitat R2 es localitza principalment en el nucli. En resposta a dany al DNA o estrès causat per un agent genotòxic o durant la fase S del cicle cel·lular la subunitat petita R2 és redistribueix des del nucli fins al citosol, formant un complex amb la subunitat R1 (Lee et al., 2008; Niida et al., 2010; Sanvisens et al., 2011; Yao et al., 2003). D'aquesta manera, quan s'ha format el complex, s'iniciarà la producció de dNTPs, per tal de reparar el dany al DNA o continuar la progressió del cicle cel·lular.

La localització nuclear de la subunitat petita (Rnr2 i Rnr4) depèn de dos proteïnes Wtm1 i Dif1 (Lee i Elledge, 2006; Sanvisens et al., 2011). En absència de dany al DNA la proteïna Wtm1 s'uneix al complex Rnr2 i Rnr4 i actua retenint-lo al nucli. En presència d'un agent genotòxic o de dany al DNA, Wtm1 desfà la unió amb el complex Rnr2-Rnr4 i permet que les dues subunitats es redistribueixen cap al citoplasma (Lee i Elledge, 2006). Es coneix molt poc sobre les característiques de la interacció física entre la proteïna Wtm1 i el complex Rnr2-Rnr4, al igual que els mecanismes implicats en l'eliminació de dita interacció entre ambdues parts. En un estudi recent de Sanvisens et al. (2011) s'ha demostrat que un mecanisme independent del *checkpoint* via Mec1-Rad53-Dun1 pot actuar sobre Wtm1 i facilitar el desacoblament amb el complex Rnr2-Rnr4 i la seva redistribució cap al citoplasma, en condicions de depleció de ferro. En aquesta situació les proteïnes d'unió a mRNA Cth1 i Cth2, membres del reguló del ferro, interactuen específicament amb el mRNA de *WTM1* promovent la seva degradació, que condueix a una davallada dels nivells de proteïna Wtm1 afavorint el desacoblament de Rnr2 i Rnr4 i la seva redistribució subcel·lular cap al citosol (**Figura 11**) (Sanvisens et al., 2011, 2014).

La proteïna Dif1 també participa en la localització subcel·lular de Rnr2-Rnr4. Dif1 interacciona directament amb el complex Rnr2-Rnr4, mitjançant un domini anomenat HUG (Lee et al., 2008; Wu i Huang, 2008), que és un domini conservat que també contenen uns altres inhibidors de la RNR, com Sml1 i Spd1. Dif1 és la proteïna responsable de l'importació nuclear de la subunitat R2 en absència de dany al DNA o en la recuperació després d'aquest, a través d'un mecanisme independent de la proteïna Wtm1 (Lee i Elledge, 2006). En presència de dany al DNA o en fase S del cicle cel·lular els nivells de proteïna Dif1 són significativament inferiors, com a conseqüència que la quinasa Dun1 fosforila directament Dif1, facilitant la seva inactivació i posterior degradació. La reducció dels nivells de Dif1 després d'un dany al DNA o

durant la fase S permet al complex Rnr2-Rnr4 desplaçar-se al citosol (**Figura 11**) (Lee et al., 2008; Niida et al., 2010).

Així doncs, durant la fase S del cycle cel·lular la localització nuclear de les proteïnes Rnr2 i Rnr4 disminueix acumulant-se al citosol perque és necessària la formació de dNTPs per la replicació del DNA. La distribució subcel·lular de la subunitat R2 al llarg del cycle cel·lular també depèn de Wtm1 i Dif1. Concretament la proteïna Wtm1 és essencial per la localització nuclear de Rnr2-Rnr4 durant la fase G1 i G2/M (Zhang et al., 2006), mentre que la proteïna importadora Dif1 és necessària al final de fase S, per tal de facilitar que el complex Rnr2-Rnr4 torni al nucli (Wu i Huang, 2008).

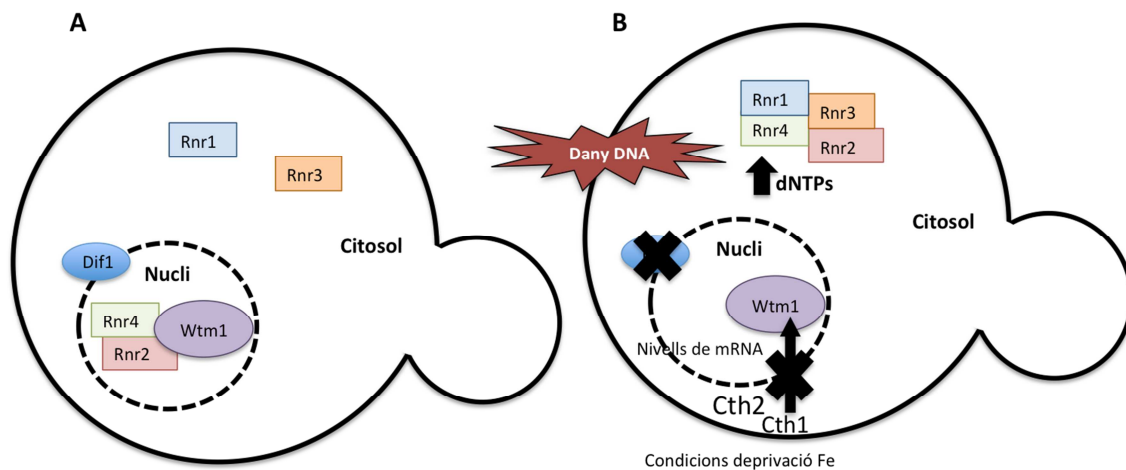


Figura 11. Regulació de la localització subcel·lular de la RNR en *S. cerevisiae*. A) Localització de les subunitat de RNR en absència de dany al DNA. En aquestes condicions la subunitat petita R2 es troba al nucli retinguda per Wtm1 i Dif1 i la subunitat gran R1 es localitza al citosol. B) En presència de dany al DNA la subunitat petita se'n va al citosol per formar el complex RNR, mitjançant els mecanismes que impliquen la regulació de Wtm1 i Dif1.

3.3.6 Inhibició de la subunitat R1 (Rnr1) mitjançant Sml1

Un altre mecanisme implicat en el control de la funció de RNR es basa en la inhibició de la subunitat gran R1 mitjançant la proteïna Sml1. En presència de dany al DNA o durant la fase S del cycle cel·lular la proteïna Sml1 és fosforilada, ubiquïtinitzada i finalment degradada. Aquesta regulació depèn del *checkpoint* mediat per Mec1-Rad53-Dun1 (Zhao et al., 2001) i això causa un augment de la activitat RNR i un increment dels dNTPs. En condicions normals Sml1 no es troba fosforilada, de manera que inhibeix l'activitat de Rnr1 i la concentració cel·lular de dNTPs es manté equilibrada (Baek et al., 2012).

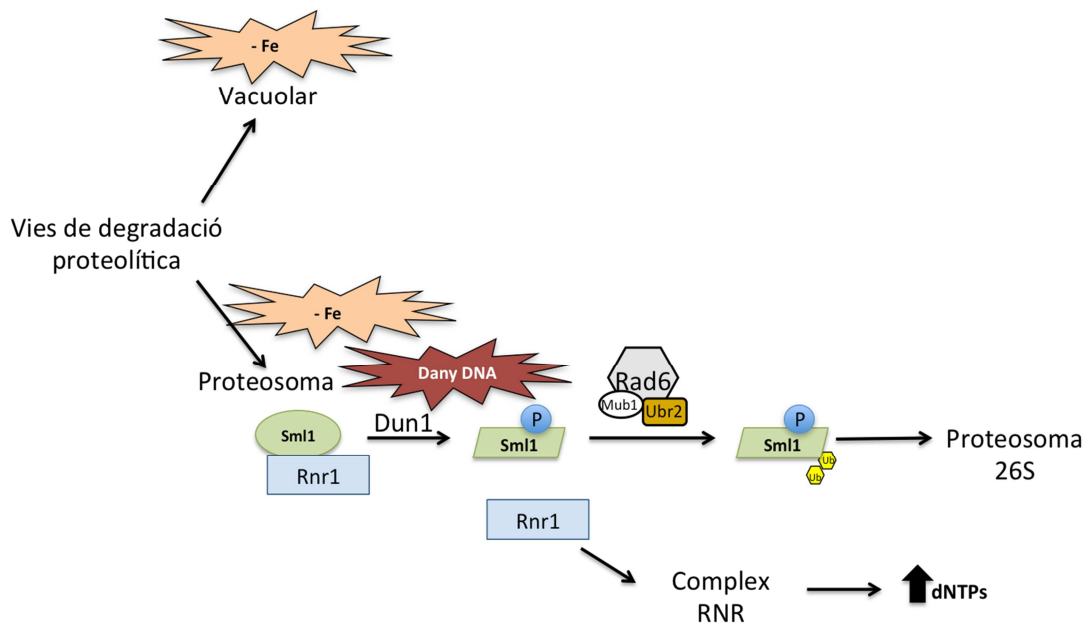


Figura 12. Esquema de les dues vies de degradació proteolítica de Sml1 en resposta a dany al DNA o dèficit de ferro per la via vacuolar o del proteosoma 26S. Sml1 es troba unit constitutivament a Rnr1, inhibint l'activitat RNR. En resposta a dany al DNA Dun1 s'activa i fosforila Sml1. Aquesta fosforilació promou la ubiquïtinització de Sml1 pel complex Rad6-Ubr2-Mub1 i la posterior degradació mitjançant el proteosoma 26S. Una vegada alliberat Rnr1, s'associa amb Rnr2 i Rnr4 amb el conseqüent augment d'activitat RNR i de producció de dNTPs. En una situació de depleció de ferro, la degradació de Sml1 depèn de les dues vies, la vacuolar i la del proteosoma [adaptat de (Andreson et al., 2010)].

En estudis “*in vitro*” s’ha observat que la quinasa Dun1 interacciona i fosforila la proteïna Sml1 en almenys tres dels seus residus serina (posicions 56, 58 i 60) (Uchiki et al., 2004) situats en una regió diferent a la implicada en la interacció amb la subunitat gran R1. Una vegada la proteïna Sml1 està fosforilada, s’ubiquïtinitza i es degrada per la via de degradació de proteïnes dependent del proteosoma 26S i/o per la via de la vacuola (Andreson et al., 2010; Azad et al., 2013; Sanvisens et al., 2014). Un estudi inicial va demostrar que en presència de dany al DNA la ubiquïtinització i degradació de Sml1 era controlada per una seqüència de reaccions que duia a terme el complex Rad6-Ubr2-Mub1 (**Figura 12**) (Andreson et al., 2010). Posteriorment s’ha demostrat que en condicions de depleció de ferro en el medi de cultiu o utilitzant curcumina (un component polifenòlic d’origen natural que posseeix diverses propietats farmacològiques i que també actua quelant el ferro intracel·lular), en ambdós casos hi ha una activació del *checkpoint* i una degradació de Sml1, que ve determinada, tant per la via del proteosoma com de la vacuola (Azad et al., 2013; Sanvisens et al., 2013).

La degradació de la proteïna Sml1 en resposta al dany al DNA es dona de manera molt ràpida i promou un increment de fins a quatre vegades dels nivells de dNTPs, permetent a la cèl·lula

reparar el dany i així continuar la progressió del cicle cel·lular (Sanvisens et al., 2014; Zhao et al., 2001).

Així doncs, la degradació de Sml1 és un dels indicadors més sensibles de l'activació del *checkpoint* de dany al DNA, i aquesta degradació inclús es pot donar en condicions en que no es detecta una fosforilació en Rad53 (Barlow et al., 2008).

En la **Figura 13** es mostra de manera esquemàtica un resum dels diferents mecanismes implicats en l'activació del *checkpoint* de dany al DNA abordats en aquest apartat 3.3.

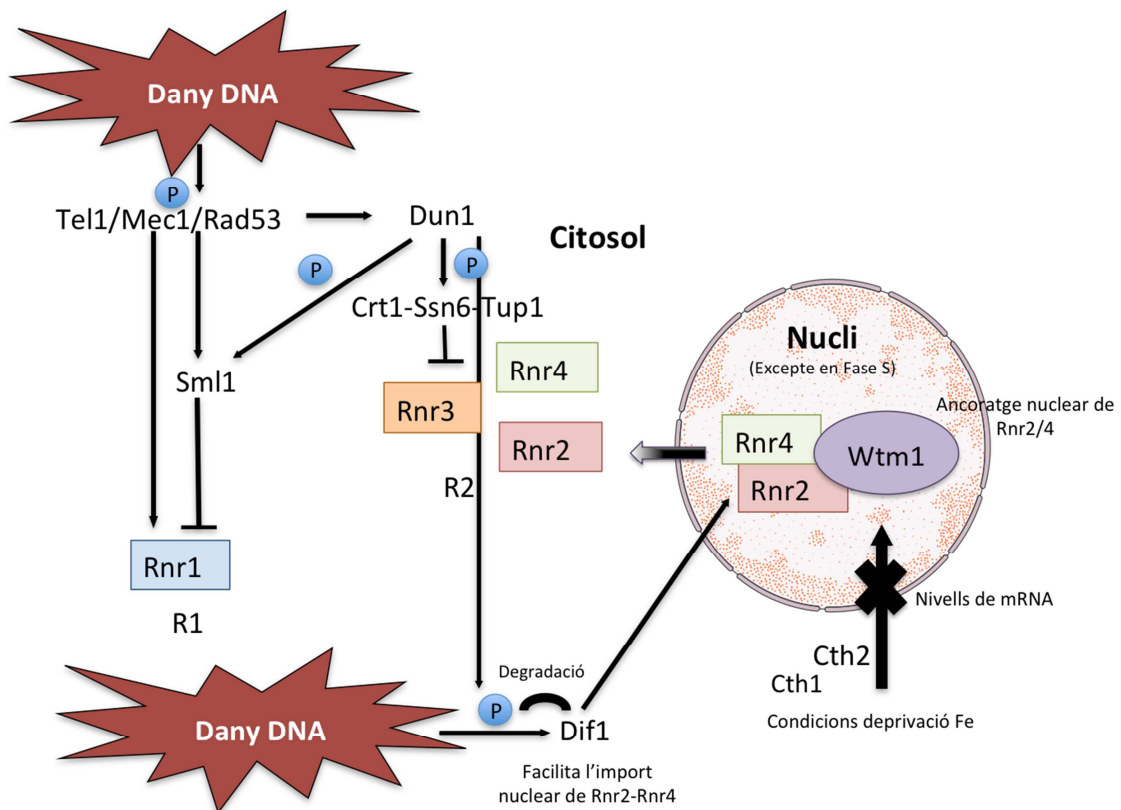


Figura 13. Esquema dels diferents mecanismes implicats en el *checkpoint* de dany al DNA via Mec1-Rad53-Dun1 en *S.cerevisiae*. Veure el text per més detalls.

4. MECANISMES DE REPARACIÓ DE DANY AL DNA

Per tal de reparar una ampla varietat de lesions produïdes al DNA que poden comprometre la integritat del genoma, les cèl·lules han desenvolupat diversos mecanismes de reparació que actuen de manera específica i dirigida al tipus de lesió concreta que s'ha produït (**Figura 14**). Una vegada reparat el dany la cèl·lula podrà continuar la progressió del cicle cel·lular.

A continuació s'explicarà en més detall la via de reparació de talls a la doble cadena i la via de reparació post-replicativa (PRR), que seran les principals que es tractaran en la memòria. No obstant, també es farà una breu introducció a d'altres vies de reparació.

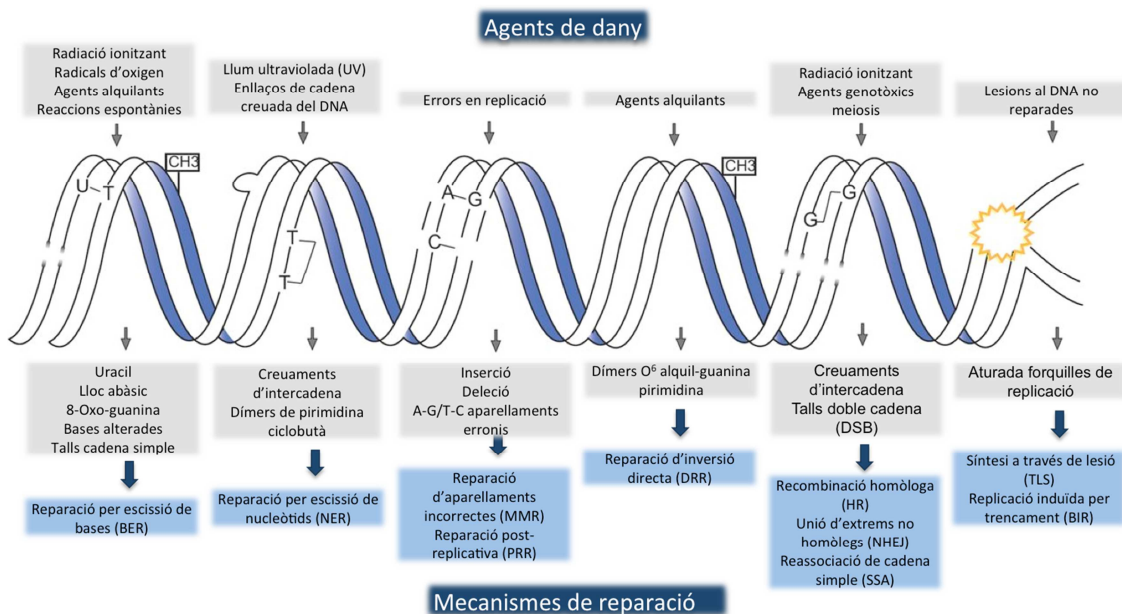


Figura 14. Dany al DNA, mecanismes de reparació i conseqüències. S'indiquen diversos agents que causen dany al DNA (part superior), exemples de lesions induïdes per aquests agents (part mitja) i els mecanismes més rellevants en la reparació del DNA per arreglar les lesions (part inferior) [Adaptat de (Genois et al., 2014)].

4.1 Mecanisme de reparació de talls a la doble cadena (DSB)

Dels diversos tipus de lesions al DNA, els talls en la doble cadena (DSB, per "Double-Strand Breaks") són les formes més citotòxiques i representen una seriosa amenaça per la viabilitat de

la cèl·lula, ja que poden causar un increment de la mutagènesis o la mort cel·lular si no és reparen adequadament. En resposta a cada DSB, les cèl·lules han de desencadenar una serie d'esdeveniments per promoure la reparació de la lesió, per tal de sobreviure i restaurar la integritat cromosòmica (Bennett et al., 1993).

Els DSB es produeixen de manera accidental durant el metabolisme de la cèl·lula o per exposicions d'aquesta a agents exògens, com radiació ionitzant, agents químics i estrès oxidatiu. D'altra banda, també apareixen DSB en processos normals de la cèl·lula com són la segregació cromosòmica durant la meiosis, el canvi de tipus sexual *MAT* en llevats i el desenvolupament dels limfòcits (Jackson i Bartek, 2009; Pâques i Haber, 1999).

Les cèl·lules utilitzen principalment dues vies per reparar els DSB: la recombinació homòloga (HR) i la unió d'extrems no homòlegs (NHEJ, per "*Non-homologous end-joining*") (**Figura 14**). Com indica el seu nom, la NHEJ, implica una lligació directa dels extrems finals trencats o danyats. La HR requereix d'una seqüència homòloga en bon estat per utilitzar-la com a plantilla per a la reparació de les dues cadenes trencades.

4.1.1 Recombinació homòloga (HR)

És un mecanisme de reparació del DNA que actua en la fase S/G2 del cicle cel·lular, que repara DSB, omple espais buits en el DNA i repara també unions covalents entre cadenes de DNA (Li i Heyer, 2008). En aquest mecanisme es precisa d'una segona còpia de DNA idèntica que actui com a motlle per restaurar la informació genètica perduda en el fragment de la cadena trencada. Això es fa mitjançant la transferència de informació genètica cap a la molècula de DNA que ha sofert la ruptura (conversió gènica) o mitjançant un intercanvi recíproc entre les dues molècules (entrecreuament). Una vegada s'ha produït un o varis DSBs, la cèl·lula detecta aquest dany al DNA i activa el *checkpoint* de dany al DNA (veure l'apartat 3.3 de la **Introducció**), conseqüentment activant el mecanisme de reparació HR. En *S. cerevisiae* els DSB són reconeguts de manera específica pel complex de reparació MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), que s'uneix als extrems danyats (De Jager et al., 2001; Petrini i Stracker, 2003), juntament amb l'endonucleasa Sae2, que intervé en l'eliminació de forquetes, adductes voluminosos i d'altres estructures aberrants del DNA (Clerici et al., 2005; Lengsfeld et al., 2007). La proteïna Rad50 exhibeix activitat ATPasa, que és necessària per reparar el DNA, mentre que Xrs2 és essencial per orientar el complex MRX als extrems trencats del DNA. Rad50 i Xrs2 incrementen l'activitat nucleasa de 3' a 5' de Mre11. Una vegada el complex MRX i Sae2 estan units als extrems tallats i no processats de la doble cadena, eliminen aproximadament 50-100 nucleòtids del final del extrem 5' del tall, per tal de produir un extrem de cadena senzilla en 3'. Aquest es recobrirà

INTRODUCCIÓ

amb la proteïna A de replicació (RPA). Aleshores aquests extrems seran el substrat per la degradació nucleolítica que es portarà a terme per dues vies redundants. Una via és dependent de l'exonucleasa Exo1, mentre que l'altra depèn del complex helicasa-topoisomerasa (Sgs1-Top3-Rmi1) amb la col·laboració de l'endonucleasa Dna2 (Mimitou i Symington, 2008; Zhu et al., 2008). RPA té múltiples funcions en els DSB: actua eliminant l'estructura secundària del ssDNA i recluta les proteïnes de control Ddc1, Ddc2, la proteïna de recombinació de lesions Rad52 (Alani et al., 1992; Lisby i Rothstein, 2004b; Zou i Elledge, 2003) i els complexos de punt de control. Aleshores, Rad52 recluta Rad51, que facilitarà la formació d'un filament de nucleoproteïna. Durant la resposta de dany al DNA, Rad52 i RPA son retingudes en els punts (*foci*) que contenen Rad51 (punts de dany al DNA), suggerint que aquestes proteïnes tenen funcions posteriors a la formació de filaments de Rad51, com pot ser l'intercanvi de cadenes i el manteniment del *checkpoint*. Amb l'ajuda de Rad54, aquest filament de cadena simple envaeix l'hèlix homòloga, que servirà com a motlle per la correcta resíntesi del fragment danyat. Aleshores es formarà un bucle de desplaçament (*D-loop*), per sintetitzar el DNA des de l'extrem 3'-OH del cromosoma trencat. Això es pot dur a terme per tres mecanismes diferents, que generen diferents productes. El primer mecanisme és la reassociació de cadenes dependents de síntesi (SDSA, *Synthesis-Dependent Strand Annealing*), de manera que es reverteix l'intercanvi de cadenes, i la cadena recent sintetitzada torna a aparellar-se amb la molècula des de la que s'ha realitzat la invasió, generant conversió gènica. El segon mecanisme es basa en la replicació induïda per tall (BIR, *Break-Induced Replication*), on la síntesi del DNA a partir del extrem 3'-OH invasor s'estén més enllà del extrem del DSB. Finalment, el tercer mecanisme es basa en l'intercanvi de cadenes, de manera que la síntesi de DNA arriba fins al segon extrem del DNA processat i té lloc la captura d'aquest, formant-se dos unions de Holliday ("*Double-Holliday junction*"). La resolució d'aquestes unions origina conversió gènica que pot estar associada a entrecreuament, dependent de la manera en que és resolt (**Figura 15**). Una vegada reparat el dany es desfà l'aparell de recombinació i es desactiva el *checkpoint* del cicle cel·lular.

Una de les primeres modificacions que té lloc molt ràpidament en resposta a DSBs és la fosforilació de la histona γ -H2A en el residu serina 129. En *S. cerevisiae* mutants en aquest residu mostren una sensibilitat significativa a agents inductors de DSB, així com en situacions on la reparació de DSB és danyada (Redon et al., 2003; Toh et al., 2006). Diversos estudis han demostrat que γ -H2A (X) promou una eficient reparació de DSB, mitjançant la regulació de la cromatina en resposta a danys al DNA, a través del reclutament de cohesines, histones modificadores i la remodelació de complexos de cromatina. També facilita l'acumulació i la

retenció de proteïnes de control i reparació en el lloc del dany (Huertas et al., 2009). Quan es produeix un DSB, els components del *checkpoint* que detecten i senyalitzen el dany, així com els factors que participen en la reparació del DNA, s'acumulen a prop de la ruptura i són visibles citològicament com *foci* nuclears quan aquestes proteïnes estan marcades amb un epítip fluorescent.

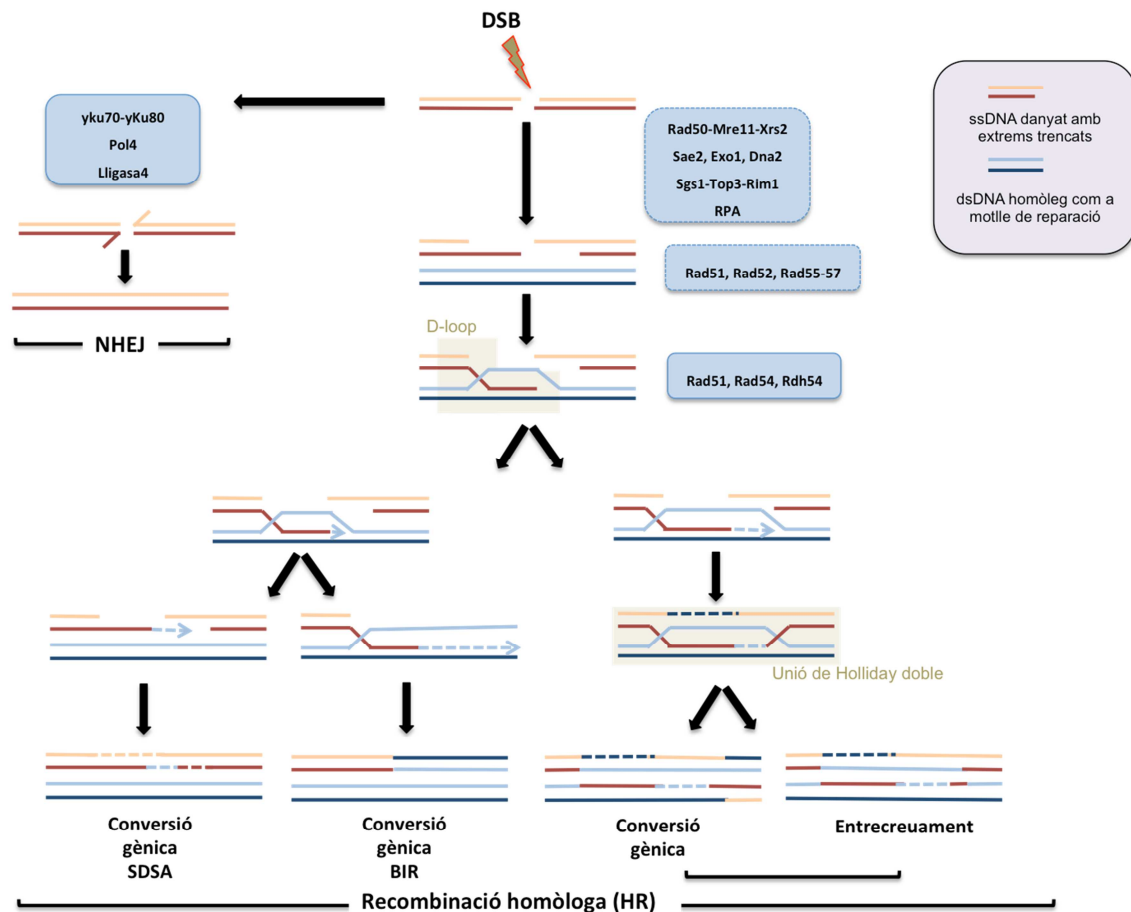


Figura 15. Via de reparació de talls a la doble cadena (DSB) en *S. cerevisiae*. Esquema dels diferents passos que es donen en la reparació de DSB, per HR i NHEJ. Es mostra la doble cadena de DNA d'una cromàtide en la que es produeix un DSB (vermell), i el de la cromàtide homòloga que és utilitzat com a motlle per la reparació (blau). Les abreviacions corresponen a: *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA), *break-induced replication* (BIR). [Adaptat de (Heyer et al., 2010)].

4.1.2 Unió d'extremes no homòlegs (NHEJ)

La NHEJ actua principalment en fase G1 (Moore i Haber, 1996; Takata et al., 1998). De manera resumida, els dos extrems de DNA tallats s'alineen i s'uneixen al complex heterodimèric yKu70-yKu80 que els hi atorga protecció en front la degradació nucleolítica (Walker et al.,

INTRODUCCIÓ

2001). Seguidament els dos extrems s'uniran per re-ligació. En aquest mecanisme de reparació es perd informació, ja que es perden els nucleòtids del punt de ruptura, causant inestabilitat genòmica (**Figura 15**).

4.2 Mecanisme de reparació post-replicativa (PRR)

Aquest mecanisme no és estrictament de reparació, sinó que es podria definir com un mecanisme de tolerància al dany al DNA. És molt important pel manteniment de la integritat del genoma i la supervivència cel·lular enfront diferents lesions que bloquegen les forquetes de replicació. Assegura que el DNA sigui sintetitzat, ja que permet la progressió de les forquetes de replicació en presència de dany sense la necessitat de reparar-lo (Andersen et al., 2008; Broomfield et al., 2001; Ulrich et al., 2005). El PRR es dur a terme mitjançant dues vies: *error-free* (lliure d'errors), també anomenada *translesion synthesis* (TLS), i *error-prone* (propens a errors), també anomenada *template switching* (TS) (**Figura 16A**). Ambdues rutes estan controlades pel complex Rad6/Rad18, on Rad6 té una activitat conjugadora de ubiquitina i Rad18 és una proteïna tipus *RING finger* amb activitat ubiquitina-lligasa, a més de tenir activitat ATPasa dependent de la unió a ssDNA. Un altre component clau és el PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), en llevat format per la proteïna Pol30, que actua com a plataforma d'ancoratge de l'activitat polimerasa que es necessita per evitar el dany. PCNA, a més, és una de les principals proteïnes que rep modificacions de ubiquitinització i SUMOilació per part dels complexos Rad6/Rad18, Ubc13/Mms2-Rad5 i Ubc9/Siz1. La seva participació en les dues vies TLS i TS, i el fet que sigui una diana de la ubiquitinització i la SUMOilació, converteix al PCNA en un component clau per comprendre els mecanismes que regulen la PRR (Andersen et al., 2008; Ulrich et al., 2005).

4.2.1 Mecanisme propens a errors

Es dur a terme mitjançant un conjunt especial de DNA polimerases, conservades al llarg de l'evolució, que a diferència de les polimerases habituals en la replicació, presenten llocs catalítics més relaxats, els quals poden adaptar-se a les lesions de la cadena motlle sense que les polimerases quedin bloquejades en el moment de catalitzar la incorporació dels nous nucleòtids. El procediment que segueix és el següent (**Figura 16B**) (Hoeijmakers et al., 2001). En presència d'una lesió, la polimerasa de síntesi de DNA habitual queda aturada just davant. Aleshores unes polimerases específiques de traducció (de baixa afinitat) agafen el control de la síntesi per saltar-ne el punt danyat, i així continuar el procés. Finalment les polimerases

habituals continuen el procés. Aquest tipus de polimerases específiques de traducció es caracteritzen per sintetitzar DNA amb una taxa de mutació molt més elevada que les polimerases de replicació habituals (Kunkel et al., 2004; Kunz et al., 2000; Prakash et al., 2005).

En *S. cerevisiae* el procés propens a errors es duu a terme mitjançant tres polimerases: pol η , Rev1 (pertanyen a la família Y de polimerases) i pol ζ (pertany a la família B). Pol η s'expressa a partir del gen *RAD30* i la pol ζ es compon de dues subunitats Rev3 i Rev7 (Waters et al., 2009). Totes elles presenten ortòlegs en humans. Aquestes polimerases específiques, igual que les habituals en la replicació, utilitzen el PCNA com a plataforma central a la qual s'uniran per tenir accés al replisoma aturat en la lesió i catalitzar la síntesi. En aquest cas el PCNA serà monoubiquitinat pel complex Rad6/Rad18 en el seu residu lisina 164 (K164) quan es produeix el bloqueig en la replicació. Aquest fet promourà l'interacció amb la família Y de polimerases, que seran capaces de replicar a través de les bases danyades.

4.2.2 Mecanisme lliure d'errors

Aquesta ruta té una gran importància en el manteniment de l'estabilitat genòmica, ja que no provoca mutacions com l'anterior. En presència d'una lesió, la polimerasa de síntesi de DNA habitual queda aturada, la lesió o forat de la cadena on s'ha aturat la polimerasa es reomple usant la cadena no danyada com a motlle, i així es restaura sense mutacions la seqüència de la cadena oposada a la lesió (**Figura 16B**) (Hoeijmakers et al., 2001).

En aquesta estratègia hi intervenen el complex Rad6/Rad18, el complex Ubc13/Mms2 i Rad5. En primer lloc el complex ubiquitina-lligasa Rad6/18 monoubiquitinitza el PCNA en el residu K164, en resposta al bloqueig de la replicació (Hoegge et al., 2002). Sobre aquest residu monoubiquitinitzat el complex Ubc13/Mms2 i Rad5 poliubiquitinitzen el PCNA (Hoegge et al., 2002). L'helicasa Rad5 sembla ser necessària pel retrocés de la forqueta de replicació i el ús de la cromàtide germana com a cadena motlle per a poder replicar el fragment de DNA afectat per la lesió (Blastyák et al., 2007; Branzei et al., 2008), el qual permet desencadenar la via.

A més a més, el PCNA també es SUMOilat durant la fase S del cicle cel·lular (Hoegge et al., 2002; Ulrich et al., 2005). Aquesta SUMOilació es realitza mitjançant Siz1, intervenint també l'helicasa Srs2, que és un inhibidor de la recombinació homòloga. Això podria suprimir la monoubiquitinització i reclutar les polimerases específiques de la via alternativa propensa a errors durant una replicació danyada (Hoegge et al., 2002).

exògens o endògens, ssDNA, llocs abàsics i modificacions en bases. Aquest mecanisme es basa en cinc passos (Boiteux i Guillet, 2004; Boiteux i Jinks-Robertson, 2013; David et al., 2007; Gros et al., 2002; Hoeijmakers et al., 2001; Mol et al., 1999): I) Una ampla varietat de N-glicosilases reconeixen les bases del DNA danyades i generen llocs apurínics o apirimidínics (AP). II) Els llocs AP són reconeguts per endonucleases. III) Les endonucleases generen extrems 3'-OH i faciliten la incorporació d'un nucleòtid (*short-patch BER*) o d'un fragment petit de nucleòtids (*long-patch BER*). IV) S'elimina l'extrem de la cadena que ha estat desplaçat durant la síntesi. V) Les lligases uneixen els extrems lliures.

Reparació per escissió de nucleòtids (NER): Aquest mecanisme actua quan hi ha distorsions en l'estructura del DNA que bloquegen la seva correcta replicació i transcripció. Aquestes lesions inclouen dímers de pirimidina ciclobutà (CPD) o fotoproductes 6-4, que són dues classes de dany induïdes per la llum ultraviolada, així com lesions causades per compostos químics. La NER es basa en sis passos (Hoeijmakers et al., 2001; McHugh et al., 2001; Prakash i Prakash, 2000; Volker et al., 2001): I) Reconeixement del dany i acoblament d'un complex multiproteic (RPA-Rad14). II) Obertura de la doble hèlix, mitjançant l'acció de les helicases. III) Incisió en els extrems de la lesió, per l'acció de l'endonucleasa que origina un fragment aproximat de 25-30 nucleòtids. IV) Eliminació del oligonucleòtid que queda entre els dos talls, per l'acció de l'exonucleasa. V) Acció d'una polimerasa que reomple el espai buit. VI) Finalment una DNA lligasa lliga el fragment recent sintetitzat.

Reparació d'aparellaments incorrectes o "Mismatch repair" (MMR): Aquest mecanisme corregeix els errors introduïts durant la replicació, concretament els aparellaments incorrectes entre bases que no mantenen l'acoblament normal establert i han evitat l'activitat correctora de les polimerases. També corregeix estructures secundàries del DNA, tals com petits bucles d'un o varis nucleòtids que poden aparèixer durant la replicació de trams repetitius de DNA (microsatèl·lits), on la polimerasa pot lliscar sobre el motlle i sintetitzar un nou DNA sobre un motlle mal alineat. Aquests errors si no es reparen poden afavorir un increment de la taxa de mutació del genoma. El MMR es basa en cinc passos (Hoeijmakers et al., 2001; Kunkel i Erie, 2005; Schofield i Hsieh, 2003): I) Reconeixement de la base mal aparellada o el bucle. II) Reconeixement de la cadena recent sintetitzada (cadena errònia). III) L'exonucleasa elimina el fragment de la cadena que conte la base errònia. IV) Es reomple el buit mitjançant l'activitat polimerasa dependent de PCNA. V) Finalment s'uneixen els extrems mitjançant l'activitat lligasa.

5. DNA MITOCONDRIAL

5.1 Aspectes generals

Les mitocòndries són orgànuls presents en el citoplasma de les cèl·lules eucariotes. Realitzen una gran varietat de funcions: producció d'ATP cel·lular a través de reaccions de conversió d'energia per fosforilació oxidativa (OXPHOS) i el cicle d'àcid tricarbòxilic (TCA), manteniment i expressió del genoma mitocondrial, biosíntesi de grups hemo, aminoàcids i nucleòtids, així com el metabolisme d'àcids grassos, estan també involucrades en la producció de ROS i apoptosi (Kaniak-Golik i Skoneczna, 2015).

Gran part de l'ATP que utilitzen les cèl·lules eucariotes prové de les vies metabòliques de les mitocòndries. En *S. cerevisiae* l'ATP es produeix a partir de dos mecanismes: quan la glucosa és present, la glucòlisi s'activa per produir ATP, mentre la gluconeogènesi i la respiració mitocondrial és reprimida. Quan les fonts de carboni fermentables no són disponibles, la cèl·lula ha de recorre a la fosforilació oxidativa, per produir ATP (Barrientos et al., 2003; Fraenkel et al., 1992; Ronne et al., 1995).

En *S. cerevisiae* hi ha aproximadament 1000 proteïnes mitocondrials (Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003), i aproximadament unes 1500 proteïnes mitocondrials en humans (Pagliarini et al., 2008). Només una petita fracció d'aquestes són codificades pels genomes mitocondrials. Bàsicament aquestes darreres són proteïnes involucrades en la síntesi d'ATP i en la fosforilació oxidativa (8 proteïnes en la mitocòndria de llevat i 13 proteïnes en la mitocòndria humana) (Merz i Westermann, 2009), incloent el genoma mitocondrial també gens per rRNAs i tRNAs, que a la seva vegada són necessaris per l'expressió dels gens mitocondrials en el seu conjunt. No obstant, la gran majoria de proteïnes mitocondrials són codificades pel genoma nuclear, sintetitzades en els ribosomes citosòlics i importades a la mitocòndria (Becker et al., 2012; Chacinska et al., 2009).

Una de les funcions clau de la mitocòndria és la síntesi i maduració de centres Fe-S (veure l'apartat 1.3 de la **Introducció**) necessaris tant per proteïnes mitocondrials com citosòliques o nuclears. Totes les proteïnes implicades en aquest procés són codificades pel genoma nuclear, encara que un defecte en aquesta funció particular de la mitocòndria, que pot resultar de defectes en la generació del potencial de membrana mitocondrial, és responsable de causar un dany nuclear (Veatch et al., 2009).

Així doncs, la informació genètica codificada en el DNA mitocondrial (mtDNA) és necessària pel correcte funcionament de les mitocòndries i també pel manteniment del genoma nuclear. Aproximadament un 15% del contingut total de DNA en *S. cerevisiae* és DNA mitocondrial, que correspon a unes 50 còpies del genoma mitocondrial (75 Kb cadascuna) en una cèl·lula haploide. Les molècules de mtDNA s'empaqueten en unes estructures anomenades nucleoides, que varien en grandària i nombre segons les condicions fisiològiques.

5.2 Classificació de les cèl·lules del llevat segons el DNA mitocondrial

En *S. cerevisiae* les cèl·lules es classifiquen en tres tipus segons l'estat del seu mtDNA. En primer lloc hi ha les cèl·lules salvatges o rho^+ (*grande*), que mantenen el mtDNA, la capacitat de respirar i tenen una mida gran en termes relatius. D'altra banda les cèl·lules *petite* són mutants incapaçs de respirar i tenen una mida petita; aquestes poden haver perdut completament el mtDNA i aleshores s'anomenen rho^0 , o només han patit delecions parcials del genoma mitocondrial, anomenant-se rho^- . Per tant, tres genotips *rho* són possibles: rho^+ (salvatge), rho^0 (pèrdua total del mtDNA) i rho^- (pèrdua parcial del mtDNA) (**Figura 17**).

Encara que les cèl·lules rho^0 i rho^- són fenotípicament idèntiques, és probable que s'originin a partir de mecanismes independents. Les *petite* sense mtDNA (rho^0) s'originen per un error en la transmissió del mtDNA, mentre que les rho^- s'originen quan es produeixen delecions parcials que es tornen a relligar. Els mutants *petite* són, en tot cas, incapaçs de realitzar la síntesi de proteïnes mitocondrials.

En *S. cerevisiae* un mecanisme indicador de l'estabilitat del mtDNA és la capacitat que tenen el organismes per respirar, ja que els mutants deficients en la respiració es poden originar per l'absència del mtDNA que compromet la fosforilació oxidativa.

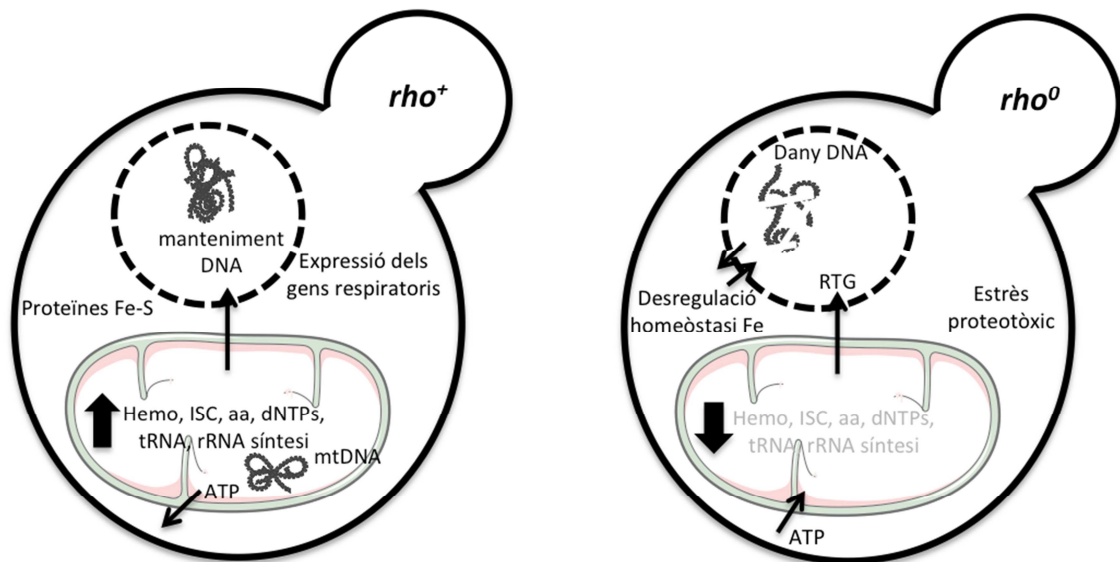


Figura 17. Representació esquemàtica d'una cèl·lula ρ^+ i d'una altra ρ^0 . Les cèl·lules ρ^+ contenen mtDNA, el cicle TCA és complert i la cadena de transport d'electrons mitocondrial funciona correctament, de manera que hi ha una correcta producció d'ATP, biosíntesi d'aminoàcids, dNTPs, centres Fe-S (ICS) i grups hemo, els quals estimulen l'expressió de gens respiratoris del nucli. Les cèl·lules ρ^0 no tenen mtDNA, presenten una disfunció en la cadena de transport d'electrons, el cicle TCA està interromput, i la síntesi de dNTPs i aminoàcids està danyada, provocant una inducció de la via retrògrada (RTG) que estimula mecanismes que permeten la supervivència de la cèl·lula. Així mateix, les cèl·lules ρ^0 tenen desregulada l'homeòstasi del ferro, causant una inestabilitat genòmica nuclear.

5.3 Manteniment del genoma mitocondrial

El manteniment del genoma mitocondrial bàsicament està controlat per un conjunt de factors codificats pel nucli, que permeten desenvolupar la replicació, recombinació i mecanismes de reparació de danys (Kaniak-Golik i Skoneczna, 2015). Aquests factors, juntament amb proteïnes d'empaquetatge, formen les molècules de mtDNA dins d'una estructura anomenada nucleoide. Les cèl·lules de llevat contenen fins a 40 nucleoides, i el nombre de molècules de mtDNA dins d'un nucleoide varia segons les condicions de creixement. Així, només es troben 1-2 molècules de mtDNA en nucleoides de cèl·lules que han crescut en condicions aeròbiques mentre que es poden trobar 20 molècules de mtDNA en nucleoides de cèl·lules cultivades en anaerobiosis. S'han identificat els components proteics dels nucleoides, els quals es poden dividir en quatre grups: I) proteïnes amb funcions conegudes en empaquetatge i síntesi de DNA, II) proteïnes que participen en el control de qualitat proteic (per exemple, xaperones i proteases), III) enzims metabòlics, i IV) components del citoesquelet (en nucleoides

d'eucariotes superiors). Aquests components tenen una gran importància en la regulació del genoma mitocondrial.

En *S. cerevisiae* hi ha varies proteïnes implicades en el manteniment del DNA mitocondrial, per exemple Abf2 i Ilv5. Una altra proteïna molt important en el manteniment del mtDNA és l'aconitasa (Aco1), la qual té una doble funció: per una part participa en la conversió del citrat a isocitrat en el cicle TCA i per l'altra és un component dels nucleoides del mtDNA que està associat a complexos DNA-proteïna en l'interior de la mitocòndria (Chen et al., 2007). L'expressió d'*ACO1* està regulada pels factors de transcripció Rtg1 i Rtg3, que són membres de la via retrògrada (RTG) i que permeten la senyalització de mitocòndria a nucli (Liu i Butow, 1999). El mutant $\Delta aco1$ és *rho*⁰, havent-se observat, que la sobreexpressió d'Aco1 pot facilitar una protecció i un major empaquetatge del mtDNA (Chen et al., 2005).

5.4 Replicació del DNA mitocondrial en *S. cerevisiae*

La replicació en el genoma mitocondrial del llevat es duu a terme principalment mitjançant la polimerasa mitocondrial Mip1, que és l'ortòleg de la polimerasa γ en humans. Les soques que no expressen el gen *MIP1* són *rho*⁰ (Foury et al., 1989; Merz i Westermann, 2009), indicant que Mip1 és la principal, sinó l'única polimerasa replicativa en mitocòndria. Un estudi "*in vitro*" ha demostrat que Mip1 es una polimerasa altament processiva (Viikov et al., 2011). Mip1 té una part N-terminal que conté dos dominis dotats amb activitat 5'-dRP (5'-fosfat desoxiribosa)-liasa i 3'-5' exonucleasa. L'activitat anterior és important per l'eliminació del motiu dRP necessari per omplir els buits mitjançant un nucleòtid durant el mecanisme de reparació BER mitocondrial, i també és important per assegurar una bona fidelitat en la replicació de la polimerasa (Kaguni et al., 2004).

Mutacions en Mip1 (o en el seu ortòleg humà pol γ) causen un fort defecte en l'activitat exonucleasa conduint a un augment en la freqüència de mutacions espontànies, i s'associen a una gran diversitat de malalties i síndromes mitocondrials, per exemple el síndrome d'Alpers, oftalmoplegia externa progressiva crònica (PEO) o síndrome d'atàxia-neuropàtica (Stumpf et al., 2010).

D'altra banda, l'augment de la freqüència de *petite* en diversos mutants *mip1* pot ser suprimit augmentant el pool de dNTPs mitocondrials o mitjançant l'exposició a àcid dihidrolipòic, que és un antioxidant que disminueix la producció de ROS (Baruffini et al., 2006). Així mateix, s'ha observat que la sobreexpressió de *RNR1* o l'inhibició de Sml1 en llevat incrementa el nombre

INTRODUCCIÓ

de còpies del mtDNA i suprimeix parcialment l'increment de colònies *petite* en mutants *mip1* (Chabes i Stillman, 2007; Lebedeva i Shadel, 2007; Stumpf et al., 2010).

La síntesi de dNTPs mitocondrials és un procés poc conegut, però alguns resultats observats en diferents línies cel·lulars suggereixen que encara que els pools de dNTPs mitocondrials i citosòlics es sintetitzen de manera independent, ràpidament es poden comunicar. Els pools de dNTPs mitocondrials es poden alimentar per dues vies separades no gaire conegudes que transporten desoxinucleòsids i/o desoxinucleòtids des del citosol a la mitocòndria: i) mitjançant un transportador de desoxinucleòtids (Dolce et al., 2001; Lambeth et al., 1997), o ii) un desoxinucleòsid és introduït, probablement pel transportador equilibrador de nucleòsids 1 (ENT1), i a continuació fosforilat per la quinasa mitocondrial (TK2) (Lai i Tarn, 2004; Rampazzo et al., 2004).

II. OBJECTIUS

OBJECTIUS

Aquest treball es centra en la implicació de la glutaredoxina Grx5 i d'Iba57, ambdues involucrades en diferents passos de la biogènesi de centres Fe-S a la mitocòndria en *S. cerevisiae*, en la inestabilitat genòmica, així com en el manteniment del DNA mitocondrial. Els objectius més específics del treball són:

1. Determinar si l'absència de Grx5 o Iba57 causa dany al DNA i inestabilitat genòmica.
2. Caracteritzar el *checkpoint* de dany al DNA en mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$.
3. Analitzar els mecanismes de reparació de dany al DNA necessaris, en absència de Grx5, pel manteniment de la viabilitat cel·lular.
4. Determinar la presència o absència de DNA mitocondrial en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$.
5. Caracteritzar possibles proteïnes implicades en el manteniment del DNA mitocondrial en les cèl·lules de llevat.

III. MATERIALS I MÈTODES

1. MICROORGANISMES UTILITZATS

1.1. Soques de *Saccharomyces cerevisiae*

Les soques de *S. cerevisiae* utilitzades es descriuen a la **Taula 3**, en la qual s'inclou el genotip i els comentaris corresponents.

Taula 3. Llista de soques de *S. cerevisiae* emprades.

Soca	Genotip	Comentaris
CML235	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 GAL2+</i>	Soca salvatge (fons genètic FY1679)
CML236	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 GAL2+</i>	Soca salvatge (fons genètic FY1679)
MML19	CML235 <i>grx5::kanMX4</i>	Disrupció de <i>GRX5</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i> (Rodríguez-Manzaneque et al., 1999)
MML160	CML236 <i>grx5::kanMX4</i> [YIplac211:: <i>URA3</i>]	(Bellí et al., 2002)
MML161	CML235 <i>grx5::kanMX4</i> [pMM25 (YIplac211:: <i>GRX5</i>):: <i>URA3</i>]	(Bellí et al., 2002)
MML163	CML235 <i>grx5::kanMX4</i> [pMM27 (YIplac211:: <i>GRX5</i> (C60S)):: <i>URA3</i>]	(Bellí et al., 2002)
MML1062	CML235 <i>cth1::natMX4 cth2::kanMX4</i>	Disrupció de <i>CTH1</i> i <i>CTH2</i> amb els mòduls <i>natMX4</i> i <i>kanMX4</i> respectivament
MML1497	CML235 <i>rev3::kanMX4</i>	Disrupció de <i>REV3</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1499	CML235 <i>rad5::kanMX4</i>	Disrupció de <i>RAD5</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1500	CML235 <i>grx5::natMX4</i>	Disrupció de <i>GRX5</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1502	CML236 <i>grx5::natMX4</i>	Disrupció de <i>GRX5</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1516	CML235 <i>rad6::kanMX4</i>	Disrupció de <i>RAD6</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>

MATERIALS I MÈTODES

MML1524	CML236 <i>rev3::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1497
MML1525	CML235 <i>rev3::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1497
MML1545	CML235 <i>rad50::kanMX4</i>	Disrupció de <i>RAD50</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1585	CML235 <i>rad52::kanMX4</i>	Disrupció de <i>RAD52</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1587	CML235 <i>rad6::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1516
MML1588	CML236 <i>rad6::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1516
MML1605	CML235 <i>rad50::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1545
MML1607	CML235 <i>rad52::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1585
MML1615	CML236 [pMM117(<i>tetO₇-GRX5</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'-SSN6</i>)]::LEU2 <i>grx5::natMX4</i>	Soca resultant de la substitució del promotor endogen de <i>GRX5</i> pel promotor <i>tetO₇</i>
MML1616	CML235 [pMM117(<i>tetO₇-GRX5</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'-SSN6</i>)]::LEU2 <i>grx5::natMX4</i>	Soca resultant de la substitució del promotor endogen de <i>GRX5</i> pel promotor <i>tetO₇</i>
MML1620	CML235 <i>sml1::CaURA3</i>	Disrupció de <i>SML1</i> amb el mòdul <i>CaURA3</i>
MML1635	CML235 <i>sml1::URA3 rad6::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1516 x MML1588
MML1648	CML235 <i>rev3::kanMX4 rad5::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1499 x MML1524
MML1652	CML235 <i>cth1::kanMX4 cth2::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Disrupció de <i>CTH1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i> i <i>CTH2</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1666	CML235 <i>sml1::URA3 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1620
MML1670	CML235 <i>rad5::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1499

MML1677	CML235 <i>ssq1::kanMX4</i>	Disrupció de <i>SSQ1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1678	CML235 <i>iba57::natMX4</i>	Disrupció d' <i>IBA57</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1694	CML235 <i>iba57::natMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1678
MML1698	CML235 <i>aco1::kanMX4</i>	Disrupció d' <i>ACO1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1700	CML235 <i>cox12::natMX4</i>	Disrupció de <i>COX12</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1701	CML235 <i>rip1::natMX4</i>	Disrupció de <i>RIP1</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1732	CML235 <i>isa1::kanMX4</i>	Disrupció d' <i>ISA1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1762	CML235 [pMM117(<i>tetO₇-GRX5</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2 <i>grx5::natMX4 cth2::kanMX4</i>	Disrupció de <i>CTH2</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i> en la soca MML1616
MML1764	CML236 [pYM-N6 (<i>ADH1p-ACO1</i>)]::kanMX4 [pCM244(<i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Soca resultant de la incorporació del promotor <i>ADH1</i> davant del gen <i>ACO1</i>
MML1774	CML235 [pYM-N6 (<i>ADH1p-ACO1</i>)]::kanMX4 [pCM244(<i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2 <i>grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1616 x MML1764
MML1798	CML236 <i>dun1::hphNTI</i>	Disrupció de <i>DUN1</i> amb el mòdul <i>hphNTI</i>
MML1800	CML235 [pMM117(<i>tetO₇-GRX5</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2 <i>grx5::natMX4 dun1::hphNTI</i>	Espora provinent del creuament MML1616 x MML1798
MML1801	CML236 <i>fet3::hphNTI</i>	Disrupció de <i>FET3</i> amb el mòdul <i>hphNTI</i>
MML1813	CML235 <i>aft1::hphNTI</i>	Disrupció de <i>AFT1</i> amb el mòdul <i>hphNTI</i>
MML1814	CML235 [pMM117(<i>tetO₇-GRX5</i>)]::URA3 <i>grx5::natMX4 cth2::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1762 x MML1615
MML1818	CML235 <i>fet3::hphNTI grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1500 x MML1801

MATERIALS I MÈTODES

MML1826	CML235 <i>dun1::hphNTI grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1500 x MML1798
MML1828	CML235 <i>dun1::hphNTI iba57::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1678 x MML1798
MML1831	CML235 <i>tel1:HIS3MX6 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1836 x MML1500
MML1834	CML236 <i>tel1:HIS3MX6 iba57::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1836 x MML1678
MML1836	CML236 <i>tel1:HIS3MX6</i>	Disrupció de <i>TEL1</i> amb el mòdul <i>HIS3MX6</i>
MML1845	CML236 [pMM1090(<i>tetO₇-RNR1</i>)>:: <i>URA3</i>	Soca resultat de la transformació de CML236 amb pMM1090
MML1846	CML235 [pMM1090(<i>tetO₇-RNR1</i>)>:: <i>URA3 grx5::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1845 x MML19
MML1848	CML236 [pMM1090(<i>tetO₇-RNR1</i>)>:: <i>URA3 iba57::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1845 x MML1678
MML1853	CML235 <i>aft1::hphNTI grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1502 x MML1813
MML1865	CML235 <i>rho</i> ⁰	Soca CML235 tractada amb bromur d'etidi (comprovada l'absència de DNA mitocondrial per RT-PCR)
MML1895	CML236 <i>dif1::natMX4</i>	Disrupció de <i>DIF1</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1896	CML235 <i>dif1::kanMX4</i>	Disrupció de <i>DIF1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1897	CML236 <i>dif1::kanMX4</i>	Disrupció de <i>DIF1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1898	CML235 <i>mec1::hphNTI dif1::kanMX4</i>	Disrupció de <i>MEC1</i> amb el mòdul <i>hphNTI</i> en la soca MML1896
MML1899	CML235 <i>dif1::natMX4 grx5::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML19 x MML1895
MML1901	CML235 <i>dif1::natMX4 grx5::kanMX4 mec1::hphNTI</i>	Disrupció de <i>MEC1</i> amb el mòdul <i>hphNTI</i> en la soca MML1899
MML1902	CML235 <i>iba57::natMX4 dif1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1678 x MML1897

MML1904	CML235 <i>iba57::natMX4 dif1::kanMX4 mec1::hphNTI</i>	Disrupció de <i>MEC1</i> amb el mòdul <i>hphNTI</i> en la soca MML1902
MML1923	CML236 [pMM1092(<i>tetO₇-NBP35</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'-SSN6</i>)]::LEU2 <i>nbp35::kanMX4</i>	Soca resultant de la substitució del promotor endogen de <i>NBP35</i> pel promotor <i>tetO₇</i>
MML1924	CML235 [pMM1092(<i>tetO₇-NBP35</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'-SSN6</i>)]::LEU2 <i>nbp35::kanMX4</i>	Soca resultant de la substitució del promotor endogen de <i>NBP35</i> pel promotor <i>tetO₇</i>
RB25	MATa <i>ADE2⁺, CAN1⁺, ura3-1, his3-11, leu2-3, 112trp1-1, RAD5⁺, rad53K227A::kanMX4</i>	Proporcionada per R. Bermejo (Instituto de Biología Funcional y Genómica, Salamanca)
MML1944	CML236 <i>rad53K227A::kanMX4</i>	Mòdul <i>rad53K227A::kanMX4</i> traslladat des de la soca RB25 a CML236
MML1945	CML235 <i>rad53K227A::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1500 x MML1944
MML1947	CML235 <i>rad53K227A::kanMX4 iba57::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1678 x MML1944
MML1983	CML235 <i>grx5::natMX4 cth2::kanMX4</i>	Disrupció de <i>CTH2</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i> en la soca MML1500
MML1985	CML236 [pMM1090(<i>tetO₇-RNR1</i>)]::URA3 <i>grx5::natMX4 cth2::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1845 x MML1983
MML1987	CML236 [pMM1090(<i>tetO₇-RNR1</i>)]::URA3 <i>aco1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1845 x MML1698
MML1990	CML236 [pMM1090(<i>tetO₇-RNR1</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'-SSN6</i>)]::LEU2 <i>iba57::natMX4</i>	Soca resultant de la transformació de MML1848 amb pCM244
MML1997	CML236 [pMM1092(<i>tetO₇-NBP35</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'-SSN6</i>)]::LEU2 <i>nbp35::kanMX4 dun1::hphNTI</i>	Espora provinent del creuament MML1798 x MML1924
MML1999	CML236 [pMM1092(<i>tetO₇-NBP35</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'-SSN6</i>)]::LEU2 <i>nbp35::kanMX4 mec1::hphNTI dif1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1901 x MML1923
MML2002	CML236 [pMM1090(<i>tetO₇-RNR1</i>)]::URA3 [pCM244(<i>tetR'-SSN6</i>)]::LEU2 <i>isa1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1990 x MML1732

MATERIALS I MÈTODES

GDP1465	MATa <i>ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 Dpb2-TAP::kanMX4 Mrc1-5FLAG::hphNTI Sld3-9MYC::LEU2 pep4::ADE2</i>	Proporcionada per G. de Piccoli (Warwik Medical School, Coventry)
MML2012	CML235 <i>Dpb2-TAP::kanMX4 Mrc1-5FLAG::hphNTI Sld3-9MYC::LEU2 pep4::ADE2</i>	Canvi de fons genètic (des de GDP1465) per successius retrocreuaments amb CML236
MML2013	CML236 <i>Dpb2-TAP::kanMX4 Mrc1 5FLAG::hphNTI Sld3-9MYC::LEU2 pep4::ADE2 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML2012 x MML1502
MML2014	CML236 <i>Dpb2-TAP::kanMX4 Mrc1 5FLAG::hphNTI Sld3-9MYC::LEU2 pep4::ADE2 iba57::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML2013 x MML1678
MML2019	CML236 <i>chk1::kanMX4</i>	Disrupció de <i>CHK1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML2030	CML235 <i>chk1::kanMX4 grx5::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML2019 x MML1500
MML2032	CML235 <i>chk1::kanMX4 iba57::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML2019 x MML1678
MML2057	CML236 [pMM1122(<i>tetO₇-RNR4</i>)>:: <i>URA3</i>	Soca resultat de la transformació de CML236 amb pMM1122
MML2059	CML235 [pMM1122(<i>tetO₇-RNR4</i>)>:: <i>URA3 iba57::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML2057 x MML1678
MML2064	CML235 <i>chk1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML2019 x CML235

1.2. Soques d'*Escherichia coli*

Per conservar i amplificar els plàsmids es va utilitzar la soca *E. coli* DH5 α [*endA1, hsdR17 (r_K-m_K-), supE44, thi-1, F-, l-, recA1, gyrA96, relA1, Δ (*lacZY-argF*), ϕ 80 α (*lacZ Δ M15*)*] (Hanahan et al., 1983).

2. PLÀSMIDS

Els plàsmids utilitzats en aquest treball i els comentaris respectius es detallen a la **Taula 4**.

Taula 4. Plàsmids utilitzats en aquest treball.

Plàsmid	Plàsmid d'origen	Comentaris
pAG25		Conté un mòdul <i>natMX4</i> per deleccionar gens (Goldstein i McCusker, 1999)
pAG60		Conté un mòdul <i>URA3MX4</i> per deleccionar gens (Goldstein i McCusker, 1999)
pFA6a-HIS3MX6		Conté un mòdul <i>HIS3MX6</i> per deleccionar gens (Janke et al., 2004)
pFA6a-kanMX4		Conté un mòdul <i>kanMX4</i> per deleccionar gens (Wach et al., 1994)
pFA6a-hphNTI		Conté un mòdul <i>hphNTI</i> per deleccionar gens (Janke et al., 2004)
pYM-N6		Plàsmid integratiu, marcador <i>kanMX4</i> , conté el promotor <i>ADH1</i> (Janke et al., 2004)
YIplac211		Plàsmid integratiu, marcador <i>URA3</i> (Gietz i Sugino, 1988)
pCM244		Plàsmid integratiu, marcador <i>LEU2</i> , conté el mòdul <i>tetR'-SSN6</i> (Bellí et al., 1998b)
pGP564		Vector genoteca (Thermo Scientific), plàsmid multicòpia, marcador <i>LEU2</i> (Jones et al., 2008).
pWJ1213		Proporcionat per R. Wellinger. Font original R. Rothstein, plàsmid centromèric que expressa Rad52-YFP per detectar <i>foci</i> associats a Rad52, marcador <i>HIS3</i> (Feng et al., 2007).
pYX122		Proporcionat per M. A. de la Torre, plàsmid centromèric que expressa GFP (Green Fluorescent Protein) dirigida a les mitocòndries, marcador <i>HIS3</i> (Westermann i Neupert, 2000)
pMM25	YIplac211	Plàsmid integratiu que conté <i>GRX5</i> amb el seu propi promotor clonat en YIplac211 entre els llocs <i>HindIII-PstI</i> (Bellí et al., 2002)
pMM27	YIplac211	Plàsmid integratiu que conté <i>GRX5</i> amb un canvi d'aminoàcid Cys>Ser (C60S) clonat en YIplac211 entre els llocs <i>HindIII-PstI</i> (Bellí et al., 2002)
pMM117	pMM110	Plàsmid integratiu que conté <i>GRX5</i> clonat en pMM110 entre els llocs <i>BamHI-HindIII</i> (Rodríguez-Manzanegue et al., 1999)

MATERIALS I MÈTODES

pMM110		Plàsmid integratiu amb el marcador <i>CaURA3</i> , per substituir el promotor endogen pel promotor <i>tetO₇</i> (Bellí et al., 1998a)
pMM1090	pMM110	Plàsmid integratiu que conté <i>RNR1</i> clonat en pMM110 entre els llocs <i>BamHI-PstI</i> .
pMM1092	pMM110	Plàsmid integratiu que conté <i>NBP35</i> clonat en pMM110 entre els llocs <i>BamHI-NotI</i> .
pMM1122	pMM110	Plàsmid integratiu que conté <i>RNR4</i> clonat en pMM110 entre els llocs <i>BamHI-PstI</i> .

3. MEDIS DE CULTIU

Els medis de cultiu utilitzats pel creixement de *S. cerevisiae* es detallen a continuació. Quan era necessari s'afegava agar al 2% per obtenir medis de cultiu sòlids.

- **YPD:** glucosa 2%; peptona 2%; extracte de llevat 1%. Per la selecció de les soques portadores dels mòduls *kanMX4*, *natMX4* i *hphNTI* s'afegia al medi genètica (200 µg/ml), nourseotricina (200 µg/ml) o higromicina B (300 µg/ml) respectivament.
- **YPGly:** glicerol 3%; peptona 2%; extracte de llevat 2%.
- **YPGal:** galactosa 2%; peptona 2%; extracte de llevat 2%.
- **SC** (Sherman et al., 2002): base nitrogenada per llevats sense aminoàcids ("YNB w/o aa", Difco™) 0,67%; glucosa 2%; Drop-out sintètic sense histidina, leucina, triptòfan, uracil i adenina (Sigma) 0,2%. El Drop-out és la combinació en sec de bases nitrogenades, aminoàcids i vitamines. Per la selecció de plàsmids s'afegava els cinc aminoàcids essencials absents en el Drop-out excepte aquell corresponent al gen marcador del plàsmid.
- **SCGly:** base nitrogenada per llevats sense aminoàcids ("YNB w/o aa", Difco™) 0,67%; glicerol 3%; Drop-out sintètic sense histidina, leucina, triptòfan, uracil i adenina (Sigma) 0,2%. Per la selecció de plàsmids s'afegava els cinc aminoàcids essencials (com en el cas del SC) absents en el Drop-out excepte aquell corresponent al gen marcador del plàsmid.

- **SC-Arg:** medi SC tal com s'ha descrit anteriorment, però utilitzant Drop-out sense arginina.
- **Medi d' esporulació:** acetat de potassi 1%; extracte de llevat 0,1%; glucosa 0,05%.

Pel cultiu d'*E. coli* es va emprar el següent medi:

- **LB:** triptona 1%; NaCl 1%; extracte de llevat 0,5%. El pH s'ajustava a 7,5 amb NaOH 1 M. Per la selecció de transformants amb els plàsmids portadors del gen de resistència a ampicil·lina s'afegia a aquest medi l'antibiòtic a una concentració final de 50 µg/ml. En el cas de transformants amb plàsmids portadors del gen de resistència a kanamicina s'afegeix aquesta a una concentració final de 50 µg/ml.

4. CULTIU DE MICROORGANISMES

Les cèl·lules de *S. cerevisiae* s'incubaven a 30°C, mentre que les cèl·lules d'*E. coli* s'incubaven a 37°C. Tots els cultius líquids s'agitaven a 180 r.p.m. La mesura del creixement dels cultius es realitzava mitjançant la lectura de la densitat òptica a 600 nm (DO₆₀₀).

En diversos experiments s'afegien agents als medis de cultiu a les concentracions indicades en cada cas:

- **Metil-metà-sulfonat (MMS) (Sigma):** Es preparava una concentració patró del 1% en aigua estèril.
- **Hidroxiurea (Sigma):** Es pesava, dissolia en aigua estèril i filtrava per deixar-ho a una concentració patró de 2 M.
- **L-canavanina (Sigma):** S'afegia directament al medi SC-Arg per tal d'obtenir una concentració final de 60 µg/ml.
- **Àcid sulfònic de batofenantrolina (BPS) (Fluka):** Es preparava una solució patró a 50 mM en aigua estèril.
- **Z-Leu-Leu-Leu-al (MG-132) (Sigma):** Es preparava una solució patró dissolta amb dimetilsulfòxid (DMSO, de Sigma) a 5 mM.
- **Fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma):** Es preparava una solució patró dissolta amb dimetilsulfòxid (DMSO, de Sigma) a 100 mM.

- **Factor alfa (Genscript):** Es preparava una concentració patró del 5 mg/ml en aigua estèril.
- **Doxiciclina (Sigma):** Es preparava una concentració patró de 5 mg/ml en etanol (50%).
- **ter-butil hidroperoxid (t-BOOH) (Sigma):** Es preparava una solució patró a 1 M en aigua estèril.

Quan es prenen mostres de cultius líquids sotmesos o no a tractaments a diferents temps es feien dilucions sempre que fos necessari, amb el mateix tipus de medi, de tal manera que la concentració cel·lular en cap dels casos fos superior a 4×10^7 cèl·lules/ml, el qual implicava que els cultius es mantenien en fase exponencial.

4.1. Criopreservació de cèl·lules a -80°C

Per conservar i mantenir les cèl·lules per futurs treballs, les soques de *S. cerevisiae* es congelaven en el mateix medi de creixement amb un 15% de glicerol, mentre que les cèl·lules d'*E. coli* es congelaven amb un 20% de glicerol. En ambdós casos es guardaven a -80°C.

5. ESTUDIS FENOTÍPICS DEL CREIXEMENT

5.1. Anàlisi del creixement microbià en medi sòlid

Per observar els fenotips de creixement, es realitzaven assajos de sensibilitat amb diferents agents genotòxics. Les cèl·lules es creixien exponencialment en medi líquid fins a una concentració al voltant de $1,5$ a 2×10^7 cèl·lules/ml, equivalent a una DO_{600} de 0,4 a 0,6 unitats. Seguidament, es plaquejaven mitjançant dilucions seriades (1:4) sobre medi sòlid. Les plaques s'incubaven durant 2 o 3 dies (excepte quan s'indiqui un altre temps) a una temperatura de 30°C. En el cas de sensibilitat a llum UV, les plaques van ser irradiades a les diferents dosis indicades en cada cas amb l'aparell "Stratalinker 1800" (Stratagen) i s'incubaven a 30°C.

5.2. Anàlisi del creixement microbià en medi líquid

Els diferents cultius exponencials es diluïen fins a una DO_{600} de 0,1 en una placa de 24 pouets ("Multiwell™", de Becton Dickinson Labware). En cada pou, el cultiu es tractava amb diferents agents, afegint la concentració adequada de cada compost a provar. La placa s'incubava en

l'aparell "PowerWave XS" (BioTek Instruments), que recollia automàticament les dades de la DO_{600} de cada un dels pouets amb periodicitat d'una hora al llarg de com a mínim 24 hores. Durant la incubació la placa es mantenia en agitació constant a 30°C.

Posteriorment les dades s'analitzaven en una fulla de càlcul (Excel), de manera que a la DO_{600} de cada cultiu i a cada hora se li restava el valor de DO_{600} del medi líquid no inoculat utilitzat (blanc). Aleshores, es calculava la pendent relativa del creixement de les soques, en la seva fase exponencial, respecte la soca salvatge.

6. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

6.1. Extracció de DNA genòmic de *S. cerevisiae*

Solucions necessàries per l'extracció:

- **TNST:** Tritó X-100 2%; SDS 1%; NaCl 0,1 M; EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.
- **FC:** fenol/cloroform/alcohol isoamílic 25:24:1 amb 8-hidroxiquinolina 0,1% i saturat amb TE.
- **TE:** Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0.
- **NaOAc:** acetat de sodi 3 M, pH 8.

Procediment d'extracció:

1. S'inoculava una colònia fresca de la soca corresponent de *S. cerevisiae* en 10 ml de medi YDP i es cultivava durant 16 hores.
2. El cultiu es centrifugava a 3.000 x g durant 3 min i les cèl·lules es resuspenien i rentaven en 1 ml d'aigua estèril per passar-les a un nou vial.
3. Les cèl·lules es resuspenien en 200 µl de TNST i 200 µl de FC, i s'afegia 200 µl de perles de vidre (400-600 µm de diàmetre, de Sigma).
4. La barreja s'agitava en el vòrtex a velocitat màxima durant 3 min, es deixava reposar en gel 1 min i es tornava a agitar 3 min més.
5. Posteriorment, s'afegia 200 µl de TE barrejant per inversió. La barreja resultant es centrifugava a 13.000 x g durant 5 min.

6. S'agafava el sobrenedant i es passava a un vial nou, al qual s'hi afegia 1 ml d'etanol 100%. Després de barrejar-ho per inversió, la barreja es centrifugava a 13.200 x g durant 5 min.
7. S'afegien 400 µl de TE al precipitat juntament amb 3 µl de RNasa (10 mg/ml) i s'incubava a 37°C durant 5 min.
8. Després, s'afegien 50 µl de NaOAc i 500 µl de FC. Aquesta barreja s'agitava en el vòrtex a velocitat màxima durant 1 min.
9. Seguidament, es centrifugava a 13.200 x g durant 5 min i s'eliminava el sobrenedant.
10. Es rentava el precipitat amb 1 ml d'etanol al 70% i es centrifugava novament a 13.200 x g durant 1 min.
11. Es retirava el sobrenedant i es centrifugava una altra vegada a la mateixa velocitat. El sobrenedant restant es retirava completament i el precipitat es deixava assecar en l'aparell "Concentrator Plus" (Eppendorf) durant 5 min, o bé a temperatura ambient durant aproximadament uns 10 min.
12. Es resuspenia el precipitat en 50 µl d'aigua Milli-Q i es valorava la concentració final obtinguda en l'equip "Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer". També es valorava la seva qualitat (absència de degradació) per electroforesi en gel d'agarosa (Serva), visualitzant les bandes amb "SYBR™ Safe" (Fisher), i comparant la intensitat de les bandes corresponents amb la intensitat de bandes patró de quantitat coneguda.

6.2. Tècniques de DNA recombinant

6.2.1. Amplificació i clonació de gens

Per la clonació de gens de *S. cerevisiae*, s'amplificaven aquests (amb els oligonucleòtids adequats per cada cas) mitjançant PCR a partir de DNA genòmic de la soca d'interès de *S. cerevisiae* i es duien a terme les digestions, tant de l'insert com del vector, amb els enzims respectius d'acord amb els llocs de restricció seleccionats. Els enzims de restricció eren de Roche o Takara i s'empraven seguint les indicacions del fabricant. Els productes de PCR i els fragments de DNA obtinguts de les digestions es purificaven utilitzant el sistema "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche), i eren valorats mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. Per determinar la mida aproximada dels fragments de DNA s'usava com estàndard "1 Kb DNA Ladder" (Invitrogen). En les lligacions entre insert i vector s'utilitzava l'enzim "T4 DNA ligasa" (Takara), seguint les instruccions del fabricant. Un cop realitzades les lligacions, es

transformava el producte en *E. coli*, s'extreia el DNA mitjançant els mètodes "jet-prep" o "miniprep" (apartats 6.2.4.1 i 6.2.4.2 de **Materials i Mètodes**) i es valorava en gel d'agarosa per comprovar que la mida corresponia a la suma del vector més l'insert. Els inserts dels clons que tenien una mida correcta es seqüenciaven al Servei de Proteòmica i Genòmica de la Universitat de Lleida per comprovar l'absència de mutacions addicionals. Finalment, els plàsmids recombinants escollits es transformaven a les soques de llevat d'interès.

6.2.2. Substitució de promotors per recombinació homòloga

Per tal de substituir el promotor propi d'un gen pel promotor *tetO₇* o *tetO₂*, es va seguir la metodologia descrita en Bellí et al. (1998a). Bàsicament, el mòdul portador del transactivador *tTA*, el marcador *kanMX4* i el promotor *tetO₂* o *tetO₇* s'amplificava per PCR a partir dels plàsmids integratius pCM224 o pCM225 respectivament, de tal manera que els fragments de DNA resultants tinguessin en els dos extrems seqüències d'uns 45-50 pb homòlogues de zones de la regió promotora a substituir. Aquests fragments de DNA es purificaven i es valoraven com s'indica en l'apartat 6.2.1 de **Materials i Mètodes**. Els fragments de DNA es transformaven (veure apartat 6.2.6 de **Materials i Mètodes**) en la soca d'interès en cada cas. En aquesta soca també s'integrava el plàsmid pCM244 (*tetR'-SSN6*) linealitzat amb *EcoRV*, que expressa el repressor *tetR'-SSN6* del promotor *tetO* en les cèl·lules de llevat. La capacitat de regular l'expressió del gen mitjançant doxiciclina s'analitzava per Northern blot (apartat 6.5 de **Materials i Mètodes**).

6.2.3. Marcatge amb els epítops YFP i GFP

Per determinar la presència de la proteïna Rad52 en *foci* associats a trencaments en el DNA es va utilitzar el plàsmid centromèric pWJ1213, que codifica per Rad52, amb l'expressió controlada sota el seu propi promotor, fusionat amb YFP (Yellow Fluorescent Protein) (Feng et al., 2007).

Pel marcatge mitocondrial es va utilitzar el plàsmid centromèric pYX122 (Westermann i Neupert, 2000), que permet un marcatge de la matriu mitocondrial amb GFP (Green Fluorescent Protein).

Es va extreure el DNA d'aquests plàsmids utilitzant la tècnica de "miniprep" (veure apartat 6.2.4.1 de **Materials i Mètodes**) i es va transformar en les soques de *S. cerevisiae* corresponents.

6.2.4. Purificació de plàsmids a partir de cultius d'*E. coli*

6.2.4.1. Mètode de la "MINIPREP"

Per la purificació de plàsmids amplificats en *E. coli* es cultivaven les cèl·lules en medi LB amb ampicil·lina a 37°C durant 16 hores, i s'utilitzava el sistema "NucleoSpin® Plasmid QuickPure" (Macherey-Nagel GmbH) segons les indicacions del fabricant. Quan es necessitava un grau superior de puresa del DNA plasmídic per la posterior seqüenciació s'utilitzava el sistema "QIAprep® Spin Miniprep kit" (Qiagen).

6.2.4.2. Mètode ràpid de la "JETPREP"

Cada colònia transformant a analitzar s'inoculava en un vial amb 500 µl de medi LB líquid amb ampicil·lina i es cultivava a 37°C durant 16 hores. Les cèl·lules es recollien per centrifugació (17.700 x g durant 1 min) i s'eliminava el sobrenedant. S'afegia 50 µl de solució BT (Tritó X-100 2%, pH 12,4 amb NaOH) a les cèl·lules sedimentades, sense resuspendre, i 50 µl més de fenol/cloroform. Aquesta barreja s'agitava durant 30 segons. Les mostres es centrifugaven a 20.780 x g durant 5 min i 5 µl del sobrenedant es carregaven en un gel d'agarosa al 0,8%, afegint 10 µg/ml de RNasa al tampó de càrrega. D'aquesta manera es podia comprovar la mida del plàsmids després de la corresponent electroforesi.

6.2.5. Transformació d'*E. coli*

L'obtenció de cèl·lules competents i la transformació de cultius d'*E. coli* mitjançant el mètode del clorur de calci es feia d'acord amb els protocols estàndards de laboratori (Ausubel et al., 1994). Durant el protocol de transformació, les cèl·lules competents es sotmetien a un xoc tèrmic a 42°C durant 2 minuts i s'incubaven a 37°C durant 1 hora, temps necessari per l'expressió fenotípica de la resistència a l'antibiòtic. Els transformants es seleccionaven en medi LB més ampicil·lina.

6.2.6. Transformació de *S. cerevisiae*

En la transformació de *S. cerevisiae* amb plàsmids d'expressió o fragments lineals de DNA es seguia el mètode ràpid amb acetat de liti (AcLi) (Gietz i Sugino, 1988), plaquejant les cèl·lules en medi selectiu (segons l'auxotròfia corresponent o altre marcador de selecció).

Per dur a terme la transformació es partia de 10 ml d'un cultiu de llevat en fase exponencial de creixement (aproximadament a una DO₆₀₀ de 0,3 unitats). Les cèl·lules es recollien per centrifugació a 1.960 x g durant 4 min a temperatura ambient, es rentaven amb aigua estèril, i

es centrifugaven de nou en les mateixes condicions. El sediment es resuspenia en 1000 µl d'una solució d'AcLi 0,1 M i TE 1 X (Tris 10 mM, pH 8 i EDTA 1 mM, pH 8) i es centrifugava a 12.290 x g durant 5 segons. A continuació, les cèl·lules es resuspenien amb 50 µl de la mateixa solució, a la qual s'afegia 5 µl de DNA de cadena simple (ssDNA) a 10 mg/ml (Roche), 300 µl de solució de polietilenglicol (PEG) [TE 1 X, pH 8; AcLi 0,1 M; i PEG 40%] i el DNA a transformar (600 ng per plàsmids integratius i 50 ng per plàsmids episomals o centromèrics). Aquesta suspensió s'homogeneïtzava completament i s'incubava en agitació a 30°C durant 30 min. Tot seguit, es realitzava un xoc tèrmic a 42°C durant 15 min. Una vegada finalitzat el temps de xoc tèrmic, les cèl·lules es centrifugaven a 17.700 x g durant 5 segons i s'eliminava el sobrenedant. Quan la selecció dels transformants era per auxotrofia, les cèl·lules es resuspenien en aigua estèril i eren plaquejades. Si la selecció dels transformants era per resistència a un antibiòtic, aquestes cèl·lules s'incubaven en 4 ml de YPD durant 4 hores a 30°C, abans de ser plaquejades. Les plaques de selecció s'incubaven a 30°C durant 48 hores i després es reaïllaven les colònies en medi de selecció. La incorporació del mòdul de resistència a l'antibiòtic al lloc apropiat del genoma es comprovava per PCR, segons l'estratègia descrita en Wach et al. (1994).

6.3. Construcció de mutants nuls simples i múltiples de *S. cerevisiae*

Els mutants nuls per un únic gen es van obtenir seguint el mètode de substitució per homologia de seqüències flanquejants curtes amb el mòdul *kanMX4* (resistència a geneticina) (Wach et al., 1994), *hphNTI* (resistència a higromicina B) (Janke et al., 2004) i *natMX4* (resistència a nourseotricina) (Goldstein i McCusker, 1999), els quals eren amplificats prèviament mitjançant PCR, segons l'estratègia descrita en Wach et al. (1994). En alguns casos les mutacions eren transferides d'un fons genètic a un altre amplificant per PCR el mòdul de delecció/selecció més uns 300 pb de cada zona flanquejant 5' i 3' UTR del gen disruptat, i transformant directament la soca receptora amb el producte amplificat (apartat 6.2.6 de **Materials i Mètodes**).

Els mutants múltiples es van obtenir creuant les soques parentals d'interès, induint l' esporulació de la soca diploide, dissecionant les tètades i analitzant les espores obtingudes per seleccionar la combinació de mutacions d'interès, seguint els protocols descrits en Sherman et al. (2002).

6.4. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant RT-PCR

Es va seguir el protocol descrit en Taylor et al. (2005) que explicarem en més detall a continuació.

6.4.1 Obtenció de mostres

La soca d'interès s'inoculava en el cultiu líquid i s'incubava en agitació durant 16 hores a 30°C. A partir d'aquest cultiu de nit, es reinoculava en medi fresc per obtenir cultius exponencials fins a una concentració de $1-2 \times 10^7$ cèl·lules/ml. Es recollia un mínim de 3×10^8 cèl·lules per mostra, equivalent a unes 10 unitats de DO_{600} . Després de recollir les cèl·lules, es centrifugaven a $3.000 \times g$ durant 5 min i es rentaven amb aigua Milli-Q. A continuació, es congelaven amb nitrogen líquid i es conservaven a -80°C o bé es continuava immediatament amb l'extracció del DNA genòmic segons l'apartat 6.1 de **Materials i Mètodes**. Un cop extret el DNA es valorava la quantitat en l'equip "Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer", i la seva qualitat (absència de degradació) per electroforesi en gel d'agarosa (Serva).

6.4.2 Determinació del nombre de còpies de DNA mitocondrial mitjançant "Multiplex RT-PCR"

Per tal de determinar la quantitat de DNA mitocondrial i DNA nuclear es va realitzar una PCR a temps real amb una reacció dúplex. D'aquesta manera es van poder analitzar les còpies de DNA mitocondrial presents en una mostra, relatives al nombre de còpies del DNA nuclear. Es va utilitzar el gen *COX2* com a reporter del DNA mitocondrial i el gen *ACT1* com a reporter del DNA nuclear. Es va realitzar una reacció dúplex, amplificant els dos gens alhora, mitjançant les sondes "Taqman® Gene Expression Assay" (Applied Biosystems). El gen *COX2* estava marcat amb el fluoròfor FAM ($\lambda_{m\grave{a}x}$. 518nm) i el gen *ACT1* amb VIC ($\lambda_{m\grave{a}x}$. 554nm), podent ser detectats d'aquesta manera en diferents canals de fluorescència.

A partir del DNA genòmic extret i quantificat (apartat 6.4.1 de **Materials i Mètodes**) es van preparar les reaccions de la PCR per triplicat amb un volum final en cada una de 20 μ l. La barreja per la PCR consistia en 4 μ l de DNA (amb una quantitat d'1 ng), 10 μ l de la "Master mix Taqman Universal PCR kit" (Applied Biosystems), 1 μ l de cada sonda i 4 μ l d'aigua Milli-Q. Les condicions per la reacció d'amplificació eren: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C; seguit de 40 cicles de 15 segons a 95°C i 1 min a 60°C. La reacció es realitzava en una placa de 96 pouets "PCR plates 96 well iCyclerIQ™" (Bio-Rad) en l'aparell "CFX96™ Real-Time System" (Bio-Rad). Per analitzar les dades es va utilitzar el software "CFX manager™" (Bio-Rad). Per tal de realitzar les

dues reaccions d'amplificació conjuntes i evitar resultats artificials, es realitzaven corbes estàndards amb diferents quantitats de DNA i es comprovava la linealitat de la reacció i l'eficiència de la mateixa.

6.4.3 Anàlisi de dades

Per l'anàlisi de les dades obtingudes després de la reacció dúplex es va seguir el procediment tal i com s'indica en Taylor et al. (2005).

Per determinar el nombre de còpies de DNA mitocondrial, es realitzava una mitjana dels valors C_T (Threshold cycles) de les tres rèpliques de cada sonda (*COX2* i *ACT1*), obtenint un valor mitjà C_T (*COX2*) i C_T (*ACT1*). Seguidament es determinava la diferència (ΔC_T) entre les mitjanes [C_T (*COX2*) - C_T (*ACT1*)]. Posteriorment, es calculava el NRC (nombre relatiu de còpies de DNA mitocondrial) de cada soca, aplicant l'equació $2^{\Delta C_T}$. Finalment, per determinar el NRC de cada soca, es relativitzava respecte la soca salvatge, seguint la següent fórmula: [NRC de la soca desitjada/NRC de la soca salvatge], i atorgant-li un valor unitat a la soca salvatge.

6.5. Anàlisi de l'expressió gènica per Northern blot

6.5.1. Obtenció de mostres

S'inoculava la soca d'interès en el cultiu líquid i s'incubava en agitació a 30°C durant 16 hores. A partir d'aquests cultius de nit, es reinoculava en medi fresc per obtenir cultius exponencials fins a una concentració de $1-2 \times 10^7$ cèl·lules/ml. En algun cas era necessària l'addició de compostos a assajar al medi de cultiu. Es recollia un mínim de 3×10^8 cèl·lules per mostra, equivalent a unes 10 unitats de DO_{600} . Just després de recollir les cèl·lules, es centrifugaven a $3.000 \times g$ durant 5 min i es rentaven amb aigua Milli-Q a 4°C. A continuació, es congelaven amb nitrogen líquid i es conservaven a -80°C, o bé es continuava immediatament amb l'extracció del RNA.

Tot el material d'electroforesi i de transferència es rentava amb aigua i abundant sabó, i després s'esbandia amb aigua Milli-Q lliure de RNases. Tant per fer els rentats dels cultius com per preparar els tampons utilitzats al llarg del protocol o per realitzar la transferència del RNA a la membrana de niló, també s'utilitzava aigua Milli-Q lliure de RNases. Totes les mostres i el material es manipulaven amb guants.

6.5.2. Extracció de RNA total

Solucions i materials:

- **Anti-Digoxigenin-ALPasa Fab fragments (Anti-DIG, Roche):** Fragments Fab d'anticòs policlonal anti-Dig conjugats amb fosfatasa alcalina (ALPasa).
- **B1:** Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; NaCl 125 mM. Esterilitzat a l'autoclau.
- **B2:** Blocking Reagent 0,5% (Roche); en tampó B1. Esterilitzat a l'autoclau.
- **B3:** dietanolamina 1% (Applied Biosystems); ajustat amb HCl fins a pH 10.
- **CDP-Star™ (Roche):** substrat de la ALPasa, la desfosforilació del qual dóna lloc a la formació d'un compost quimioluminiscent.
- **FC:** fenol/cloroform/alcohol isoamílic 25:24:1 amb 0,1% 8-hidroxiquinolina i saturat de TE.
- **Fenol àcid (Invitrogen):** fenol:aigua 3,75:1.
- **MagicHyb:** Na₂HPO₄ 250 mM, pH 7,2; EDTA 1 mM, pH 8,0; SDS 20%; Blocking Reagent 0,5%. Es conserva a 4°C.
- **Membrana de Niló carregada positivament (Roche).**
- **NaOAc:** acetat de sodi 3 M, pH 5,2. Esterilitzat a l'autoclau.
- **NaOH 0,1 M i Tris-HCl 0,1 M:** per transferir el RNA a la membrana de niló.
- **10 x NBC:** àcid bòric 0,5 M; citrat de sodi 10 mM; NaOH 50 mM; pH 7,5. Després de preparar aquesta solució s'afegia dietil pirocarbonat 1%, es barrejava i s'esterilitzava a l'autoclau.
- **Tampó de càrrega 10 x:** Ficoll 15%; EDTA disòdic 0,1 M, pH 8,0; blau de bromofenol 0,25%.
- **TE:** Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0. Esterilitzat a l'autoclau.
- **TES:** Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0; SDS 0,5%. Esterilitzat a l'autoclau.
- **WB:** Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7,2; EDTA 1mM, pH 8,0; SDS 1%.

A continuació es detalla el protocol següent:

1. Es resuspenien les cèl·lules en 25 µl de TE i 25 µl de fenol àcid.
2. S'incubava la barreja a 65°C durant 2 min i posteriorment s'afegava un volum igual de perles de vidre.
3. Les cèl·lules es trencaven agitant la barreja en el vòrtex a velocitat màxima durant 7 min.

4. S'afegien 600 µl de TES i 600 µl de fenol àcid, i després s'agitava en el vòrtex a velocitat màxima durant 30 segons més.
5. Novament s'incubava la barreja a 65°C durant 15 min i es feia una última agitació en el vòrtex a velocitat màxima durant 30 segons. Seguidament la mostra es mantenia a 0°C durant 5 min.
6. Es centrifugava la barreja a 13.200 x g durant 5 min a 4°C, després es recollia tot el sobrenedant, es col·locava en un tub nou i s'hi afegia 500 µl de FC.
7. S'agitava en el vòrtex a velocitat màxima durant 30 segons i després es centrifugava a 13.200 x g durant 5 min a 4°C.
8. S'agafava tot el sobrenedant, es dipositava en un tub nou i s'afegien 40 µl de NaOAc i 1 ml d'etanol 100%.
9. Per la precipitació del RNA, s'incubava la mescla a -20°C durant un temps aproximat de 1-2 hores. Aleshores es centrifugava a 13.200 x g a 4°C durant 5 min.
10. Es rentava el precipitat amb etanol 70%. Es retirava tot el sobrenedant i es deixava assecar a l'aparell "Concentrator Plus" (Eppendorf) durant 3 o 4 min, o bé a temperatura ambient durant uns 10 min, fins que el precipitat estigués sec.
11. Es resuspenia el RNA en 50 µl d'aigua Milli-Q lliure de RNases. El RNA total extret es conservava a -20°C o es processava directament per electroforesi.
12. Per la valoració del RNA total extret es feia una dilució 1:100 en aigua Milli-Q lliure de RNases i es mesurava la densitat òptica d'aquesta dilució a 260 nm (DO_{260}). La concentració es calculava tenint en compte que una unitat de DO_{260} correspon aproximadament a 40 µg/µl de RNA. Si el rati [DO_{260}/DO_{280}] s'aproximava a 2 indicava que el RNA obtingut era pur. La concentració final s'ajustava entre 5 i 10 µg/µl.

6.5.3. Síntesi de sondes de DNA marcades amb Digoxigenin-dUDP

La síntesi de sondes per la detecció de mRNA es duia a terme utilitzant el producte "DIG DNA Labeling Mix, 10 x concentration" (Roche), seguint les indicacions del fabricant. Com a motlle per a la síntesi de la sonda s'utilitzava un fragment del gen d'interès (d'entre 300 i 500 pb), amplificant per PCR a partir de DNA genòmic amb els oligonucleòtids adequats en cada cas. La qualitat del fragment de DNA genòmic amplificat per PCR s'observava per electroforesi en gel d'agarosa al 0,8%. La qualitat de la sonda es verificava mitjançant el mètode "Dot-blot". Aquesta tècnica consistia en la fixació de dilucions seriades 1:10 de la sonda a analitzar a la membrana de niló mitjançant l'equip "Stratalinker 1.800" (Stratagen) irradiant amb llum ultraviolada (12.000 µJ/cm²). Després, es procedia a la seva detecció per quimioluminescència

(apartat 6.5.7 de **Materials i Mètodes**), comparant la intensitat de la marca resultant amb la d'una altra sonda prèviament utilitzada, per veure'n la qualitat relativa i conseqüentment determinar la quantitat a emprar en les posteriors hibridacions.

6.5.4. Electroforesi en un gel de formaldehid-agarosa

1. Es barrejaven 0,8 g d'agarosa en 80 ml d'1 x NBC i s'escalfava fins que l'agarosa quedava completament dissolta. Es deixava refredar fins a 65°C i s'afegia 2 ml de formaldehid al 37% barrejant bé.
2. La solució d'agarosa es posava a la cubeta d'electroforesi amb els pintes per formar els pous i es deixava solidificar durant 45 min aproximadament. Com a tampó d'electroforesi s'utilitzava el 1 x NBC.
3. S'afegia de 5 a 10 µg de RNA total en un vial nou. Després s'afegien 2 µl de 10 x NBC, 3 µl de formaldehid al 37% i 10 µl de formamida.
4. S'incubava aquesta mescla a 65°C durant 15 min i aleshores s'afegia 2 µl de tampó de càrrega 10 x juntament amb 0,5 µl de solució de bromur d'etidi (2 mg/ml).
5. Les mostres es carregaven al gel i l'electroforesi es corria a 100 V durant 90 min.

6.5.5. Transferència a la membrana de niló i fixació amb rajos UV

1. La membrana de niló de càrrega positiva (dimensions 5 x 15 cm) es submergia en aigua Milli-Q durant 5 min.
2. Primer es col·locava la membrana i després el gel sobre l'equip de buit "VacuBlot" seguint les instruccions del fabricant (equip per la transferència del RNA acoblat a la bomba de buit, "LKB VacuGen X", de Pharmacia). S'acoblava l'equip a la bomba de buit i es mantenia a una pressió de 50 mBar.
3. El gel es cobria amb aigua Milli-Q durant 15 min.
4. Es retirava l'aigua i es cobria el gel de nou amb NaOH 0,1 M durant 15 min. Aquest pas es repetia una vegada més.
5. Es treia la solució anterior i es cobria el gel amb Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 durant 15 min.
6. Es retirava aquesta solució i aleshores es cobria la càmera del "VacuBlot" amb aigua Milli-Q fins cobrir completament el gel. El RNA es transferia durant 90 min.
7. Transcorregut aquest temps, es treia la membrana del "VacuBlot" i es col·locava sobre una safata amb paper de filtre humit. La membrana s'exposava a l'equip "Stratalinker 1.800", que aplica llum ultraviolada (12.000 µJ/cm²) per fixar el RNA.

8. Usant un transiluminador UV convencional es verificava la transferència i la posició dels rRNA.
9. Per eliminar el tampó de càrrega i el formaldehid es rentava la membrana dos cops amb 100 ml de WB a 65°C durant 15 min.

6.5.6. Hibridació i rentats

1. La solució MagicHyb es precalentava en un bany a 65°C fins que era completament líquida.
2. Després dels rentats, la membrana es posava en un tub d'hibridació juntament amb 8 ml de MagicHyb i s'incubava durant 1 hora a 65°C amb rotació.
3. Per desnaturalitzar la sonda aquesta es dissolia en 100 µl de TE a una concentració final de 2,5 ng/ml i s'escalfava a 90°C durant 5 min. Seguidament, es mantenia a 0°C durant 5 min més.
4. S'afegia la sonda desnaturalitzada al tub d'hibridació que contenia la membrana i s'incubava a 65°C amb rotació moderada durant 16 hores.
5. Per retirar l'excés de sonda es rentava la membrana a 65°C durant 20 min amb 100 ml de WB precalentat a la mateixa temperatura. Aquest pas es repetia dos vegades més.

6.5.7. Detecció per quimioluminescència

Els passos que venen a continuació es realitzaven a temperatura ambient.

1. Es rentava la membrana dos vegades amb 50 ml de B1 durant 5 min.
2. Es bloquejava la membrana utilitzant 50 ml de B2 i s'incubava en agitació suau durant 60 min.
3. L'anticòs anti-DIG es diluïa en una proporció 1:15.000 en B2 i s'incubava en agitació suau durant 30 min.
4. Per retirar l'excés d'anticòs, la membrana es rentava quatre cops amb 50 ml de B1 durant 10 min.
5. Posteriorment, s'incubava la membrana amb 50 ml de B3 durant 5 min i després amb 1 ml de B3 amb CDP-Star diluït 1:100 durant 5 min.
6. Per captar la quimioluminescència s'utilitzava l'equip "ChemiDoc™ MP Imaging System" (Bio-Rad).

6.5.8. Quantificació de la imatge obtinguda

La imatge resultant es podia quantificar mitjançant el programa "ImageJ". S'obtenia el rati $[(\text{senyal del mRNA d'interès-senyal del fons})/(\text{senyal del mRNA del gen } SNR19\text{-senyal del fons})]$ i els resultats es relativitzaven d'acord a un valor unitat adjudicat a la mostra de referència que s'especificarà en cada cas.

6.6. Anàlisi de proteïnes per Western blot

6.6.1. Obtenció de mostres (Mètode de la urea)

En cultius que creixien exponencialment en medi líquid es recollia un mínim de 3×10^8 cèl·lules per mostra, equivalent a unes 10 unitats de DO_{600} . Després de recollir les cèl·lules, es centrifugaven a $3.000 \times g$ durant 5 min i es rentaven amb aigua Milli-Q a $4^{\circ}C$. A continuació, es congelaven amb nitrogen líquid i es conservaven a $-80^{\circ}C$ o bé es continuava amb l'extracció de la proteïna.

6.6.2. Extracció de proteïna (Mètode de la urea)

El sediment de cèl·lules es resuspensia en $15 \mu l$ d'urea 5M i s'escalfava 3 min a $90^{\circ}C$ per tal d'afavorir la lisi cel·lular. Seguidament, s'afegia l'equivalent de dos volums de perles de vidre i la suspensió s'agitava vigorosament en un vòrtex durant 7 min. A continuació, s'afegia $50 \mu l$ de 1 x SR (2% SDS i Tris-HCl 125 mM, pH 6,5), s'agitava 30 segons més, i es tornava a incubar a $90^{\circ}C$ durant 2 min. Per tal d'eliminar les restes i els agregats cel·lulars, el lisat cel·lular es transferia a un altre vial, foradant el fons del tub original amb l'extret cel·lular cru, introduint-lo en un altre tub i centrifugant a baixa velocitat ($3.070 \times g$ durant 2 min). A continuació, es centrifugava la mostra ja lliure de restes cel·lulars a més velocitat ($13.680 \times g$ durant 5 min) per obtenir l'extracte proteic en el sobrenedant. Es calculava la concentració de proteïna de cada mostra amb l'assaig de proteïna "Micro DC Protein Assay" (Bio-Rad).

6.6.3. Obtenció de mostres (Mètode del TCA)

En cultius que creixien exponencialment en medi líquid es recollia un mínim de 3×10^8 cèl·lules per mostra, equivalent a unes 10 unitats de DO_{600} . Després de recollir les cèl·lules, es centrifugaven a $3.000 \times g$ durant 5 min i es rentaven amb àcid tricloroacètic (TCA, de Sigma) al 20%, a una temperatura de $4^{\circ}C$. A continuació, es congelaven amb nitrogen líquid i es conservaven a $-80^{\circ}C$ o bé es continuava amb l'extracció de la proteïna.

6.6.4. Extracció de proteïna (Mètode del TCA)

El sediment cel·lular es resuspénia en 100 µl de TCA 20%, a continuació s’afegia perles de vidres i la suspensió s’agitava vigorosament en un vòrtex durant 1 min i seguidament es deixava reposar durant 1 min a 0°C, repetint aquest procediment 7 vegades. Seguidament s’afegia 100 µl de TCA 5% i es recuperava tot el sobrenedant, que es passava a un nou vial. Es centrifugava la mostra a 13.680 x g durant 5 min a 4°C i s’eliminava el sobrenedant. Al sediment se li afegia 200 µl d’acetona freda i es resuspénia vigorosament amb la pipeta, posteriorment es tornava a centrifugar a 13.680 x g durant 5 min a 4°C i s’eliminava el sobrenedant. Aquest pas es repetia 5 vegades, per tal d’eliminar totes les restes de TCA. Es retirava tot el sobrenedant i es deixava assecar el sediment a l’aparell “Concentrator Plus” (Eppendorf) durant 3 o 4 min, fins que el precipitat estigués sec. Aleshores s’afegia 100 µl del tampó de resuspensió (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; SDS 1%; PMSF 1mM) i s’agitava 5 min a 25°C. Finalment es calculava la concentració de proteïna de cada mostra amb l’assaig de proteïna “Micro DC Protein Assay” (Bio-Rad).

6.6.5. Electroforesi en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

S’agafava un total de 10 a 20 µg de proteïna de cada mostra (depenent del anticòs a usar) i s’afegia 4 µl de 4 x SS (sacarosa 20% i blau de bromofenol 0,02%) amb β-mercaptoetanol (β-ME) 4%. La barreja s’incubava a 90°C durant 2 min i es carregava en un gel de SDS-PAGE. Les mostres s’acompanyaven d’un estàndard de pes molecular de proteïnes (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standards, d’Invitrogen). Es corria l’electroforesi a 25 mA per gel, en un tampó de Tris 25 mM pH 8, glicina 192 mM i SDS 0,1%.

La concentració dels gels més utilitzats es descriuen en la **Taula 5**. Segons la mida de la proteïna a estudiar, variava el percentatge d’acrilamida/BIS-acrilamida del gel separador.

Taula 5. Composició dels gels de SDS-PAGE utilitzats.

	GEL SEPARADOR			GEL EMPAQUETADOR	
	18%	10 %	7,5%	5%	
Acrilamida 40%	2,25 ml	1,21 ml	0,91 ml	0,38 ml	
BIS-acrilamida 2%	1,2 ml	0,67 ml	0,50 ml	0,2 ml	
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	0,75 ml
H ₂ O	0,2 ml	1,79 ml	2,26 ml		1,63 ml
SDS 10%	50 µl	50 µl	50 µl	30 µl	
Persulfat amònic 10%	25 µl	25 µl	25 µl	20 µl	
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	

6.6.6. Transferència a una membrana de PVDF

Es mullava una membrana de difluorur de polivinilidè (PVDF, de Milipore) en metanol durant 5 segons, s'esbandia amb aigua Milli-Q abundant i s'equilibrava en tampó de transferència durant 5 min. La transferència de les proteïnes a la membrana de PVDF es duia a terme mitjançant el sistema semi-sec ("Trans-Blot[®] SD Semy-Dry Transfer Cell", Biorad), seguint les instruccions del fabricant.

6.6.7. Immunodetecció

Es seguia el següent procediment:

1. La membrana amb les proteïnes es bloquejava durant una hora en tampó B (llet en pols comercial Molico 5% en TBST).
2. Es feia tres rentats a la membrana, durant un total de 25 min, en abundant TBST (Tris-HCl 20 mM, pH 8; NaCl 125 mM; Tween 20 0,1%).
3. S'incubava la membrana durant 1 hora (o tota la nit a 4°C) en 25 ml de tampó I (llet en pols Molico 0,25% en TBST) en el qual s'havia afegit l'anticòs primari desitjat a la dilució corresponent (veure **Taula 6**).
4. Seguidament, es tornava a rentar la membrana una vegada durant 15 min i una segona vegada durant 5 min, en TBST.
5. La membrana es preincubava durant 10 min en tampó I.
6. Es tornava a incubar la membrana durant 30 min en tampó I, en el qual s'havia afegit aquesta vegada l'anticòs secundari unit a l'enzim peroxidasa.
7. A continuació, la membrana es rentava cinc vegades més durant un total de 40 min en TBST.
8. Finalment, s'incubava la membrana amb 1 ml de substrat de l'enzim ("Clarity[™] Western ECL Substrate", de Bio-Rad) durant 5 min.
9. Per a la detecció quimioluminescent s'utilitzava l'equip "ChemiDoc[™] MP Imaging System", de Bio-Rad.

En la **Taula 6** es detallen els anticossos primaris utilitzats en Western blot en aquesta memòria.

Taula 6. Anticossos primaris i secundaris emprats en Western blot, amb el seu origen i dilucions emprades.

WESTERN BLOT	
ANTICÒS PRIMARI	ANTICÒS SECUNDARI
Anti-Aco1 (Lab. del Dr. R.Lill) 1:2000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-c-myc Santa Cruz 1:250	Anti-ratolí IgG HRP (Pierce) 1:12500
Anti-Dif1 (Lab. de la Dra. S.J.Elledge) 1:800	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-H2A phospo S129 Abcam 1:1000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-Hexoquinasa Hxk1 US Biological 1:5000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-àcid lipoic (Lab. de la Dra. E.Cabiscol) 1:5000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-Rad53 Abcam 1:2000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-Rnr1 Abcam 1:5000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-Rnr2 (Lab. de la Dra. J.Stubbe) 1:5000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-Rnr4 (Lab. de la Dra. J.Stubbe) 1:5000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500
Anti-Sml1 Agrisera 1:1000	Anti-conill IgG Peroxidase-linked (GE Healthcare) 1:12500

6.6.8. Control de càrrega

Per tal de comprovar que la quantitat de proteïna era la mateixa en totes les mostres, la membrana, una vegada exposada, es rentava tres vegades durant un total de 60 min en TBST. Seguidament es tornava a rehibridar amb l'anticòs anti-Hexoquinasa Hxk1 (US Biological), seguint el protocol a partir del punt 1 de l'apartat 6.6.7 de **Materials i Mètodes**.

En alguns casos o en el procés final, en la membrana de PVDF es realitzava una tinció de Coomassie per comprovar els nivells de proteïna totals. S'aplicava una solució Coomassie (0,1% Coomassie brilliant blue; 25% isopropanol i 10% àcid acètic) durant 20 min, seguidament s'aplicava una solució decolorant per destenyir (10% isopropanol; 10% àcid acètic) durant 20 min i es deixava assecar la membrana a temperatura ambient.

6.6.9. Quantificació de la imatge obtinguda

La imatge resultant es quantificava mitjançant el programa "ImageJ", com en l'apartat 6.5.8 de **Materials i Mètodes**. Els resultats es relativitzaven d'acord a un valor unitat adjudicat a la mostra de referència, que s'especificarà en cada cas.

7. TÈCNIQUES DE MICROSCOPIA

7.1. Detecció de Rad52 marcat amb YFP en *foci* associats al DNA

S'inoculaven les soques d'interès en medi SC líquid i s'incubava en agitació a 30°C durant 16 hores. A partir d'aquests cultius de nit, es reinoculava en medi fresc SC per tal d'obtenir cultius exponencials fins a una concentració de $1-2 \times 10^7$ cèl·lules/ml. En algun cas s'addicionava algun compost a assajar al medi de cultiu. Aleshores es recollien les cèl·lules i s'observava l'emissió de fluorescència per YFP (Yellow Fluorescent Protein), utilitzant el microscopi de fluorescència "Olympus® BX51", segons les tècniques estàndards. Els filtre emprat va ser el XF104-2 que té un rang de longitud d'ona (λ) d'excitació entre 490 i 510 nm i d'emissió entre 535 i 565 nm. Es contaven 300 cèl·lules gemmades i no gemmades per experiment, realitzant un mínim de tres experiment independents.

7.2. Immunolocalització de Rnr2

7.2.1 Obtenció de mostres

Les soques s'inoculaven en medi líquid durant 16 hores en agitació a 30°C. A partir d'aquests cultius, es reinoculava en medi fresc per obtenir cultius exponencials fins a una concentració de $1-2 \times 10^7$ cèl·lules/ml. En algun cas s'addicionava algun compost a assajar al medi de cultiu.

Es recollia 3×10^7 cèl·lules en 1 ml, i la mostra es fixava amb 100 μ l de formaldehid al 37% i 100 μ l de KH_2PO_4 1M a pH 6,5 durant 90 min a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, les cèl·lules es podien guardar a 4°C o continuar el procediment.

7.2.2 Immunofluorescència

Solucions i materials:

- **Formaldèhid 37% (Sigma).**
- **BS:** Blocking Reagent 0,5% (Roche); en tampó PBS.
- **10 x PBS:** NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 4,3 mM; KH_2PO_4 , ajustat a pH 7.
- **PB:** KH_2PO_4 100 mM pH 6,5.
- **Polilisina:** Poly-D-lysine hidrobromide (**Sigma**).
- **Portaobjectes multipouet:** Multitest Slide 15-well, (**MP Biomedical LLC**).
- **SB:** Sorbitol 1,2 M en PB.
- **Zymolyasa 20T (ICN).**

A continuació es detalla el protocol:

1. Les cèl·lules es centrifugaven a 1.500 x g durant 2 min. A continuació es rentava el sediment amb 1 ml de PB, es tornava a centrifugar a 1.500 x g durant 2 min i es resuspensia amb una barreja de 250 μ l de SB i β -mercaptoetanol (β -ME) al 2%.
2. S'afegia 5 μ l de Zymolyasa 20T a 10 mg/ml i s'incubava a 37°C durant 5 min, per tal d'obtenir els protoplasts, la formació dels quals es controlava observant en el microscòpic òptic. Transcorregut aquest temps, es deixaven els vials a 0°C durant 5 min. Aleshores es centrifugava a 1.500 x g durant 2 min i es resuspensia el sediment amb 100 μ l de SB.
3. Paral·lelament es tractava els pouets dels portaobjectes amb 5 μ l de polilisina al 0,1% durant 10 min a temperatura ambient; seguidament es feien 2 rentats amb aigua Milli-Q i es deixava assecar.
4. S'afegia 20 μ l de la resuspensió cel·lular als pouets del portaobjectes prèviament tractats i es deixava durant 10 min a temperatura ambient. Seguidament es retirava l'excés de líquid.
5. Es rentava el portaobjectes en PB durant 5 min.
6. S'incubava amb 0,1% de saponina en PB durant 5 min i es rentava amb PBS 1 x durant 5 min. Seguidament es feien 5 rentats de 5 min cadascun amb BS.

MATERIALS I MÈTODES

7. Les mostres s'incubaven durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari diluït en BS (dilucions segons la **Taula 7**).
8. Es feien tres rentats al portaobjectes, durant un total de 15 min, en abundant PBS 1 x.
9. Es tornava a incubar el portaobjectes a temperatura ambient i fosc durant 120 min en solució BS, en la qual s'havia afegit aquesta vegada l'anticòs secundari.
10. A continuació, el portaobjectes es rentava tres vegades més, durant un total de 15 min en PBS 1 x i protegit de la llum.
11. Aleshores les mostres s'incubaven en fosc durant 10 min amb 5 µl a 5 µg/ml de diclorhidrat de 4',6-diamidina-2-fenilindol (DAPI, de Sigma) en PBS 1 x per tal de teyir els nuclis. Seguidament es rentava el portaobjectes amb PBS 1 x durant 5 min i es deixava assecar a temperatura ambient i protegit de la llum (Silva et al., 2005).
12. Finalment, els pouets es cobrien amb 5 µl de "Vector-shield mounting medium" (Vector Lab. Co).
13. Per a la detecció fluorescent s'utilitzava el microscopi de fluorescència Olympus® BX51, segons les tècniques estàndards.

Es realitzava l'anàlisi quantitatiu dels resultats en funció de la seva localització subcel·lular, realitzant un comptatge mínim de 300 cèl·lules per experiment, en almenys 3 experiments realitzats de forma independent.

En la següent taula es detallen els anticossos utilitzats en immunofluorescència en aquesta memòria.

Taula 7. Anticossos primaris i secundaris emprats en immunofluorescència, amb el seu origen i les dilucions emprades.

IMMUNOFLUORESCÈNCIA	
ANTICÒS PRIMARI	ANTICÒS SECUNDARI
Anti-Rnr2 (Lab. de la Dra. J.Stubbe) 1:10000	Alexa Fluor® 488, IgG de cabra anti-conill (H+L) (Invitrogen) 1:1000

8. SINCRONITZACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR I ANÀLISI PER CITOMETRIA DE FLUX

8.1. Recollida de mostres

Les soques s'inoculaven en medi líquid durant 16 hores en agitació a 30°C. A partir d'aquests cultius, es reinoculava en medi fresc per obtenir cultius exponencials. Quan el cultiu es trobava en creixement exponencial (0,3 de DO₆₀₀) s'afegia factor- α (Genscript) a una concentració final de 4 $\mu\text{g/ml}$ durant 60 min, per tal de sincronitzar les cèl·lules en la fase G1. Transcorregut aquest període, es tornava a afegir la mateixa quantitat de factor- α durant 60 min més. S'observava al microscopi òptic que les cèl·lules estiguessin totes sense gemma. A continuació, per tal d'eliminar la feromona, els cultius es filtraven amb un sistema de filtració (Afora) i filtres "Mixed esters of cellulosa, Osmonics MicronSep™" d'un diàmetre de 47 mm i un porus de 0,22 μm . Aleshores el filtre amb les cèl·lules es resuspensia en medi fresc, prèviament preescalfat a 30°C. Les mostres successives es recollien als temps indicats en cada experiment, amb 1 ml de cultiu per l'anàlisi de citometria de flux i 20 ml per l'obtenció de proteïna (veure l'apartat 6.6 **Materials i Mètodes** la manipulació de la proteïna).

8.2. Tinció amb iodur de propidi i anàlisi de les mostres

La tinció de iodur de propidi s'ha adaptat de Nash et al. (1988) i Tyers i Futcher (1993).

A continuació es detalla el protocol seguit:

1. A partir d'un volum d'1 ml de mostra (obtingut en l'apartat 8.1 de **Materials i Mètodes**) se li afegia 3 ml etanol absolut (Scharlau) i es deixava incubant durant 1 hora o tota la nit a 4°C.
2. Es centrifugaven les mostres a 850 x g durant 5 min a temperatura ambient. Seguidament els sediments es resuspensien amb 500 μl de SSC 1 x (NaCl 150 mM; citrat de sodi 15 mM ajustat a pH 7) i 10 μl de RNasa A (Serva) a 10 mg/ml durant 16 hores a 50°C.
3. S'afegia 5 μl de proteïnasa K (Roche) a 10 mg/ml en cada mostra i s'incubava a 50°C durant 1 hora.
4. Seguidament les mostres eren sonicades amb l'aparell "Soniprep 150" de MSE durant 5 seg a una potència mitja.

5. S'afegia 1 ml de SSC 1 x i 100 µl de iodur de propidi (Sigma) a una concentració de 50 µg/ml en cada mostra, i les mostres es deixaven protegides de la llum a temperatura ambient durant 30 min.
6. Finalment, s'analitzaven per citometria de flux amb l'aparell "BD FACSCanto™II flow cytometer" (BD Biosciences), utilitzant el software "BDFACS Diva 6.1.3".

9. ANÀLISI DE LA FREQUÈNCIA DE MUTACIÓ ESPONTÀNIA

La soca d'interès s'inoculava en cultiu líquid i s'incubava en agitació durant 16 hores a 30°C. A partir d'aquest cultiu, es reinoculava en medi fresc per obtenir cultius exponencials fins a una concentració de $1-2 \times 10^7$ cèl·lules/ml. Es recollia un mínim de 1×10^8 cèl·lules per mostra. Es centrifugaven a $3.000 \times g$ durant 5 min i es rentaven amb aigua Milli-Q estèril. Seguidament es resuspenia el sediment amb 400 µl d'aigua Milli-Q estèril. Es feia una dilució 10^{-6} de la mostra i es plaquejaven quatre rèpliques de cada mostra en medi YPD durant 3 dies a 30°C, per determinar el nombre de cèl·lules totals. Paral·lelament, la resta de mostra es dividia en tres alíquotes i es plaquejaven en medi SC-Arg (sense arginina) que contenia 60 µg/ml de L-canavanina (Sigma) com agent selectiu, incubant seguidament durant 5 dies a 30°C. Posteriorment es realitzava el recompte de colònies en els dos medis, determinant la freqüència de mutació espontània dividint el nombre de colònies que van créixer en el medi SC-Arg contenint L-canavanina respecte el nombre total de colònies crescudes en el medi YPD, aplicant el factor de correcció de la dilució emprada. Es va realitzar un total de deu experiments independents per a cada condició experimental.

10. DETECCIÓ DELS NIVELLS DE FERRO INTRACEL·LULAR

Per determinar els nivells de Fe intracel·lular en *S. cerevisiae* es va seguir el protocol descrit per Tamarit et al. (2006).

10.1. Obtenció de mostres

S'inoculava la soca d'interès en medi líquid durant 16 hores a 30°C en agitació. Passat aquest temps, es diluïen fins a una concentració d' $1,5 \times 10^6$ cèl·lules/ml i es deixaven créixer fins ben

entrada la fase exponencial. Aleshores es recollia 7×10^8 cèl·lules per mostra. Es centrifugaven a $3.000 \times g$ durant 5 min i es rentaven amb aigua Milli-Q a 4°C . Es descartava acuradament el sobrenedant i el sediment resultant es separava en tres vials independents cadascun amb el mateix nombre de cèl·lules, per tal de mesurar el contingut de Fe per triplicat. Seguidament les mostres es congelaven amb nitrogen líquid i es conservaven a -80°C o, alternativament, es podia continuar immediatament el procés.

10.2. Processament cel·lular i mesura dels nivells de Fe

1. Les cèl·lules de cada mostra es digerien afegint una barreja de 285 μl d'aigua Milli-Q i 214 μl d'àcid nítric al 7%. S'agitava amb el vòrtex a velocitat màxima durant 30 seg, després s'incubaven les mostres en agitació (300 r.p.m.) a una temperatura de 100°C durant 16 hores.
2. Es centrifugaven les mostres a $12.300 \times g$ durant 5 min a temperatura ambient, posteriorment es transferien 400 μl del sobrenedant a un vial nou. A més, s'afegien 300 μl d'aigua Milli-Q, 160 μl d'ascorbat sòdic (provinent d'una solució patró a 38 mg/ml) i 126 μl d'acetat d'amoni (provinent d'una solució d'acetat d'amoni saturada, diluïda al 3%).
3. A continuació, es mesurava la densitat òptica a 420 nm (DO_{420}). Aquesta mesura servia com a control de que cada mostra tingués el mateix nombre de cèl·lules. També es realitzava una altra mesura de densitat òptica a 535 nm (DO_{535}). Seguidament s'afegien 16 μl del quelant de Fe àcid sulfònic de batofenantrolina (BPS, de Fluka), a partir d'una solució patró a 34 mg/ml preparada al moment, i es tornava a mesurar la densitat òptica a 535 nm (DO_{535}), per tal de llegir l'absorbància específica del complex ferro-quelant. S'utilitzava un espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401 PC. Per a cada condició experimental es van realitzar un mínim de tres experiments independents.
4. Mitjançant les dades obtingudes en l'espectrofotòmetre, es va calcular els nivells relatius de Fe intracel·lular, segons es descriu en Tamarit et al. (2006).

11. QUANTIFICACIÓ DE MITOCÒNDRIES MITJANÇANT GFP I CITOMETRIA DE FLUX

Es partia de cultius exponencials de soques de llevat transformades amb el plàsmid pYX122 (Westermann i Neupert, 2000), el qual permet l'expressió de GFP localitzada en la matriu mitocondrial. S'agafava 1×10^7 cèl·lules (aproximadament 0,3 unitats de DO_{600}) i es centrifugaven a $12.290 \times g$ durant 20 segons. Aquestes cèl·lules es resuspenien en 1 ml de aigua Milli-Q, per tal d'eliminar les possibles interferències en la lectura que podia causar el medi. Seguidament es procedia a la determinació de la fluorescència, agafant 100.000 cèl·lules de cada mostra i llegint a una longitud d'ona d'excitació de 488 nm i dins d'un espectre d'emissió entre 510-530 nm, mitjançant l'aparell "BD FACSCanto™II flow cytometer" (BD Biosciences).

Es realitzaven tres rèpliques de cada mostra, i la mitjana obtinguda en cada cas es relativitzava d'acord a un valor unitat adjudicat a la mostra de referència, que s'especifica en cada cas. Es van realitzar un mínim de tres experiment independents per cada soca.

12. QUANTIFICACIÓ DE COLÒNIES "PETITE"

Les soques d'interès (en aquest cas es treballava amb mutants condicionals, sota un promotor *tetO*) s'inoculaven en medi líquid durant 16 hores a 30°C en agitació. Passat aquest temps es diluïa i es deixava créixer de nou fins a la fase exponencial mitja. Aleshores (moment considerat com temps 0) es retirava una alíquota del cultiu, es feia una dilució 10^{-4} i es plaquejava per triplicat 100 μ l d'aquesta dilució en plaques de medi YPD, que s'incubaven a 30°C durant 3 dies. Al mateix temps, al cultiu líquid se li afegia doxiciclina a una concentració final de 5 μ g/ml i es mantenia, mitjançant dilucions pertinents, en condicions de creixement constant (entre 0,15 – 0,8 DO_{600}). Cada 24 hores s'agafava una mostra de cultiu, es diluïa i es plaquejava com el cas anterior. Una vegada passat els tres dies, es comptaven totes les colònies crescudes en les plaques de medi YPD, on es diferenciava dos mides (grans i petites). Les colònies petites teòricament eren les que no poden respirar i no tenen DNA mitocondrial.

Per confirmar els resultats, es sembrava aproximadament 100 colònies (grans i petites) en plaques de medi YPDGly (permetent estrictament un metabolisme respiratori) i es confirmava per cada clon la seva capacitat respiratòria.

13. AÏLLAMENT DE CLONS ESPECÍFICS A PARTIR D'UNA GENOTECA DE DNA DE *S. cerevisiae*

L'objectiu d'aquesta tècnica era la identificació de gens capaços d'evitar la pèrdua i/o ajudar a mantenir el DNA mitocondrial, utilitzant el mutant condicional *tet0⁻GRX5Δcth2* (MML1814), emprant una genoteca sobreexpressora comercial de *S. cerevisiae*.

El mutant en qüestió es va fer créixer exponencialment i es va transformar amb una genoteca sobreexpressora comercial de DNA genòmic de llevat ("Yeast genome tiling pooled DNA", de GE Healthcare), continguda en el vector pGP564, segons el mètode de transformació de *S. cerevisiae* descrit en l'apartat 6.2.6 de l'apartat **Materials i Mètodes**. Paral·lelament es va transformar la soca salvatge com a control per tal de quantificar l'eficiència de transformació. Una vegada realitzada la transformació, la suspensió de cèl·lules mutants transformades es va inocular en medi líquid SC sense leucina (a causa que el vector de la genoteca conté *LEU2* com marcador de la selecció) i es va incubar a 30°C. Passades 4 hores s'hi va afegir doxiciclina a 5 µg/ml durant un total de 72 hores, per tal d'apagar l'expressió de *GRX5*. Transcorregut aquest període, es va plaquejar en medi SC (sense leucina) i es va incubar durant 5 dies a 30°C.

Les colònies que van créixer en el medi SC sense leucina es van sembrar en plaques de medi SCGly sense leucina, utilitzant-les com a indicadors de la presència de DNA mitocondrial, ja que el creixement en medi amb glicerol com a única font de carboni està associat a la capacitat de respirar i, per tant, a la presència de DNA mitocondrial.

A partir dels clons que van créixer en medi SCGly, es va reaïllar els plàsmids utilitzant el kit "Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II" (Zymo Research), seguint les indicacions del fabricant. Posteriorment, es van amplificar els plàsmids obtinguts del llevat en cèl·lules competents de *E. coli* DH5α (veure en l'apartat 1.2 **Materials i Mètodes**) seguint el protocol de transformació de bacteris (apartat 6.2.5 **Materials i Mètodes**).

Seguidament es van realitzar anàlisis de restricció, per demostrar que els plàsmids pertanyien a la genoteca (ja que tots ells contenien dos fragments comuns). A més, el patró de restricció específic de cadascun d'ells servia de marcador de clons independents.

A continuació els dos extrems dels inserts de DNA genòmic de *S. cerevisiae* presents en els plàsmids que tenien patrons de restricció diferents es van seqüenciar en l'equip 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems) al Servei de Proteòmica i Genòmica de la Universitat de Lleida, per tal de determinar la regió del genoma del llevat present en cada clon. El següent pas consistia en retransformar cadascun dels plàsmids diferents en la soca *tet0₇-GRX5 Δ cth2* (MML1814) per tal de confirmar la seva estabilitat en aquestes cèl·lules i la capacitat de rescatar la capacitat de respirar i mantenir el DNA mitocondrial.

L'últim pas consistia en realitzar una RT-PCR per mesurar els nivells de DNA mitocondrial (veure l'apartat 6.4 de **Materials i Mètodes**), i així confirmar els resultats previs amb cada clon positiu de la genoteca.

14. ANÀLISI ESTADÍSTIC MITJANÇANT EL PROGRAMA JMP11

Es recollien les dades corresponents a un mínim de tres experiments independents, segons s'indicarà en cada cas. Aquestes dades s'analitzaven estadísticament amb el programa JMP11 (Statistical Software). Quan es comparava més de dos soques, tractades i/o no tractades, es realitzava el test estadístic Tukey-Kramer HSD, per determinar la probabilitat p de que un valor sigui diferent al proposat per la hipòtesi nul·la. En canvi, quan es comparava dues variables entre si, es realitzava el test estadístic t -Student. Quan la comparació entre dues soques donava un valor $p < 0,001$, la diferència era considerada com estadísticament molt significat, i això es representava al gràfic com ***, quan el valor p era $< 0,01$ com **, i quan el valor p era $< 0,05$ com *. Els test estadístic es va aplicar respecte la soca salvatge, exceptuant alguns casos concrets en que s'indicarà la soca de referència.

IV. RESULTATS

1. L'ABSÈNCIA DE LES PROTEÏNES IMPLICADES EN LA BIOGÈNESI DE CENTRES Fe-S CAUSA DANY CONSTITUTIU AL DNA I INESTABILITAT GENÒMICA

L'absència de Zim17 (xaperona que col·labora amb Ssq1 i està implicada en la biogènesi de centres Fe-S) provoca un augment de la freqüència de recombinació, causant inestabilitat genòmica nuclear (Díaz de la Loza et al., 2011). Basant-nos en aquest treball anterior, el grup de recerca havia realitzat uns estudis previs demostrant que l'absència de Grx5 també causa un augment de la freqüència de recombinació de gens nuclears, resultant ser 17 vegades superior a les cèl·lules salvatges, fet que no passa quan manquen altres proteïnes mitocondrials no relacionades amb la síntesi de centres Fe-S.

1.1 L'absència de les proteïnes mitocondrials Grx5 o Iba57 causa un increment de la taxa de mutacions espontànies

A partir de l'esmentat fenotip del mutant $\Delta grx5$ que suggeria que el seu genoma és inestable es va determinar la freqüència de mutacions espontànies (un altre indicador de l'estabilitat del DNA) tant en el mutant $\Delta grx5$ (MML1500) com en $\Delta iba57$ (MML1678). Tant Grx5 com Iba57 estan implicades en diferents etapes de la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S. Grx5 intervé en les reaccions comuns de la via de transferència dels centres Fe-S del tipus [2Fe-2S] i [4Fe-4S], i d'aquesta manera participa en el control de l'homeòstasi del ferro, de manera que el mutant $\Delta grx5$ acumula ferro intracel·lular. D'altra banda, Iba57 està implicada en la maduració dels centres [4Fe-4S] formant part d'una branca secundària en la síntesi mitocondrial de centres Fe-S, no estant relacionada directament amb l'homeòstasi del ferro (veure apartat 1.3 de la **Introducció**).

Per determinar la freqüència de mutacions espontànies es va mesurar l'aparició de colònies dels mutants $\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i la soca salvatge que podien créixer en un medi SC sense arginina i suplementat amb L-canavanina (com es descriu en l'apartat 9 de **Materials i Mètodes**). La L-canavanina és un anàleg tòxic de l'aminoàcid arginina, de manera que la resistència a aquest compost és conseqüència de mutacions en el locus *CAN1* codificant d'un transportador de l'esmentat aminoàcid. En la **Figura 18** s'observa que en les soques mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ la freqüència de colònies resistents a canavanina (can^R) és 5,6 i 7,1 vegades superior a la de la soca salvatge respectivament.

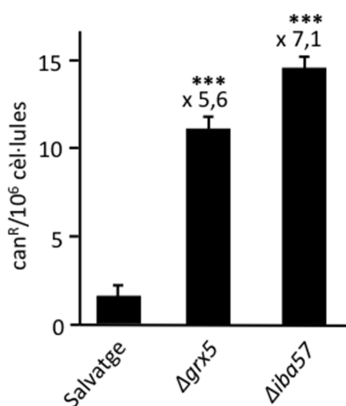


Figura 18. Els mutants *Δgrx5* o *Δiba57* mostren una elevada freqüència de mutació espontània. Les taxes de mutació espontània en la soca salvatge (CML235), *Δgrx5* (MML1500) i *Δiba57* (MML1678) van ser calculades pel test de formació de colònies resistents a L-canavanina a partir de cultius exponencials. Les barres corresponen a la mitjana de deu experiments independents (\pm s.d.) i els valors numèrics estan relativitzats respecte a la soca salvatge.

Aquest resultat recolza que l'absència de les proteïnes mitocondrials Grx5 i Iba57 causa un increment de la inestabilitat genòmica nuclear, en concordança amb les elevades freqüències de recombinació en el mutant *Δgrx5* observades prèviament.

1.2 La manca de Grx5 o Iba57 causa nivells elevats de lesions constitutives en el DNA

L'increment de la freqüència de recombinació i mutacions espontànies està associat a inestabilitat genòmica i lesions al DNA, com per exemple DSB (Aguilera i García-Muse, 2013). Concretament la formació de DSB en el DNA és un dels principals factors que causen fenotips recombinogènics. Per aquest motiu, es va determinar si el DNA contenia lesions constitutives en absència de Grx5 o Iba57. Amb aquest objectiu es va utilitzar un plàsmid (pWJ1213) a partir del qual s'expressa la proteïna Rad52 fusionada a un epítot YFP. Rad52 és un dels components centrals en la reparació homòloga de talls a la doble cadena del DNA o de múltiples talls de cadena simple (Lisby et al., 2001), de tal manera que Rad52 s'uneix als extrems lliures 3' del ssDNA que es formen una vegada el dany està produït (com es menciona en l'apartat 4.1.1 de la **Introducció**). El resultat d'aquesta interacció entre Rad52 i el ssDNA és la formació de *foci* que contenen Rad52. Degut a que està marcada amb l'epítot fluorescent YFP aquesta forma de Rad52 és un excel·lent indicador, mitjançant microscopia de fluorescència, per detectar DSB o acumulació de ssDNA en el nucli.

El percentatge de cèl·lules amb *foci* incrementa significativament en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$, en concret 5,2 i 4,9 vegades més que en la soca salvatge respectivament (**Figura 19A**). La presència de *foci* només es dona en cèl·lules gemmades, és a dir, en cèl·lules que es troben en fase S/G2 del cicle cel·lular, en el moment que es sintetitza el DNA o al finalitzar el procés. Per confirmar que aquest dany constituïu al DNA és específic de les proteïnes mitocondrials implicades en la biogènesi dels centres Fe-S, es va utilitzar també un mutant mancant d'una altra proteïna mitocondrial, Cox12, no relacionada amb la biogènesi de centres Fe-S, sinó que forma part de la subunitat VIb de la citocrom c oxidasa respiratòria. En aquest cas, el mutant $\Delta cox12$ presenta aproximadament el mateix nombre de *foci* que la soca salvatge (**Figura 19A**), confirmant que l'augment de la freqüència de *foci* no és generalitzable a qualsevol defecte mitocondrial. En la **Figura 19B** es visualitza el nombre superior de cèl·lules que contenen *foci* Rad52-YFP en el mutant $\Delta grx5$ respecte la soca salvatge. En resum, els resultats indiquen que les cèl·lules absents de Grx5 o Iba57 mostren uns alts nivells constitutius de dany al DNA, associats a la replicació d'aquest.

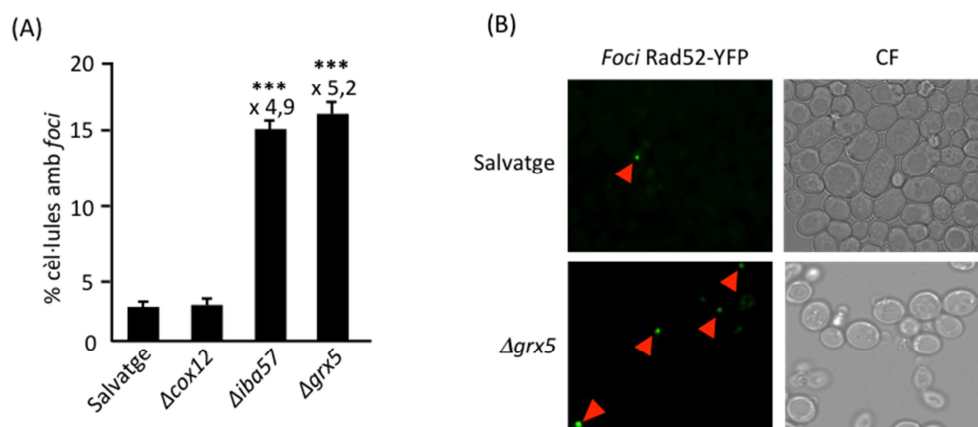


Figura 19. La formació de *foci* associats a Rad52-YFP incrementa en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$. A) Percentatge de cèl·lules gemmades que contenen *foci* en la soca salvatge (CML235), $\Delta cox12$ (MML1700), $\Delta grx5$ (MML1500) i $\Delta iba57$ (MML1678) creixent exponencialment en medi SC. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d.). B) Visualització dels *foci* en la soca salvatge i el mutant $\Delta grx5$ per microscopia de fluorescència. Les fletxes vermelles indiquen la localització del *foci*; a la imatge de la dreta es visualitza el conjunt de cèl·lules per contrast de fase (CF).

Un altre indicador de dany al DNA és la fosforilació de la histona γ -H2A (Downs et al., 2000). En els mutants $\Delta grx5$ o $\Delta iba57$ s'aprecia uns majors nivells basals de fosforilació de la histona γ -H2A respecte la soca salvatge, els quals es veuen incrementats després d'un tractament de

RESULTATS

les cèl·lules amb 0,2% de MMS durant 30 min, en ambdós casos també de manera més elevada que en la soca salvatge (**Figura 20A**).

Per verificar que la sobreacumulació constitutiva de les lesions al DNA mostrada en el mutant $\Delta grx5$ és conseqüència de l'absència de la funció de Grx5 i no es deguda a efectes secundaris o mutacions no caracteritzades del mutant nul, es va utilitzar un mutant condicional que expressa Grx5 sota el control d'un promotor *tetO₇*. Aquest mutant condicional *tetO₇-GRX5* regula l'expressió de *GRX5* mitjançant l'addició de doxiciclina al medi, de manera que en absència de l'antibiòtic s'expressa Grx5, però quan s'afegeix doxiciclina es reprimeix l'expressió del gen, conduint progressivament a una caiguda dels nivells intracel·lulars de Grx5 (Rodríguez-Manzanaque et al., 2002).

Estudis previs del grup havien demostrat que en un mutant $\Delta grx5$ s'indueixen els gens del reguló del ferro, per exemple *FIT3*, que codifica per un transportador de ferro de la membrana plasmàtica, resultant en una acumulació d'aproximadament 5 vegades més de ferro que en una soca salvatge (Rodríguez-Manzanaque et al., 2002). Per confirmar el caràcter condicional del mutant *tetO₇-GRX5* i determinar la cinètica de pèrdua de la proteïna Grx5, es va analitzar els nivells de mRNA del gen *FIT3* en el mutant condicional a les 0, 12 i 24 hores de tractament amb 5 µg/ml de doxiciclina al medi, utilitzant una soca salvatge i un mutant nul $\Delta grx5$ com a controls (**Figura 20B**). En la soca salvatge i en el mutant *tetO₇-GRX5* a temps 0 hores (és a dir, sense doxiciclina), els nivells d'expressió de *FIT3* són baixos, mentre que després de 12 i 24 hores de tractament amb doxiciclina es produeix una inducció de *FIT3* en el mutant *tetO₇-GRX5* semblant a la del mutant nul, indicant que ja després de 12 hores d'inactivació de l'expressió del gen *GRX5* l'activitat de la proteïna Grx5 en la cèl·lula és molt baixa. En concordança amb això, i pel que fa a l'acumulació del ferro intracel·lular (**Figura 20C**), a les 24 hores de tractament amb doxiciclina el mutant *tetO₇-GRX5* acumula 4,5 vegades més ferro que a temps 0, indicant també la pèrdua de la proteïna Grx5.

Una vegada observat el correcte funcionament del mutant condicional *tetO₇-GRX5*, aquest es va tractar amb doxiciclina durant 12 i 24 hores, i es van determinar els nivells de fosforilació de la histona H2A per Western blot (**Figura 20D**). Es va observar un increment progressiu de la fosforilació de H2A a mesura que es reduïa l'activitat de Grx5, i aquest resultat es veia intensificat quan els cultius es tractaven a cada punt amb 0,1% de MMS durant 30 minuts.

En resum, els resultats mostrats a la **Figura 20** confirmen que els mutants *Δgrx5* o *Δiba57* presenten un dany constitutiu al DNA, i que al menys en el cas de *Grx5* és la pèrdua de la proteïna la que provoca directament l'acumulació de lesions al DNA.

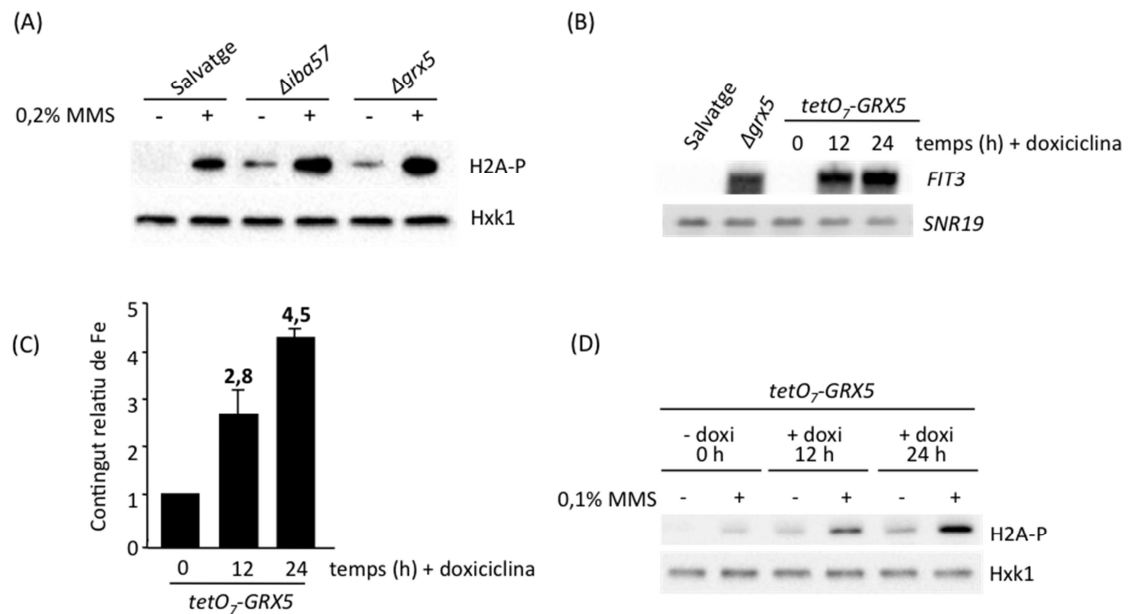


Figura 20. Els mutants *Δgrx5* i *Δiba57* presenten dany al DNA a nivells superiors que la soca salvatge. A) Anàlisi per Western blot de la fosforilació de la histona H2A (H2A-P) en les soques salvatge (CML235), *Δgrx5* (MML1500) i *Δiba57* (MML1678), sense (-) i amb un tractament de 0,2% de MMS (+) durant 30 min a partir de cultius exponencials en medi YPD. S'utilitza Hxk1 com a control de càrrega. B) Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió de mRNA del gen *FIT3* en la soca salvatge, *Δgrx5* i *tetO₇-GRX5* (en aquest cas a 0, 12 i 24 hores de tractament amb doxiciclina). Com a control de càrrega es va utilitzar el RNA de *SNR19*. C) Determinació del ferro intracel·lular en el mutant condicional *tetO₇-GRX5* després de 0, 12 i 24 hores de tractament amb doxiciclina a 5 µg/ml. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (± s.d.) i estan relativitzades respecte al temps 0. D) Anàlisi per Western blot dels nivells de H2A-P, a partir de cultius exponencials de la soca MML1616 (*tetO₇-GRX5*) en medi YPD líquid sense doxiciclina (temps 0) o després d'un tractament amb aquest antibiòtic (5 µg/ml) durant els respectius temps indicats, i per cadascun d'aquests temps sense tractar o tractat durant 30 min amb 0,1% de MMS. Com a control de càrrega es va utilitzar Hxk1.

RESULTATS

1.3 Els mutants *Δgrx5*, *Δiba57* i els afectats en altres components de la maquinària ISC presenten hipersensibilitat a agents genotòxics

La inestabilitat genòmica afecta la integritat del DNA i conseqüentment la viabilitat cel·lular. Com s'ha demostrat anteriorment, els mutants *Δgrx5* i *Δiba57* presenten inestabilitat genòmica i dany constitutiu al DNA. A partir d'aquestes dades es va avaluar com resulta afectada la viabilitat cel·lular d'aquests mutants després d'un tractament amb agents genotòxics. Es van utilitzar dos compostos: i) MMS, que és un agent alquilant que provoca talls a la cadena del DNA, i ii) HU, que és un compost que inhibeix l'activitat RNR, reduint el nombre de dNTPs i conseqüentment provocant un retard en la replicació del DNA (estrès replicatiu).

Es van realitzar estudis de sensibilitat, afegint els components genotòxics en medi YPD sòlid, en la soca salvatge, *Δgrx5*, *Δssq1*, *Δiba57* i *Δisa1*, tots ells mutants en la maquinària ISC mitocondrial. Es van utilitzar dos mutants implicats en la transferència mitocondrial dels centres Fe-S de tipus [2Fe-2S] i [4Fe-4S], *Δgrx5* i *Δssq1*, i dos mutants involucrats en la maduració específica dels centres [4Fe-4S] mitocondrials, *Δiba57* i *Δisa1*. S'observa (**Figura 21A**) que en presència de MMS tots els mutants són hipersensibles, comparats amb la soca salvatge, encara que el mutant *Δgrx5* és el que manifesta un fenotip de sensibilitat més marcat. Pel que fa a la HU tots els mutants també són hipersensibles, encara que els mutants *Δiba57* i *Δisa1* són els que mostren un efecte més intens respecte la soca salvatge.

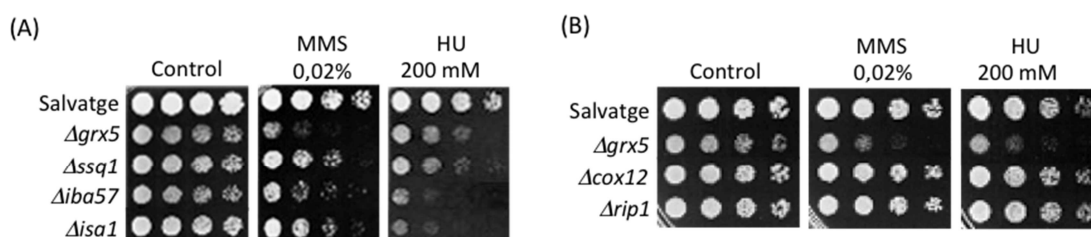


Figura 21. Diferents mutants en la maquinària ISC mitocondrial manifesten hipersensibilitat a agents genotòxics. A) Anàlisi de sensibilitat en plaques de YPD amb 0,02% de MMS o 200 mM de HU; les soques sembrades són: salvatge (CML235), *Δgrx5* (MML1500), *Δssq1* (MML1677), *Δiba57* (MML1678) i *Δisa1* (MML1732), en dilucions seriades a partir de cultius exponencials en medi YPD. B) Com l'aparat (A) amb les següents soques salvatge, *Δgrx5*, *Δcox12* (MML1700) i *Δrip1* (MML1701). Les plaques van ser incubades durant 3 dies a 30°C.

Donat que l'absència de les proteïnes anteriors, implicades en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S, també causa defectes en la fosforilació oxidativa mitocondrial, es va testar si els mutants Δcox12 i Δrip1 , defectius en la cadena de transport d'electrons però no en la síntesi de centres Fe-S, també eren hipersensibles a MMS i HU. Ambdós mutants no presenten hipersensibilitat als dos agents genotòxics (**Figura 21B**), indicant que la hipersensibilitat observada en els mutants ISC als agents és independent de defectes en la fosforilació oxidativa, al menys de manera directa.

Per verificar el fenotip d'hipersensibilitat que mostra el mutant Δgrx5 envers els agents que causen dany al DNA es va analitzar la pèrdua de viabilitat a causa d'un tractament a elevades dosis de MMS en el mutant condicional $\text{tetO}_7\text{-GRX5}$. Per dur a terme aquest estudi de viabilitat es va fer créixer el mutant $\text{tetO}_7\text{-GRX5}$ en medi YPD líquid en condicions exponencials; aleshores el cultiu es va dividir en dos i un d'ells es va tractar amb doxiciclina (5 $\mu\text{g/ml}$), mentre que el no tractat correspon al temps 0 hores (condicions control on encara s'expressa GRX5). Tant el cultiu control com els tractats durant 12 i 24 hores amb doxiciclina es van sotmetre a una elevada dosi de MMS (0,2%) durant 1 hora i a continuació es va determinar la supervivència sembrant dilucions seriades en plaques de YPD (**Figura 22**).

S'aprecia que la pèrdua de viabilitat causada pel MMS és molt superior en els cultiu on la doxiciclina ha provocat la depleció de Grx5 a les cèl·lules que en el cultiu (temps 0) on les cèl·lules disposen de Grx5 (**Figura 22**). Aquests resultats confirmen que és la manca de Grx5, i no altres efectes indirectes, la que provoca la hipersensibilitat a un agent genotòxic com el MMS.

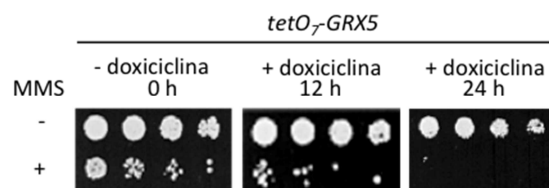


Figura 22. L'absència de Grx5 provoca una pèrdua severa de viabilitat després d'un tractament amb MMS. Anàlisi de viabilitat després d'un tractament de 60 min amb 0,2% de MMS en el mutant condicional $\text{tetO}_7\text{-GRX5}$ (MML1616) a temps 0, 12 i 24 hores en presència de doxiciclina (5 $\mu\text{g/ml}$). Veure el text pels detalls experimentals addicionals.

RESULTATS

Seguidament, es va voler avaluar si la presència de molècules de Grx5 sense activitat biològica també causaven una hipersensibilitat a agents genotòxics. Es va utilitzar un mutant (MML163, $\Delta grx5/GRX5-C60S$) on l'activitat de Grx5 és totalment suprimida a causa de la substitució del residu Cys60 del centre actiu per un residu de serina (Bellí et al., 2002). En aquestes condicions també s'aprecia una hipersensibilitat tant a MMS com a HU (**Figura 23**), el qual indica que és la manca d'activitat funcional de Grx5 i no la simple absència de la proteïna la responsable de la hipersensibilitat a genotòxics.

En resum, tots aquests resultats indiquen que els mutants implicats en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S mostren hipersensibilitat a agents genotòxics, i que almenys en el cas de Grx5 aquesta sensibilitat és deguda a l'absència de proteïna activa.

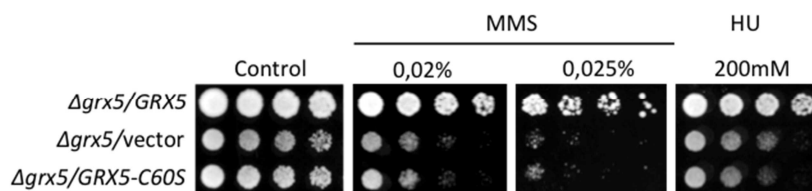


Figura 23. Hipersensibilitat a agents que causen dany al DNA en cèl·lules que expressen una mutació en el centre actiu de Grx5. Dilucions seriades de les soques $\Delta grx5/GRX5$ (MML161), $\Delta grx5/vector$ (MML160) i $\Delta grx5/GRX5-C60S$ (MML163) en medi sòlid YPD amb MMS a una concentració de 0,02% i 0,025% i HU a 200 mM. Les plaques van ser incubades durant 3 dies a 30°C.

1.4 L'absència de la proteïna Nbp35, involucrada en la maquinària CIA, causa lesions al DNA

Una proteïna citosòlica essencial en la maquinària CIA que permet l'ensamblatge de centres Fe-S per a proteïnes extramitocondrials és Nbp35 (veure l'aparat 1.3.3 de la **Introducció**). El mutant nul d'aquesta proteïna és inviable, de manera que es va construir un mutant condicional amb *NBP35* expressat sota el promotor *tetO₇*, per tal de determinar si també hi ha un dany al DNA quan la maquinària CIA citosòlica està compromesa.

Per determinar la presència de lesions al DNA en el mutant condicional *tetO₇-NBP35* es va observar si apareixien *foci* de Rad52-YFP quan es suprimia l'expressió de *NBP35*. Tal com mostra la **Figura 24**, el mutant condicional *tetO₇-NBP35* sense tractar amb doxiciclina mostra un percentatge de *foci* semblant al de la soca salvatge en la **Figura 19**, mentre que quan aquell es tracta durant 55 hores amb doxiciclina i es perd la proteïna Nbp35, el nombre de *foci* de Rad52-YFP augmenta significativament (3,6 vegades).

Aquest augment significatiu de *foci* de Rad52-YFP en absència de Nbp35 confirma que defectes en la maquinària citosòlica CIA, i per tant en la biogènesi de centres Fe-S extramitocondrials, també condueixen a danys al DNA.

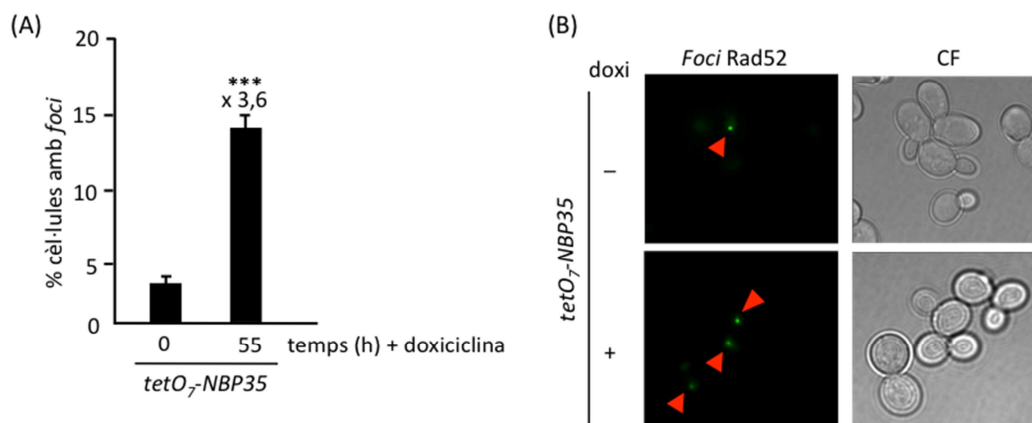


Figura 24. Increment en la formació de *foci* Rad52-YFP en absència de la proteïna citosòlica Nbp35. A) Percentatge de cèl·lules gemmades que contenen *foci* amb Rad52-YFP en el mutant condicional *tetO7-NBP35* (MML1924) a temps 0 i després de 55 hores de tractament amb doxiciclina (5 µg/ml). Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (± s.d.). B) Imatges dels *foci* amb Rad52-YFP en cultius sense tractar amb doxiciclina (-) i tractats durant 55 hores (+). Les imatges de l'esquerra corresponen a la fluorescència per YFP i les fletxes vermelles indiquen la localització dels *foci* associats a Rad52. Les imatges de la dreta mostren les mateixes cèl·lules per contrast de fases (CF).

2. L'ABSÈNCIA DE LES PROTEÏNES Grx5 O Iba57 CAUSA UN RETARD EN LA FASE S DEL CICLE CEL·LULAR

En presència de dany al DNA les cèl·lules disposen de diversos mecanismes de control del cicle cel·lular que condueixen a una aturada o un retard de la progressió del mateix per tal d'activar els mecanismes de reparació del dany.

Les lesions al DNA i la hipersensibilitat a HU observada en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ podria suggerir defectes constitutius en la replicació del DNA. Per aquest motiu, en primer lloc es van realitzar corbes de creixement en medi YPD líquid (**Figura 25**), on es va apreciar que tant el mutant $\Delta grx5$ com $\Delta iba57$ presentaven un creixement significativament més lent que el de la soca salvatge. Això no passava en el mutant mitocondrial $\Delta cox12$ no implicat en las biogènesi

RESULTATS

de centres Fe-S. En el cas del mutant $\Delta grx5$ aquest creixement encara era més lent que en el mutant $\Delta iba57$. Aquests resultats suggerien, doncs, problemes en la progressió del cicle cel·lular d'ambdós mutants.

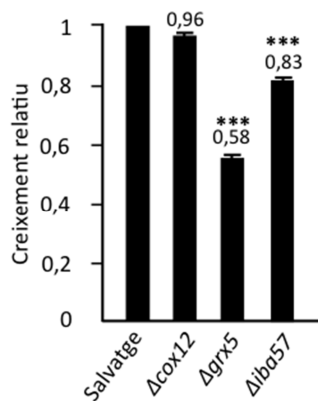


Figura 25. Els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ presenten un retard en el creixement cel·lular. Velocitat relativa de creixement en fase exponencial en medi YPD de la soca salvatge (CML235), $\Delta cox12$ (MML1700), $\Delta grx5$ (MML1500) i $\Delta iba57$ (MML1678). Les barres corresponen a la mitjana de sis experiments independents (\pm s.d.) i els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge.

En conseqüència, es va estudiar la progressió del cicle cel·lular mitjançant citometria de flux en cultius sincrònics, després d'una aturada en la fase G1 provocada pel tractament amb factor alfa. L'estudi es va realitzar amb les soques salvatge, $\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i el doble mutant $\Delta grx5\Delta iba57$, creixent en medi YPD. Després de l'alliberament de l'aturada amb factor alfa, es va realitzar un tractament amb una concentració subletal de HU (15 mM), mantenint una part del cultiu sense tractar com a control (**Figura 26**). Es van recollir i analitzar les mostres cada 15 min, tal com es descriu en l'apartat 8 de **Materials i Mètodes**.

La **Figura 26** mostra, en primer lloc, que la soca salvatge en cultius exponencials asincrònics té una porció similar de cèl·lules $1n$ (fase G1 del cicle cel·lular) i $2n$ (fase G2/M del cicle cel·lular). En canvi, tant en els mutants simples com en el doble mutant predominen les cèl·lules en $1n$. Aquest fet ja podria indicar defectes en la progressió del cicle cel·lular dels mutants afectats en la biogènesi de centres Fe-S. Seguidament, a l'analitzar la progressió del cicle cel·lular en cultius sincrònics s'observa que les soques mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ no tractades amb HU mostren un retard constitutiu de 15-30 minuts en la progressió del cicle cel·lular comparat amb la soca salvatge (**Figura 26**). Al tractar les soques amb una concentració de 15 mM de HU, s'aprecia un retard addicional en les mutants respecte la soca salvatge, essent més pronunciat

en el mutant *Δgrx5*. El doble mutant *Δgrx5Δiba57* es comporta com el mutant simple *Δgrx5*. Aquest efecte epistàtic concorda amb que Grx5 té una funció més general i actua en una etapa prèvia respecte Iba57 en la biogènesi de centres Fe-S.

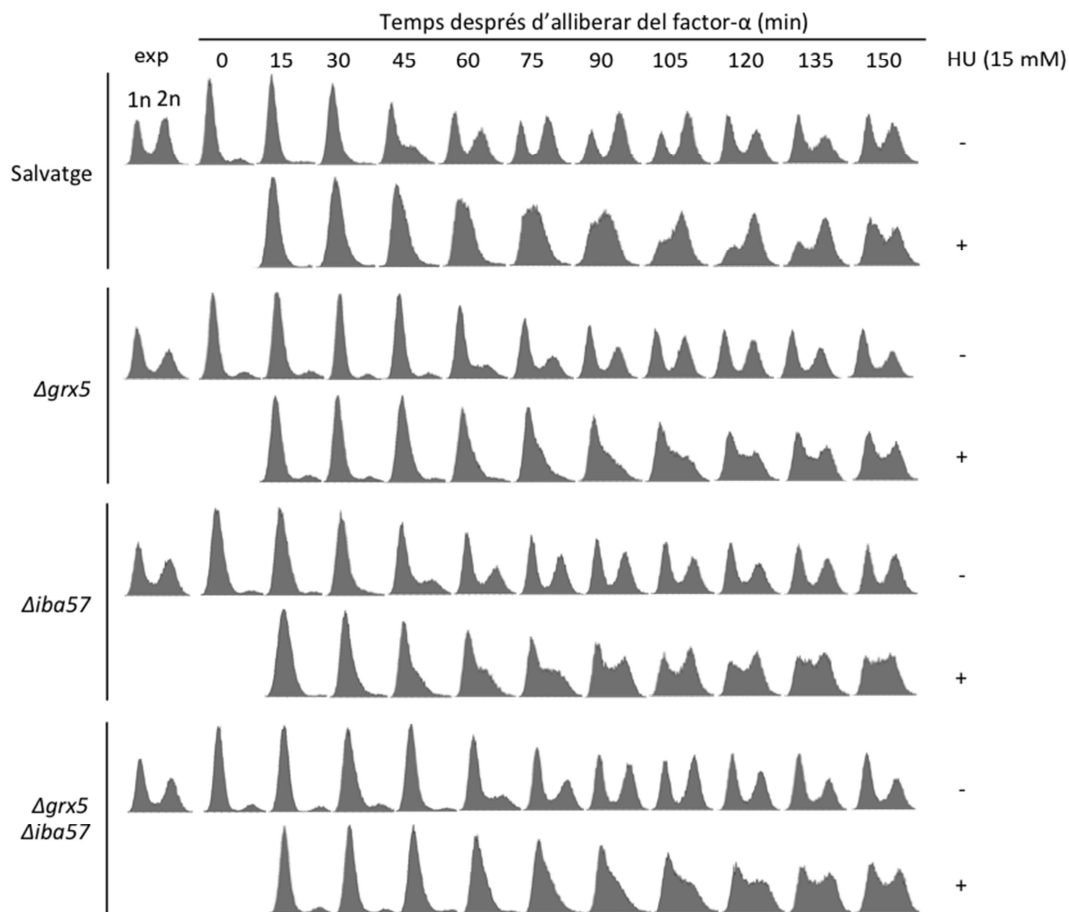


Figura 26. Retard en la fase S del cycle cel·lular en diferents mutants en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S. Es mostra la progressió del cycle cel·lular en la soca salvatge (CML235), *Δgrx5* (MML1500), *Δiba57* (MML1678) i *Δgrx5Δiba57* (MML1694). Cultius exponencials d'aquestes soques creixent en medi YPD es van sincronitzar en fase G1 del cycle cel·lular amb factor alfa, i a continuació es van alliberar de l'aturada en medi YPD sense cap tractament (-) o tractant amb 15 mM de HU (+). Les mostres per l'anàlisi per citometria de flux es van agafar als temps indicats, incloent també una mostra de cultius exponencials no sincrònics.

Aquestes dades confirmen que els mutants *Δgrx5* i *Δiba57* no poden progressar adequadament a través del cycle cel·lular, suggerint alteracions en la fase S per les dificultats de les cèl·lules per replicar correctament el DNA.

3. LA MANCA DE PROTEÏNES INVOLUCRADES EN LA MAQUINÀRIA ISC O CIA CAUSA UNA ACTIVACIÓ CONSTITUTIVA DEL *CHECKPOINT* DE DANY AL DNA

La progressió més lenta de la fase S del cicle cel·lular per una banda, així com l'existència de lesions constitutives al DNA (evidenciades per la fosforilació de la histona H2A i la formació de *foci* associats a Rad52) en els mutants en la maquinària ISC suggereixen una activació del *checkpoint* de dany al DNA. L'activació d'aquest sistema de control permetria activar els mecanismes de reparació del DNA o de tolerància al dany, per tal d'assegurar la supervivència cel·lular.

3.1 Els nivells de la proteïna Sml1 estan reduïts en absència de la funció de les maquinàries ISC o CIA

Ens vàrem preguntar, doncs, si aquestes evidències de dany al DNA observades en mutants en la biogènesi de centres Fe-S conduïen a l'activació del *checkpoint*. Per aquest motiu es va utilitzar un dels indicadors més sensibles de l'activació del *checkpoint* de dany al DNA, com és la degradació de la proteïna Sml1 (Barlow et al., 2008).

Amb l'objectiu esmentat, es van analitzar els nivells de proteïna Sml1 en el mutant condicional *tetO₇-GRX5*. Després d'afegir doxiciclina, i per tant, d'apagar l'expressió de *GRX5*, es va apreciar una reducció notable dels nivells de Sml1, indicant l'activació del *checkpoint* (**Figura 27A**). Aquesta disminució dels nivells de Sml1 encara es mostrava més agreujada quan es va realitzar un tractament amb una concentració de 0,1% de MMS durant 30 minuts en el mutant condicional tractat amb doxiciclina (temps 24 hores) en comparació amb la mostra a temps 0 on s'expressa *GRX5*.

D'altra banda, els nivells de mRNA de *SML1* en els mutants *Δgrx5*, *Δiba57* i *Δisa1* així com en el mutant condicional *tetO₇-GRX5* sense i amb addició de doxiciclina no variaven respecte la soca salvatge, tractada i sense tractar amb MMS, indicant que únicament efectes post-transcripcionals causaven la davallada dels nivells de Sml1 (**Figura 27B**).

També es va voler confirmar que la reducció dels nivells de Sml1 en absència de Grx5 era exclusiva de l'absència de l'activitat biològica d'aquesta proteïna. Per aquest motiu, es van observar els nivells de Sml1 en el mutant *Δgrx5/GRX5-C60S* (**Figura 27C**). En aquest mutant

també s'apreciava una degradació de Sml1, similar a la del mutant $\Delta grx5$, indicant que l'activació del *checkpoint* és deguda a l'absència de l'activitat funcional de Grx5.

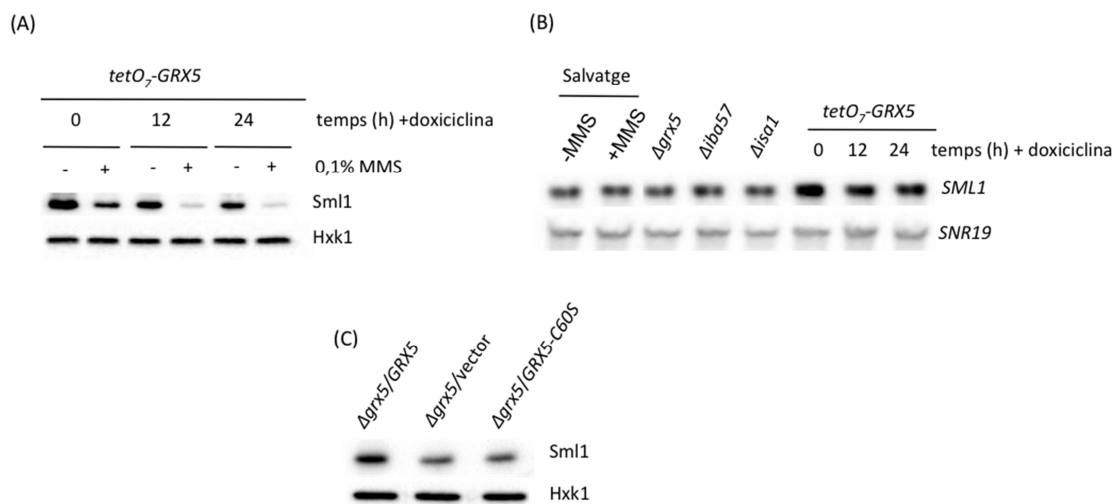


Figura 27. El *checkpoint* de dany al DNA està constitutivament actiu en absència de Grx5. A) Nivells de la proteïna Sml1 analitzats per Western blot en cultius del mutant condicional $tetO_7-GRX5$ (MML1616) a temps 0, 12 i 24 hores després d'afegir doxiciclina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sense tractar (-) o tractats (+) amb MMS 0,1% durant 30 min als temps indicats. B) Expressió dels nivells de mRNA, mitjançant Northern blot, del gen *SML1* en la soca salvatge (CML235) tractada amb 0,1% MMS durant 30 min (+) o sense tractar (-), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta iba57$ (MML1678), $\Delta isa1$ (MML1732) i el mutant condicional $tetO_7-GRX5$ a temps 0, 12 i 24 hores amb doxiciclina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Es va utilitzar com a control de càrrega el RNA de *SNR19*. C) Nivells de Sml1 en les soques $\Delta grx5/GRX5$ (MML161), $\Delta grx5/vector$ (MML160) i $\Delta grx5/GRX5-C60S$ (MML163) a partir de cultius exponencials, analitzats per Western blot. Es va utilitzar Hxk1 com a control de càrrega.

A continuació, es va analitzar si l'activació del *checkpoint* de dany al DNA es produïa en altres mutants en gens que codifiquen per proteïnes també implicades en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S (incloent tant les que participen en la maquinària central o comú de síntesi i, per tant en la regulació de l'homeòstasi del ferro, com d'altres implicades en la maduració de centres específics de Fe-S, que no tenen relació amb l'homeòstasi del ferro), així com en la biogènesi citosòlica. Així doncs, es va estudiar el nivells de Sml1 en els mutants en la maquinària mitocondrial $\Delta grx5$, $\Delta ssq1$, $\Delta iba57$ i $\Delta isa1$, i en el mutant condicional en la maquinària citosòlica $tetO_7-NBP35$. Com a control es va utilitzar el mutant $\Delta cox12$, que codifica per una proteïna mitocondrial no relacionada amb la biosíntesi de centres Fe-S (**Figura 28**).

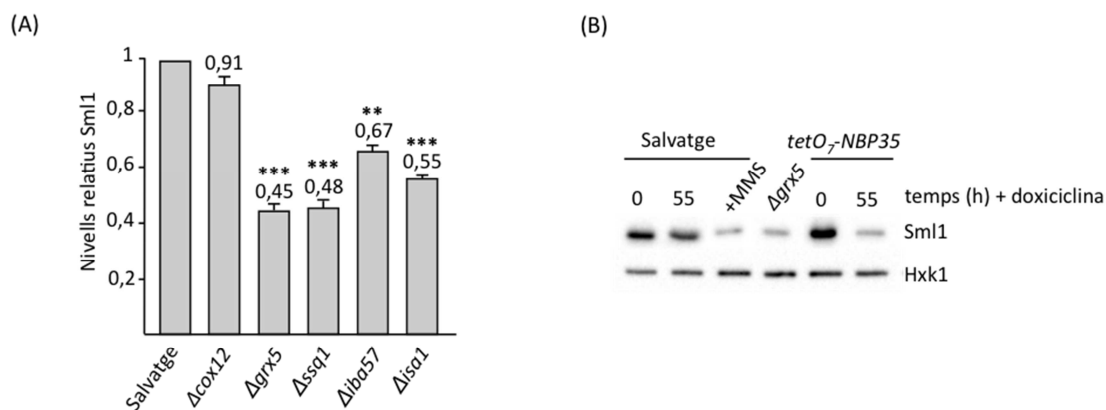


Figura 28. Activació del *checkpoint* de dany al DNA en absència de proteïnes mitocondrials i citosòliques involucrades en la biogènesi de centres Fe-S. A) Quantificació dels nivells de Sml1, a partir d’anàlisi per Western blot, en la soca salvatge (CML235), Δ cox12 (MML1700), Δ grx5 (MML1500), Δ ssq1 (MML1677), Δ iba57 (MML1678) i Δ isa1 (MML1732), relativitzats respecte a la soca salvatge. Les barres corresponen a la mitjana de sis experiments independents (\pm s.d.). B) Anàlisi per Western blot dels nivells de Sml1 en la soca salvatge (tractada amb doxiciclina a 5 μ g/ml durant 55 hores, o amb MMS a 0,1% durant 30 min), Δ grx5 (MML1500) sense tractament, i el mutant condicional *tetO₇-NBP35* (MML1924) a temps 0 i 55 hores de tractament amb doxiciclina. Es va utilitzar Hxk1 com a control de càrrega.

Els resultats van mostrar una disminució significativa dels nivells de Sml1 en absència de qualsevol de les proteïnes mitocondrials implicades en la biogènesi de centres Fe-S, indicant l’activació del *checkpoint* de dany al DNA. En contrast, la manca de Cox12 no sembla activar el *checkpoint* de dany al DNA (**Figura 28A**).

Per altra banda, la **Figura 28B** mostra els nivells de Sml1 en absència de la proteïna citosòlica Nbp35. A les 55 hores de tractar el mutant condicional *tetO₇-NBP35* amb doxiciclina s’aprecia que els nivells de Sml1 disminueixen significativament, com en el cas del mutant Δ grx5 o bé de la soca salvatge tractada amb 0,1% de MMS durant 30 minuts, indicant que quan es compromet la maquinària CIA el *checkpoint* de dany al DNA també s’activa. Com a control, es mostra que un tractament perllongat amb doxiciclina no causa cap alteració en els nivells de la proteïna Sml1 en la soca salvatge (**Figura 28B**).

Els nivells de Sml1 varien al llarg del cicle cel·lular, disminuint fins a 6 vegades en la fase S respecte la fase G1 i fins a 9 vegades respecte la fase G2/M del cicle cel·lular, per tal que el complex RNR pugui sintetitzar més dNTPs per dur a terme la replicació del DNA o per reparar els possibles danys al DNA (Zhao et al., 2001). Per tal de comprovar que la major degradació de Sml1 no és deguda a l’allargament de la fase S que succeeix en l’absència de Grx5 i Iba57, es

van determinar els nivells de Sml1 en cultius sincrònics dels mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$, i es van comparar amb els de la soca salvatge (**Figura 29**).

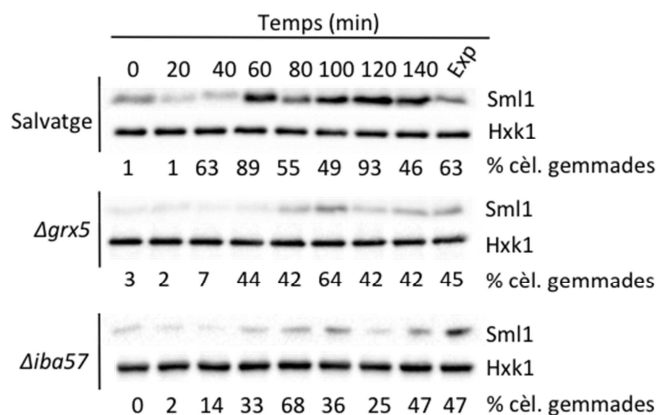


Figura 29. La degradació de Sml1 no és deguda a l'allargament de fase S en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$. Es mostren els nivells de proteïna Sml1, analitzats mitjançant Western blot, en la soca salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500) i $\Delta iba57$ (MML1678), a partir de cultius exponencials sincronitzats amb factor alfa en fase G1 i alliberats de l'aturada a temps 0. Les mostres es van recollir en els temps indicats (min). Es mostren també els nivells de Sml1 en cultius exponencials asincrònics, així com el percentatge de cèl·lules gemmades en cada punt. Es va utilitzar Hxk1 com a control de càrrega.

Ambdós mutants presenten un retard en l'acumulació de Sml1 respecte la soca salvatge, que és paral·lel al retard observat en la progressió del cicle cel·lular (observar la **Figura 26**). No obstant això, s'aprecia una disminució significativa dels nivells de proteïna Sml1 en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ respecte la soca salvatge al llarg de tot el cicle cel·lular (**Figura 29**), fet que indica que l'activació del *checkpoint* de dany al DNA es produeix de manera independent del retard en fase S del cicle cel·lular observat en aquest mutants.

El mutant $\Delta grx5$ té alterada la regulació de l'homeòstasi de ferro, amb el factor transcripcional Af1 activat constitutivament (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002), a diferència del mutant $\Delta iba57$ (veure l'apartat 1.5 de la **Introducció**). En conseqüència, un dels fenotips del mutant $\Delta grx5$ és l'acumulació de ferro intracel·lular (**Figura 20**). Per aquesta raó ens vàrem preguntar si l'acumulació de ferro podia influenciar en l'activació del *checkpoint* de dany al DNA. Donat que Fet3 participa en el procés d'alta afinitat de captació de ferro, es va construir un doble mutant $\Delta grx5\Delta fet3$, el qual no acumula excés de ferro ni tampoc presenta uns nivells insuficients d'aquest, ja que el sistema de captació de ferro de baixa afinitat controlat per Fet4 encara roman funcional (C. Maria, Tesis Doctoral, Universitat de Lleida, 2014). En aquestes

RESULTATS

condicions es van analitzar els nivells de Sml1 (**Figura 30**), apreciant que el doble mutant $\Delta grx5\Delta fet3$ té aproximadament els mateixos nivells de Sml1 que el mutant $\Delta grx5$, fet que confirma que l'activació del *checkpoint* no és conseqüència de l'acumulació intracel·lular de ferro que presenta el mutant $\Delta grx5$.

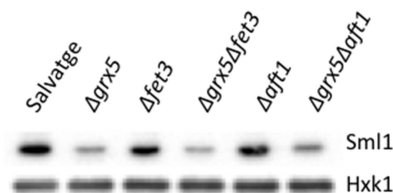


Figura 30. La degradació de Sml1 en el mutant $\Delta grx5$ és independent de l'acumulació intracel·lular de ferro. Es mostren els nivells de proteïna Sml1, analitzats per Western blot, en cultius de la soca salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta fet3$ (MML1801), $\Delta grx5\Delta fet3$ (MML1818), $\Delta aft1$ (MML1813) i $\Delta grx5\Delta aft1$ (MML1853). Es va utilitzar Hxk1 com a control de càrrega.

Seguidament, per descartar que l'activació del factor transcripcional Aft1 jugués un paper en la degradació dels nivells de proteïna Sml1 en el mutant $\Delta grx5$ es va analitzar si les cèl·lules a les que els hi falta *AFT1* mostren uns nivells de proteïna Sml1 igual que la soca salvatge. Efectivament, Sml1 només es degrada quan falta Grx5, i així el doble mutant $\Delta grx5\Delta aft1$ mostra nivells similars als del mutant simple $\Delta grx5$ (**Figura 30**), indicant que el factor Aft1 no afecta els nivells de la proteïna Sml1 ni en presència ni en absència de Grx5.

En resum, quan les maquinàries mitocondrial o citosòlica de biogènesi de centres Fe-S estan danyades es produeix una activació constitutiva del *checkpoint* de dany al DNA, manifestada per la degradació de Sml1.

3.2 La degradació de Sml1 en el mutant $\Delta grx5$ depèn de les vies de degradació a través de la vacuola i del proteosoma 26S

En resposta a dany al DNA, la fosforilació i ubiquitinització de la proteïna Sml1 promou la seva degradació a través del proteosoma 26S, alleugerint la inhibició del complex RNR (Andreson et al., 2010). No obstant, s'ha observat en estudis recents que en condicions de depleció de ferro del medi, ja sigui utilitzant el quelant BPS o curcumina, s'indueix la degradació de Sml1 mitjançant la combinació de les vies proteosòmica i vacuolar (Azad et al., 2013; Sanvisens et al., 2014).

Per tal de determinar si la degradació de la proteïna Sml1 en el mutant $\Delta grx5$ depèn de la via vacuolar o de la del proteosoma 26S, es va tractar el mutant $\Delta grx5$ durant 90 minuts amb l'inhibidor del proteosoma MG-132, amb l'inhibidor vacuolar PMSF, o bé amb la combinació d'ambdós inhibidors, tal com es descriu en Azad et al. (2013). Seguidament es van estudiar el nivells de la proteïna Sml1 (**Figura 31**), apreciant que la degradació de Sml1 en el mutant $\Delta grx5$ depèn de les dues vies degradadores, de manera que únicament quan es combinen els dos inhibidors alhora els nivells de Sml1 són com els de la soca salvatge.

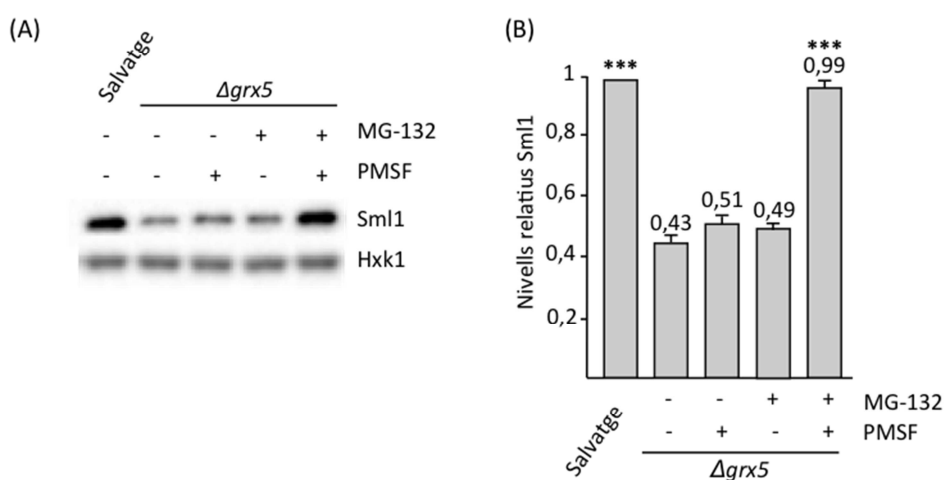


Figura 31. La degradació de Sml1 en el mutant $\Delta grx5$ depèn de la via del proteosoma 26S i de la vacuola. A) Anàlisi, mitjançant Western blot, dels nivells de la proteïna Sml1 en la soca salvatge (CML235) utilitzada com a control i el mutant $\Delta grx5$ (MML1500) tractat durant 90 min amb 100 μ M de l'inhibidor MG-132, amb 1 mM de l'inhibidor PMSF, o amb la combinació d'ambdós inhibidors, així com el control sense inhibidors només amb el solvent DMSO. Com a control de càrrega es va utilitzar Hxk1. B) Quantificació dels nivells de la proteïna Sml1 en la soca salvatge i el mutant $\Delta grx5$ amb els inhibidors utilitzats en (A), relativitzant respecte a la soca salvatge. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d.). El test estadístic Tukey-Kramer es va aplicar utilitzant el mutant $\Delta grx5$ sense cap tractament com a referència.

3.3 La disrupció de SML1 en el mutant $\Delta grx5$ no rescata el fenotip de creixement ni la sensibilitat a agents genotòxics

Atès que el mutant $\Delta grx5$ té alterats els nivells de ferro (Rodríguez-Manzanaque et al., 2002) i que el complex RNR necessita ferro per la síntesi de dNTPs (Reichard et al., 1988), es va hipotetitzar que l'alentiment en el creixement del mutant, i concretament en la fase S del cicle

RESULTATS

cel·lular, podia ser resultat d'una disminució de l'activitat RNR amb la conseqüent escassetat de dNTPs.

Per tant, es va eliminar el gen *SML1* en la soca $\Delta grx5$, per tal d'augmentar l'activitat RNR i conseqüentment la producció de dNTPs. Una vegada construït el doble mutant $\Delta grx5\Delta sm11$ es va analitzar el creixement cel·lular i la sensibilitat a MMS i HU (**Figura 32**). No es van observar diferències significatives en el creixement cel·lular entre el mutant $\Delta grx5$ i el doble mutant $\Delta grx5\Delta sm11$ (**Figura 32A**), indicant que el retard del mutant $\Delta grx5$ no és causat per la baixa activitat del complex RNR. El mateix passa respecte a les sensibilitats a agents genotòxics, de manera que el doble mutant $\Delta grx5\Delta sm11$ mostra la mateixa sensibilitat que el mutant $\Delta grx5$ a MMS i HU (**Figura 32B**).

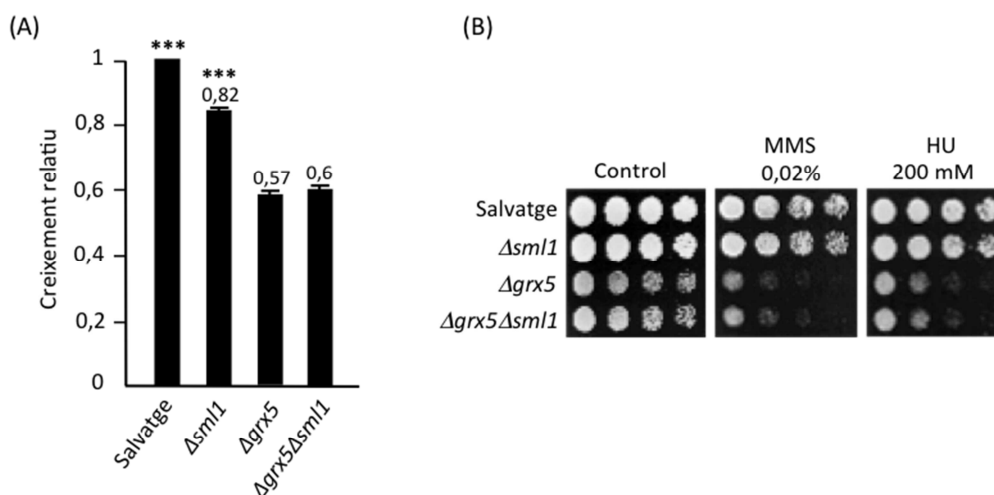


Figura 32. La manca de *SML1* no rescata els defectes en el creixement ni la sensibilitat a MMS i HU del mutant $\Delta grx5$. A) Velocitat de creixement exponencial en medi YPD de les soques $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta sm11$ (MML1620) i $\Delta grx5\Delta sm11$ (MML1666), relativitzada respecte la soca salvatge (CML235). Les barres corresponen a la mitjana de cinc experiments independents (\pm s.d.). El test estadístic Tukey-Kramer es va aplicar utilitzant el mutant $\Delta grx5$ com a referència. B) Dilucions sèriades de la soca salvatge, $\Delta grx5$, $\Delta sm11$ i $\Delta grx5\Delta sm11$ en medi sòlid YPD amb MMS (0,02%) o HU (200 mM). Les plaques van ser incubades durant 3 dies a 30°C.

4. CARACTERITZACIÓ DEL CHECKPOINT DE DANY AL DNA EN ELS MUTANTS

Δgrx5 i *Δiba57*

En aquest apartat es descriuen els estudis realitzats per caracteritzar la dependència dels diferents mediadors del *checkpoint* de dany al DNA en els mutants en la maquinària ISC *Δgrx5* i *Δiba57* i en el mutant condicional *tetO₇-NBP35* de la maquinària CIA. L'objectiu era determinar si l'activació del *checkpoint* seguia la via canònica Mec1/Rad53/Dun1, tal com s'activa després d'un dany causat per un agent genotòxic, o bé seguia un patró totalment diferent, com podria ser el cas de l'activació per depleció de ferro, on Sml1 és degradat de manera dependent de Dun1 però independent de Mec1 i Rad53 (Sanvisens et al., 2014).

4.1 L'activació del *checkpoint* de dany al DNA en els mutants *Δgrx5* i *Δiba57* no depèn de la quinasa Tel1

Un component central del *checkpoint* de dany al DNA és la quinasa Tel1 (ATM en humans). Es va analitzar, doncs, la participació de Tel1 en la degradació de Sml1 en els mutants *Δgrx5* i *Δiba57*.

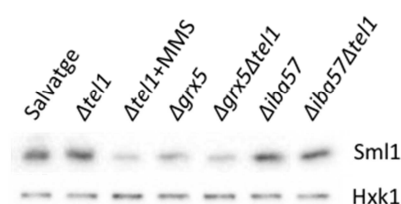


Figura 33. La quinasa Tel1 no intervé en la degradació de Sml1 en els mutants *Δgrx5* i *Δiba57*. Anàlisi mitjançant Western blot dels nivells de la proteïna Sml1 en cultius exponencials de la soca salvatge (CML235), *Δtel1* (MML1836), *Δgrx5* (MML1500), *Δiba57* (MML1678), *Δgrx5Δtel1* (MML1831) i *Δiba57Δtel1* (MML1834). La soca MML1836 és va tractar també amb 0,1% de MMS durant 30 min. Com a control de càrrega es va utilitzar Hxk1.

Els nivells de Sml1 en els dobles mutants *Δgrx5Δtel1* i *Δiba57Δtel1* són idèntics que en els respectius mutants simples (**Figura 33**), indicant que Tel1 no juga cap paper en la degradació de Sml1, ni per tant en l'activació del *checkpoint* en aquestes condicions.

RESULTATS

4.2 La quinasa Mec1 participa en la degradació de Sml1 en absència d'Iba57 o Nbp35 però no en absència de Grx5

Donat que la quinasa Tel1 no juga cap paper en l'activació del *checkpoint* de dany al DNA en absència de Grx5 o Iba57, es va estudiar el paper de la quinasa Mec1 (ATR en humans). Mec1 inicia una regulació en cascada de diverses quinases per tal d'activar el *checkpoint* i promoure l'increment de dNTPs per reparar el dany. Tal com s'ha descrit en l'apartat 3.3.1 de la **Introducció**, el mutant $\Delta mec1$ és inviable, i per aquest motiu es va construir el mutant $\Delta mec1\Delta dif1$, ja que la deleció de *DIF1* suprimeix la letalitat del mutant $\Delta mec1$ (Wu i Huang, 2008). A l'observar els nivells de Sml1 en la soca salvatge, el mutant $\Delta dif1$ i el doble mutant $\Delta dif1\Delta mec1$ s'aprecia que són semblants en tots els casos (**Figura 34A**) demostrant que les mutacions no afecten els nivells constitutius de Sml1.

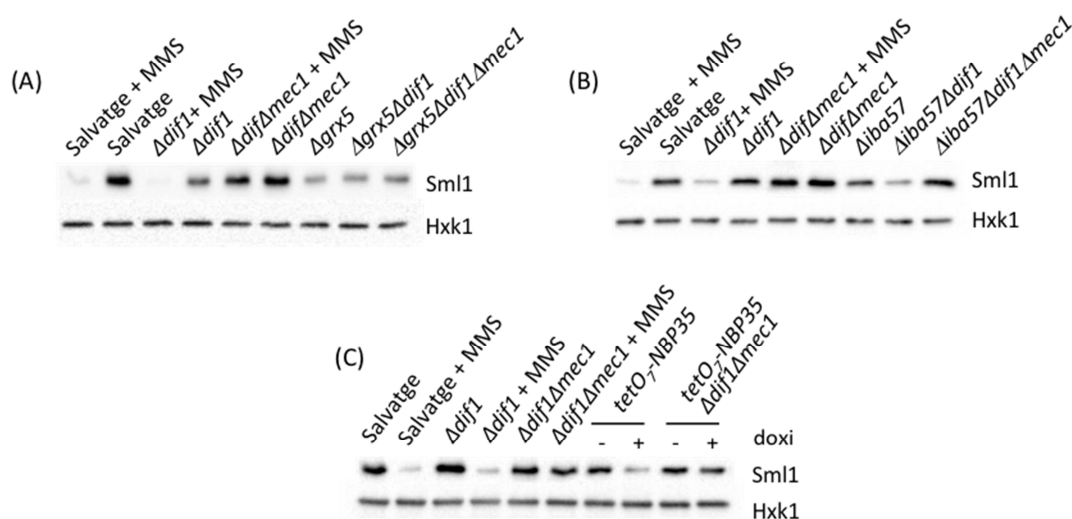


Figura 34. La degradació de Sml1 en absència d'Iba57 o Nbp35 és dependent de Mec1, a diferència del mutant $\Delta grx5$. A) Nivells de Sml1, analitzats per Western blot, en cultius exponencials de les soques salvatge (CML235), $\Delta dif1$ (MML1896), $\Delta dif1\Delta mec1$ (MML1898), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta grx5\Delta dif1$ (MML1899) i $\Delta grx5\Delta dif1\Delta mec1$ (MML1901). Algunes d'aquestes es van tractar també amb 0,1% de MMS durant 30 min. B) Com l'apartat (A) utilitzant les soques salvatge, $\Delta dif1$, $\Delta dif1\Delta mec1$, $\Delta iba57$ (MML1678), $\Delta iba57\Delta dif1$ (MML1902) i $\Delta iba57\Delta dif1\Delta mec1$ (MML1904). C) Com als apartats (A) i (B) utilitzant les soques salvatge, $\Delta dif1$, $\Delta dif1\Delta mec1$, $tetO_{-}NBP35$ (MML1924) i $tetO_{-}NBP35\Delta dif1\Delta mec1$ (MML1999). Com a control de càrrega es va utilitzar Hck1.

El doble mutant $\Delta grx5\Delta dif1$ mostra els mateixos nivells de Sml1 que el mutant $\Delta grx5$ indicant que l'absència de Dif1 no altera els nivells de Sml1 en absència de Grx5 (**Figura 34A**). Per la seva banda, en el triple mutant $\Delta grx5\Delta dif1\Delta mec1$ els nivells de Sml1 no varien respecte el

mutant simple $\Delta grx5$, indicant que la degradació de la proteïna Sml1 en absència de Grx5 és independent de Mec1. Per altra banda, en el cas del mutant $\Delta iba57$, quan es deleciona *DIF1* i *MEC1* s'aprecia un augment de la proteïna Sml1 respecte el mutant simple $\Delta iba57$, arribant a nivells de la soca salvatge (**Figura 34B**). Aquest fet mostra que en absència d'Iba57 la degradació de Sml1 i la respectiva activació del *checkpoint* sí que depèn de la quinasa Mec1. Finalment, en el cas del mutant condicional $tetO_{-}NBP35\Delta dif1\Delta mec1$ tractat amb doxiciclina i per tant sense expressió de *NBP35*, els nivells de Sml1 no baixen com el cas del mutant $tetO_{-}NBP35$ amb doxiciclina, indicant que la degradació de Sml1 també és dependent de Mec1 en absència de Nbp35 (**Figura 34C**).

4.3 La degradació de Sml1 és dependent de Dun1 en els mutants $\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i $tetO_{-}NBP35$

En resposta a un estrès genotòxic o en condicions de depleció de ferro del medi la quinasa Dun1 fosforila Sml1 i en promou la seva degradació (Sanvisens et al., 2014; Uchiki et al., 2004; Zhao i Rothstein, 2002). Per estudiar si Dun1 participa en la regulació dels nivells de Sml1 en absència de Grx5, d'Iba57 o de Nbp35 es va introduir la mutació $\Delta dun1$ en els corresponents mutants en les maquinàries ISC i CIA.

En primer lloc, es va estudiar la participació de Dun1 en absència de Grx5, ja sigui utilitzant el mutant condicional $tetO_{-}GRX5$ o bé el mutant nul $\Delta grx5$. Quan s'observen els nivells de Sml1 en el mutant $tetO_{-}GRX5\Delta dun1$ a les 24 hores de tractament amb doxiciclina (**Figura 35A**) o bé en el doble mutant $\Delta grx5\Delta dun1$ (**Figura 35B**) s'aprecia que aquells són respectivament superiors en comparació amb el mutant condicional $tetO_{-}GRX5$ sense tractar amb doxiciclina o el mutant $\Delta grx5$, indicant que l'activitat quinasa Dun1 és necessària per la reducció dels nivells de la proteïna Sml1 en absència de Grx5.

En absència d'Iba57, Dun1 també juga un paper en la reducció dels nivells de Sml1. Així, els nivells de Sml1 del doble mutant $\Delta iba57\Delta dun1$ mostren un increment significatiu respecte el mutant $\Delta iba57$, arribant als nivells de la soca salvatge, fet indicatiu de la dependència de Dun1 en la degradació de Sml1 quan Iba57 no és present (**Figura 35B**).

Adicionalment, es va realitzar una corba de creixement en medi YPD, sense tractament o bé tractant amb 0,0075% de MMS o amb 40 mM de HU (**Figura 35C**). En ambdós casos els dobles mutants $\Delta grx5\Delta dun1$ i $\Delta iba57\Delta dun1$ presenten un creixement constitutiu més lent que els respectius mutants simples i a més, mostren una sensibilitat significativa quan són tractats

RESULTATS

amb MMS i HU. Aquests resultats recolzen que la quinasa Dun1 juga un paper fisiològic molt important en les cèl·lules absents de Grx5 o Iba57 mitjançant la reducció dels nivells de la proteïna Sml1.

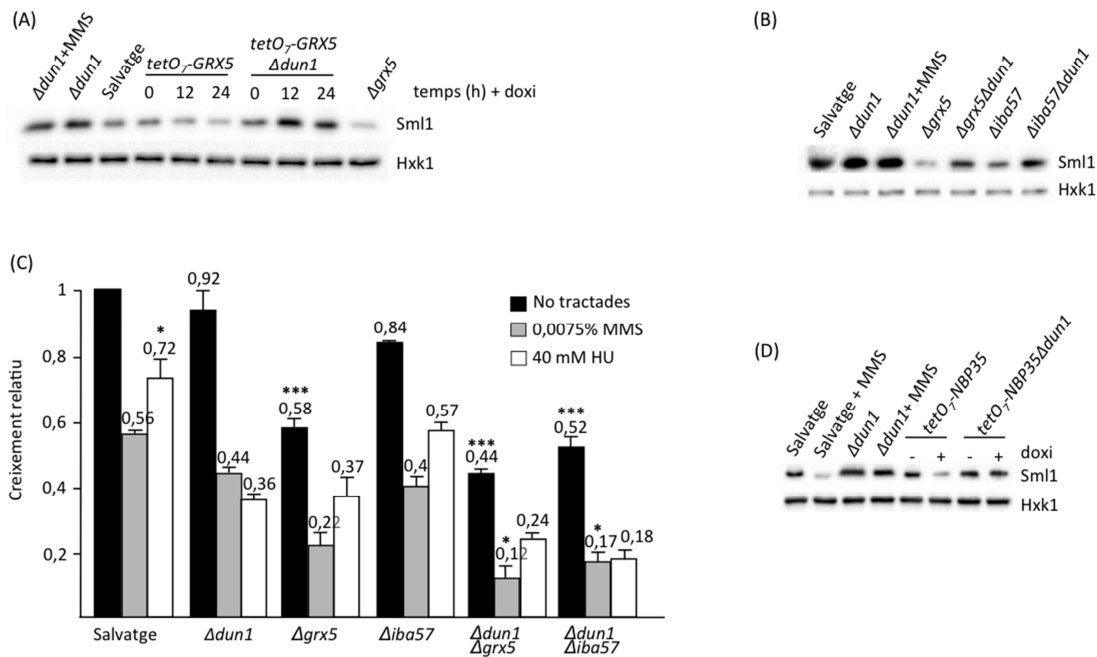


Figura 35. L'activitat de la quinasa Dun1 és necessària per la degradació de Sml1 en absència de Grx5, Iba57 i Nbp35. A) Nivells de Sml1, analitzats per Western blot, en les soques salvatge (CML235), $\Delta dun1$ (MML1798), $tetO_{7-GRX5}$ (MML1616), $tetO_{7-GRX5} \Delta dun1$ (MML1800) i $\Delta grx5$ (MML1500). Els mutants condicionals es van tractar durant 0, 12 i 24 hores amb doxiciclina a una concentració de 5 μ g/ml, mentre que la soca $\Delta dun1$ es va tractar amb 0,1% de MMS durant 30 min. B) Com a l'aparat (A), utilitzant la soca salvatge, $\Delta dun1$, $\Delta grx5 \Delta dun1$ (MML1826), $\Delta iba57$ (MML1678) i $\Delta iba57 \Delta dun1$ (MML1828). C) Velocitat de creixement exponencial de la soca salvatge, $\Delta dun1$, $\Delta grx5$, $\Delta iba57$, $\Delta grx5 \Delta dun1$ i $\Delta iba57 \Delta dun1$, no tractades i tractades amb 0,0075% de MMS i 40mM de HU. Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge sense tractar. Les barres corresponen a la mitjana de cinc experiments independents (\pm s.d.). El test estadístic Tukey-Kramer es va aplicar utilitzant el mutant $\Delta dun1$ com a referència. D) Com als apartats (A) i (B) utilitzant la soca salvatge, $\Delta dun1$, $tetO_{7-NBP35}$ (MML1924) i $tetO_{7-NBP35} \Delta dun1$ (MML1997). Com a control de càrrega es va utilitzar Hxk1.

Finalment es va determinar si la quinasa Dun1 també està relacionada amb la degradació dels nivells de Sml1 en absència de la proteïna citosòlica Nbp35. A l'observar els nivells de Sml1 en el mutant condicional $tetO_{7-NBP35}$ tractat amb doxiciclina hi ha una davallada, tal com s'havia descrit anteriorment; però en el cas del $tetO_{7-NBP35} \Delta dun1$ tractat amb doxiciclina, aquests

nivells són com els de la soca salvatge (**Figura 35D**), indicant que la degradació de Sml1 en absència de Nbp35 és controlada per Dun1.

En resum, Dun1 sembla tenir un paper molt important en la reducció dels nivells de Sml1 quan la biogènesi de centres Fe-S està danyada, ja sigui a nivell mitocondrial o citosòlic.

4.4 La disminució dels nivells de Sml1 en absència de Grx5 o Iba57 és independent de la quinasa Rad53

Estudis previs havien demostrat que la quinasa Rad53 és necessària per activar Dun1 i la conseqüent degradació de Sml1 tant en resposta a un estrès genotòxic com en la fase S del cicle cel·lular (veure l'aparat 3.3.1 de la **Introducció**). *RAD53* és un gen essencial, però la seva absència pot ser rescatada a conseqüència d'alguna mutació puntual o incrementant els nivells de dNTPs (Allen et al., 1994).

En primer lloc es va determinar mitjançant Western blot si la quinasa Rad53 es fosforila en absència de Grx5 o Iba57, tal com passa quan es produeix un estrès genotòxic causat per MMS o HU (Chen et al., 2007). Tal com mostra la **Figura 36A**, no hi ha hiperfosforilació constitutiva (i per tant canvi en la mobilitat electroforètica) en els mutants $\Delta grx5$ o $\Delta iba57$ respecte la soca salvatge, tot i que al tractar amb 0,1% de MMS durant 30 minuts s'observa una hiperfosforilació clarament més intensa en els mutants. Aquestes observacions en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ suggereixen que Rad53 no està implicada en l'activació constitutiva del *checkpoint*.

Per confirmar la independència de Rad53 en el procés d'activació del *checkpoint* de dany al DNA en els mutants en la maquinària ISC, es va treballar amb un mutant de *RAD53* que permet mantenir la viabilitat cel·lular, concretament el mutant *rad53(K227A)*. Aquest mutant té una molt baixa activitat quinasa de Rad53, mantenint un nivell normal de dNTPs (Hoch et al., 2013). La **Figura 36B** mostra que els nivells de Sml1 en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta grx5 rad53(K227A)$ són en ambdós casos menors que en la soca salvatge, i que inclús disminueixen encara una mica més en absència d'activitat Rad53, suggerint que Rad53 no té cap implicació en la reducció dels nivells de Sml1 en absència de Grx5. Resultats similars s'observen en l'absència d'Iba57 (**Figura 36B**).

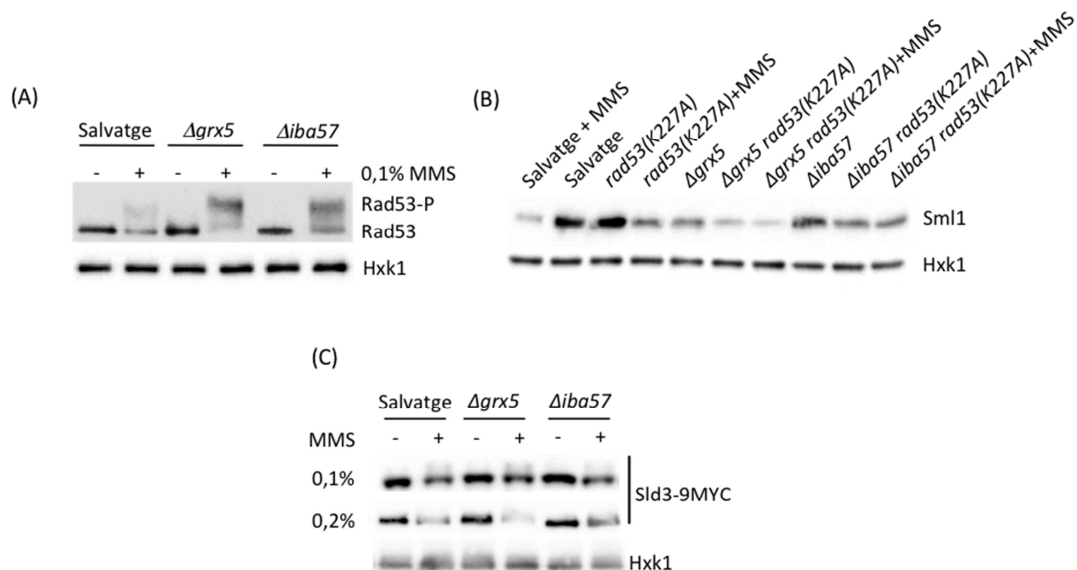


Figura 36. L'activació del *checkpoint* de dany al DNA en els mutants Δ *grx5* o Δ *iba57* és independent de la quinasa Rad53. A) Nivells de fosforilació de Rad53 en cèl·lules tractades i no tractades amb 0,1% de MMS durant 30 min. Rad53-P indica la forma fosforilada. Les mostres es van obtenir de cultius exponencials de les soques salvatge (CML235), Δ *grx5* (MML1500) i Δ *iba57* (MM1678). B) Nivells de la proteïna Sml1, analitzats per Western blot, en les soques salvatge, *rad53(K227A)* (MML1944), Δ *grx5*, Δ *grx5 rad53(K227A)* (MML1945), Δ *iba57*, Δ *iba57 rad53(K227A)* (MML1947). En els casos que s'indica es va realitzar un tractament de 30 min amb 0,1% de MMS. C) Nivells de Sld3-MYC en la soca salvatge Sld3-9MYC (MML2012), Δ *grx5* Sld3-9MYC (MML2013) i Δ *iba57* Sld3-9MYC (MML2014), sense (-) o amb (+) un tractament de 0,1% o 0,2% de MMS durant 30 min. Com a control de càrrega es va utilitzar Hxk1.

Finalment, per confirmar que Rad53 no juga cap paper en l'activació del *checkpoint* de dany al DNA es va fer un experiment control analitzant la fosforilació de Sld3, que és una proteïna necessària per la replicació del DNA que es fosforila de manera dependent de Rad53 i independent de Dun1 en resposta a un estrès genotòxic (Lopez-Mosqueda et al., 2010). En aquest cas, a nivell basal (sense tractament amb MMS) no s'observen diferències entre els mutants ISC i la soca salvatge (**Figura 36C**), recolzant que l'activació de Rad53 no és necessària per la reducció dels nivells de Sml1 en els diferents mutants ISC. Al tractar amb MMS es veu un lleuger canvi en la mobilitat electroforètica i una disminució en els nivells de proteïna, similar en tots els casos que assenyalaria la degradació, conseqüent de la fosforilació prèvia de la proteïna Sld3 en resposta a agents genotòxics.

4.5 La quinasa Chk1 és necessària per activar Dun1 en absència d'Iba57, però no en absència de Grx5

Mec1 és una de les principal quinases del *checkpoint* de dany al DNA, la qual reconeix un motiu en les quinases Rad53 i Chk1, promovent la seva activació (com es mostra en la **Figura 9** de la **Introducció**) (Sanchez et al., 1999). A més a més, Chk1 també està involucrada en el *checkpoint* de dany en fase G2/M, promovent l'aturada del cicle en aquesta fase. Ens vàrem preguntar, doncs, per la possible implicació de la quinasa Chk1, activada per Mec1, en la degradació de Sml1 via fosforilació de Dun1.

Amb l'objectiu de respondre a aquesta pregunta es van construir els dobles mutants $\Delta grx5\Delta chk1$ i $\Delta iba57\Delta chk1$ i es van analitzar els nivells de Sml1 en ells. Com mostra la **Figura 37A** els nivells de Sml1 en el doble mutant $\Delta iba57\Delta chk1$ són superiors als del mutant $\Delta iba57$ i iguals als de la soca salvatge. Per contra, la proteïna Sml1 presenta els mateixos nivells reduïts en el mutant $\Delta grx5$ i en el doble mutant $\Delta grx5\Delta chk1$. Aquests resultats suggereixen que Chk1 dependria de la resposta de Mec1 i actuaria com un mediador per tal d'activar la senyalització del *checkpoint* per degradar Sml1 en el cas de les cèl·lules absents de la proteïna Iba57, però no en el cas del mutant $\Delta grx5$.

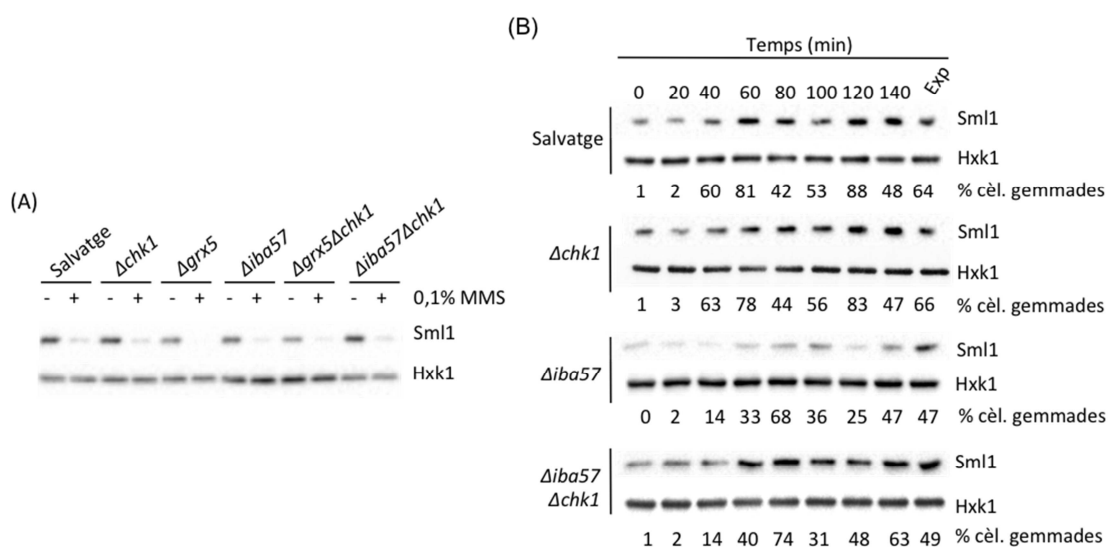


Figura 37. La quinasa Chk1 juga un paper en la senyalització de la degradació de Sml1 en absència d'Iba57, però no en absència de Grx5. A) Nivells de la proteïna Sml1, analitzats per Western blot, a partir de cultius exponencials de les soques salvatge (CML235), $\Delta chk1$ (MML2019), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta grx5\Delta chk1$ (MML2030), $\Delta iba57$ (MML1678) i $\Delta iba57\Delta chk1$ (MML2032). B) Nivells de la proteïna Sml1 en cultius sincrònics de la soca salvatge, $\Delta chk1$ (MML2064), $\Delta iba57$ i $\Delta iba57\Delta chk1$, alliberats de l'aturada en G1 a temps 0. Es mostren també els nivells en un cultiu exponencial asincrònic. S'indica el percentatge de cèl·lules gemmades en cada punt. Com a control de càrrega es va utilitzar Hck1.

RESULTATS

Per tal d'analitzar més detalladament la implicació de Chk1 en la resposta de degradació de Sml1 en absència d'Iba57 es va utilitzar també cultius sincrònics. En la **Figura 37B** s'aprecia que el mutant $\Delta iba57$ presenta una elevada reducció dels nivells de la proteïna Sml1 al llarg del cicle cel·lular, indicant l'activació del *checkpoint* de dany al DNA i un retard en l'increment d'aquests nivells a causa del retard que presenta en fase S del cicle cel·lular, tal com s'ha comentat anteriorment. En canvi, en el doble mutant $\Delta iba57\Delta chk1$ s'aprecien uns nivells semblants als de la soca salvatge, fet que indica que Chk1 és necessària per promoure la reducció dels nivells de Sml1 provocada per la manca d'Iba57. Chk1 només estaria implicada en l'activació del *checkpoint* de dany al DNA i la conseqüent reducció dels nivells de Sml1, i no en la progressió del cicle cel·lular, ja que amb presència o no de Chk1 el mutant $\Delta iba57$ continua presentant un retard en la progressió de la fase S del cicle cel·lular.

En conclusió, el mutant $\Delta iba57$ necessita una resposta depenent de les quinases Mec1 i Chk1 per tal d'activar Dun1, per tal que aquesta quinasa promogui la degradació de la proteïna Sml1. En el cas del mutant $\Delta grx5$, aquesta dependència no es produeix i Dun1 s'activa utilitzant un altre mecanisme.

Resumint breument aquest apartat, s'ha observat que els diferents mediadors del *checkpoint* de dany al DNA varien entre els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$. En el cas de l'absència de Grx5, l'activació del *checkpoint* que comporta la degradació de Sml1 és depenent de Dun1 i independent de Tel1, Mec1, Rad53 i Chk1, resposta semblant a l'activació del *checkpoint* de dany al DNA causada per una depleció de ferro (Sanvisens et al., 2014). En canvi, en el cas del mutant $\Delta iba57$, la degradació de Sml1 és depenent de Mec1, Chk1 i Dun1 i independent de Tel1 i Rad53, produint-se la mateixa situació quan la maquinària CIA està danyada en absència de Nbp35.

5. Rnr2 MOSTRA UNA REDISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR CITOPLASMÀTICA QUAN LA MAQUINÀRIA ISC O CIA ESTAN DANYADES

En presència de dany al DNA o durant la síntesi del DNA en la fase S del cicle cel·lular l'activitat RNR és finament regulada per diferents mecanismes. Un dels més importants consisteix en la redistribució subcel·lular de les subunitats Rnr2 i Rnr4 des del nucli al citoplasma, lloc on s'ensamblarà el complex RNR per tal de sintetitzar els dNTPs (Yao et al., 2003). En altres condicions, la subunitat R2 de la RNR, formada per Rnr2 i Rnr4, es troba localitzada en el nucli,

mentre que la subunitat R1, formada per un homodímer de proteïnes Rnr1, es troba al citoplasma. Vàrem estudiar, doncs, la localització de Rnr2 en diferents mutants en les maquinàries ISC i CIA.

5.1 Dif1 regula la relocalització de Rnr2 en absència de Grx5 o Iba57

Dif1 interacciona directament amb el complex Rnr2-Rnr4 facilitant l'import nuclear d'aquest en absència de dany al DNA, després de la fase S del cicle cel·lular, una vegada Rnr2/Rnr4 han format part de l'enzim RNR en el citoplasma per sintetitzar els dNTPs i replicar així el DNA. S'ha observat que en la fase S del cicle cel·lular els nivells de Dif1 disminueixen dràsticament, permetent així que Rnr2 i Rnr4 es mantinguin en el citosol per tal d'activar la RNR i conseqüentment generar dNTPs. Dun1 és la proteïna encarregada de promoure la degradació de la proteïna Dif1 (Lee et al., 2008).

Amb aquests antecedents, a continuació es varen analitzar els nivells constitutius de Dif1 en absència de Grx5 o Iba57, per tal d'observar si presentaven una reducció respecte la soca salvatge, fet que suggeriria una possible relocalització citoplasmàtica de Rnr2 i Rnr4 en els mutants en la maquinària ISC. Els resultats dels anàlisis per Western blot varen indicar que els nivells de la proteïna Dif1 en els mutants $\Delta grx5$ o $\Delta iba57$ presenten una davallada significativa, semblant als de la soca salvatge tractada amb MMS (**Figura 38A**).

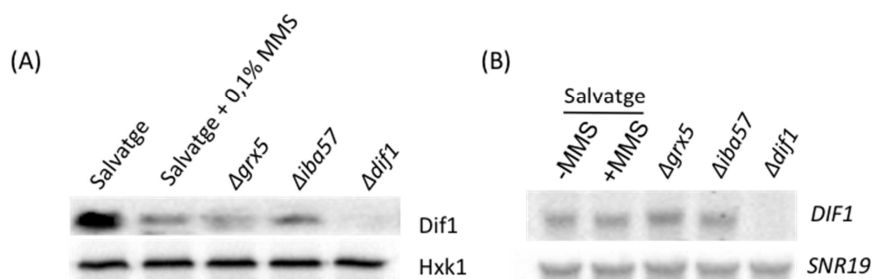


Figura 38. Dif1 és degradada en absència de Grx5 o Iba57. A) Nivells de la proteïna Dif1, utilitzant les soques salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta iba57$ (MML1678) i com a control negatiu $\Delta dif1$ (MML1896). La soca salvatge es va tractar amb 0,1% de MMS durant 30 min. Es va utilitzar Hxk1 com a control de càrrega. B) Es mostren els nivells de mRNA de *DIF1*, mitjançant Northern blot, de les mateixes soques i tractaments que el cas anterior (A). Com a control de càrrega es va utilitzar el RNA de *SNR19*.

A continuació es van analitzar els nivells de mRNA de *DIF1* per Northern blot, per tal de descartar possibles efectes en l'expressió del gen en els mutants en la maquinària ISC, i es van

comparar amb els de la soca salvatge, tractada o no amb MMS. Els resultats mostren que els nivells de mRNA de *DIF1* no varien, indicant que únicament efectes post-transcripcionals causarien la davallada dels nivells de la proteïna Dif1 en els mutants en la maquinària ISC (**Figura 38B**).

Aquests resultats assenyalen que Dun1, que resta constitutivament actiu en ambdós mutants (*Δgrx5* i *Δiba57*), estimularia la degradació de Dif1, i apunten a una redistribució subcel·lular de Rnr2 i Rnr4 cap al citosol, on l'absència de Dif1 no facilitarà el retorn de Rnr2 i Rnr4 al nucli.

5.2 Redistribució subcel·lular de Rnr2 en absència de Grx5, Iba57 o Nbp35

Els resultats anteriors suggereixen que en absència de Grx5 o Iba57, Rnr2 i Rnr4 no es troben al nucli sinó que s'han desplaçat al citosol, per tal de formar el complex RNR, augmentar l'activitat d'aquest i així generar més dNTPs que puguin fer front als requeriments cel·lulars necessaris. Per aquest motiu es va realitzar una immunofluorescència indirecta, tal com es descriu en l'apartat 7.2 de **Materials i Mètodes**, per detectar la sublocalització de Rnr2, utilitzant un anticòs policlonal directe contra Rnr2, i una tinció DAPI per tenyir el nucli. Es van diferenciar tres tipus de localitzacions subcel·lulars: nuclear, nuclear-citoplasmàtica i citoplasmàtica. Per a cada condició es va realitzar un mínim de tres experiments independents en el que es contaven un mínim de 300 cèl·lules en cada un d'ells.

En la **Figura 39** es mostra en primer lloc que la soca salvatge presenta un patró de localització de Rnr2 majoritàriament nuclear; concretament en un 86% de cèl·lules Rnr2 es troba en el nucli (**Figura 39A**). En canvi, quan se li aplica un estrès genotòxic (en aquest cas causat per MMS) Rnr2 es redistribueix cap al citoplasma (només un 7% roman al nucli) tal com ja s'havia descrit en Yao et al. (2003). A l'observar el patró de distribució subcel·lular de Rnr2 en els mutants *Δgrx5* o *Δiba57* s'aprecia una distribució predominantment citoplasmàtica en ambdós mutants (**Figura 39A**). En el cas del mutant *Δgrx5* en menys d'un 1% de les cèl·lules Rnr2 es troba en el nucli, mentre que en el 82% es troba exclusivament al citoplasma, mostrant un patró pràcticament idèntic al de la soca salvatge tractada amb MMS. Aquest patró varia en el cas del mutant *Δiba57*, on tot i que només un 7% de Rnr2 es troba al nucli, únicament el 49% de les cèl·lules presenten una localització de Rnr2 exclusivament citoplasmàtica (gairebé la meitat que en absència de Grx5). En el 44% restant de cèl·lules Rnr2 presenta una localització nucleo-citoplasmàtica.

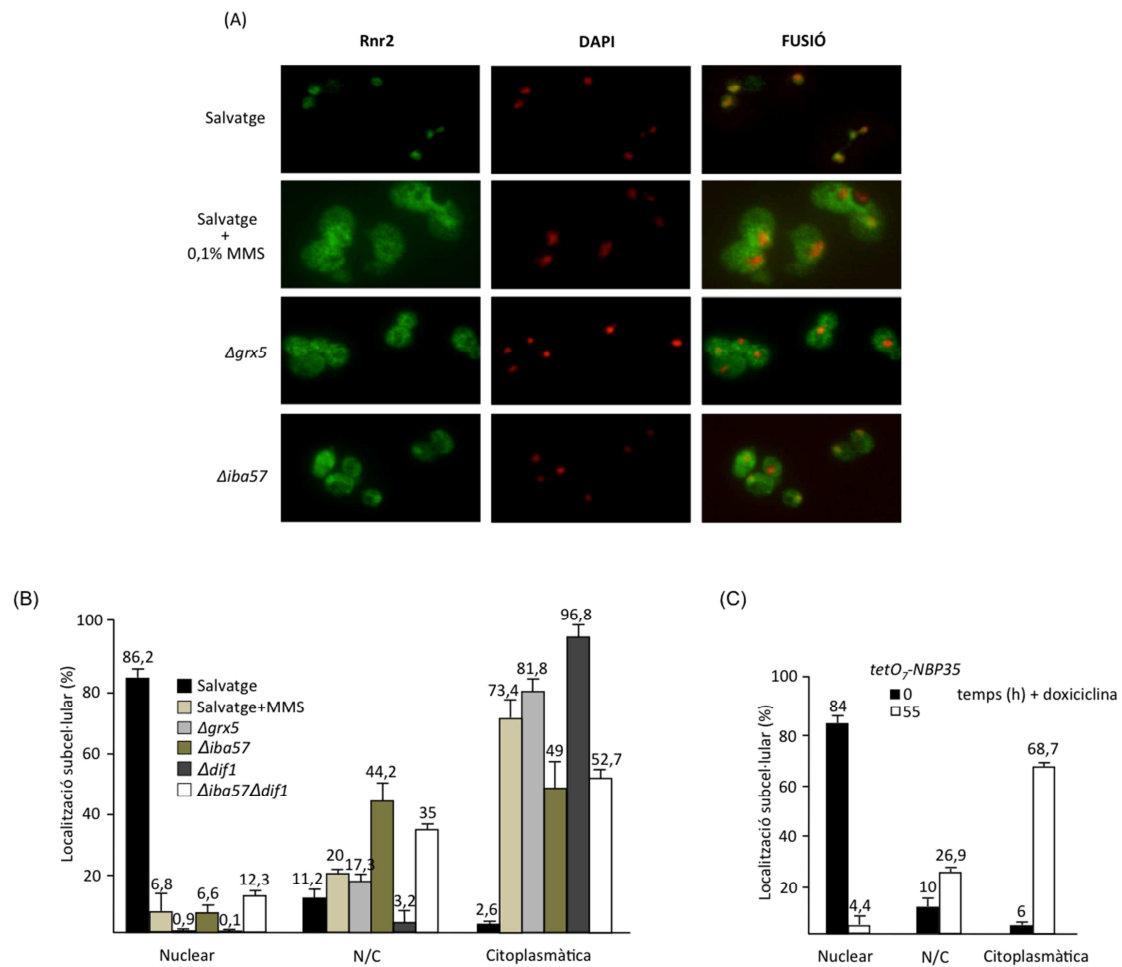


Figura 39. Rnr2 es redistribueix del nucli cap al citoplasma quan la maquinària ISC o CIA estan danyades. A) Localització subcel·lular de Rnr2, determinada mitjançant immunofluorescència indirecta. La localització de Rnr2 es mostra en verd i la tinció nuclear mitjançant DAPI en vermell. Les soques utilitzades són: salvatge (CML235), salvatge tractada amb 0,1% de MMS durant 60 min, $\Delta grx5$ (MML1500) i $\Delta iba57$ (MML1678). B) Anàlisi quantitativ dels patrons de localització subcel·lular de Rnr2 de la soca salvatge, la soca salvatge tractada amb 0,1% de MMS durant 60 min, $\Delta grx5$, $\Delta iba57$, $\Delta dif1$ (MML1896) i $\Delta iba57\Delta dif1$ (MML1902); es mostra el percentatge de localització subcel·lular nuclear, nuclear-citoplasmàtica (N/C) i citoplasmàtica. C) Idèntic que en l'apartat (B) però en aquest cas utilitzant el mutant condicional $tetO_7-NBP35$ (MML1924) després de 0 i 55 hores de tractament amb doxiciclina. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d.) realitzant un recompte de 300 cèl·lules en cada un d'ells.

Per indagar més en les raons per les que el mutant $\Delta iba57$ no presentava un patró de Rnr2 amb un major percentatge de localització exclusivament citoplasmàtica, es va analitzar la localització subcel·lular de Rnr2 en el mutant $\Delta iba57\Delta dif1$, ja que resultats anteriors indicaven

RESULTATS

que els nivells de Dif1 en el mutant *Δiba57* eren lleugerament majors comparats amb els de la soca salvatge tractada amb agents genotòxics o amb els del mutant *Δgrx5* (**Figura 38A**).

En absència de Dif1 la proteïna Rnr2 mostra un patró exclusivament citoplasmàtic (**Figura 39B**), tal com ja s'havia descrit en Lee et al. (2008), a causa del no funcionament de l'activitat d'importació nuclear de Dif1. En els nostres experiments de localització de Rnr2 en el doble mutant *Δiba57Δdif1* es va observar que en un 53% de cèl·lules Rnr2 es trobava exclusivament en el citoplasma, percentatge similar a l'observat en el mutant *Δiba57* (49%) (**Figura 39B**). Aquest resultat indicaria que la redistribució citoplasmàtica de Rnr2 en el mutant *Δiba57* dependria exclusivament de la degradació de Dif1, i suggereix fortament que un altre mecanisme de retenció de Rnr2 al nucli podria estar actuant, el qual contràriament no actuaria en cas del mutant *Δgrx5*.

A més a més també es va voler observar què passava en absència de Nbp35. Per assolir aquest objectiu es va analitzar la localització de Rnr2 en el mutant condicional *tetO₇-NBP35* no tractat o tractat durant 55 hores amb doxiciclina. Els estudis varen indicar un patró significatiu de redistribució subcel·lular de Rnr2 citoplasmàtica o nucleo-citoplasmàtica (**Figura 39C**). Aquests resultats indicarien que tant defectes en la maquinària ISC com en la CIA promourien una redistribució citoplasmàtica de Rnr2 (igual que succeeix en una resposta a danys al DNA) per tal de formar més complexos de RNR i poder augmentar així l'activitat.

5.3 La regulació de la sublocalització de Rnr2 mitjançant Wtm1 presenta diferències en absència de Grx5 o Iba57

La localització nuclear del complex Rnr2 i Rnr4 depèn de dos mecanismes: i) mitjançant la proteïna importadora Dif1 (tal com s'ha observat en l'aparat 5.1 i 5.2 de **Resultats**) i ii) mitjançant la proteïna d'ancoratge nuclear Wtm1. Aquesta és una proteïna nuclear que s'uneix al complex Rnr2-4 i l'ancora al nucli limitant la seva exportació (Lee et al., 2008; Wu i Huang, 2008). En presència de dany al DNA o d'un estrès replicatiu, la interacció física entre Wtm1 i Rnr2-4 es redueix, facilitant la sortida de Rnr2 i 4 al citoplasma. La deleció de *WTM1* causa un moviment significatiu de nucli a citoplasma del complex Rnr2-Rnr4 (Lee et al., 2008).

Com ja s'ha dit, mutants defectius en la maquinària mitocondrial comú de síntesi de ISC (per exemple el mutant *Δgrx5*) presenten una activació constitutiva del reguló del ferro, dependent del factor transcripcional Aft1. Un dels membres del reguló Aft1 que s'indueix quan està actiu

és *CTH2*, responsable de promoure la degradació del mRNA de gens involucrats en l'homeòstasi del ferro. En condicions de depleció de ferro en el medi, la proteïna Cth2 interactua específicament amb el mRNA de *WTM1* i en promou la seva degradació, facilitant la sortida del complex Rnr2-4 cap al citoplasma (Sanvisens et al., 2011). Contràriament, d'altres membres de la maquinària de biogènesi de ISC implicats en passos posteriors no comuns, com és el cas d'*Iba57*, no causen una activació del reguló Aft1, i per tant, no s'indueix *CTH2*.

D'aquesta manera es podria pensar que hi ha diferències en la regulació controlada per *Wtm1* referent a la localització de Rnr2-4 en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$. Per tal de comprovar aquesta hipòtesis, en primer lloc es van analitzar els nivells de mRNA de *CTH2* i *WTM1* en el mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$. Com era d'esperar, la inducció del gen *CTH2*, només té lloc en el mutant $\Delta grx5$, i no en la soca salvatge o en el mutant $\Delta iba57$ (**Figura 40**). Com a control, també es van estudiar els nivells de mRNA d'un altre gen que està induït quan Aft1 és actiu, *FIT3* i es va observar una inducció dels nivells exclusivament en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta acth1\Delta acth2\Delta grx5$, fet que acaba de confirmar que l'activació del reguló de ferro ocorre en absència de Grx5, però no en absència d'*Iba57*.

Els nivells de mRNA de *WTM1* presenten diferències significatives entre el mutant $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$. Així, en el mutant $\Delta grx5$ els nivells són pràcticament nuls, mentre que els del mutant $\Delta iba57$ són inclús lleugerament superiors als de la soca salvatge. En el mutant $\Delta acth1\Delta acth2\Delta grx5$ els nivells de *WTM1* són com els de la soca salvatge, fet que confirma que la degradació de *WTM1* en el mutant $\Delta grx5$ és deguda a Cth2.

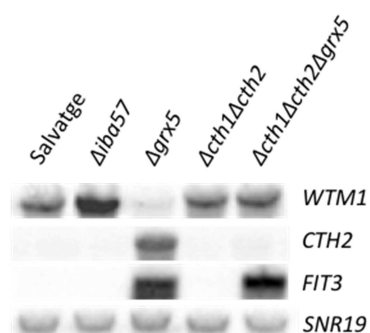


Figura 40. Cth2 promou la baixada dels nivells de mRNA de *WTM1* en el mutant $\Delta grx5$, fet que no ocorre en el mutant $\Delta iba57$. Nivells de mRNA de *WTM1*, *CTH2* i *FIT3* en cultius exponencials en medi YPD de la soca salvatge (CML235), $\Delta iba57$ (MML1678), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta acth1\Delta acth2$ (MML1062) i $\Delta acth1\Delta acth2\Delta grx5$ (MML1652). Com a control de càrrega es va utilitzar el RNA de *SNR19*.

RESULTATS

En resum, el mutant $\Delta grx5$ presenta uns menors nivells de *WTM1*, fet promogut per *CTH2*, el que suggereix que la proteïna Wtm1 tingui nivells molt baixos i, en conseqüència, el complex Rnr2-Rnr4 no estigui interaccionant amb Wtm1, provocant que s'alliberi al citoplasma. A més, $\Delta grx5$ també té disminuïts els nivells de Dif1, la qual importa Rnr2-4 al nucli. La combinació dels dos mecanismes independents explicaria l'elevada localització citoplasmàtica de Rnr2. En canvi, en el mutant $\Delta iba57$, Wtm1 encara està ancorant Rnr2-4 al nucli i l'únic mecanisme que facilita la seva redistribució citoplasmàtica és la disminució observada de Dif1; això explicaria que la localització exclusivament citoplasmàtica de Rnr2 en aquest mutant fos menor.

Per confirmar el paper de Wtm1 en la redistribució citoplasmàtica de Rnr2 en absència de Grx5 es va analitzar la localització de Rnr2 en els mutants condicionals *tetO₇-GRX5* i *tetO₇-GRX5 Δ cth2* amb i sense doxiciclina (**Figura 41**). El mutant condicional *tetO₇-GRX5* sense doxiciclina presenta un 85% de les cèl·lules amb Rnr2 al nucli, assenyalant una situació similar a la de la soca salvatge (**Figura 39**). En canvi, quan aquest mutant es tracta amb doxiciclina, i per tant Grx5 és absent, Rnr2 es redistribueix cap al citoplasma en un 87% de la població cel·lular, una situació semblant a la soca mutant $\Delta grx5$ de la **Figura 39**. No obstant, en el mutant condicional *tetO₇-GRX5 Δ cth2* sense tractar amb doxiciclina el patró de sublocalització cel·lular de Rnr2 és majoritàriament nuclear. Quan es tracta amb doxiciclina s'observa una predominança nuclear de Rnr2 (68%), i només en una petita fracció de cèl·lules es troba exclusivament al citoplasma (12%) o presenta una distribució nucli-citoplasma (20%).

Aquests resultats indiquen que la degradació del mRNA de *WTM1*, regulada per Cth2, juga un paper important en la redistribució subcel·lular de Rnr2 en absència de Grx5, evitant el seu ancoratge en el nucli. En canvi, els elevats nivells de mRNA de *WTM1* en el mutant $\Delta iba57$ explicarien l'augment de les cèl·lules que comparteixen una distribució nucli-citoplasmàtica de Rnr2 en aquest mutant, en comparació al mutant $\Delta grx5$, tot i la disminució dels nivells constitutius de la proteïna Dif1.

A partir dels resultats dels anàlisis dels mecanismes implicats en la redistribució subcel·lular del complex Rnr2-4 es pot concloure que en el mutant $\Delta iba57$ la redistribució majoritàriament citoplasmàtica de Rnr2 es deu exclusivament a la disminució dels nivells de la importina Dif1. En canvi, en el mutant $\Delta grx5$ la localització de Rnr2 exclusivament citoplasmàtica seria deguda a l'absència d'ancoratge entre Wtm1 i el complex R2 (estimulada per l'activació de Aft1), i també a la degradació de la proteïna Dif1. En ambdós casos Rnr2, i suposadament també Rnr4, surten al citoplasma per formar més complexos RNR i així incrementar la seva activitat per tal

d'augmentar consegüentment el nombre de dNTPs, fet que ajudaria a reparar/tolerar el dany al DNA en aquests mutants.

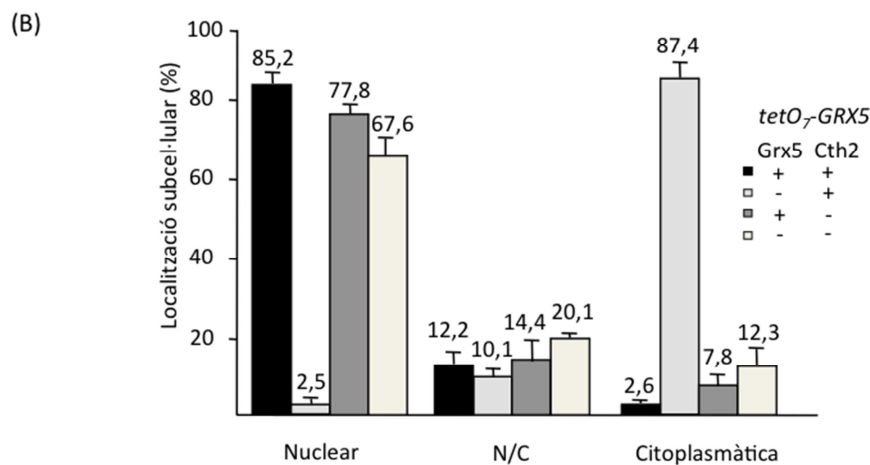
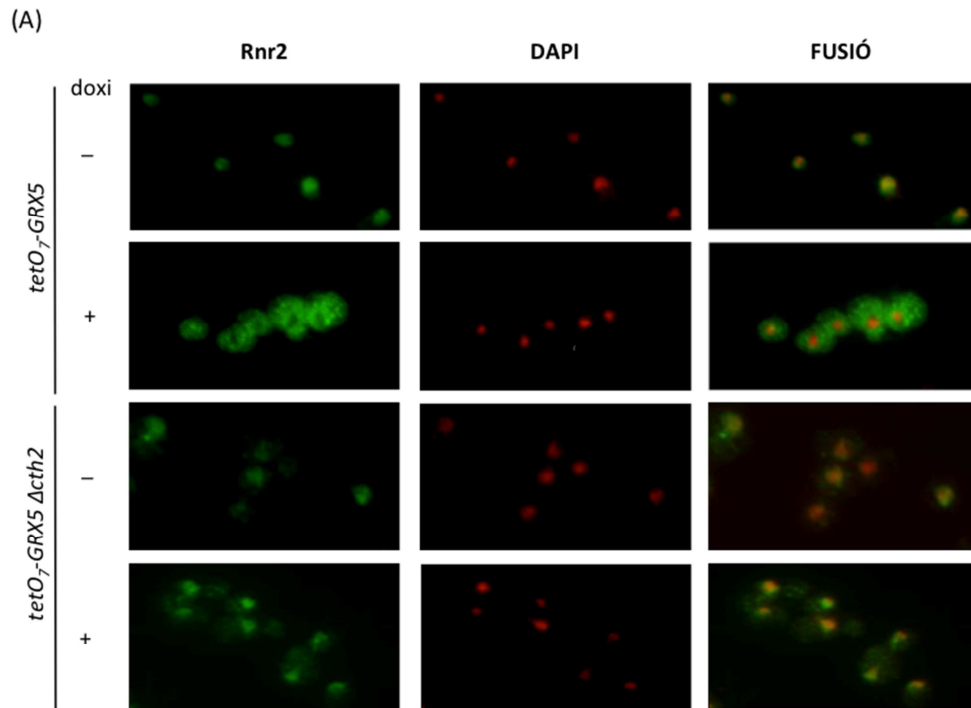


Figura 41. La redistribució subcel·lular de Rnr2 en absència de Grx5 és principalment regulada per Wtm1. A) Localització subcel·lular de Rnr2 en els mutants condicionals *tetO₇-GRX5* (MM1616) i *tetO₇-GRX5Δcth2* (MML1762) amb i sense tractament amb doxiciclina (5 µg/ml, 24 hores). La localització de Rnr2 es mostra en verd i la tinció nuclear mitjançant DAPI en vermell. B) Anàlisi quantitatiu dels patrons de localització subcel·lular de Rnr2 de les soques *tetO₇-GRX5* i *tetO₇-GRX5Δcth2* on es mostra el percentatge de cèl·lules amb localització nuclear, nuclear-citoplasmàtica (N/C) i citoplasmàtica. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (± s.d.). Al marge dret es mostra si hi ha expressió de Grx5 i Cth2.

5.4 Els nivells de mRNA de *RNR1-4* en absència de Grx5 o Iba57 no resulten afectats

Un altre dels mecanismes de control de la RNR és la regulació transcripcional dels gens *RNR1-4*. Així, quan es produeix un dany al DNA Dun1 promou l'alliberació del complex repressor Crt1-Ssn6-Tup1 dels promotors dels gens *RNR2*, *RNR3* i *RNR4*, causant la inducció de la seva transcripció (Huang et al., 1998) (veure l'apartat 3.3.4 de la **Introducció**). Els nivells de mRNA del gen *RNR3* són els que incrementen més dràsticament en resposta a un estrès genotòxic, augmentant fins a 100 vegades respecte els nivells basals (Andreson et al., 2010).

Per tal d'estudiar si es produïa una inducció en l'expressió dels mRNAs de les subunitats de RNR quan la maquinària ISC estava compromesa es van determinar per Northern blot els nivells de mRNA dels gens *RNR1/2/3/4* en els mutants $\Delta grx5$ o $\Delta iba57$. Es va incloure com a control de l'experiment els nivells dels mRNAs d'aquests gens en la soca salvatge no tractada i tractada amb 200 mM de HU. Els resultats (**Figura 42A**) mostren que no es produeix cap inducció significativa en l'expressió dels mRNAs de les diferents subunitats que componen la RNR en cap dels dos mutants quan es compara amb l'observada en la soca salvatge tractada amb HU. No obstant, en el mutant $\Delta grx5$ s'observa una lleugera inducció dels nivells d'expressió de *RNR1* i *RNR3*, suggerint un petita resposta transcripcional per regular el complex RNR. Aquest resultat indica que l'activació del *checkpoint* en resposta al dany al DNA i el possible increment de dNTPs que mostren els mutants $\Delta grx5$ o $\Delta iba57$ no estan controlats pel mateix mecanisme que regula la transcripció dels gens *RNR* i concretament, per la branca que regula el complex repressor Crt1-Ssn6-Tup1.

Com s'ha vist en els apartats anteriors en ambdós mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ els nivells de proteïna Sml1 estan disminuïts a causa de la degradació promoguda per diferents quinases del *checkpoint* de dany al DNA. Aquesta reducció dels nivells de Sml1 és important per l'activació de RNR i la síntesi de dNTPs. Atès que la proteïna Sml1 s'uneix directament a la subunitat Rnr1 per tal d'inhibir-ne la seva funció es va voler determinar si variaven els nivells de la proteïna Rnr1 en absència de Grx5 o Iba57.

Amb aquest propòsit, es va realitzar un Western blot per analitzar els nivells de Rnr1 en els mutants $\Delta grx5$ o $\Delta iba57$, i com a control es va estudiar la soca salvatge tractada i no tractada amb MMS. Com s'observa en la **Figura 42B**, els nivells de la proteïna Rnr1 incrementen en els dos mutants, però de manera molt més exacerbada en el mutant $\Delta grx5$, on s'assoleixen nivells semblants als de la soca salvatge tractada amb MMS. Aquests resultats indiquen que el mutant $\Delta grx5$, per tal d'optimitzar l'activitat RNR, disminuiria els nivells de Sml1 amb el conseqüent

augment dels nivells de la proteïna Rnr1, afavorint així una major activació de la subunitat R1. En canvi, la degradació de Sml1, i en conseqüència l'increment de Rnr1, és molt més moderat en el mutant *Δiba57*.

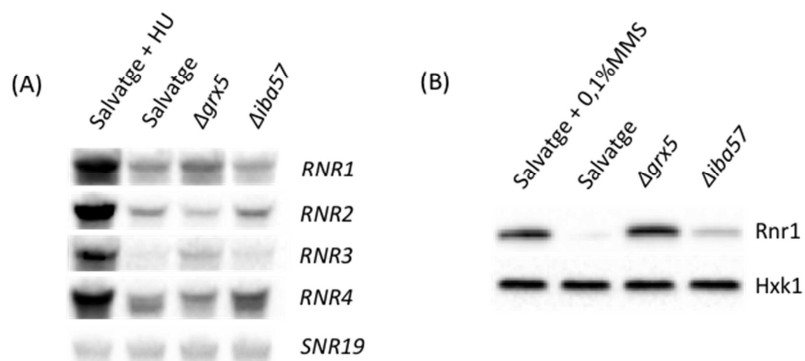


Figura 42. Els nivells de mRNA dels gens *RNR1-4* no estan induïts en absència de Grx5 o Iba57, però si que s'incrementen els nivells de la proteïna Rnr1. A) Nivells de mRNA dels gens *RNR1-4*, analitzats mitjançant Northern blot, de les soques salvatge (CML235), *Δgrx5* (MML1500), *Δiba57* (MML1678) i la soca salvatge tractada amb 200 mM de HU durant 60 min. Com a control de càrrega es va utilitzar el RNA de *SNR19*. B) Nivells de la proteïna Rnr1, analitzats per Western blot, en les mateixes soques utilitzades en l'apartat anterior. La soca salvatge es va tractar amb 0,1% de MMS durant 30 min. Es va utilitzar Hxk1 com a control de càrrega.

6. LES VIES PRR I HR JUGUEN UN PAPER IMPORTANT EN ABSÈNCIA DE Grx5

6.1 La via PRR és important per la supervivència dels mutants sense Grx5

Els defectes en la progressió de la fase S del cicle cel·lular en l'absència de Grx5 suggereixen problemes en la replicació del DNA. Aquests defectes justificarien l'elevada taxa de recombinació i l'alta freqüència de mutació espontània que presenta de forma constitutiva el mutant *Δgrx5*. Per aquest motiu, vàrem estudiar l'efecte de la manca de diversos components de la via de reparació post-replicativa en el mutant *Δgrx5*. Aquesta via permet la tolerància a lesions que bloquegen les forquetes de replicació, promovent la continuació de la replicació del DNA (per més informació veure l'apartat 4.2 de la **Introducció**).

La via PRR es divideix en dues sub-vies que estan controlades per un complex comú format per Rad6/Rad18. Una d'aquestes sub-vies s'anomena TLS o lliure d'errors, i un dels components

RESULTATS

principals és Rad5. Aquesta via utilitza la cadena no danyada com a motlle per tal de restaurar la cadena danyada. L'altra sub-via s'anomena TS o propensa a errors, essent Rev3 un dels seus components principals. Aquesta via permet saltar la lesió i continuar el procés de replicació, causant en conseqüència algunes mutacions (**Figura 16A**).

En primer lloc, es va construir el doble mutant $\Delta grx5\Delta rad6$, alterat en la maquinària central i comuna de la via. En el procés de construcció del doble mutant mitjançant el creuament dels mutants simples i la posterior esporulació i dissecció de tètades es va observar que les espores que corresponien al doble mutant mostraven un efecte quasi sintètic letal (**Figura 43C**), fet que suggeria fortament un paper important de la via PRR en absència de Grx5.

Seguidament es va analitzar el creixement exponencial relatiu comparant soques mutades on s'anul·lava cadascuna de les dues sub-vies PRR, o ambdues alhora, en combinació amb la mutació $\Delta grx5$ (**Figura 43A**). En el doble mutant $\Delta grx5\Delta rad6$ s'observava que la taxa de creixement està significativament compromesa respecte el mutant $\Delta grx5$, indicant la importància de la via PRR en absència de Grx5. Aquest fenotip es repeteix en el mutant $\Delta grx5\Delta rad5\Delta rev3$, quan s'anul·len alhora les dues sub-vies, TLS i TS, a causa de la manca de Rad5 i Rev3, tot i la presència de Rad6, corroborant la relació entre el conjunt de la via PRR i l'absència de Grx5. Per determinar si una de les dues sub-vies tenia major importància per a la supervivència del mutant $\Delta grx5$ es va comparar la taxa de creixement en els mutants $\Delta grx5\Delta rad5$ i $\Delta grx5\Delta rev3$, podent-se observar que la manca de la sub-via dependent de Rad5 mostra més afectació en el creixement que la sub-via dependent de Rev3 (**Figura 43A**). Tot i això, existeix una certa additivitat entre les dues vies pel que respecta a la taxa de creixement.

En paral·lel es va analitzar si la via PRR és important per la supervivència cel·lular després d'un dany al DNA causat per MMS o un estrès de HU en absència de Grx5 (**Figura 43B**). Els resultats obtinguts indiquen que el doble mutant $\Delta grx5\Delta rad6$ i el triple $\Delta grx5\Delta rad5\Delta rev3$ mostren els mateixos nivells d'hipersensibilitat als agents genotòxics, essent molt més sensibles que el mutant $\Delta grx5$. Aquest resultat és consistent amb la funció rellevant de la via PRR quan falta Grx5, possiblement per facilitar la progressió de la forqueta de replicació quan el DNA està danyat. Es van comparar també les sensibilitats dels mutants afectats en les vies TLS o TS, per tal d'estudiar l'impacte de la manca de cadascuna d'elles en la supervivència cel·lular després d'un estrès genotòxic (**Figura 43D i E**). Així, el doble mutant $\Delta grx5\Delta rad5$ mostra major sensibilitat que el $\Delta grx5\Delta rev3$, fins i tot a dosis molt baixes dels agents genotòxics. Aquests resultats confirmen que la via TLS, dependent de Rad5, juga un paper més important en la supervivència cel·lular en absència de Grx5.

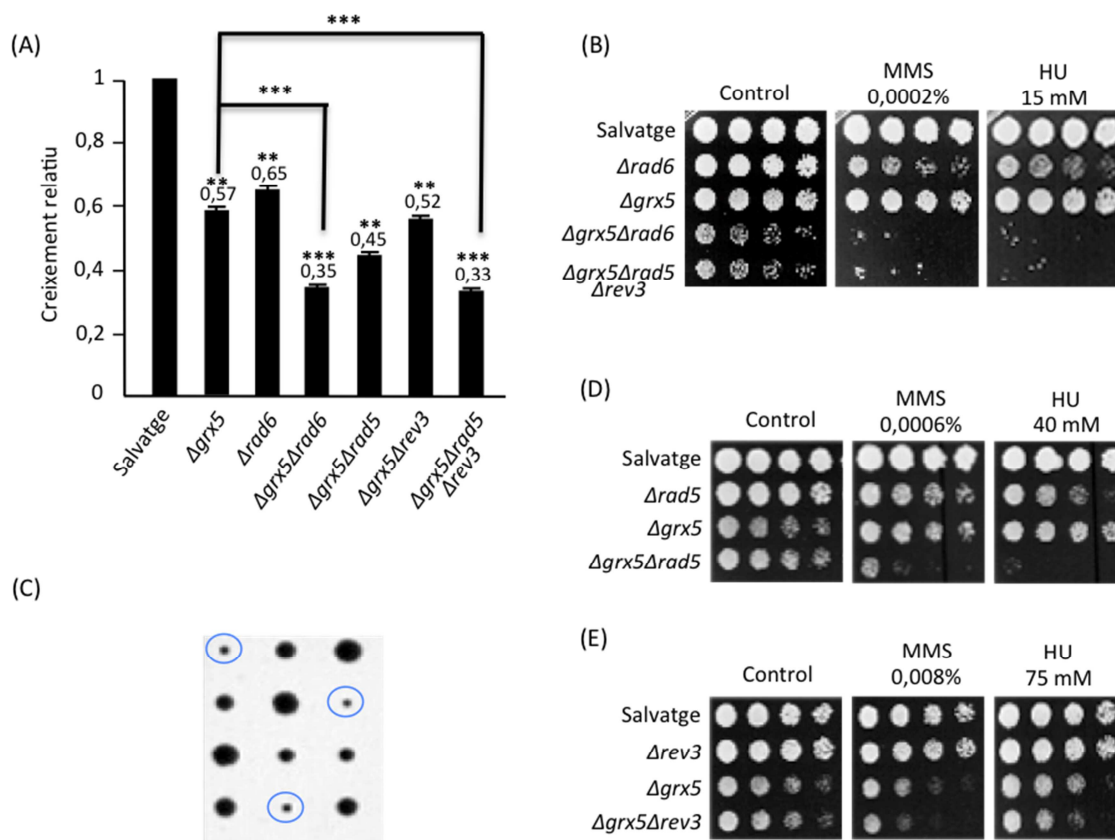


Figura 43. La via PRR és necessària en absència de Grx5. A) Velocitat relativa de creixement en fase exponencial en medi YPD a 30°C de la soca salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta rad6$ (MML1516), $\Delta grx5\Delta rad6$ (MML1587), $\Delta grx5\Delta rad5$ (MML1670), $\Delta grx5\Delta rev3$ (MML1525), i $\Delta grx5\Delta rad5\Delta rev3$ (MML1648). Les barres corresponen a la mitjana de cinc experiments independents (\pm s.d.). El test estadístic Tukey-Kramer és aplicat amb la soca salvatge i el mutant $\Delta grx5$ com a referència. B) Dilucions seriadades de la soca salvatge, $\Delta rad6$, $\Delta grx5$, $\Delta grx5\Delta rad6$ i $\Delta grx5\Delta rad5\Delta rev3$ en medi sòlid YPD amb els agents MMS (0,0002%) i HU (15 mM). Les plaques van ser incubades durant 6 dies a 30°C. C) Dissecció de tètredes a partir de cèl·lules diploides, provinents del creuament dels mutants simples $\Delta rad6$ i $\Delta grx5$. Els clons haploides van créixer en medi YPD a 30°C durant 5 dies. Els cercles indiquen els dobles mutants $\Delta grx5\Delta rad6$. D) Estudis de sensibilitat similars als de l'apartat (B) utilitzant la soca salvatge, $\Delta rad5$ (MML1499), $\Delta grx5$ i $\Delta grx5\Delta rad5$ en medi sòlid YPD amb els agents MMS (0,0006%) o HU (40 mM). Les plaques van ser incubades durant 4 dies a 30°C. E) Igual que en l'apartat (B) utilitzant la soca salvatge, $\Delta rev3$ (MML1497), $\Delta grx5$ i $\Delta grx5\Delta rev3$ en medi sòlid YPD amb els agents MMS (0,008%) o HU (75 mM). Les plaques es van incubar durant 4 dies a 30°C.

RESULTATS

6.2 El mecanisme HR està involucrat en la reparació de dany al DNA en absència de Grx5

La via PRR dependent de Rad5 utilitza el mecanisme de reparació HR per tal de restaurar la integritat del DNA malmès (Ball et al., 2009; Putnam et al., 2010). Per aquesta raó es va estudiar si els mecanismes de HR estaven involucrats en la reparació del dany constituït al DNA que mostra el mutant $\Delta grx5$.

Amb aquest propòsit es van realitzar estudis de sensibilitat a agents genotòxics de dos mutants de la via HR en presència i absència de Grx5, concretament els mutants $\Delta rad50$ i $\Delta rad52$. Rad50 actua en les primeres fases de reparació de DSB, formant el complex MRX i unint-se directament als extrems tallats del DNA. En canvi, Rad52 participa en fases posteriors de la via HR, reconeixent els punts d'acumulació de ssDNA i estimulant l'activitat recombinasa.

En la **Figura 44A** s'aprecia que els haploides provinents de les espores que corresponen al doble mutant $\Delta grx5\Delta rad50$ (encerclades de color blau) mostren un creixement molt compromès, indicant que la via HR està implicada en la resposta a dany al DNA en absència de Grx5. Seguidament es va analitzar la sensibilitat dels dobles mutants $\Delta grx5\Delta rad50$ i $\Delta grx5\Delta rad52$, comparada amb el mutant simple $\Delta grx5$, després d'un tractament amb MMS o HU. Els resultats dels estudis mostren que ambdós mutant dobles presenten una significativa hipersensibilitat als dos agents genotòxics, respecte el mutant $\Delta grx5$ (**Figura 44B**).

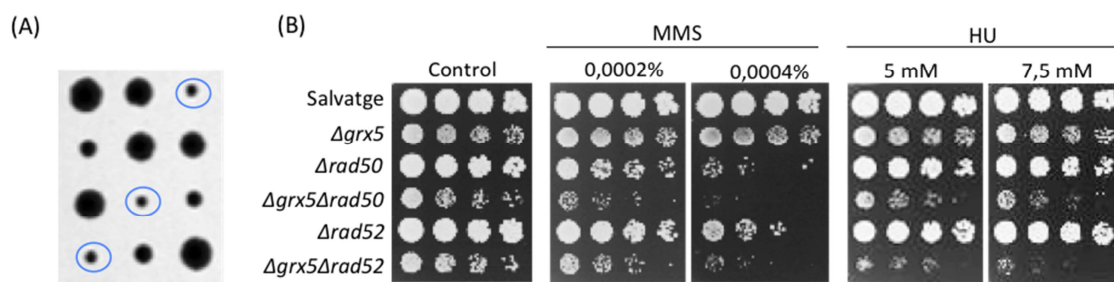


Figura 44. El mecanisme de reparació HR juga un paper important en absència de Grx5. A) Dissecció de les tètredes a partir de cèl·lules diploides provinents del creuament dels mutants simples $\Delta rad50$ i $\Delta grx5$. Els clons haploides van créixer en medi YPD a 30°C durant 5 dies. Els cercles indiquen els dobles mutants $\Delta grx5\Delta rad50$. B) Estudi de sensibilitat en placa, mitjançant dilucions seriadades, de la soca salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta rad50$ (MML1545), $\Delta rad52$ (MML1585), $\Delta grx5\Delta rad50$ (MML1605) i $\Delta grx5\Delta rad52$ (MML1607). Es van utilitzar els agents MMS (0,0002% i 0,0004%) i HU (5 i 7,5 mM). Les plaques van ser incubades durant 4 dies a 30°C.

Aquests resultats recolzen que la via PRR dependent de Rad5 requereix també els mecanismes de HR per tal d'assegurar la supervivència cel·lular del mutant *Δgrx5*, resultant essencial després del tractament de HU i MMS.

7. LA MANCA DE PROTEÏNES INVOLUCRADES EN LA MAQUINÀRIA ISC CAUSA DISFUNCIÓ MITOCONDRIAL

La pèrdua del mtDNA està relacionada amb inestabilitat genòmica nuclear (Veatch et al., 2009); defectes en les funcions mitocondrials estan associats amb un increment dels nivells de canvis genètics en el genoma nuclear (Rasmussen et al., 2003), un increment de ROS i un augment de dany al DNA nuclear (Lill i Mühlhoff, 2008). A la seva vegada la inestabilitat del genoma nuclear observada en els diferents mutants ISC podria ocasionar una disfunció de la mitocòndria, que podria afectar al mtDNA, la capacitat de respiració i d'altres funcions.

A continuació es tractaran aquests aspectes en els diferents mutants de la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S.

7.1 L'absència de Grx5 o Iba57 causa l'activació de la via retrògrada de senyalització mitocòndria-nucli

La via de senyalització retrògrada (RTG) és un mecanisme que permet la comunicació entre el nucli i la mitocòndria, doncs el manteniment de la funció mitocondrial durant el creixement cel·lular i el desenvolupament depèn de l'aportació del genoma nuclear.

CIT2 és un gen diana de la via RTG que codifica una isoforma peroxisomal de la proteïna citrat sintasa. Les cèl·lules que tenen compromeses les funcions mitocondrials, per exemple per la pèrdua del mtDNA (cèl·lules *petite*), mostren un increment significatiu del nivell de mRNA de *CIT2* (Chelstowska i Butow, 1995; Liu i Butow, 2006).

Per aquest motiu es van analitzar, mitjançant Northern blot, els nivells de mRNA del gen *CIT2* en la soca salvatge i en els mutants *Δgrx5* i *Δiba57* (**Figura 45**). Els resultats indiquen una inducció dels nivells d'expressió de *CIT2* en ambdós mutants respecte als de la soca salvatge, indicant que la via RTG està activada. En el cas del mutant *Δgrx5* aquesta inducció és major,

RESULTATS

possiblement perquè Grx5 està actuant en el centre de la maquinària ISC, i probablement està implicada en més processos dependents de proteïnes que contenen ISC, com l'homeòstasi del ferro, la reparació i la protecció a dany oxidatiu, entre altres. En qualsevol cas aquesta inducció podria suggerir una afectació en les funcions mitocondrials, com la capacitat de respirar i el manteniment del mtDNA.

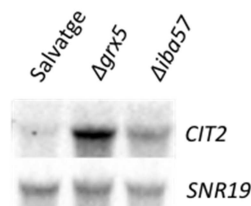


Figura 45. Inducció dels nivells de mRNA de *CIT2* en absència de Grx5 o Iba57. Es mostren els nivells de mRNA, mitjançant Northern blot, del gen *CIT2* en la soca salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500) i $\Delta iba57$ (MML1678). Com a control de càrrega es va utilitzar el RNA del gen *SNR19*.

7.2 Mutants en la maquinària ISC mostren una pèrdua del DNA mitocondrial i, consegüentment, de la capacitat respiratòria

L'activació constitutiva de la via RTG suggereix una disfunció de la mitocondria. Per això, es va estudiar si en absència de Grx5 o Iba57 estava afectada una de les principals funcions mitocondrials, com és la capacitat de respirar, doncs la pèrdua o mutacions del mtDNA provoquen danys o l'absència de la capacitat respiratòria (Shadel et al., 1999).

Es van sembrar els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ en plaques de YPGly, per tal de determinar la capacitat de respirar d'aquests mutants. En aquest medi la glucosa es substitueix per glicerol, que és una font de carboni no fermentable. Tant el mutant $\Delta grx5$ com el $\Delta iba57$ no poden créixer en YPGly (**Figura 46A**), indicant problemes en la respiració. Aquesta incapacitat de respirar no s'observa en el mutant mitocondrial $\Delta cox12$. Tal com ja s'havia descrit en McStay et al. (2013), la deleció de *COX12* no afecta al creixement en glicerol, doncs Cox12 és necessària per l'ensamblatge de la citocrom c oxidasa, però dispensable per la seva activitat (LaMarche et al., 1992), fet que indica que no tots els mutants mitocondrials presenten defectes respiratoris.

Com ja s'ha dit, una de les fonts principals dels defectes mitocondrials, inclosa la incapacitat de respirar, és l'absència o deleccions parcials del mtDNA. Per aquest motiu, es va analitzar

l'absència o presència de mtDNA, mitjançant la determinació del nombre de còpies de DNA mitocondrial per RT-PCR (veure l'apartat 6.4 de **Materials i Mètodes**). A l'observar el nombre de còpies de mtDNA en diferents mutants involucrats en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S es va apreciar que cap dels mutants analitzats ($\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i $\Delta isa1$) presentava mtDNA (**Figura 46B**), indicant que aquests mutants són soques *petite*. Com a control, es va utilitzar el mutant $\Delta cox12$, que mostra uns nivells de mtDNA semblants a la soca salvatge, confirmant que no tots els mutants mitocondrials manifesten una pèrdua de mtDNA.

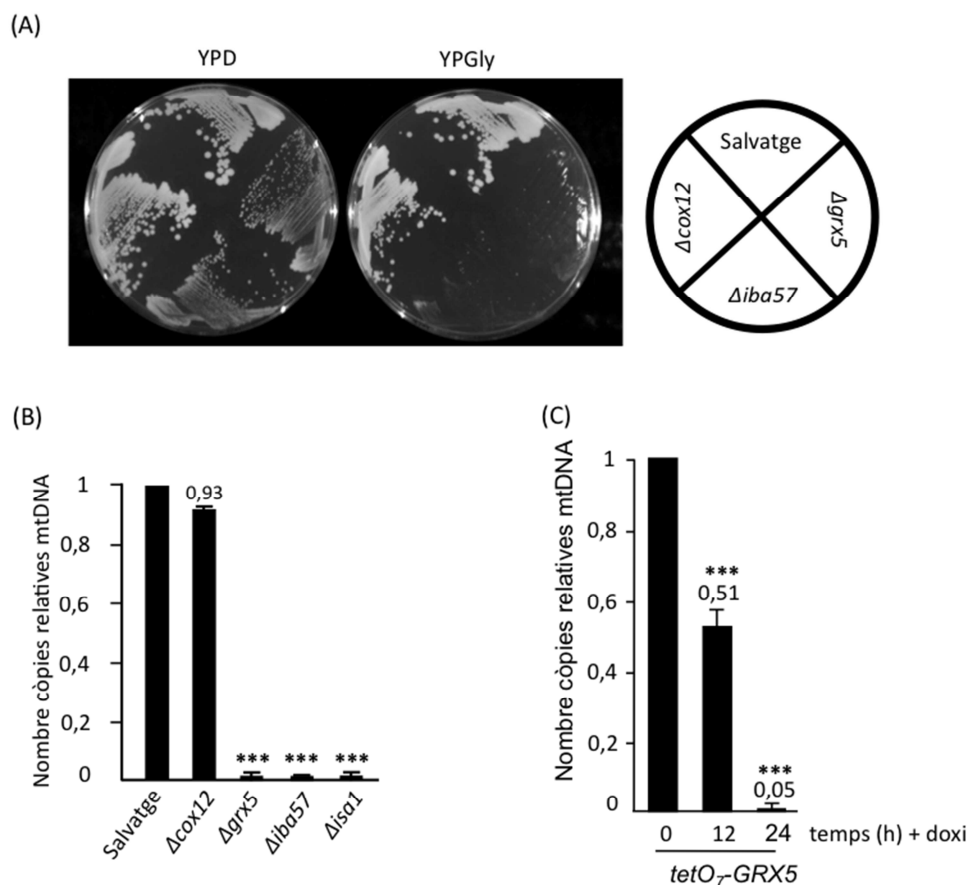


Figura 46. L'absència de Grx5, Iba57 o Isa1 causa una pèrdua del mtDNA i, en conseqüència incapacitat respiratòria. A) Creixement en medi YPD i YPGly de les soques salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta iba57$ (MML1678) i $\Delta cox12$ (MML1700). Les plaques es van incubar durant 4 dies a 30°C. B) Nombre relatiu de còpies de mtDNA de les soques $\Delta cox12$, $\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i $\Delta isa1$ (MML1732) comparat amb la soca salvatge, al qual se li va atorgar el valor unitat; les barres corresponen a la mitjana de cinc experiments independents (\pm s.d). C) Igual que en l'aparat (B) però utilitzant el mutant condicional *tetO₇-GRX5* (MM1616) a temps 0, 12 i 24 hores de tractament amb doxiciclina (5 μ g/ml). Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d.), relativitzada respecte el temps 0 hores (quan s'expressa *GRX5*). El test estadístic Tukey-Kramer està referit al valor de les mostres a temps 0 hores.

Per confirmar que l'absència de mtDNA en aquests mutants és primerament deguda a la pèrdua de funció de la proteïna, i no a d'altres efectes secundaris, es va mesurar el nombre de còpies de mtDNA en el mutant condicional *tetO₇-GRX5* (**Figura 46C**). Els resultats indiquen que es produeix una davallada dels nivells de mtDNA en paral·lel a la pèrdua de la proteïna Grx5, fins a l'absència total de mtDNA, després de 24 hores amb doxiciclina. Aquests resultats confirmen els resultats anteriors utilitzant el mutant *Δgrx5*, i corroboren que la pèrdua del mtDNA en aquest mutant és deguda a la pèrdua de la funció de Grx5.

En resum, l'absència de proteïnes involucrades en la síntesi mitocondrial de centres Fe-S, causa una pèrdua del mtDNA, formant-se colònies *petite* i, consegüentment, provocant defectes en funcions mitocondrials com la pèrdua de la capacitat de respirar.

7.3 Els mutants en la maquinària ISC mantenen les mitocòndries

A continuació, ens vàrem plantejar què passava amb els orgànuls mitocondrials quan es perdia el mtDNA com a resultat de defectes en la maquinària ISC. Per tal d'estudiar-ho es va utilitzar un plàsmid centromèric (pYX122) que expressa la proteïna GFP localitzada en la matriu mitocondrial. Aquest plàsmid permet determinar la presència o absència de mitocòndries, a més de donar informació sobre la seva morfologia. Es va transformar amb el plàsmid la soca salvatge, el mutant *Δiba57* i els mutants condicionals *tetO₇-GRX5*, *tetO₇-GRX5Δcth2* i *tetO₇-NBP35*. Posteriorment es va analitzar per citometria de flux la intensitat de fluorescència que mostraven aquestes soques en la longitud d'ona corresponent a la GFP. Es va analitzar 100.000 cèl·lules en tres experiments independents.

En absència de Grx5, en el mutant condicional *tetO₇-GRX5* després del tractament de doxiciclina el nivell de fluorescència és similar al de la soca salvatge o del propi *tetO₇-GRX5* sense tractar amb doxiciclina (**Figura 47A**), indicant en tots els casos la presència de mitocòndries. El mutant *Δiba57* també presenta mitocòndries a nivells semblants que els de la soca salvatge, i el mutant condicional *tetO₇-GRX5Δcth2* tampoc presenta alterat el nombre de mitocòndries (en el posteriors apartats s'explicarà l'ús i la funció d'aquest mutant). Com a control es va utilitzar el mutant condicional *tetO₇-NBP35*, que no afecta a les mitocòndries. En absència de Nbp35, no s'observa cap disminució del nombre de mitocòndries, tal com era d'esperar, mostrant nivells similars als dels anteriors mutants.

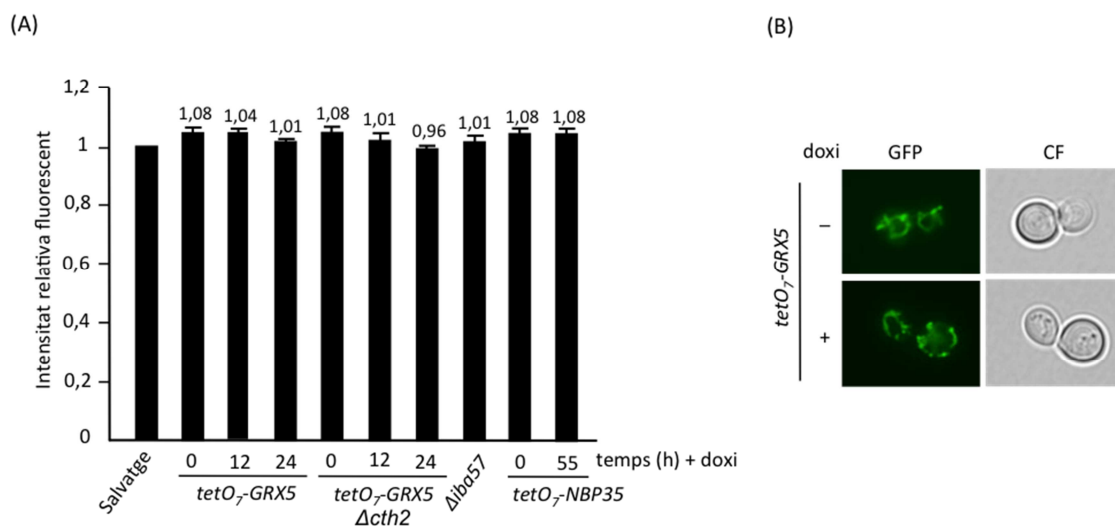


Figura 47. L'absència de Grx5 o Iba57 no causa una pèrdua de mitocòndries. A) Nivells relatius de fluorescència, corresponents a la longitud d'ona de GFP, en la soca salvatge (CML235), *Δiba57* (MML1678), el mutant condicional *tetO₇-GRX5* (MML1616), *tetO₇-GRX5Δcth2* (MML1762) i *tetO₇-NBP35* (MM1924) després de les hores indicades sota tractament amb doxiciclina (5 μg/ml) en el medi SC. A la soca salvatge se li va atorgar el valor unitat, i les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (± s.d.). B) Microscopia de fluorescència (GFP) del mutant condicional *tetO₇-GRX5*, sense tractar amb doxiciclina (-) o tractat durant 24 hores amb doxiciclina (+) a la mateixa concentració que en l'apartat anterior. Es mostra també la imatge per contrast de fases (CF).

Per corroborar la presència de mitocòndries es varen visualitzar per microscòpia de fluorescència cèl·lules dels diferents mutants condicionals en cultius sense i amb presència de doxiciclina. En la **Figura 47B** s'aprecia com a exemple el mutant condicional *tetO₇-GRX5* quan expressa la proteïna Grx5 i en la seva absència (sense i amb doxiciclina respectivament). En ambdós casos s'observa la presència de mitocòndries en quantitats similars, les quals, a més mostren una morfologia normal. Aquests resultats es van repetir quan es van analitzar els diferents mutants.

En resum, en els mutants implicats en diferents passos de la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S, tot i mostrar una pèrdua del mtDNA, les mitocòndries encara es troben presents, almenys durant el període de temps analitzat.

8. CERCA DE PROTEÏNES IMPLICADES EN EL MANTENIMENT DEL DNA MITOCONDRIAL EN ABSÈNCIA DE Grx5

S'han descrit algunes proteïnes implicades en el manteniment del mtDNA en *S. cerevisiae*, per exemple: i) proteïnes que actuen en l'empaquetatge del mtDNA com Aco1 i Abf2, ii) implicades en la biogènesi mitocondrial, com Ilv5, Ilv6 o Cha1, i iii) en el metabolisme d'aminoàcids, com Lpd1, entre d'altres (Bogenhagen et al., 2003; Chen et al., 2005; Kaufman et al., 2000). Per tant, ens varem plantejar fer un estudi de cerca i caracterització de proteïnes que puguin estar implicades en el manteniment del mtDNA en absència de Grx5.

8.1 En absència de Grx5, la proteïna Aco1, implicada en el manteniment del mtDNA presenta uns nivells pràcticament nuls

En *S. cerevisiae*, l'aconitasa (Aco1) juga una doble funció: per una part està relacionada amb el cicle del TCA, i per l'altra, és un component dels nucleoides del mtDNA, i participa en l'empaquetatge del mtDNA (Chen et al., 2007). L'expressió d'Aco1 està controlada per dues vies de regulació del metabolisme: el sistema HAP, que és més actiu en cèl·lules amb gran activitat respiratòria (DeRisi et al., 1997), i el sistema retrògrad (RTG), que s'activa en cèl·lules que presenten disfuncions mitocondrials (Butow i Avadhani, 2004; Liu i Butow, 2006). Quan hi ha defectes en les dues vies HAP i RTG disminueixen els nivells de proteïna Aco1 i les cèl·lules perden el mtDNA (Chen et al., 2005). Per tant, Aco1 és una proteïna de gran importància en el manteniment del mtDNA.

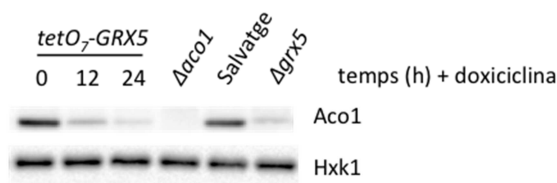


Figura 48. Disminució dels nivells de proteïna Aco1 en absència de Grx5. Els nivells d'Aco1 es van analitzar, mitjançant Western blot, en la soca salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500), $\Delta aco1$ (MML1698) i $tetO_7-GRX5$ (MM1616), aquesta darrera tractada amb doxiciclina (0, 12 i 24 hores) a una concentració de 5 $\mu\text{g/ml}$. Es va utilitzar Hxk1 com a control de càrrega.

Per aquest motiu, es van analitzar els nivells de la proteïna Aco1 en absència de Grx5, ja sigui utilitzant el mutant nul o el condicional *tetO₇-GRX5* (**Figura 48**). En el mutant Δ *grx5* s'aprecia una reducció dràstica dels nivells d'Aco1 en comparació amb la soca salvatge. Aquesta reducció dels nivells de proteïna es veu corroborada en el mutant condicional *tetO₇-GRX5*, a mesura que es perd la proteïna Grx5. Aquest fet suggereix que hi podria haver una relació directa entre la pèrdua del mtDNA i els baixos nivells d'Aco1 en el mutant Δ *grx5*, possiblement perquè Aco1 no ajudaria a empaquetar el mtDNA ni a mantenir la seva estabilitat.

8.2 La sobreexpressió d'ACO1 en absència de Grx5 no ajuda a mantenir el mtDNA

Una vegada determinats els nivells tan baixos de la proteïna Aco1 en absència de Grx5, es va plantejar la hipòtesis de sobreexpressar *ACO1* per tal d'ajudar a mantenir l'estabilitat del mtDNA. Estudis previs havien demostrat que la integració d'una còpia simple d'*ACO1* controlada sota el promotor *ADH1* ajudava a reduir el nombre de colònies *petite* i mantenir el mtDNA en mutants implicats en la via RTG, en el Δ *abf2* o en altres mutants que no presenten mtDNA (Chen et al., 2005, 2007).

Per aquest motiu, la primera estratègia va ser sobreexpressar *ACO1* sota el promotor *ADH1* en el mutant condicional *tetO₇-GRX5*. Una vegada construïda la soca, primerament es van analitzar els nivells de mRNA d'*ACO1* d'aquest mutant *tetO₇-GRX5 ADH1p-ACO1*, comparats amb els del mutant condicional *tetO₇-GRX5*. Els resultats (**Figura 49A**) indiquen que a temps inicial sense doxiciclina (quan encara s'expressa *GRX5*) els nivells de mRNA d'*ACO1* augmenten considerablement respecte als de la soca salvatge o del mutant condicional sense la construcció *ADH1p-ACO1*. En canvi, quan es tracta amb doxiciclina i s'apaga l'expressió de *GRX5* els nivells d'*ACO1* baixen significativament igual que els del mutant condicional sense *ADH1p-ACO1*, suggerint que aquesta sobreexpressió no es manté quan es perd Grx5. Com a control del correcte funcionament del mutant *tetO₇-GRX5 ADH1p-ACO1* es van observar els nivells de mRNA de *FIT3*, gen que s'indueix quan el reguló Aft1 està activat en absència de Grx5. Donada la davallada dels nivells de mRNA d'*ACO1* en el mutant condicional *tetO₇-GRX5 ADH1p-ACO1*, es van estudiar també els nivells de proteïna mitjançant Western blot, per tal de confirmar que l'ús d'aquest promotor no ajudava a mantenir els nivells d'Aco1 en absència de Grx5. Els resultats de l'estudi mostren que el mutant *tetO₇-GRX5 ADH1p-ACO1* no presenta cap canvi a nivell post transcripcional en comparació amb el *tetO₇-GRX5* (**Figura 49B**). Així, els nivells d'Aco1 disminueixen a mesura que es depleciona Grx5, de forma similar en ambdós mutants.

RESULTATS

Ja que l'estratègia de sobreexpressar *ACO1* utilitzant el promotor *ADH1* en absència de Grx5 per tal d'obtenir un increment dels nivells de proteïna Aco1 no era efectiva, es va provar una segona estratègia per intentar mantenir uns nivells d'Aco1 semblants als de la soca salvatge. Així, està descrit que l'expressió d'*ACO1* augmenta en el mutant $\Delta cth2$ en condicions de deficiència de ferro, en comparació amb els de la soca salvatge, ja que *ACO1* és un dels gens diana de Cth2 (Puig et al., 2005). Per tant, es va deletar *CTH2* en el mutant condicional *tetO₇-GRX5*, i es varen estudiar els nivells de mRNA d'*ACO1* en el mutant condicional *tetO₇-GRX5* $\Delta cth2$. Els resultats del Northern blot mostraven una inducció de l'expressió del gen *ACO1* en aquest mutant *tetO₇-GRX5* $\Delta cth2$ respecte el mutant condicional *tetO₇-GRX5*. Aquesta inducció es manté quan s'apaga l'expressió de *GRX5* després del tractament amb doxiciclina (Figura 49A), indicant que en absència de Grx5 encara poden haver-hi uns elevats nivells de mRNA d'*ACO1*. Com a control també es va veure la inducció del gen *FIT3*, que era similar en els dos mutants condicionals analitzats, indicant la pèrdua de l'expressió de *GRX5* després del tractament amb doxiciclina. Seguidament es varen analitzar els nivells de proteïna Aco1 en el mutant condicional que no tenia *CTH2*, observant que els nivells d'Aco1 es mantien estables a pesar de l'absència de Grx5, comparats amb els de la soca condicional *tetO₇-GRX5* (Figura 49B).



Figura 49. La deleció de Cth2 ajuda a mantenir els nivells d'Aco1 en absència de Grx5. A) Anàlisi dels nivells de mRNA d'*ACO1*, *FIT3* (utilitzat com a control de la pèrdua de l'expressió de *GRX5*) i *SNR19* (control de càrrega), mitjançant Northern blot, de les soques salvatge (CML235), $\Delta grx5$ (MML1500), *tetO₇-GRX5* (MM1616), *tetO₇-GRX5* $\Delta cth2$ (MML1762), *tetO₇-GRX5* *ADH1p-ACO1* (MML1774) després del tractament de 0, 12 i 24 hores amb doxiciclina (5 μ g/ml). B) Nivells de proteïna Aco1 en la soca salvatge, $\Delta grx5$, *tetO₇-GRX5*, *tetO₇-GRX5* $\Delta cth2$ i *tetO₇-GRX5* *ADH1p-ACO1*, analitzats per Western blot, després del corresponent tractament amb doxiciclina. Es va utilitzar Hxk1 com a control de càrrega.

L'absència de Cth2 en el mutant condicional *tetO₇-GRX5*, per tant, ajuda a mantenir els nivells d'Aco1, i per tant a separar experimentalment l'estudi del paper d'Aco1 i de Grx5 en el manteniment del mtDNA.

Amb aquests antecedents, es va mirar la formació de colònies *petite* en el mutant condicional *tetO₇-GRX5*, tal com s'indica en l'apartat 12 de **Materials i Mètodes**. Com s'observa en la **Figura 50A**, quan encara no s'ha iniciat el tractament amb doxiciclina, totes les colònies són *rho*⁺, poden créixer en YPGly i, per tant, respirar. No obstant, a mesura que es va apagant l'expressió de *GRX5* el nombre de colònies *rho*⁺ va disminuint i consegüentment s'incrementa el nombre de colònies *rho*⁰, i així a les 24 hores de tractament amb doxiciclina només un 1,8% de colònies són *rho*⁺. Seguidament, es va realitzar el mateix experiment en el mutant condicional *tetO₇-GRX5Δcth2* (**Figura 50A**). Els resultats indiquen que encara que hi ha uns majors nivells d'Aco1, en absència de Grx5 les cèl·lules no poden respirar. A les 24 hores del tractament amb doxiciclina cap cèl·lula pot créixer en YPGly de manera paral·lela al que succeeix en el mutant condicional *tetO₇-GRX5*. Aquests resultats suggereixen que encara que hi ha hagi uns nivells més elevats d'Aco1, això no és suficient per mantenir la capacitat de respirar quan no hi ha Grx5, apuntant a defectes en altres proteïnes requerides per tal de mantenir el DNA mitocondrial.

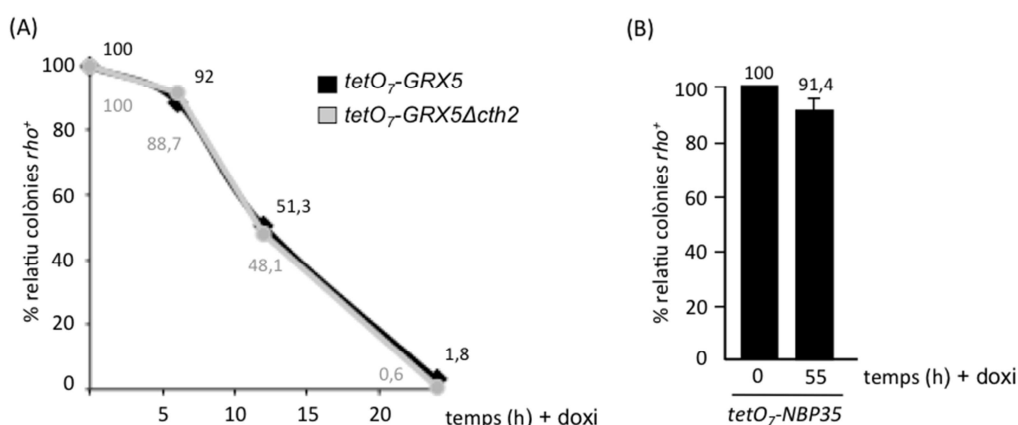


Figura 50. L'increment dels nivells d'Aco1, mitjançant la deleció de *CTH2* en absència de Grx5 no ajuda a mantenir la capacitat respiratòria. A) Percentatge de colònies amb capacitat respiratòria, determinat mitjançant el recompte de colònies *rho*⁺ (capacitat de créixer en medi YPGly), en cultius en medi YPD tractat amb doxiciclina (5 µg/ml) durant les hores indicades en el gràfic, en els mutants condicionals *tetO₇-GRX5* (MM1616) i *tetO₇-GRX5Δcth2* (MML1762). B) Idèntic a l'aparat (A) però utilitzant el mutant condicional *tetO₇-NBP35* (MM1924). Les cinètiques corresponen a la mitjana de tres experiments independents.

Com a control es va mesurar la pèrdua de colònies *rho*⁺ en el mutant condicional *tetO₇-NBP35* (**Figura 50B**). En aquest cas, la pèrdua d'aquesta proteïna extramitocondrial involucrada en la biogènesi de centres Fe-S citosòlics no causa una pèrdua de la capacitat respiratòria.

RESULTATS

Seguidament es va quantificar el mtDNA en els tres mutants condicionals *tetO₇-GRX5*, *tetO₇-GRX5 Δ cth2* i *tetO₇-GRX5 ADH1p-ACO1*, per tal d'examinar si l'increment dels nivells d'Aco1 observats en el mutant condicional sense *CTH2* ajuda a mantenir l'estabilitat del mtDNA.

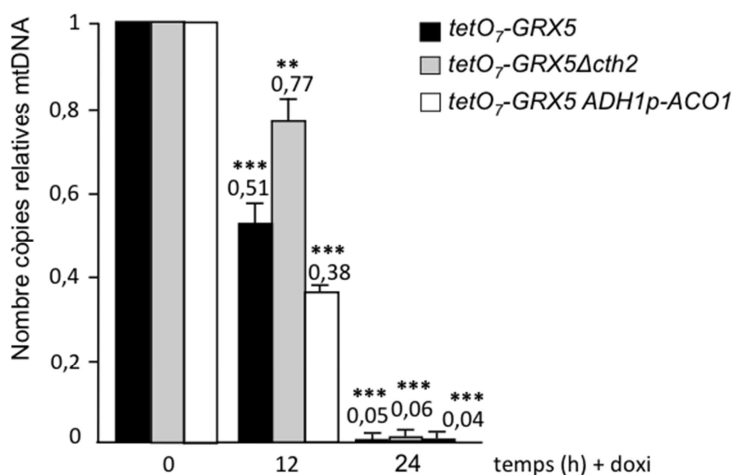


Figura 51. L'increment dels nivells d'Aco1 no estabilitza el mtDNA en absència de Grx5. Nombre relatiu de còpies de mtDNA en els mutants condicionals *tetO₇-GRX5* (MM1616), *tetO₇-GRX5 Δ cth2* (MML1762) i *tetO₇-GRX5 ADH1p-ACO1* (MML1774), creixent exponencialment en medi YPD després del tractament de 0, 12 i 24 hores amb doxiciclina (5 μ g/ml). El nombre de còpies de mtDNA es va relativitzar respecte el temps 0 hores de cada mutant, al que se li va atorgar el valor unitat. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d.). En el test estadístic Tukey-Kramer es va utilitzar el temps 0 hores de cada mutant com a referència.

Com ja s'havia demostrat (**Figura 46**), en el mutant condicional *tetO₇-GRX5* a mesura que s'apaga l'expressió de *GRX5* es va perdent el mtDNA, fins que en absència total de *GRX5* es perd tot el mtDNA (**Figura 51**). El mutant *tetO₇-GRX5 ADH1p-ACO1* va seguir un patró idèntic que el mutant condicional *tetO₇-GRX5*, confirmant que la sobreexpressió d'*ACO1* utilitzant el promotor *ADH1* no ajuda a mantenir el mtDNA. Finalment, es van determinar els nivells de mtDNA en el mutant condicional *tetO₇-GRX5 Δ cth2*, essent aquest l'únic mutant que mantenia uns nivells elevats d'Aco1. En aquest cas, en el temps 12 hores de tractament amb doxiciclina, s'observen uns nivells lleugerament superiors de mtDNA respecte els altres mutants. Tot i això, quan Grx5 es troba totalment absent (temps 24 hores amb doxiciclina), el mtDNA s'ha perdut completament, tal i com ocorre en els altres mutants (**Figura 51**). Aquests resultats indiquen que l'augment dels nivells d'Aco1 en absència de Grx5 no és suficient per mantenir el mtDNA ni la capacitat respiratòria. Possiblement sigui necessària la participació d'alguna altra proteïna

relacionada amb el metabolisme del DNA mitocondrial que requereixi, directa o indirectament, centres Fe-S per tal de mantenir el mtDNA.

8.3 Utilització d'una genoteca de sobreexpressió per cercar clons que mantinguin el mtDNA en absència de Grx5

Després d'observar que l'increment dels nivells d'una de les principal proteïnes involucrades en l'empaquetatge del mtDNA, Aco1, no ajudava a mantenir el mtDNA en absència de Grx5, es va plantejar la hipòtesi que alguna altra proteïna podria tenir un rol crucial en el manteniment del mtDNA en aquestes condicions de deficiència de la maquinària ISC. Per aquest motiu, es va utilitzar una genoteca comercial de sobreexpressió de DNA genòmic de llevat en el vector pGP564 ("Yeast genome tiling pooled DNA", GE Healthcare) on hi ha representats tots els gens que codifiquen proteïnes (a més de gens no codificants, regions intergèniques i altres elements cromosòmics) (Jones et al., 2008). L'objectiu d'aquest experiment era trobar algun gen pel qual la sobreexpressió del seu producte proteic fos capaç de mantenir el mtDNA en absència de Grx5.

Per tant, es va transformar una mostra de la genoteca en el mutant condicional *tetO₇-GRX5 Δ cth2* (MML1814), tal com es descriu en l'apartat 13 de **Materials i Mètodes**. En aquest cas es va utilitzar la soca que tenia deletat *CTH2*, ja que això permetia tenir uns nivells més elevats de proteïna Aco1, i poder així identificar d'altres possibles gens el producte proteic dels quals estabilitzés el mtDNA. Una vegada transformat el DNA es va sembrar en medi líquid SC selectiu pels plàsmids durant 72 hores amb doxiciclina (5 μ g/ml), per tal d'apagar l'expressió de *GRX5*. En paral·lel es va determinar la freqüència de cèl·lules transformades amb el vector buit.

Cinètiques prèvies (no mostrades) havien indicat que a les 72 hores de tractament amb doxiciclina l'expressió de *GRX5* en la soca *tetO₇-GRX5 Δ cth2* (MML1814) estava apagada. En la transformació es van obtenir més de 50 clons que creixien en medi SC amb glicerol (com a única font de carboni) i sense leucina, per tant portadors d'un plàsmid de la genoteca i capaços de respirar, fet que indicaria la presència de mtDNA. A partir d'aquestes colònies s'obtenia el plàsmid des de cultius derivats de les mateixes i s'amplificava en *E. coli*. Seguidament es realitzava un anàlisi de restricció emprant els enzims *SacI* i *HindIII*. En aquest anàlisi s'esperava trobar patrons de restricció diferents que equivaldrien a clons independents capaços de respirar i mantenir el mtDNA. No obstant, tots els patrons observats dels diferents clons van

RESULTATS

resultar idèntics (**Figura 52**), suggerint que només hi havia un únic clon capaç de rescatar la capacitat de mantenir el mtDNA. El següent pas va ser seqüenciar els dos extrems dels inserts dels plàsmids per tal d'identificar la regió genòmica responsable de la recuperació de la capacitat respiratòria i segurament del manteniment del mtDNA. En tots els casos aquesta regió contenia el propi gen *GRX5*, qui era segurament responsable del fenotip de rescat.

Aquest resultat indica que el disseny de l'experiment era correcte, doncs el control positiu de l'experiment (*GRX5*) va ser obtingut repetidament. No obstant, el resultat suggereix que possiblement siguin necessàries diverses proteïnes actuant conjuntament, en absència de Grx5, per tal d'estabilitzar el mtDNA, o alternativament, sense excloure la primera possibilitat, que la/les proteïnes continguin centres Fe-S per ser funcionals, de manera que tot i la sobreexpressió, no pugui jugar el seu paper cel·lular d'estabilització del mtDNA si la maquinària ISC està danyada.

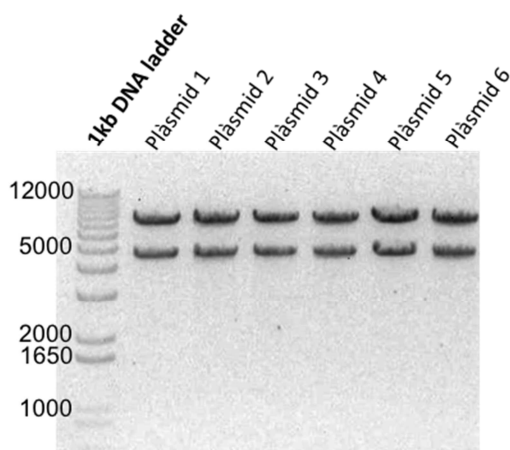


Figura 52. Tots els clons de la genoteca sobreexpressora capaços de rescatar la capacitat respiratòria del mutant sense Grx5 contenen el gen *GRX5*. Gel d'agarosa (0,8%) amb els fragments derivats dels plàsmids supressors de la capacitat respiratòria en el mutant condicional *tetO₇-GRX5 Δ cth2* (MML1814) després de 72 hores amb doxiciclina. Es va digerir 1 μ g de cadascun dels plàsmids amb els enzims *SacI*-*HindIII*, utilitzant el marcador de pes molecular (1kb DNA ladder d'Invitrogen) per indicar la mida dels fragments.

9. LA SOBREEXPRESSIONIÓ DE *RNR1* PERMET EL MANTENIMENT DEL DNA MITOCONDRIAL I LA CAPACITAT RESPIRATÒRIA EN ABSÈNCIA D'*Iba57*

Diversos estudis indiquen que la sobreexpressió de *RNR1* ajuda a incrementar el nombre de còpies de mtDNA (Lebedeva i Shadel, 2007), augmentant la concentració de dNTPs i suprimint l'increment de la formació de colònies *petite* en el mutant $\Delta mip1$ (Stumpf et al., 2010). Mip1 és la DNA polimerasa mitocondrial, ortòloga a Pol γ en humans. Diferents mutacions en Mip1 causen una disminució de l'estabilitat del mtDNA (Baruffini et al., 2006) i, conseqüentment, es deriven diverses malalties.

A més a més, mitjançant la sobreexpressió de *RNR1* es pot restaurar el nombre de còpies de mtDNA a uns nivells semblants a la soca salvatge quan manca la proteïna Abf2, implicada en l'empaquetatge i manteniment del mtDNA (Lebedeva i Shadel, 2007).

9.1 La sobreexpressió de *RNR1* rescata l'absència de mtDNA en el mutant $\Delta iba57$

Un estudi realitzat per Taylor et al. (2005) proposa un model on l'increment de l'activitat RNR, a causa de la deleció de *SML1* o la sobreexpressió de *RNR1*, genera una fluctuació dels pools de dNTPs cel·lulars, i conseqüentment, això permet la regulació del nombre de còpies de mtDNA. A partir d'aquesta informació ens vàrem plantejar sobreexpressar *RNR1* en un mutant on falta *Iba57*, degut a que el mutant $\Delta iba57$ presenta una sensibilitat més exacerbada a HU possiblement perquè presenta uns nivells inferiors de dNTPs. Per tal d'assolir aquest objectiu es va sobreexpressar *RNR1* sota un promotor *tetO₇* regulat per doxiciclina, que permet uns elevats nivells de proteïna (Bellí et al., 1998a). La sobreexpressió es va dur a terme en una soca salvatge que seguidament es va creuar amb la soca mutant $\Delta iba57$, i posteriorment es va promoure l'esperulació dels diploides resultants, la dissecció de les tètades, i finalment, la selecció de les espores resultants per tal d'obtenir les cèl·lules filles *tetO₇-RNR1 $\Delta iba57$* . D'aquesta manera ens asseguràvem que aquestes cèl·lules heretessin el mtDNA de la soca parental salvatge.

Un cop obtinguda la soca filla que sobreexpressa *RNR1* en absència d'*Iba57* (*tetO₇-RNR1 $\Delta iba57$*), es va mesurar en primer lloc la capacitat de respirar, analitzant el creixement en un medi amb glicerol (**Figura 53A**). Així, vàrem confirmar que la sobreexpressió de *RNR1* rescata la capacitat de respirar del mutant sense *Iba57*. Seguidament es va mesurar el nombre

RESULTATS

de còpies de mtDNA, tal com ja s'ha descrit anteriorment. El mutant nul $\Delta iba57$ presenta una absència total de mtDNA, a l'igual que la soca rho^0 . En canvi, la sobreexpressió de $RNR1$ mitjançant el promotor $tetO_7$ permet mantenir els nivells de mtDNA en absència d' $Iba57$, a nivells similars als de la soca salvatge (**Figura 53B**).

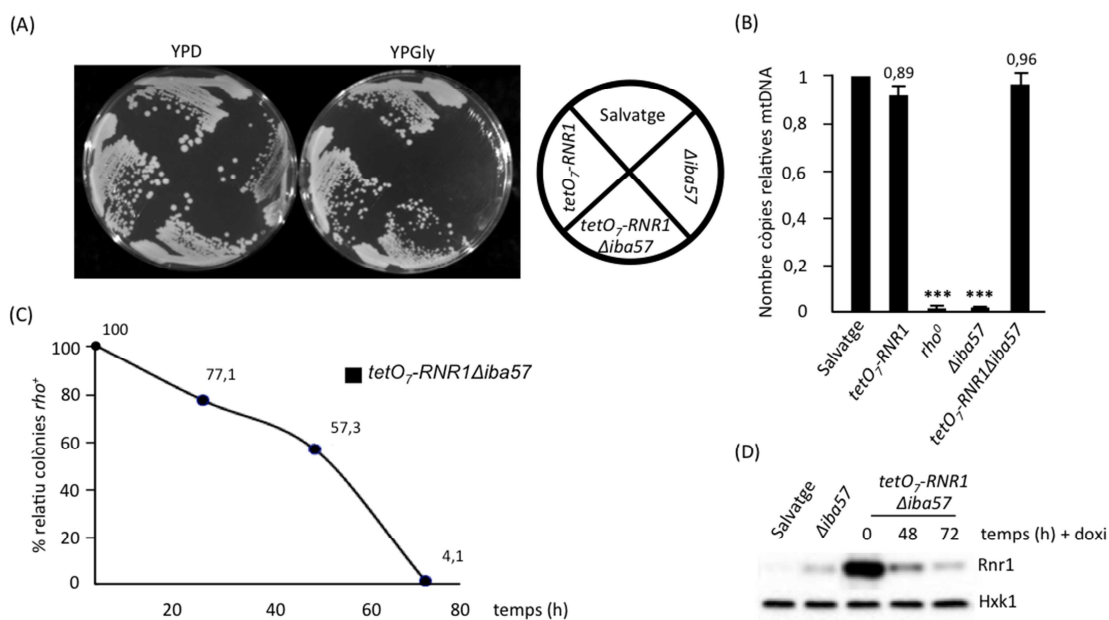


Figura 53. La sobreexpressió de $RNR1$ rescata la pèrdua del mtDNA en absència d' $Iba57$. A) Creixement en medi YPD i YPGly de les soques salvatge (CML235), $\Delta iba57$ (MML1678), $tetO_7-RNR1$ (MML1845) i $tetO_7-RNR1\Delta iba57$ (MML1848). Les plaques es van incubar durant 4 dies a 30°C. B) Nombre relatiu de còpies de mtDNA de les soques salvatge, $tetO_7-RNR1$, rho^0 (MML1865), $\Delta iba57$ i $tetO_7-RNR1\Delta iba57$ en creixement exponencial en medi YPD. El nombre de còpies de mtDNA es va relativitzar respecte el de la soca salvatge, a la qual se li va atorgar el valor unitat; les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d.). C) Percentatge de colònies rho^+ en el mutant $tetO_7-RNR1\Delta iba57$ (MML1990) després d'apagar l'expressió de $RNR1$ mitjançant doxiciclina (5 μ g/ml) durant el període de temps indicat. Es va recomprovar el creixement de les colònies en medi YPGly. D) Anàlisi dels nivells de Rnr1 mitjançant Western blot de les soques salvatge, $\Delta iba57$ i $tetO_7-RNR1\Delta iba57$, aquesta última tractada amb doxiciclina (5 μ g/ml) durant 0, 48 i 72 hores. Com a control de càrrega es va utilitzar Hxk1.

La sobreexpressió de $RNR1$ pot provocar un fenotip mutador, degut a l'increment de dNTPs. Per tal d'assegurar-nos que el manteniment del mtDNA és degut a la sobreexpressió de $RNR1$, i no pas a efectes derivats de l'augment de la freqüència de mutacions, es va determinar el percentatge de cèl·lules *petite* (rho^0) en el mutant condicional $tetO_7-RNR1\Delta iba57$ a mesura que s'anava reduint la sobreexpressió de Rnr1 (**Figura 53C**). A temps inicials, quan $RNR1$ està sobreexpressada en absència d' $Iba57$ les colònies són rho^+ i poden respirar, corroborant els resultats de la **Figura 53A**. A mesura que es va apagant l'expressió de $RNR1$ mitjançant

l'addició de doxiciclina al medi, el nombre de colònies *rho*⁺ va disminuint progressivament fins que a les 72 hores de tractament el nombre de colònies *rho*⁺ es redueix al 4,1%, indicant la pèrdua de la capacitat de respirar, tal i com ocorre en el mutant *Δiba57*. A aquests temps avançats de tractament amb doxiciclina els nivells de Rnr1 corresponen als nivells basals del mutant *Δiba57*, tal com s'observa en la **Figura 53D**.

En resum, aquests resultats mostren que la sobreexpressió de *RNR1* en absència d'*Iba57* rescata el fenotip de formació de cèl·lules *petite*.

9.2 La sobreexpressió de *RNR1* no rescata la pèrdua del mtDNA en el mutant *Δgrx5*

A continuació ens vàrem plantejar si la sobreexpressió de *RNR1* també ajudava a mantenir el mtDNA en absència de Grx5. Per aquest motiu es va crear una soca salvatge que sobreexpressava *RNR1* amb els mutants nuls *Δgrx5* i *Δgrx5Δact2* (en aquest cas també es va utilitzar el doble mutant *Δgrx5Δact2* per tal de mantenir uns elevats nivells de proteïna Aco1) i es va procedir com en l'apartat anterior. Els resultats, però, indiquen que la sobreexpressió de *RNR1* no ajuda a mantenir el mtDNA en absència de Grx5 (**Figura 54B**).

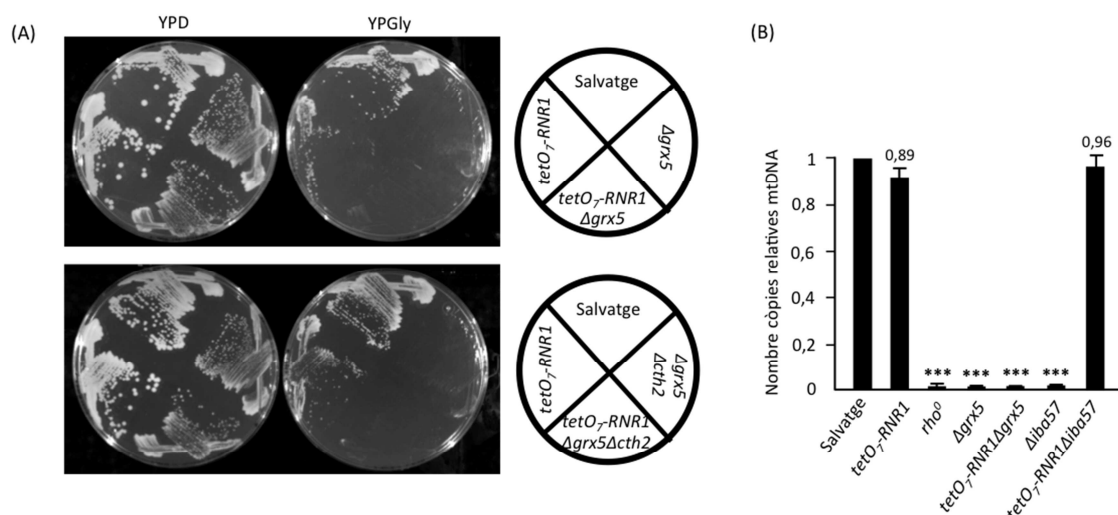


Figura 54. En absència de Grx5 la sobreexpressió de *RNR1* no rescata la pèrdua del mtDNA ni el creixement en glicerol. A) Creixement en medi YPD i YPGly sòlid de les soques salvatge (CML235), *Δgrx5* (MML1500), *tetO₇-RNR1* (MML1845), *tetO₇-RNR1Δgrx5* (MML1845) i *tetO₇-RNR1Δgrx5Δact2* (MML1985). Les plaques es van incubar durant 4 dies a 30°C. B) Nombre relatiu de còpies de mtDNA, analitzat mitjançant RT-PCR, de les soques salvatge, *tetO₇-RNR1*, *rho*⁰ (MML1865), *Δgrx5*, *tetO₇-RNR1Δgrx5*, *Δiba57* (MML1678) i *tetO₇-RNR1Δiba57* (MML1848). El nombre de còpies de mtDNA es va relativitzar respecte la soca salvatge; les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (± s.d.).

RESULTATS

Aquest fet indicaria que el rescat podria ser exclusiu de la branca mediada per Iba57 implicada en la maduració dels centres [4Fe-4S].

9.3 La sobreexpressió de *RNR1* no rescata la pèrdua del mtDNA en altres mutants de proteïnes mitocondrials relacionades amb centres [4Fe-4S]

Seguidament es va estudiar què passava amb el mtDNA quan mancaven altres components de branca mitocondrial involucrada específicament en la maduració dels centres [4Fe-4S]. A més d'Iba57, en aquesta branca estan implicades les proteïnes Isa1 i Isa2. Aquestes tres proteïnes interaccionen físicament entre elles i, a més, l'absència d'Iba57 causa fenotips similars a la falta d'Isa1 o Isa2 (Mühlenhoff et al., 2011), incloent la pèrdua del mtDNA (**Figura 46B**). Per tant, es va sobreexpressar *RNR1* en el mutant $\Delta isa1$ seguint el mateix procediment que en els casos anteriors. Aquesta sobreexpressió no permet al mutant $\Delta isa1$ créixer en un medi amb una font de carboni no fermentable (**Figura 55A**), indicant que la sobreexpressió de *RNR1* no rescata la pèrdua del mtDNA.

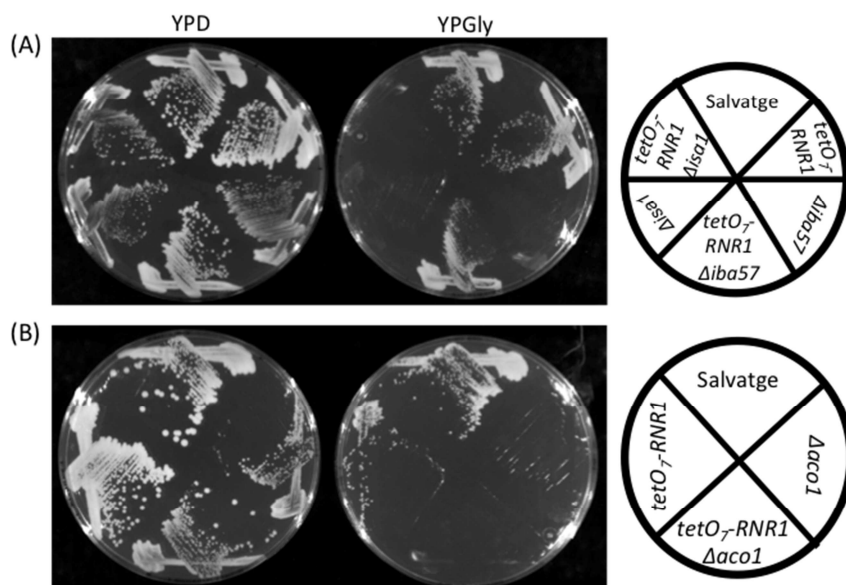


Figura 55. La sobreexpressió de *RNR1* no permet el creixement en medi YPGly en absència d'Isa1 o Aco1. A) Creixement en placa en medi YPD i YPGly de les soques salvatge (CML235), $tetO_7$ -*RNR1* (MML1845), $\Delta iba57$ (MML1678), $tetO_7$ -*RNR1* $\Delta iba57$ (MML1848), $\Delta isa1$ (MML1732) i $tetO_7$ -*RNR1* $\Delta isa1$ (MML2002). B) El mateix que en l'apartat (A) utilitzant les soques salvatge, $\Delta aco1$ (MML1698), $tetO_7$ -*RNR1* $\Delta aco1$ (MML1987) i $tetO_7$ -*RNR1*. En ambdós casos, les plaques es van incubar durant 4 dies a 30°C.

En paral·lel també es va sobreexpressar *RNR1* en el mutant $\Delta aco1$, ja que Aco1 és una de les apoproteïnes que requereix d'un centre [4Fe-4S] aportat pel complex Iba57-Isa1-Isa2. No

obstant, però, la sobreexpressió de *RNR1* tampoc permet reestabilitzar els nivells de mtDNA, ni per tant, tampoc el creixement en glicerol del mutant (**Figura 55B**).

Aquests resultats indiquen que la sobreexpressió de *RNR1*, ja sigui a causa de una funció pròpia o bé de l'increment dels pools de dNTPs, permet mantenir els nivells de mtDNA, exclusivament en absència d'Iba57.

9.4 L'increment dels nivells de dNTPs rescata la pèrdua del mtDNA en absència d'Iba57

Com que la sobreexpressió de *RNR1* ajuda a mantenir el mtDNA en absència d'Iba57 seguidament ens vàrem preguntar si aquest rescat era degut a una funció de Rnr1 independent de la RNR, o bé es devia a l'increment de dNTPs, doncs està descrit que la sobreexpressió de *RNR1* mitjançant un promotor *GAL1* incrementa deu vegades més el nombre de dNTPs (Chabes i Stillman, 2007).

Per tal de respondre la qüestió plantejada es va sobreexpressar *RNR4*, una altra subunitat del complex RNR, mitjançant el promotor *tetO₇*. La deleció del gen *RNR4* mostra un fenotip *petite* a causa de la pèrdua del mtDNA (Contamine i Picard, 2000). Aquests autors ja suggereixen que un bloqueig en la producció dels dNTPs condueix a l'aturada de la replicació del DNA nuclear i mitocondrial, essent la síntesi del mtDNA més sensible a la disminució del subministrament dels precursors del DNA.

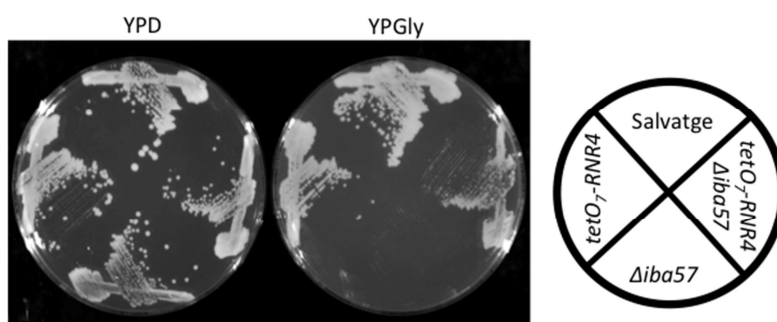


Figura 56. La sobreexpressió de *RNR4* rescata la capacitat respiratòria en absència d'Iba57. Creixement en placa en medi YPD i YPGly de les soques salvatge (CML235), *tetO₇-RNR4* (MML2057), *Δiba57* (MML1678), *tetO₇-RNR4Δiba57* (MML2059). Les plaques es van incubar a 30°C durant 4 dies.

Els resultats de l'estudi mostren que la sobreexpressió de *RNR4* en absència d'Iba57 permet el creixement en medi amb glicerol, és a dir, permet respirar (**Figura 56**). Aquest resultat indica

que la sobreexpressió de *RNR4* també ajuda a mantenir el mtDNA, recolzant la hipòtesi que l'increment en el nombre de dNTPs seria el responsable del manteniment del mtDNA en absència d'Iba57.

9.5 La sobreexpressió de *RNR1* rescata els defectes en la síntesi de l'àcid lipoic i les auxotròfies per lisina i glutamat del mutant *Δiba57*

Els mutants *Δisa1*, *Δisa2* i *Δiba57* són viables, però presenten defectes en la síntesi de la lisina i el glutamat a causa de defectes específics en la maduració dels enzims mitocondrials aconitasa i homoaconitasa, que contenen centres Fe-S (Mühlenhoff et al., 2011). Per aquest motiu, vàrem analitzar si el mutant *Δiba57* que sobreexpressa *RNR1* restaura la prototròfia per lisina i glutamat. Amb aquest propòsit es van mesurar les velocitats de creixement en medi SC sense lisina i sense glutamat, així com amb ambdós aminoàcids com a control (**Figura 57A, B i C**). En medi SC complet (**Figura 57A**), s'aprecia creixement de totes les soques (salvatge, *Δiba57*, *tetO₇-RNR1* i *tetO₇-RNR1Δiba57*), encara que en el cas del mutant *Δiba57* aquest creixement és més lent que el de la soca salvatge (tal com havíem vist en l'apartat 2 de **Resultats**). La sobreexpressió de *RNR1* ajuda molt lleugerament a augmentar la velocitat de creixement en el mutant. En canvi, en medi SC sense lisina, tal com era d'esperar, el mutant *Δiba57* no va créixer a causa de l'auxotròfia per a aquest aminoàcid, mentre que el mutant *Δiba57* que sobreexpressa *RNR1* és capaç de créixer sense lisina, rescatant aquest defecte en la síntesi de l'aminoàcid (**Figura 57B**). Una situació idèntica s'observa en absència de glutamat, doncs la sobreexpressió de *RNR1* en el mutant *Δiba57* permet el creixement en absència de l'esmentat aminoàcid (**Figura 57C**). Per tant, la sobreexpressió de *RNR1* en el mutant *Δiba57*, a part d'afavorir el manteniment del mtDNA, també rescata altres funcions defectives en aquest mutant.

Per altra banda, Iba57 és necessària per l'activació d'altres proteïnes mitocondrials que contenen centres Fe-S de la família radical-SAM, com l'àcid lipoic sintasa (Lip5). Aquest enzim catalitza la inserció del sofre dins del residu d'octanol per tal de formar el grup lipoil. Isa1, Isa2 i Iba57 són necessàries per la funció de Lip5. L'àcid lipoic actua com a co-factor de tres complexos enzimàtics en *S. cerevisiae*: glicina descarboxilasa (GDC), piruvat deshidrogenasa (PDH) i α -cetoglutarat deshidrogenasa (α -KGDH) (Gelling et al., 2007).

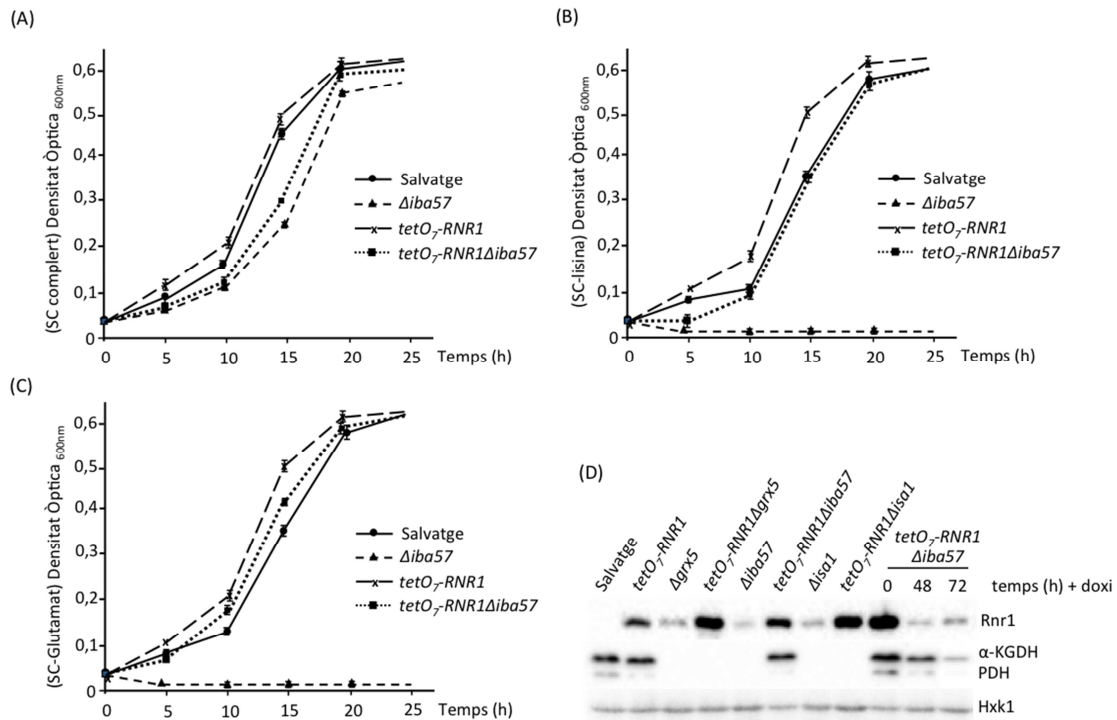


Figura 57. La sobreexpressió de *RNR1* permet rescatar defectes en la síntesi de lisina i glutamat i en la de l'àcid lipòic en absència d'*Iba57*. A) Corba de creixement en medi SC amb tots els aminoàcids, de la sòca salvatge (CML235), *tetO₇-RNR1* (MML1845), $\Delta iba57$ (MML1678), *tetO₇-RNR1* $\Delta iba57$ (MML1848) durant 24 hores. B) Com en l'aparat (A) però utilitzant medi SC sense lisina. C) Com en els aparats (A) i (B) però en medi SC sense glutamat. D) Anàlisi dels nivells de la proteïna Rnr1 i de l'àcid lipòic [co-factor present en piruvat deshidrogenasa (PDH) i α -cetoglutarat deshidrogenasa (α -KGDH)], mitjançant Western blot, en la sòca salvatge, *tetO₇-RNR1*, $\Delta grx5$ (MML1500), *tetO₇-RNR1* $\Delta grx5$ (MML1845), $\Delta iba57$, *tetO₇-RNR1* $\Delta iba57$, $\Delta isa1$ (MML1732), *tetO₇-RNR1* $\Delta isa1$ (MML2002) i *tetO₇-RNR1* $\Delta iba57$ (MML1990), en cultius en medi SC tractats durant 0, 48 i 72 hores amb doxiciclina (5 μ g/ml). Com a control de càrrega es va utilitzar Hxk1.

Les cèl·lules que no contenen *Iba57* són deficientes en àcid lipòic, a causa d'un defecte en la síntesi d'aquest (Gelling et al., 2007). Per tant vàrem analitzar si la sobreexpressió de *RNR1* podia rescatar el defecte en la síntesi de l'àcid lipòic en els mutants $\Delta grx5$, $\Delta isa1$ i $\Delta iba57$ (Figura 57D). En aquest cas vàrem analitzar l'estat de modificació de les subunitats que contenen l'àcid lipòic directament mitjançant un anticòs anti-àcid lipòic. Aquest anticòs reconeix dues proteïnes lipoilades, concretament PDH i α -KGDH. En els mutants nuls $\Delta grx5$, $\Delta isa1$ i $\Delta iba57$ no es van detectar les proteïnes corresponents, indicant que aquestes proteïnes no estan lipoilades. En el cas dels mutants $\Delta grx5$ i $\Delta isa1$ que sobreexpressen *RNR1* no es rescata el defecte esmentat. En canvi, en el mutant $\Delta iba57$ que sobreexpressa *RNR1* s'observa un rescat en la síntesi de l'àcid lipòic, amb la conseqüent lipoilació de PDH i, més intensament,

RESULTATS

α -KGDH. Aquesta lipoilació desapareix quasi totalment després de la depleció de Rnr1 en presència de doxiciclina en el medi (**Figura 57D**).

En resum, la sobreexpressió de *RNR1* en absència d'*Iba57* ajuda a mantenir el mtDNA segurament a causa de l'increment de dNTPs, permetent rescatar diverses disfuncions mitocondrials degudes a l'absència de la proteïna *Iba57*, com són defectes en la biosíntesi de lisina i glutamat, així com la restauració de la síntesi de l'àcid lipoic.

V. DISCUSSIÓ

1. La maquinària mitocondrial ISC i l'estabilitat del genoma nuclear

Per tal de preservar l'estabilitat del genoma enfront dels estressos endògens i exògens causants de múltiples mutacions i així garantir la correcta duplicació cromosòmica i la seva transmissió a la descendència, les cèl·lules utilitzen diversos mecanismes de control i de reparació del DNA (Aguilera i García-Muse, 2013). Aquests mecanismes tenen un rol molt important en la detecció de lesions del DNA al llarg de les diferents fases del cicle cel·lular i la consegüent reparació d'aquests danys en les cèl·lules, amb la finalitat d'evitar defectes en la integritat genòmica que poden causar un gran nombre de malalties.

Estudis recents relacionen els defectes en la biogènesi de centres Fe-S amb la inestabilitat genòmica nuclear (Stehling et al., 2012). Es coneix una varietat de proteïnes que contenen centres Fe-S i participen en processos essencials com la replicació i la reparació del DNA, la transcripció i la segregació de cromosomes (Paul i Lill, 2015). En aquest sentit, les proteïnes involucrades en la maquinària mitocondrial (ISC) i en la maquinària citosòlica (CIA) de síntesi de centres Fe-S juguen un paper clau en diferents processos del metabolisme del DNA nuclear, doncs aquests centres Fe-S formen part de diverses subunitats de les DNA polimerases (pol α , pol δ , i pol ϵ), la DNA primasa Pri2, la DNA helicasa Rad3, la nucleasa Dna2, la DNA glicosilasa Ntg2 i varis components del sistema de reparació del DNA entre d'altres (Gari et al., 2012; Paul i Lill, 2015; Stehling et al., 2012). Danys funcionals en aquests enzims del metabolisme del DNA que contenen centres Fe-S condueixen a varies malalties neurodegeneratives i diversos tipus de càncers, com la xerodèrmia pigmentada, la tricotiodistròfia (Lehmann et al., 2003), l'anèmia de Fanconi (Levitus et al., 2005) i el síndrome de Warsaw (Van der Lelij et al., 2010). Per exemple, la proteïna Mms19 involucrada en la maduració i la inserció de centres Fe-S a les apoproteïnes citosòliques interacciona amb diversos enzims necessaris pel metabolisme del DNA, afectant la reparació d'aquest, la segregació cromosòmica i l'estabilitat dels telòmers. La inactivació de Mms19 o bé altres mutants de la maquinària CIA (com Cia1 o Nar1) condueixen a un increment de les respostes de dany al DNA i a la inactivació de vies de reparació d'aquest, promovent consegüentment inestabilitat genòmica (Stehling et al., 2012).

El focus central d'aquesta tesi és l'estudi de la inestabilitat genòmica associada a danys en diferents etapes de la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S en el llevat *S. cerevisiae*, especialment quan Grx5 (membre de la maquinària central ISC) és absent. Varis components de la maquinària central ISC són essencials per la viabilitat cel·lular; no obstant, les cèl·lules absents de Grx5 encara mantenen la seva viabilitat, i per tant, constitueixen un model idoni per estudiar en més profunditat aquest procés. A més a més, efectes en la inestabilitat

genòmica en absència d'Iba57, membre no implicat en la maquinària central ISC, també han estat estudiats en la tesi.

El mutant *Δgrx5* presenta diversos fenotips com la incapacitat de créixer en medi mínim, hipersensibilitat a agents externs oxidants, acumulació de ferro intracel·lular, activació del reguló de ferro Aft1, increment en els nivells de proteïnes oxidades (carbonilades) i defectes en l'activitat d'enzims que porten associats centres Fe-S, com l'aconitasa o la succinat deshidrogenasa (Rodríguez-Manzanaque et al., 1999; 2002). Aquests mateixos fenotips s'han observat en cèl·lules absents d'altres proteïnes involucrades en la maquinària central ISC. En contrast, la totalitat d'aquests fenotips no s'observen en mutant implicats en etapes posteriors de la síntesi de centres Fe-S a nivell mitocondrial, com és el cas del mutant *Δiba57*, que no presenta acumulació de ferro intracel·lular ni activació del factor transcripcional Aft1 ni hipersensibilitat a agents que causen dany oxidatiu.

Basant-nos en estudis previs que descriuen que l'absència de Zim17 (xaperona que contribueix a la biogènesi de centres Fe-S) provoca un augment de la freqüència de recombinació, causant inestabilitat genòmica nuclear (Díaz de la Loza et al., 2011), es va realitzar un estudi inicial demostrant que l'absència de Grx5 també causa un augment significatiu de la freqüència de recombinació de gens nuclears. A partir d'aquestes dades es va observar en aquesta tesi que l'absència de Grx5 i Iba57 condueix a un increment de la inestabilitat genètica a causa d'unes elevades taxes de mutacions espontànies en gens nuclears. Aquesta inestabilitat genètica es pot donar en resposta a l'estrès replicatiu del DNA (Northam et al., 2010). Aquest tipus d'estrès es creu que és mutagènic, en part perquè pot causar directament dany al DNA provocant un augment de ssDNA o danys en les forquetes de replicació (Lisby et al., 2004a), fet que implicaria un rol del mecanisme de reparació/tolerància PRR, més concretament de la subvia propensa a errors (Shor et al., 2013).

A més a més, en el present estudi es va observar un increment en la formació de *foci* associats a Rad52, tant en absència de Grx5 com d'Iba57, fet indicatiu d'un dany constitutiu al DNA quan la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S està danyada, ja sigui en etapes inicials o finals de la síntesi dels centres. L'increment en la formació de *foci* implica la reparació de lesions espontànies al DNA, com per exemple DSBs, forats i/o ssDNA (Lisby et al., 2001), lesions totes elles reconegudes per Rad52 (Lisby et al., 2003). La formació de *foci* observada mitjançant un marcador fluorescent en absència d'Iba57 i Grx5 es va donar exclusivament en cèl·lules en gemmació, és a dir, en cèl·lules que es troben replicant el DNA cromosòmic o durant la segregació cromosòmica. Com a control, es va analitzar la formació de *foci* en un altre mutant

mitocondrial no implicat en la biogènesi de centres Fe-S (Δcox12). Aquest mutant va mostrar uns nivells molt baixos de *foci* associats a Rad52, similars als de la soca salvatge, indicant que el dany constitutiu al DNA observat en absència de les funcions de Grx5 i Iba57 és exclusivament degut a danys en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S i no és l'efecte d'un dany més generalitzat i no definit causat per la interrupció d'altres processos mitocondrials.

Un altre fenotip observat en absència de Grx5 o Iba57 és la hiperfosforilació de la histona γ -H2A, que es veu més exacerbada després d'un tractament amb un agent genotòxic extern. Per verificar que aquest fenotip d'hiperfosforilació en les cèl·lules mutants Δgrx5 és directament causat per l'absència de Grx5 i no degut a possibles efectes inespecífics secundaris, es van analitzar també els nivells de fosforilació de γ -H2A utilitzant un mutant condicional on l'expressió de *GRX5* està regulada per doxiciclina sota un promotor *tetO₇* (Bellí et al., 1998a; Bellí et al., 1998b), i així vàrem poder concloure que la depleció de la proteïna Grx5 és directament la responsable del fenotip de hiperfosforilació de la histona 2A. La hiperfosforilació de la histona H2A és un indicador de dany espontani al DNA (Downs et al., 2000), de manera que un increment en els seus nivells de fosforilació (com succeeix en els dos mutants esmentats) és indicatiu de dany al DNA probablement a causa de DSBs o de múltiples ssDNAs (Davidson et al., 2012).

Després de demostrar que l'absència de Grx5 o Iba57 causa un increment en la inestabilitat genòmica nuclear i un dany constitutiu al DNA, ens vàrem preguntar si aquesta inestabilitat constitutiva podia afectar la viabilitat del mutant Δgrx5 i de la resta dels mutants ISC després de tractaments amb diversos agents genotòxics externs. Es van utilitzar dos agents genotòxics: MMS (agent alquilant que provoca talls a la cadena del DNA) i HU (agent que inhibeix l'activitat RNR, reduint els nivells de dNTPs). De fet, les cèl·lules mutants Δgrx5 mostraven una sensibilitat més pronunciada a MMS i HU que les salvatges, fenotip que es va repetir en els diversos mutants en la maquinària ISC mitocondrial (Δiba57 , Δssq1 i Δisa1), indicant que es requereix la integritat de la maquinària ISC per la supervivència cel·lular en presència d'agents genotòxics. No obstant, no tots els mutants ISC presenten el mateix grau d'hipersensibilitat als agents genotòxics. Concretament, el mutant Δgrx5 és més sensible a MMS que els altres mutants. Aquest fet, més les elevades taxes d'hiperrecombinació mostrades en el mutant, suggereixen que el mecanisme de reparació HR està diferencialment més actiu quan manca Grx5 (Lundin et al., 2005). En contrast, els mutants Δiba57 i Δisa1 són més sensibles a HU.

Per corroborar el fenotip d'hipersensibilitat observat en les cèl·lules mutants Δgrx5 envers els agents genotòxics, es va observar una pèrdua de viabilitat a elevades dosis de MMS en

absència de Grx5 en el mutant condicional *tetO₇-GRX5*, confirmant que Grx5 és necessària pel manteniment de l'estabilitat genòmica, paral·lelament amb d'altres possibles rols d'aquesta proteïna. Addicionalment, es va substituir la cisteïna del centre actiu de Grx5, fent-se palès que les cèl·lules que expressen únicament la proteïna mutada continuen mostrant hipersensibilitat als agents genotòxics, fet indicatiu que la hipersensibilitat a HU i MMS és deguda a la manca d'activitat funcional de Grx5.

En estudis paral·lels, es va demostrar que l'acumulació de ferro intracel·lular i el dany oxidatiu que presenta el mutant $\Delta grx5$ no són els responsables de la hipersensibilitat als agents genotòxics (C. Maria, Tesis doctoral, Universitat de Lleida, 2014). Aquesta conclusió es corrobora en el cas del mutant $\Delta iba57$, ja que aquest no presenta acumulació de ferro intracel·lular ni dany oxidatiu.

A més a més, es va analitzar la sensibilitat als agents genotòxics en dos mutants mitocondrials no implicats en la biogènesi de centres Fe-S, que concretament són defectius en la cadena de transport electrònic ($\Delta rip1$ i $\Delta cox12$). En aquest cas no es va observar sensibilitat als agents, fet que indica que la inestabilitat genòmica, la hipersensibilitat als agents genotòxics, la viabilitat cel·lular compromesa i el dany constitutiu al DNA observat en els mutants ISC és exclusiu dels defectes primaris en la capacitat de formació dels centres Fe-S.

Després d'observar tots aquests fenotips de inestabilitat genòmica degut a defectes en la maquinària mitocondrial ISC ens vàrem plantejar què passava quan la maquinària citosòlica CIA estava afectada, concretament en absència de la proteïna Nbp35. Aquesta proteïna és essencial i està involucrada en l'etapa inicial de la formació dels centres Fe-S extramitocondrials. En la seva absència es va apreciar també un increment en la formació de *foci* associats a Rad52, semblant al que passa amb els mutants mitocondrials $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$, indicant que defectes en la biogènesi de centres Fe-S, tant mitocondrial com extramitocondrial, causen un dany constitutiu al DNA. La presència de dany al DNA i la inestabilitat genòmica ja s'havia demostrat en mutants implicats en les etapes de la maduració citosòlica dels centres Fe-S, com per exemple en el mutant $\Delta mms19$ (Stehling et al., 2012).

2. Alteracions en la biogènesi de centres Fe-S i activació del *checkpoint* de dany al DNA

L'estabilitat del genoma és de gran importància per tal de propagar correctament la informació genètica a les següents generacions. Per aquest motiu, la presència de dany al DNA provoca que la cèl·lula iniciï diverses respostes per facilitar els processos de reparació del DNA. Una d'aquestes respostes és l'activació de *checkpoints* en les diferents fases del cicle cel·lular,

encarregats de controlar i coordinar fidelment que no es produeixin errors en aquestes fases i per tant que la replicació del DNA i la segregació cromosòmica es duguin correctament sense introduir errors genètics. Defectes en els *checkpoints* han estat associats amb la formació de cèl·lules cancerígenes (Lodish et al., 2000). Un *checkpoint* important és el que controla la fase S, de manera que la seva activació promou una aturada o alentiment de la fase S del cicle cel·lular per tal de reparar el dany del DNA. Una vegada reparat aquest dany, el *checkpoint* es desactiva i continua la progressió del cicle cel·lular.

La presència de *foci* associats a Rad52 observats exclusivament en cèl·lules gemmades, així com les elevades taxes de mutació espontània en els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta lba57$, suggerien problemes en la replicació del DNA en aquests mutants. Per aquest fet, vàrem analitzar la progressió del cicle cel·lular mitjançant la sincronització dels mutants en fase G1. Es va observar que les cèl·lules mancades de Grx5 o lba57 mostraven un fenotip de retard en la progressió de la fase S, que s'exacerbava quan els cultius es tractaven amb una dosi subletal de HU. Aquest fet era lleugerament més pronunciat en el mutant $\Delta grx5$. No obstant, el doble mutant $\Delta grx5 \Delta lba57$ es comportava com el mutant simple $\Delta grx5$, fet que es pot explicar com conseqüència de que Grx5 té una funció més general i actua en una etapa prèvia respecte d'lba57 en la biogènesi de centres Fe-S.

Aquests anàlisis ens varen indicar que el dany al DNA en els mutants ISC s'origina principalment durant la fase S del cicle cel·lular, i que defectes constitutius en la replicació del DNA poden ser la font d'aquest dany. En concordança amb aquest fet, els diferents mutants ISC presenten sensibilitat a HU.

L'afectació de la biogènesi de centres Fe-S en absència de Grx5 reduiria la disponibilitat de centres Fe-S, fet que estimularia una davallada en l'activitat de les polimerases de DNA que requereixen centres [4Fe-4S], com és el cas de les polimerases Pol α , Pol ϵ , Pol δ i Pol ζ necessàries per la replicació del DNA. Això provocaria, possiblement, la desestabilització del complex replicatiu del DNA i probablement la pèrdua de les subunitats accessòries (Jain et al., 2014; Netz et al., 2012), que són essencials per la funció de les forquetes de replicació. No obstant, la naturalesa exacta dels danys al DNA en els mutants ISC analitzats en aquest estudi no es coneix.

El retard en la progressió de la fase S del cicle cel·lular indicant problemes en la replicació del DNA, les lesions constitutives al DNA evidenciades mitjançant la formació de *foci* associats a Rad52 i la fosforilació de la histona H2A són observacions, totes elles, que suggereixen que el

checkpoint de dany al DNA estaria activat en les cèl·lules mutants $\Delta grx5$ per pal·liar aquest dany, doncs la reparació de dany constitutiu al DNA requeriria un increment dels nivells de dNTPs. El retard observat en fase S després del tractament amb HU en els mutants ISC, comparat amb els de la soca salvatge, reflectiria els elevats nivells de dNTPs requerits quan els centres Fe-S són deficitaris i, en conseqüència, la necessitat d'incrementar l'activitat RNR en aquests mutants.

Per tal de comprovar que el *checkpoint* de dany al DNA està actiu es varen determinar els nivells de la proteïna Sml1, essent aquesta l'inhibidor de la Rnr1 i un dels marcadors més sensibles de l'activació del *checkpoint* de dany al DNA (Barlow et al., 2008). El dany en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S, mitjançant la depleció de Grx5, provoca una degradació severa de l'inhibidor Sml1, que conseqüentment conduiria cap a un increment de l'activitat RNR. Aquesta activació del *checkpoint* de dany al DNA es va observar quan estava danyada la biogènesi tant mitocondrial com la citosòlica dels centres, havent-hi una degradació significativa dels nivells de Sml1 en absència de Ssq1, Isa1, Iba57 i Nbp35. En canvi, en d'altres mutants mitocondrials no implicats en la síntesi i transport de centres Fe-S, com $\Delta cox12$, els nivells de Sml1 no estaven alterats.

Vàrem investigar si la degradació de Sml1 en el mutant $\Delta grx5$ era específica de la pèrdua de Grx5 o bé conseqüència d'un efecte secundari. En primer lloc, vàrem observar que en absència de l'activitat funcional de Grx5 continuava havent-hi una degradació de Sml1. En segon lloc, utilitzant el mutant condicional on l'expressió de *GRX5* és regulada per doxiciclina es va apreciar que a mesura que es perdia la proteïna Grx5 disminuïen els nivells de Sml1. Altrament, mitjançant la sincronització de les cèl·lules en G1, es va observar que els nivells de Sml1 eren inferiors al llarg de tot el cicle cel·lular, de manera que aquesta disminució era independent del retard en la progressió de la fase S. A més a més, l'acumulació de ferro i la inducció del factor transcripcional Aft1 en aquest mutant (Rodríguez-Manzanique et al., 2002) eren independents de l'activació del *checkpoint*. Utilitzant mutants que no acumulen ferro o mancats d'Aft1, $\Delta grx5\Delta fet3$ i $\Delta grx5\Delta aft1$, vàrem demostrar que els nivells de proteïna Sml1 baixen exclusivament a causa de la falta de la proteïna Grx5 i no com conseqüència d'un efecte indirecte.

Seguidament vàrem investigar els mecanismes que les cèl·lules de llevat absents de Grx5 utilitzen per promoure la degradació de Sml1. Com ja s'ha comentat en la Introducció d'aquesta tesis, danys al DNA deguts a agents genotòxics provoquen la fosforilació, ubiquïtinització i posterior degradació de Sml1, mitjançant el proteosoma 26S (Andreson et al.,

2010; Uchiki et al., 2004). No obstant, estudis recents han demostrat que en condicions de depleció de ferro del medi, utilitzant el quelant BPS o curcumina, s'indueix la degradació de Sml1 mitjançant la combinació de les vies de degradació proteosòmica i vacuolar (Azad et al., 2013; Sanvisens et al., 2014). Els nostres resultats, utilitzant inhibidors del proteosoma (MG-132) i de la vacuola (PMSF), indiquen que la degradació de Sml1 en absència de Grx5 depèn de les dues vies de degradació proteolítica: la proteosòmica i la vacuolar.

Un altre mecanisme fonamental per augmentar l'activitat RNR, i així regular els nivells de dNTPs, és la redistribució de la subunitat petita R2 (Rnr2 i Rnr4) de la RNR del nucli al citoplasma (Lee et al., 2008; Yao et al., 2003). Quan la maquinària de centres Fe-S mitocondrial o citosòlica està afectada es produeix una redistribució quasi total o total de Rnr2 (i probablement Rnr4) cap al citosol, per tal de formar i activar més complexos RNR, i augmentar d'aquesta manera la seva activitat.

En els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ hi ha una redistribució de la subunitat petita R2 al citoplasma, però no un augment en l'expressió de *RNR2* i *RNR4*. En aquest sentit, estudis realitzats per Yao i col·laboradors varen demostrar que en condicions d'estrès genotòxic la absència d'inducció dels nivells de mRNA de *RNR2* i *RNR4* no impedia la relocalització citoplasmàtica de la subunitat petita R2 (Yao et al., 2003).

En absència de Grx5, l'importina nuclear Dif1 mostra uns nivells constitutivament reduïts, que contribuirien a una redistribució citosòlica del complex Rnr2/4, ja que la seva absència no facilitaria el retorn d'aquest complex al nucli. A més, les cèl·lules mancades de Grx5 mostren uns nivells pràcticament nuls de mRNA de *Wtm1*. Wtm1 és una proteïna involucrada en l'ancoratge del complex Rnr2/4 al nucli (Lee i Elledge, 2006; Zhang et al., 2006). Per tant, l'absència de Wtm1 en el mutant $\Delta grx5$ eliminaria la interacció física entre Wtm1 i el complex Rnr2/4, facilitat d'aquesta manera la sortida del complex cap al citoplasma, juntament amb l'increment de l'activitat RNR. Exceptuant l'últim, aquests efectes són compartits per les cèl·lules deficientes en Iba57. La degradació del mRNA de *Wtm1* és promoguda per Cth2, membre del reguló Aft1, ja que Cth2 reconeix i s'uneix, a través dels seus dits de zinc, als AREs situats a la regió 3'UTR del mRNA de *Wtm1*, induint la seva degradació, i conseqüentment, promovent la davallada dels nivells de proteïna (Sanvisens et al., 2011). El reguló Aft1 és actiu en cèl·lules deficientes de Grx5, però no en les deficientes d'Iba57. Això explicaria la diferència entre ambdós mutants, que inclou una inferior redistribució citosòlica de Rnr2 en cèl·lules deficientes d'Iba57. En qualsevol cas, els nostres resultats donen suport a l'existència de dany al DNA nuclear en absència d'Iba57, i per tant apunten a un paper directe o indirecte fora de la

mitocòndria d'aquest membre implicat en una via lateral en la síntesi mitocondrial de centres Fe-S. A més a més, el mutant condicional *NBP35* també mostra una redistribució citosòlica de Rnr2, confirmant que el dany en la maquinària CIA també causa un increment en l'activitat RNR.

L'increment de l'activitat RNR, i consegüentment l'augment dels pools de dNTPs en resposta al dany endogen del DNA en els mutants ISC, podria servir per promoure la tolerància front aquest dany. Així, els elevats nivells de dNTPs promouen la supervivència cel·lular després del dany, possiblement accelerant la progressió de les forquetes de replicació, promovent l'elongació de la cadena del DNA en presència d'estrès replicatiu, o incrementant la síntesi a través de lesions al DNA (Poli et al., 2012); però, al mateix temps incrementen les taxes de mutació espontània i promouen les lesions de tolerància (Chabes et al., 2003), fet que pot correspondre al fenotip hipermutagènic observat en els mutants defectius en la biogènesi de centres Fe-S. Elevades concentracions de dNTPs intracel·lulars induirien mutagènesis a través de l'augment d'errors de les polimerases de DNA (Chabes et al., 2003; Stone et al., 2011).

Una resposta similar a la descrita aquí va ser observada en els mutants *Δrad55*, *Δrad54* i *Δtsa1* que també presenten una major inestabilitat genòmica, suggerint que un increment en la regulació de l'activitat RNR és una resposta general a la inestabilitat genòmica (Davidson et al., 2012).

La via de senyalització del *checkpoint* en resposta al dany al DNA és activa en els mutants mitocondrials i citosòlics de la biogènesi de centres Fe-S, però no segueix la via canònica mediada per Mec1/Rad53/Dun1 després d'un estrès genotòxic (Zhao et al., 2001; Zhao i Rothstein, 2002). Mentre que agents causants de dany al DNA indueixen la hiperfosforilació de Rad53 i Dun1, en els tres mutants analitzats en l'estudi present es necessita l'activació de Dun1 però aquesta activació és independent de Rad53 en tots tres casos.

L'absència d'Iba57 o Nbp35 desencadena l'activació de Mec1 i consegüentment la degradació de Sml1, de manera que la manca total de Mec1 en cèl·lules sense Iba57 o Nbp35 revoca la reducció de Sml1. D'altra banda, la manca de Chk1 (paràleg de Rad53) anul·la la disminució de Sml1 en les cèl·lules absents d'Iba57, recolzant fortament la participació de Chk1 en aquesta via. Per contra, Mec1 i Chk1 no són necessàries per activar Dun1 en cèl·lules mancades de Grx5. Aquestes dades són sorprenents, ja que tots tres mutants en la biogènesi de centres Fe-S exhibeixen nivells similarment elevats en la formació de *foci* associats a Rad52, suggerint dany al DNA. Una possibilitat raonable podria ser que dues vies de senyalització diferents contribuïrien en aquesta transmissió de senyal, convergint ambdues en Dun1: d'una banda (en

el mutant $\Delta iba57$ i en les cèl·lules que expressen condicionalment *NBP35*), seguint una via de senyalització Mec1/Chk1/Dun1, i per altra banda (en cèl·lules $\Delta grx5$) l'activació de Dun1 seria independent de Mec1, de manera similar a quan els components de la senyalització del ferro estan danyats (Sanvisens et al., 2014). Només la segona via actuaria en les cèl·lules absents de Grx5, ja que no s'observen diferències en els nivells de Sml1 entre el doble mutant $\Delta grx5\Delta mec1$, i el simple $\Delta grx5$. No obstant, l'activació de Dun1 en condicions de depleció de ferro no sembla estar associada a dany al DNA, ja que aquesta situació no presenta un augment en la formació de *foci* associats a Rad52 (dades no mostrades), contràriament al cas del mutant $\Delta grx5$.

Existeixen altres situacions on la via de senyalització de dany al DNA difereix de la via canònica, destacant diferents rols dels components. Varis estudis han proposat que vies independents de Rad53 activen la funció de la quinasa Dun1 en llevat (Bashkirov et al., 2003). Per exemple, l'activació transcripcional de *SNM1*, un gen necessari per la reparació dels enllaços de cadena creuada del DNA en resposta al dany, sembla ser dependent de Dun1 i independent de Rad53 (Wolter et al., 1996). Així mateix, el mutant $\Delta rad53\Delta chk1$ mostra una menor taxa de reordenaments cromosòmics que els mutants simples $\Delta mec1$ o $\Delta dun1$, suggerint que no totes les senyals des de Mec1 a Dun1 passen per Rad53 i Chk1 (Myung et al., 2001). A més a més, les quinases Mec1 i Dun1 semblen estar implicades en la supressió de reordenaments cromosòmics i en el silenciament de gens telomèrics a través d'un mecanisme independent de Rad53 (Craven i Petes, 2000). De la mateixa manera, la fosforilació de Sod1 dependent de Mec1 i Dun1 condueix a la seva redistribució nuclear per convertir-se en un factor transcripcional de resposta a ROS (Tsang et al., 2014). A més, es requereix alguns substrats específics de Mec1 en el replisoma, per la represa de la síntesi del DNA quan les forquetes estan aturades (Rouse et al., 2004). Addicionalment, es creu que hi ha funcions de Mec1 independents de Rad53, ja que el mutant $\Delta mec1$ és més sensible als agents d'aturada de les forquetes de replicació que el mutant $\Delta rad53$ (Tercero i Diffley, 2001). Finalment, Mec1, però no Rad53, és necessari per establir Pol ϵ quan les forquetes estan aturades (Cobb et al., 2003), assenyalant de nou diferents funcions quan les forquetes de replicació estan danyades.

No obstant, en tots els mutants d'aquest estudi la quinasa Dun1 seria la màxima responsable de promoure la degradació de l'inhibidor de la subunitat R1, Sml1, i conseqüentment augmentar l'activitat RNR.

3. Mecanismes de reparació/tolerància de dany en el DNA en cèl·lules absents de Grx5

Després d'observar que les cèl·lules absents de Grx5 mostraven elevades taxes de mutació espontània, dany constitutiu al DNA, un retard en la progressió del cicle cel·lular i l'activació del *checkpoint* de dany al DNA, vàrem voler explorar les vies de reparació del DNA que podien ser importants per la supervivència del mutant $\Delta grx5$ especialment en presència d'agents genotòxics. D'aquesta manera vàrem observar un efecte sintètic letal entre la manca de Grx5 i dels components de la via PRR. En aquest sentit, les cèl·lules mutants $\Delta grx5\Delta rad6$, on ambdues branques (*error-prone* i *error-free*) de la PRR estan interrompudes, mostren una afectació severa en el creixement, que es veu agreujada en presència d'agents genotòxics, fins i tot a dosis baixes. Aquest fenotip podria explicar-se per funcions dependents de Rad6 i independents de la via PRR, en el procés de ubiquïtinització i degradació de Sml1, que conduiria a una baixa activitat RNR (Andreson et al., 2010). Per descartar aquesta possibilitat es va construir el triple mutant $\Delta grx5\Delta rad5\Delta rev3$, on les dues branques de la via PRR estan anul·lades, però Rad6 encara és present i es va observar una idèntica afectació en el creixement cel·lular, el qual va corroborar la necessitat de la via PRR per la supervivència cel·lular en absència de Grx5.

El mutant $\Delta grx5\Delta rad5$ mostra un creixement cel·lular encara més compromès que el mutant $\Delta grx5\Delta rev3$, indicant que la branca post-replicativa lliure d'errors (TLS) jugaria un paper més crític en les cèl·lules sense Grx5. Així doncs, les cèl·lules absents de Grx5 mostren un escenari on Rev3, que requereix de centres [4Fe-4S] (Netz et al., 2012), podria perdre la seva funció. Atès que les cèl·lules mancades de Grx5 són viables, és probable que la poca però encara persistent síntesi de centres Fe-S que es duu a terme en el mutant permeti que Rev3 encara sigui parcialment funcional en aquestes condicions. En aquest sentit, el retard en el creixement cel·lular causat per l'anul·lació de la via lliure d'errors dependent de Rad5 (TLS) és exacerbat quan ambdues vies, dependents de Rev3 i Rad5, són inhabilitades, indicant que Rev3 exerceix encara una funció subsidiària en tals condicions.

La via de reparació HR juga un rol crític dins de la branca *error-free* de la via PRR (Broomfield et al., 2001). D'acord amb això, quan els components de la via HR estan absents en les cèl·lules $\Delta grx5$ augmenta dràsticament la hipersensibilitat als agents genotòxics. Es van construir dues soques mutants, elegint dos gens implicats en diferents etapes del mecanisme de HR, concretament *RAD50* i *RAD52*. Una d'elles és la soca $\Delta grx5\Delta rad50$ (inhibint les via HR en els estadis inicials i la via NHEJ), i l'altra la soca $\Delta grx5\Delta rad52$ (on només la via HR està afectada). Ambdues mostren una severa hipersensibilitat a dosis baixes de MMS i HU, emfatitzant la

En resum, la primera part de la tesis demostra que defectes en les diferents etapes de la síntesi mitocondrial i citosòlica de centres Fe-S causa dany al DNA nuclear, promovent conseqüentment l'activació del *checkpoint* de dany al DNA, on Dun1 participaria en un rol central en aquesta resposta, tot i que es duria a terme a través de mecanismes diferents dels que actuen després d'un tractament extern amb un agent genotòxic, conduint finalment a l'increment de l'activitat RNR.

La **Figura 58** esquematitza el paper dels diferents components del *checkpoint* de dany al DNA en absència de Grx5, Iba57 i Nbp35. Les vies de tolerància/reparació del dany al DNA, PRR i HR, serien importants pel manteniment de la viabilitat cel·lular en absència de Grx5, i especialment quan l'acció d'agents genotòxics externs s'afegeix al danys intrínsecs en el DNA en el mutant.

4. Defectes en la maquinària mitocondrial ISC i la pèrdua del mtDNA

La segona part d'aquesta tesis es basa en la determinació d'absència o presència de mtDNA en diferents mutants en la maquinària ISC de la biogènesi de centres Fe-S i, conseqüentment en cas negatiu, la cerca de proteïnes que ajudin al seu manteniment (especialment quan Grx5 i Iba57 són absents).

Les mitocòndries són necessàries per la producció d'energia cel·lular mitjançant la fosforilació oxidativa, per la síntesi de centres Fe-S (Lill i Mühlhoff, 2008), per dur a terme la mort cel·lular programada (Eisenberg et al., 2007) i per la producció de ROS (Yoboue et al., 2014) entre d'altres processos. Aquests orgànuls contenen múltiples còpies del seu propi DNA, que codifiquen una petita fracció de les aproximadament 1000 proteïnes que actuen en la mitocòndria. Les proteïnes codificades pel mtDNA estan involucrades principalment en la síntesi d'ATP i en la fosforilació oxidativa. No obstant, el genoma nuclear codifica gran part de les proteïnes necessàries per la majoria de funcions mitocondrials, que són importades dins la mitocòndria post-traduccionament (Sickmann et al., 2003). La via de comunicació entre el nucli i la mitocòndria és molt important en una gran varietat de funcions cel·lulars, com la divisió cel·lular, el control del creixement i la morfologia, l'envelliment, la detecció de nutrients i d'altres processos metabòlics (Traven et al., 2001). Hi ha dues vies de regulació metabòlica en resposta a l'activitat mitocondrial: (i) el sistema activador de proteïnes hemo (HAP), que és més actiu en cèl·lules amb una robusta activitat respiratòria (DeRisi et al., 1997) i (ii) el sistema retrògrad (RTG), que és actiu en cèl·lules on les mitocòndries estan compromeses o disfuncionals (Liu i Butow, 2006).

El mtDNA és dispensable per la viabilitat del llevat (Nagley i Linnane, 1970) i també en alguns tipus de cèl·lules humanes (King i Attardi, 1989). No obstant, la importància de mantenir adequadament els nivells de mtDNA és fonamental, ja que la seva absència o bé mutacions puntuals o delecions parcials pots causar un gran nombre de síndromes i malalties. De tota manera, no està clar ni ben definit com alteracions en el nombre de còpies del mtDNA afecten l'expressió gènica mitocondrial, la biogènesi o l'activitat OXPHOS, entre d'altres funcions (Lebedeva i Shadel, 2007).

Per aquest motiu, el primer pas que vàrem dur a terme va ser determinar si la via de senyalització RTG (nucli-mitocòndria), que s'activa en processos de disfunció mitocondrial, estava afectada. Aquesta via retrògrada RTG sembla funcionar com un mecanisme de resposta a estrès o homeostàtic que permet a les cèl·lules adaptar-se a les alteracions mitocondrials, mitjançant una reconfiguració d'un subconjunt de gens nuclears (Chelstowska et al., 1999), conduint a unes modificacions del metabolisme per acomodar les cèl·lules als defectes de la mitocòndria. *CIT2* és un gen diana de la via RTG (que codifica una isoforma peroxisomal de la citrat sintasa), el qual incrementa significativament l'expressió del seu mRNA en les cèl·lules *petite* (Liu i Butow, 2006). Vàrem demostrar que tant l'absència de Grx5 com d'Iba57 causava un increment significatiu de l'expressió de mRNA de *CIT2*. Aquest fet és indicatiu de l'activació de la via RTG en ambdós mutants, assenyalant una disfunció mitocondrial i suggerint l'absència de mtDNA. No obstant, en el mutant $\Delta grx5$ la inducció de l'expressió de *CIT2* és superior que en les cèl·lules absents d'Iba57, possiblement perquè Grx5 actua en el centre de la maquinària ISC i a més a més, està implicat en processos de dany oxidatiu. Aquests processos són una de les causes de l'activació de la senyalització retrògrada (Butow i Avadhani, 2004).

Després de demostrar que la manca de Grx5 o Iba57 en les cèl·lules causa una activació de la via de senyalització nucli-mitocòndria, vàrem voler analitzar si els diferents mutants ISC mantenien o no el mtDNA. Per aquest motiu vàrem mesurar el nombre de còpies de mtDNA en els mutants $\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i $\Delta isa1$, conclouent que defectes en la maquinària mitocondrial ISC causaven la pèrdua total del mtDNA en tots els mutants, independentment de l'etapa de la biogènesi en que es troben. En un estudi previ, on es va caracteritzar algunes de les funcions del mutant $\Delta iba57$, es va determinar que aquest mutant presentava defectes en la respiració i en el manteniment del mtDNA (Gelling et al., 2007). Per descartar que cap efecte secundari podia ocasionar aquesta pèrdua, vàrem utilitzar el mutant condicional *tetO_γ-GRX5*, observant que a mesura que es perdia la proteïna Grx5 disminuïa el nombre de còpies del mtDNA fins la pèrdua total, fet que corroborava el resultat previ. Com a control, es va observar que el

mutant Δcox12 mantenia el mtDNA, indicant que l'absència d'altres proteïnes mitocondrials no implicades en la biogènesi de centres Fe-S no necessàriament causa la pèrdua del mtDNA.

Les cèl·lules absents de mtDNA mantenen un metabolisme mitocondrial limitat, però encara essencial per la supervivència cel·lular. Desconeixem la causa exacta de la pèrdua del mtDNA en els diferents mutants de la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S, però podria ser que l'única polimerasa de DNA mitocondrial (Mip1), responsable de la síntesi del mtDNA, així com de la seva reparació i recombinació en la mitocòndria (Viikov et al., 2012), no funcionés correctament, i per tant, es perdés el mtDNA. Aquest fet podria respondre a la necessitat d'algun tipus de centre Fe-S per realitzar la seva activitat com passa en algunes polimerases del DNA nuclear (Netz et al., 2012). Conseqüentment, defectes en la biogènesi d'aquests centres causarien una reduïda disponibilitat d'aquests en la polimerasa. Actualment es desconeix si Mip1 requereix de centres Fe-S. Alternativament, podria ser que la comunicació entre els pools de dNTPs mitocondrials i citosòlics (essent aquests últims la font principal de dNTPs de la cèl·lula) estigués alterada i, per tant, no es pogués sintetitzar nou mtDNA. Una altra possible causa seria que els diferents mutants ISC presenten unes elevades taxes de mutagènesi (tal com hem vist anteriorment). Aquestes mutacions nuclears podrien afectar a gens indispensables pel manteniment del genoma mitocondrial i nuclear. Mutacions en determinats gens podrien causar dany al mtDNA, conduir a una pèrdua del mtDNA i generar disfuncions mitocondrials. Algun exemple descrit recentment on productes d'aquests gens nuclears inclouen proteïnes involucrades en diferents vies de reparació i manteniment del mtDNA són les glicosilases Ogg1 i Ntg1, i l'endonucleasa Apn1, involucrades en dany oxidatiu al DNA, eliminat mitjançant el mecanisme de reparació BER (Phadnis et al., 2006; Vongsamphanh et al., 2001; 2006). Adicionalment, i com una altra possible explicació, alguns autors suggereixen que la pèrdua del mtDNA es correlacionaria amb la inestabilitat del genoma nuclear i amb defectes en la biogènesi de centres Fe-S degut a una reducció del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). En condicions normals de la cèl·lula, alguns centres Fe-S són exportats al citosol i s'uneixen a diverses proteïnes que estan involucrades en el manteniment del genoma nuclear, afavorint l'estabilitat del genoma (veure més a dalt). En canvi, en cèl·lules amb defectes en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S, la pèrdua del mtDNA i la reducció del potencial de membrana condueix a una davallada en l'import de proteïnes i de ferro cap a la mitocòndria i, conseqüentment, en la síntesi i formació de centres Fe-S en la mitocòndria o l'export d'aquests al citosol, on aquests centres Fe-S no es podran unir a les proteïnes que els requereixen, i alhora encarregades de mantenir l'estabilitat genòmica (Veatch et al., 2009). Finalment, és possible que la poca disponibilitat de centres Fe-S desestabilitzés o inactivés

alguna/es proteïna/es requerida/es pel manteniment del mtDNA, portadores d'aquests co-factors.

Seria possible que la inestabilitat genòmica nuclear observada quan falten components de la maquinària ISC fos un efecte indirecte, degut a la pèrdua del mtDNA. No obstant, aquesta possibilitat no estaria totalment justificada, ja que defectes en la maquinària citosòlica CIA (mutants que presenten mtDNA) també presenten inestabilitat del genoma nuclear.

Un segon fenotip observat en els mutants mitocondrials ISC és l'absència de creixement en medi que conté fonts de carboni no fermentables, en el nostre cas glicerol, indicant una deficiència respiratòria. Hi ha una relació directa entre la deficiència respiratòria i mutacions en el mtDNA o l'absència total d'aquest (Brun et al., 2003). Una fenotip indicador d'aquests dos defectes és la formació de colònies *petite*. Utilitzant el mutant condicional *tetO₇-GRX5* s'observa de manera paulatina que a mesura que es perd Grx5 incrementen les colònies *petite*.

Després d'observar aquests fenotips, ens vàrem preguntar si l'absència del mtDNA aniria associada a la pèrdua de l'òrgànul. Per aquest motiu, mitjançant l'ús d'un plàsmid que expressa una proteïna fluorescent reporter de les mitocondries, i utilitzant els mutants condicionals regulables per doxiciclina, determinàrem que en absència de Grx5 o Iba57 l'òrgànul es mantenia present malgrat la manca del mtDNA.

S'han descrit diverses proteïnes que juguen un rol molt important en el manteniment del mtDNA, essent una de les principals Aco1. Una de les funcions de la proteïna Aco1 és protegir el genoma mitocondrial dels diversos danys, a través d'una interacció directa amb el mtDNA, promovent l'estabilització d'aquest a través del control de les activitats primàries del DNA, com són la replicació, recombinació o reparació (Chen et al., 2007). Conscients amb aquesta informació, vàrem observar que les cèl·lules absents de Grx5 presentaven uns nivells pràcticament nuls de proteïna. Una reducció de 2 vegades de l'activitat *in vitro* d'unió entre Aco1 i el mtDNA en alguns mutants és suficient per causar la inestabilitat del mtDNA *in vivo* (Chen et al., 2007). Aco1 conté un centre [4Fe-4S] on 3 de les 4 molècules de ferro estan coordinades per tres cisteïnes (Cys³⁸², Cys⁴⁴⁵ i Cys⁴⁴⁸) i la integritat d'aquest centre és essencial per realitzar l'activitat enzimàtica aconitasa (Hirling et al., 1994). No obstant, el simple fet d'augmentar els nivells de proteïna Aco1 sense mantenir la funció, independentment de l'activitat, ja són suficients per mantenir el mtDNA (Chen et al., 2005). Per aquest motiu, vàrem provar d'augmentar els nivells de proteïna Aco1 utilitzant dues estratègies: en primer lloc sobreexpressant *ACO1* mitjançant el promotor *ADH1*, i en segon, delectant *CTH2*, ja que la manca d'aquest promou l'increment de l'expressió d'*ACO1* en condicions de deficiència de

ferro (Puig et al., 2005). Però, la presència d'uns nivells més elevats de proteïna Aco1 no són suficients per mantenir l'estabilitat del mtDNA quan manca Grx5. Aquestes observacions suggereixen que a més dels baixos nivells d'Aco1, altres factors són responsables de la pèrdua del mtDNA quan falta Grx5.

Per tal d'identificar proteïnes que estabilitzessin el mtDNA es va utilitzar una genoteca comercial sobreexpressora de DNA genòmic de llevat, que contenia una representació de tots els gens. No obstant, però, no va aparèixer cap gen on la sobreexpressió del qual permetés rescatar l'absència de mtDNA quan manca Grx5, conclouent que possiblement es necessiti la combinació de més d'una proteïna sobreexpressada per mantenir l'estabilitat del mtDNA o bé que aquesta proteïna, encara que sobreexpressada, no sigui funcional quan la maquinària ISC està danyada potser per requerir centres Fe-S de manera molt estricta.

5. L'increment de l'activitat RNR i el manteniment del mtDNA en absència d'Iba57

Varis estudis suggereixen que alteracions en l'activitat RNR promouen un augment en el nombre de còpies de mtDNA en cèl·lules de llevat (Lebedeva i Shadel, 2007; Stumpf et al., 2010), indicant que els dNTPs són un factor limitant per la replicació i reparació del mtDNA. De fet, la sobreexpressió de *RNR1* o la deleció de *SML1* pot suprimir la formació de mutants *petite* en una gran varietat de fons genètics (Lecrenier i Foury, 1995; O'Rourke et al., 2005; Zhao et al., 1998). En aquest sentit la sobreexpressió de *RNR1* incrementa 10 vegades els pools de dNTPs i la deleció de *SML1* ho incrementaria aproximadament unes 2,5 vegades (Poli et al., 2012). Aquest increment en el subministrament de dNTPs podria estimular l'activitat de la polimerasa mitocondrial i la conseqüent replicació del mtDNA (Lecrenier i Foury, 1995).

Partint d'aquesta informació, vàrem sobreexpressar *RNR1* en la soca salvatge, i aquesta soca es va creuar amb diferents mutants mitocondrials ISC ($\Delta grx5$, $\Delta iba57$ i $\Delta isa1$) obtenint soques derivades sobreexpressores de *RNR1* i mutades en la maquinària ISC, pensant que aquest increment en el pool de dNTPs ajudaria a la soca mutada a mantenir el mtDNA. L'únic cas on la sobreexpressió de *RNR1* va ajudar a restaurar i mantenir els nivells mtDNA semblants als de la soca salvatge va ser en les cèl·lules absents d'Iba57. En canvi, ni en el mutant $\Delta grx5$ en la maquinària mitocondrial central de centres [2Fe-2S] i [4Fe-4S], ni el mutant $\Delta isa1$, en la mateixa branca de centres [4Fe-4S] que Iba57, aquest increment de dNTPs no va rescatar l'absència del mtDNA. La sobreexpressió de *RNR1* també rescata el defecte en la capacitat respiratòria del mutant $\Delta iba57$, fet explicable, ja que al restaurar el mtDNA també es recuperen les funcions depenent d'aquest, entre d'elles la respiració.

Per tal de confirmar que era l'activitat RNR i el respectiu increment de dNTPs el que causava el rescat del mtDNA en el mutant *Δiba57* es va sobreexpressar una altra subunitat de la RNR, concretament Rnr4. La sobreexpressió d'aquesta subunitat també permetia el manteniment del mtDNA (dades no mostrades) i el creixement en glicerol en les cèl·lules absents d'Iba57, concloent que és l'activitat RNR i el conseqüent increment de dNTPs el que permet regular el nombre de còpies de mtDNA en aquest mutant.

Fins aquest punt de l'estudi desconeixem el mecanisme exacte pel qual es produeix el rescat i manteniment del mtDNA exclusivament en el mutant *Δiba57*. Algunes possibles hipòtesis serien que aquest increment de dNTPs totals que es produeix en la cèl·lula al sobreexpressar *RNR1* resultaria en un major transport cap a la mitocondria d'aquests, i en un augment de l'activitat de la DNA polimerasa mitocondrial (Mip1) i, en conseqüència, de la síntesi del mtDNA. Està documentat que la replicació del mtDNA es produeix de manera contínua en totes les etapes del cicle cel·lular (Sena et al., 1975; Williamson i Moustacchi, 1971). Per tant, el retard en la progressió del cicle cel·lular en les cèl·lules absents d'Iba57, que és similar quan es sobreexpressa *RNR1* (dades no mostrades), tal com ja està descrit per Chabes et al. (2007), permetria més temps per la replicació del mtDNA. Addicionalment, el mutant *Δiba57* és el que presenta una hipersensibilitat més exacerbada a HU, el que podria indicar que és més sensible també a una aportació extra de dNTPs. Una altra possibilitat seria que Iba57 tingués una possible afinitat i/o interacció amb la polimerasa mitocondrial Mip1. Podria ser que algun centre [4Fe-4S] fos requerit per realitzar la seva activitat (com és el cas de la polimerasa δ i Rev3, necessàries per la replicació del DNA nuclear). Per tant, l'absència d'Iba57 reduiria la disponibilitat de centres [4Fe-4S] i estimularia la davallada de la seva activitat, o bé de la seva afinitat pels dNTPs, fet que podria ser contrarestat a l'augmentar els nivells de dNTPs.

Un altre aspecte rellevant de la sobreexpressió de *RNR1* en absència d'Iba57 és el rescat dels defectes en la síntesi de l'àcid lipoic, lisina i glutamat. El mutant *Δiba57* és auxotròfic pel glutamat i la lisina a causa de defectes específics en la maduració dels enzims Fe-S mitocondrials aconitasa i homoaconitasa involucrats en les corresponents rutes biosintètiques (Mühlenhoff et al., 2011). També presenta defectes en la síntesi de l'àcid lipoic (que es realitza mitjançant els enzims piruvat deshidrogenasa, glicina descarboxilasa i α -cetoglutarat deshidrogenasa), el qual és necessari per la formació dels grups lipoils (Gelling et al., 2007). En la síntesi de l'àcid lipoic Iba57, Isa1 i Isa2 juguen un paper molt important al donar les molècules de sofre dels seus centres [4Fe-4S] necessaris per realitzar dita síntesi.

En les cèl·lules absents d'Iba57 es bloqueja la funció mitocondrial respiratòria, s'activa la via retrògrada RTG i s'interromp la síntesi de glutamat i lisina. Aquesta activació de la via RTG inhibiria la síntesi de α -cetoglutarat, essent aquest un potent repressor de la via RTG. L'absència de α -cetoglutarat impediria la funció reguladora negativa de la via RTG realitzada per *MKS1*, per tant, la via estaria sempre activa. A més a més, el α -cetoglutarat és precursor de la lisina (Sekito et al., 2002) i el glutamat (Farooq i Pracheil, 2013; Liu i Butow, 1999); així, la manca de α -cetoglutarat impediria la síntesi d'ambdós. Possiblement la recuperació del mtDNA mitjançant l'augment de l'activitat RNR (degut a la sobreexpressió de *RNR1* i *RNR4*) en cèl·lules absents d'Iba57 provoca una repressió de la via RTG (dades no mostrades) i, conseqüentment, un augment en la síntesi de α -cetoglutarat, que facilitaria la síntesi de lisina i glutamat i el rescat fenotípic de les corresponents auxotròfies.

En resum, en aquesta segona part de la tesis es mostra que defectes en diferents etapes de la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S provoquen la pèrdua del mtDNA i, conseqüentment, defectes en la respiració. A més, l'augment de l'activitat RNR i el subseqüent increment dels nivells de dNTPs provoca el manteniment del mtDNA exclusivament en les cèl·lules absents d'Iba57, corroborant que el nombre de còpies de mtDNA en el llevat pot ser regulat per l'activitat RNR. Aquests resultats podrien suggerir una possible relació entre la proteïna Iba57 i la polimerasa mitocondrial Mip1. A més, aquesta recuperació del mtDNA promou el rescat dels defectes en la síntesi de l'àcid lipoic i de les auxotròfies per lisina i glutamat, potser a través de la via RTG.

VI. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Les cèl·lules absents de Grx5 o Iba57, proteïnes implicades en la síntesi mitocondrial de centres [4Fe-4S]/[2Fe-2S] i [4Fe-4S] respectivament, mostren una elevada taxa de mutacions espontànies en gens nuclears, fenotip que no es produeix en mutants defectius en funcions mitocondrial no associades a la formació dels centres.
2. Defectes en la maquinària mitocondrial o citosòlica de formació de centres Fe-S causen uns elevats nivells de dany constitutiu al DNA, reflexats per la formació de *foci* associats a Rad52 i la hiperfosforilació de la histona 2A.
3. Els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$ mostren hipersensibilitat a l'agent alquilant del DNA MMS i a l'agent inhibidor de la ribonucleòtid reductasa hidroxidreica, encara que el patró de sensibilitats és diferent entre ambdòs mutants.
4. L'absència de les proteïnes Grx5 o Iba57 causa un retard en la progressió al llarg de la fase S del cicle cel·lular, que es veu exacerbat amb l'addició d'una dosi subletal de hidroxidreica.
5. El *checkpoint* de dany al DNA està constitutivament actiu quan la síntesi mitocondrial o citosòlica de centres Fe-S està danyada, indicat per la degradació de la proteïna Sml1 inhibidora de la ribonucleòtid reductasa.
6. Els mediadors de la via de senyalització del *checkpoint* són diferents entre els mutants $\Delta grx5$ i $\Delta iba57$, tenint com a punt comú la quinasa Dun1, que és la responsable de promoure la degradació de Sml1 i conseqüentment l'augment de l'activitat ribonucleòtid reductasa.
7. En les cèl·lules absents de Grx5 l'activació del *checkpoint* de dany al DNA és independent de l'acumulació de ferro intracel·lular i de l'activació del reguló Aft1.
8. La degradació de la proteïna Sml1 en absència de Grx5 depèn tant de la ruta del complex Rad6-Urb2-Mub1 i del proteosoma 26S com de la ruta vacuolar proteolítica.

CONCLUSIONS

9. Rnr2 es redistribueix cap al citoplasma en les cèl·lules mutants *Δgrx5*, de manera semblant a les cèl·lules salvatges tractades amb MMS. Aquest efecte és degut a la desestabilització del mRNA de *WTM1* promogut per Cth2, que evita l'ancoratge nuclear de Rnr2, i a la disminució dels nivells de proteïna Dif1 facilitadora de l'import nuclear. Les cèl·lules absents d'Iba57 i Nbp35 (aquesta darrera involucrada en la síntesi citosòlica dels centres Fe-S) també presenten una redistribució citosòlica de Rnr2, encara que en menor grau i deguda exclusivament a Dif1.
10. Les cèl·lules mancades de Grx5 i Rad6 mostren una afectació severa en la viabilitat cel·lular, fet que implica la participació de la via de reparació post-replicativa, especialment la branca lliure d'errors però també en menor mesura la branca propensa a errors, per tal de mantenir la supervivència cel·lular en absència de Grx5.
11. La via de reparació homòloga juga un paper important, juntament amb la via post-replicativa, per tal de reparar el dany causat al DNA per agents genotòxics i mantenir la supervivència cel·lular en les cèl·lules mutants *Δgrx5*.
12. Defectes en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S causen la pèrdua del DNA mitocondrial i, conseqüentment, disfunció mitocondrial, pèrdua de capacitat respiratòria i activació de la via RTG.
13. La pèrdua del DNA mitocondrial en els mutants de la maquinària mitocondrial de síntesi de centres Fe-S no comporta la pèrdua dels orgànuls mitocondrials.
14. L'increment de l'activitat ribonucleòtid reductasa, i el conseqüent increment de dNTPs, permet el manteniment del DNA mitocondrial i el rescat dels defectes en la síntesi d'àcid lipoic i en la biosíntesi de lisina i glutamat en cèl·lules absents d'Iba57, però no en els mutants sense Grx5.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, A., i García-Muse, T. (2013). Causes of genome instability. *Annual Review of Genetics*, 47, 1–32.
- Alani, E., Thresher, R., Griffith, J. D., i Kolodner, R. D. (1992). Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *Journal of Molecular Biology*, 227(1), 54–71.
- Allen, J. B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E. C., i Elledge, S. J. (1994). The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes & Development*, 8(20), 2401–15.
- Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., i Herrero, E. (2009). Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 66.
- Andersen, P. L., Xu, F., i Xiao, W. (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Research*, 18(1), 162–73.
- Andreson, B. L., Gupta, A., Georgieva, B. P., i Rothstein, R. (2010). The ribonucleotide reductase inhibitor, Sml1, is sequentially phosphorylated, ubiquitylated and degraded in response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 38(19), 6490–501.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., i Struhl, K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley and Sons*.
- Azad, G. K., Singh, V., Golla, U., i Tomar, R. S. (2013). Depletion of cellular iron by curcumin leads to alteration in histone acetylation and degradation of Sml1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 8(3):e59003.
- Baek, I. J., Kang, H. J., Chang, M., Choi, I. D., Kang, C. M., i Yun, C. W. (2012). Cadmium inhibits the protein degradation of Sml1 by inhibiting the phosphorylation of Sml1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(3), 385–90.
- Balk, J., Aguilar Netz, D. J., Tepper, K., Pierik, A. J., i Lill, R. (2005). The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 25(24), 10833–41.
- Balk, J., i Lill, R. (2004). The cell's cookbook for iron-sulfur clusters: recipes for fool's gold? *ChemBiochem*, 5(8), 1044–9.
- Ball, L. G., Zhang, K., Cobb, J. A., Boone, C., i Xiao, W. (2009). The yeast Shu complex couples error-free post-replication repair to homologous recombination. *Molecular Microbiology*, 73(1), 89–102.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M. M., Gualberto, J. M., Claxton, R., Naik, S. G., Huynh, B. H., Herrero, E., Jacquot, J. P., Johnson, M. K., i Rouhier, N. (2008). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *The EMBO Journal*, 27(7), 1122–33.
- Barlow, J. H., Lisby, M., i Rothstein, R. (2008). Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Molecular Cell*, 30(1), 73–85.

BIBLIOGRAFIA

- Barrientos, A. (2003). Yeast models of human mitochondrial diseases. *IUBMB Life*, 55(2), 83–95.
- Baruffini, E., Lodi, T., Dallabona, C., Puglisi, A., Zeviani, M., i Ferrero, I. (2006). Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans. *Human Molecular Genetics*, 15(19), 2846–55.
- Bashkirov, V. I., Bashkirova, E. V., Haghazari, E., i Heyer, W. D. (2003). Direct kinase-to-kinase signaling mediated by the FHA phosphoprotein recognition domain of the Dun1 DNA damage checkpoint kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 23(4), 1441–52.
- Becker, T., Böttinger, L., i Pfanner, N. (2012). Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 85–91.
- Beinert, H. (2000). Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(1), 2–15.
- Beinert, H., Holm, R. H., i Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science*, 277(5326), 653–659.
- Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., i Herrero, E. (1998a). Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast*, 14(12), 1127–38.
- Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., i Herrero, E. (1998b). An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 26(4), 942–7.
- Bellí, G., Molina, M. M., García-Martínez, J., Pérez-Ortsín, J. E., i Herrero, E. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Glutaredoxin 5-deficient Cells Subjected to Continuous Oxidizing Conditions Are Affected in the Expression of Specific Sets of Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 12386–12395.
- Bellí, G., Polaina, J., Tamarit, J., De La Torre, M. A., Rodríguez-Manzaneque, M. T., Ros, J., i Herrero, E. (2002). Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37590–37596.
- Bennett, C. B., Lewis, A. L., Baldwin, K. K., i Resnick, M. A. (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5613–7.
- Berens, T. J., i Toczyski, D. P. (2012). Keeping it together in times of stress: checkpoint function at stalled replication forks. *Molecular Cell*, 45(5), 585–6.
- Biswas, S., Chida, A., i Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein–thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochemical Pharmacology*, 71, 551–564.

- Blastyák, A., Pintér, L., Unk, I., Prakash, L., Prakash, S., i Haracska, L. (2007). Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Molecular Cell*, 28(1), 167–75.
- Bogenghagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L., i Kobayashi, R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(11), 1205–16.
- Boiteux, S., i Guillet, M. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 3(1), 1–12.
- Boiteux, S., i Jinks-Robertson, S. (2013). DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(4), 1025–64.
- Bolar, N. A., Vanlander, A. V., Wilbrecht, C., Van der Aa, N., Smet, J., De Paepe, B., Vandeweyer, G., Kooy, F., Eyskens, F., De Letter, E., Delanghe, G., Govaert, P., Leroy, J. G., Loeys, B., Lill, R., Van Laer, L., i Van Coster, R. (2013). Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene *IBA57* causes severe myopathy and encephalopathy. *Human Molecular Genetics*, 22(13), 2590–602.
- Booker, S. J., Cicchillo, R. M., i Grove, T. L. (2007). Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(5), 543–52.
- Branzei, D., i Foiani, M. (2005). The DNA damage response during DNA replication. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 568–75.
- Branzei, D., Vanoli, F., i Foiani, M. (2008). SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature*, 456(7224), 915–20.
- Broomfield, S., Hryciw, T., i Xiao, W. (2001). DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 486(3), 167–84.
- Brun, S., Aubry, C., Lima, O., Filmon, R., Berges, T., Chabasse, D., i Bouchara, J. P. (2003). Relationships between Respiration and Susceptibility to Azole Antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 847–853.
- Bushweller, J. H., Aslund, F., Wüthrich, K., i Holmgren, A. (1992). Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry*, 31(38), 9288–93.
- Butow, R. A., i Avadhani, N. G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular Cell*, 14(1), 1–15.
- Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., i Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, 110(4), 1353–8.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A. De Frutos, R., Palau, F., Patel, P. I., Di Donato, S., Mandel, J. L., Coccozza, S., Koenig, M., i Pandolfo, M.

BIBLIOGRAFIA

- (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271(5254), 1423–7.
- Chabes, A., Georgieva, B., i Domkin, V. (2003). Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell*, 112, 391–401.
- Chabes, A., i Stillman, B. (2007). Constitutively high dNTP concentration inhibits cell cycle progression and the DNA damage checkpoint in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 104(4), 1183–8.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., i Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*, 138(4), 628–44.
- Chelstowska, A., i Butow, R. A. (1995). RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(30), 18141–6.
- Chelstowska, A., Liu, Z., Jia, Y., Amberg, D., i Butow, R. A. (1999). Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast*, 15(13), 1377–91.
- Chen, S., Smolka, M. B., i Zhou, H. (2007). Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 986–95.
- Chen, X. J., Wang, X., i Butow, R. A. (2007). Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13738–43.
- Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A., i Butow, R. A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*, 307(5710), 714–7.
- Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., i Longhese, M. P. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38631–8.
- Cobb, J. A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C., i Gasser, S. M. (2003). DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *The EMBO Journal*, 22(16), 4325–36.
- Contamine, V., i Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiology and Molecular Biology*, 64(2), 281–315.
- Couturier, J., Jacquot, J., i Rouhier, N. (2009a). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2539–2557.
- Couturier, J., Koh, C. S., Zaffagnini, M., Winger, A. M., Gualberto, J. M., Corbier, C., Decottignies, P., Jacquot, J. P., Lemaire, S. D., Didierjean, C., i Rouhier, N. (2009b).

- Structure-Function Relationship of the Chloroplastic Glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 9299–9310.
- Craven, R. J., i Petes, T. D. (2000). Involvement of the Checkpoint Protein Mec1p in Silencing of Gene Expression at Telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 20(7), 2378–2384.
- Cui, H., Kong, Y., i Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 646354.
- David, S. S., O'Shea, V. L., i Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941–50.
- Davidson, M. B., Katou, Y., Keszthelyi, A., Sing, T. L., Xia, T., Ou, J., Vaisica, J.A., Thevakumaran, N., Marjavaara, L., Myers, C. L., Chabes, A., Shirahige, K., i Brown, G. W. (2012). Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *The EMBO Journal*, 31(4), 895–907.
- De Jager, M., Dronkert, M. L., Modesti, M., Beerens, C. E., Kanaar, R., i Van Gent, D. C. (2001). DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Research*, 29(6), 1317–25.
- De la Torre Ruiz, M. A., i Lowndes, N. F. (2000). DUN1 defines one branch downstream of RAD53 for transcription and DNA damage repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 485(2-3), 205–6.
- De la Torre-Ruiz, M. A., Green, C. M., i Lowndes, N. F. (1998). RAD9 and RAD24 define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. *The EMBO Journal*, 17(9), 2687–98.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3217–66.
- Deponte, M., Becker, K., i Rahlfs, S. (2005). Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins. *Biological Chemistry*, 386, 33–40.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R., i Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278(5338), 680–6.
- Díaz de la Loza, M. D. C., Gallardo, M., García-Rubio, M. L., Izquierdo, A., Herrero, E., Aguilera, A., i Wellinger, R. E. (2011). Zim17/Tim15 links mitochondrial iron-sulfur cluster biosynthesis to nuclear genome stability. *Nucleic Acids Research*, 39(14), 6002–15.
- Dolce, V., Fiermonte, G., Runswick, M. J., Palmieri, F., i Walker, J. E. (2001). The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2284–8.
- Downs, J. A., Lowndes, N. F., i Jackson, S. P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, 408(6815), 1001–4.

BIBLIOGRAFIA

- Eckers, E., Bien, M., Stroobant, V., Herrmann, J. M., i Deponte, M. (2009). Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: the catalytic redox mechanism redux. *Biochemistry*, 48, 1410–1423.
- Eisenberg, T., Büttner, S., Kroemer, G., i Madeo, F. (2007). The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis*, 12(5), 1011–23.
- Elledge, S. J., i Davis, R. W. (1987). Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. *Molecular and Cellular Biology*, 7(8), 2783–93.
- Farooq, M., i Pracheil, T. (2013). Mitochondrial DNA instability in cells lacking aconitase correlates with iron citrate toxicity. *Oxidative Medicine Cell Longevity*, 493536.
- Feng, Q., Düring, L., de Mayolo, A. A., Lettier, G., Lisby, M., Erdeniz, N., Mortensen, U. H., i Rothstein, R. (2007). Rad52 and Rad59 exhibit both overlapping and distinct functions. *DNA Repair*, 6(1), 27–37.
- Finn, K., Lowndes, N. F., i Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(9), 1447–73.
- Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene *MIP1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(34), 20552–60.
- Foury, F., i Roganti, T. (2002). Deletion of the mitochondrial carrier genes *MRS3* and *MRS4* suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24475–83.
- Foury, F., i Talibi, D. (2001). Mitochondrial Control of Iron Homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast Frataxin-deficient strain. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 7762–8.
- Fraenkel, D. G. (1992). Genetics and intermediary metabolism. *Annual Review of Genetics*, 26, 159–77.
- Frey, P. A., i Magnusson, O. T. (2003). S-Adenosylmethionine: a wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylcobalamin? *Chemical Reviews*, 103(6), 2129–48.
- Fu, Y., i Xiao, W. (2006). Identification and characterization of CRT10 as a novel regulator of *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase genes. *Nucleic Acids Research*, 34(6), 1876–83.
- Gari, K., León Ortiz, A. M., Borel, V., Flynn, H., Skehel, J. M., i Boulton, S. J. (2012). *MMS19* links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science*, 337(6091), 243–5.
- Gelling, C., Dawes, I. W., Richhardt, N., Lill, R., i Muhlenhoff, U. (2007). Mitochondrial Iba57p Is Required for Fe/S Cluster Formation on Aconitase and Activation of Radical SAM Enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, 28(5), 1851–1861.

- Genois, M. M., Paquet, E. R., Laffitte, M. C., Maity, R., Rodrigue, A., Ouellette, M., i Masson, J. Y. (2014). DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 40–73.
- Gerald, J. N. F., Benjamin, J. M., i Kron, S. J. (2002). Robust G1 checkpoint arrest in budding yeast: dependence on DNA damage signaling and repair. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 8), 1749–57.
- Gerber, J., i Lill, R. (2002). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion*, 2(1-2), 71–86.
- Ghezzi, P. (2005). Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochemical Society Transactions*, 33, 1378–1381.
- Gietz, R. D., i Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 74(2), 527–34.
- Goldstein, A. L., i McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(14), 1541–53.
- Gros, L., Saparbaev, M. K., i Laval, J. (2002). Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene*, 21(58), 8905–25.
- Hammet, A., Pike, B. L., Mitchelhill, K. I., Teh, T., Kobe, B., House, C. M., Kemp, B. E., i Heierhorst, J. (2000). FHA domain boundaries of the dun1p and rad53p cell cycle checkpoint kinases. *FEBS Letters*, 471(2-3), 141–6.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557–580.
- Harper, J. W., i Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*, 28(5), 739–45.
- Harrison, J. C., i Haber, J. E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annual Review of Genetics*, 40, 209–35.
- Hausmann, A., Samans, B., Lill, R., i Mühlenhoff, U. (2008). Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 8318–8330.
- Herrero, E., Bellí, G., i Casa, C. (2010). Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Current Protein & Peptide Science*, 11(8), 659–68.
- Herrero, E., i De La Torre-Ruiz, M. A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1518–1530.
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., i Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44, 113–39.

BIBLIOGRAFIA

- Hidalgo, E., i Demple, B. (1996). Activation of SoxR-dependent transcription in vitro by noncatalytic or NifS-mediated assembly of [2Fe-2S] clusters into apo-SoxR. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7269–72.
- Hirling, H., Henderson, B. R., i Kühn, L. C. (1994). Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. *The EMBO Journal*, 13(2), 453–61.
- Hoch, N. C., Chen, E. S., Buckland, R., Wang, S. C., Fazio, A., Hammet, A., Pallicioli, A., Chabes, A., Tsai, M.D., i Heierhorst, J. (2013). Molecular basis of the essential S phase function of the rad53 checkpoint kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 33(16), 3202–13.
- Hoegge, C., Pfander, B., i Moldovan, G. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, (419) 135–141.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366–74.
- Hofer, A., Crona, M., Logan, D. T., i Sjöberg, B. M. (2012). DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1), 50–63.
- Holmgren, A. (1979). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 3664–3671.
- Huang, M., i Elledge, S. J. (1997). Identification of *RNR4*, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), 6105–13.
- Huang, M., Zhou, Z., i Elledge, S. J. (1998). The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell*, 94(5), 595–605.
- Huertas, D., Sendra, R., i Muñoz, P. (2009). Chromatin dynamics coupled to DNA repair. *Epigenetics*, 4(1), 31–42.
- Ingemarson, R., i Thelander, L. (1996). A kinetic study on the influence of nucleoside triphosphate effectors on subunit interaction in mouse ribonucleotide reductase. *Biochemistry*, 35(26), 8603–9.
- Izquierdo, A., Casas, C., Mühlenhoff, U., Lillig, C. H., i Herrero, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryotic Cell*, 7(8), 1415–26.
- Jackson, S. P., i Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–8.
- Jain, R., Vanamee, E. S., Dzikovski, B. G., Buku, A., Johnson, R. E., Prakash, L., Prakash, S., i Aggarwal, A. K. (2014). An iron-sulfur cluster in the polymerase domain of yeast DNA polymerase ϵ . *Journal of Molecular Biology*, 426(2), 301–8.

- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schowob, E., i Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11), 947–962.
- Johansson, C., Lillig, C., i Holmgren, A. (2004). Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7537–7543.
- Jones, G. M., Stalker, J., Humphray, S., West, A., Cox, T., Rogers, J., Dunham, I., i Prelich, G. (2008). A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Methods*, 5(3), 239–41.
- Jordan, A., i Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 71–98.
- Kaguni, L. S. (2004). DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 293–320.
- Kaniak-Golik, A., i Skoneczna, A. (2015). Mitochondria-nucleus network for genome stability. *Free Radical Biology & Medicine*, (82), 73-104.
- Kaplan, C. D., i Kaplan, J. (2009). Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chemical Reviews*, 109(10), 4536–52.
- Kashlan, O. B., i Cooperman, B. S. (2003). Comprehensive model for allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase: refinements and consequences. *Biochemistry*, 42(6), 1696–706.
- Kaufman, B. A., Newman, S. M., Hallberg, R. L., Slaughter, C. A., Perlman, P. S., i Butow, R. A. (2000). In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 7772–7.
- King, M. P., i Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 246(4929), 500–3.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., i Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *The EMBO Journal*, 18(14), 3981–9.
- Klinkenberg, L. G., Webb, T., i Zitomer, R. S. (2006). Synergy among differentially regulated repressors of the ribonucleotide diphosphate reductase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 5(7), 1007–17.
- Kolberg, M., Strand, K. R., Graff, P., i Andersson, K. K. (2004). Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1699(1-2), 1–34.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 16895–8.
- Kunkel, T. A., i Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 681–710.

BIBLIOGRAFIA

- Kunz, B. A., Straffon, A. F., i Vonarx, E. J. (2000). DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion synthesis. *Mutation Research*, 451(1-2), 169–85.
- Lai, M. C., i Tarn, W. Y. (2004). Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31745–9.
- LaMarche, A. E., Abate, M. I., Chan, S. H., i Trumpower, B. L. (1992). Isolation and characterization of *COX12*, the nuclear gene for a previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(31), 22473–80.
- Lambeth, D. O., Mehus, J. G., Ivey, M. A., i Milavetz, B. I. (1997). Characterization and cloning of a nucleoside-diphosphate kinase targeted to matrix of mitochondria in pigeon. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24604–11.
- Lebedeva, M. A., i Shadel, G. S. (2007). Cell cycle- and ribonucleotide reductase-driven changes in mtDNA copy number influence mtDNA Inheritance without compromising mitochondrial gene expression. *Cell Cycle*, 6(16), 2048–57.
- Lecrenier, N., i Foury, F. (1995). Overexpression of the *RNR1* gene rescues *Saccharomyces cerevisiae* mutants in the mitochondrial DNA polymerase-encoding *MIP1* gene. *Molecular & General Genetics*, 249(1), 1–7.
- Lee, Y. D., i Elledge, S. J. (2006). Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes & Development*, 20(3), 334–44.
- Lee, Y. D., Wang, J., Stubbe, J., i Elledge, S. J. (2008). Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Molecular Cell*, 32(1), 70–80.
- Lehmann, A. R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, 85(11), 1101–11.
- Lengsfeld, B. M., Rattray, A. J., Bhaskara, V., Ghirlando, R., i Paull, T. T. (2007). Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Molecular Cell*, 28(4), 638–51.
- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B. C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W. W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Roimans, M.A., Pals, G., Arwert, F., Mathew, C. G., Zdzienicka, M.Z., Hiom, K., De Winter, J. P., i Joenje, H. (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature Genetics*, 37(9), 934–5.
- Li, L., Bagley, D., Ward, D. M., i Kaplan, J. (2008). Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 28(4), 1326–37.
- Li, L., Chen, O. S., McVey Ward, D., i Kaplan, J. (2001). *CCC1* is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29515–9.
- Li, L., Jia, X., Ward, D. M., i Kaplan, J. (2011). Yap5 protein-regulated transcription of the *TYW1* gene protects yeast from high iron toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38488–97.

- Li, L., i Kaplan, J. (2004). A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33653–61.
- Li, W. F., Yu, J., Ma, X. X., Teng, Y. B., Luo, M., Tang, Y. J., i Zhou, C. Z. (2010). Structural basis for the different activities of yeast Grx1 and Grx2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 1542–1547.
- Li, X., i Heyer, W. D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(1), 99–113.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460(7257), 831–8.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., i Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(9), 1491–508.
- Lill, R., i Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 457–486.
- Lill, R., i Mühlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 669–700.
- Lillig, C., i Berndt, C. (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron–sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8168–8173.
- Lillig, C. H., Berndt, C., i Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(11), 1304–17.
- Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C., i Rothstein, R. (2004a). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*, 118(6), 699–713.
- Lisby, M., Mortensen, U. H., i Rothstein, R. (2003). Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nature Cell Biology*, 5(6), 572–7.
- Lisby, M., i Rothstein, R. (2004b). DNA repair: keeping it together. *Current Biology : CB*, 14(23), R994–6.
- Lisby, M., Rothstein, R., i Mortensen, U. H. (2001). Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8276–82.
- Liu, Z., i Butow, R. A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annual Review of Genetics*, 40, 159–85.
- Liu, Z., i Butow, R. A. (1999). A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 6720–8.

BIBLIOGRAFIA

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., i Darnell, J. (2000). Mutations Affecting Genome Stability. 4^a ed. *Molecular Cell Biology*. Cap. 24.5.
- Lönn, M., i Hudemann, C. (2008). Expression pattern of human glutaredoxin 2 isoforms: identification and characterization of two testis/cancer cell-specific isoforms. *Antioxid & Redox Signaling*, 10(3), 547–557.
- Lopez-Mosqueda, J., Maas, N. L., Jonsson, Z. O., Defazio-Eli, L. G., Wohlschlegel, J., i Toczyski, D. P. (2010). Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing. *Nature*, 467(7314), 479–83.
- Lopreiato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrigoni, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L. A., i Carignani, G. (2004). Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *The Biochemical Journal*, 377, 395–405.
- Lowndes, N. F., i Murguia, J. R. (2000). Sensing and responding to DNA damage. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(1), 17–25.
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., i Grant, C. M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular Biology of the Cell*, 9, 1081–1091.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. H., i Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 33(12), 3799–811.
- Malavé, T. M., i Dent, S. Y. R. (2006). Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(4), 437–43.
- Maria, C. (2014). Genomic instability associated to impairment of Fe-S cluster synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. Tesis doctoral. Universitat de Lleida.
- Mazumder, A., Tummler, K., Bathe, M., i Samson, L. D. (2013). Single-cell analysis of ribonucleotide reductase transcriptional and translational response to DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 33(3), 635–42.
- McFarlan, S. C., Terrell, C. A., i Hogenkamp, H. P. (1992). The purification, characterization, and primary structure of a small redox protein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, an archaebacterium. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(15), 10561–9.
- McHugh, P. J., Spanswick, V. J., i Hartley, J. A. (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *The Lancet. Oncology*, 2(8), 483–90.
- McStay, G. P., Su, C. H., Thomas, S. M., Xu, J. T., i Tzagoloff, A. (2013). Characterization of assembly intermediates containing subunit 1 of yeast cytochrome oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26546–56.

- Merz, S., i Westermann, B. (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology*, 10(9), R95.
- Mesecke, N., Mittler, S., Eckers, E., Herrmann, J. M., i Deponte, M. (2008a). Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins. *Biochemistry*, 47(5), 1452–63.
- Mesecke, N., Spang, A., Deponte, M., i Herrmann, J. M. (2008b). A Novel Group of Glutaredoxins in the cis-Golgi Critical for Oxidative Stress Resistance. *Molecular Biology of the Cell*, 19(6), 2673–2680.
- Meyer, J. (2008). Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(2), 157–70.
- Miao, R., Holmes-Hampton, G. P., i Lindahl, P. A. (2011). Biophysical investigation of the iron in Aft1-1(up) and Gal-YAH1 *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 50(13), 2660–71.
- Mimitou, E. P., i Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, 455(7214), 770–4.
- Mol, C. D., Parikh, S. S., Putnam, C. D., Lo, T. P., i Tainer, J. A. (1999). DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 101–28.
- Molina, M. M., Bellí, G., De La Torre, M. A., Rodríguez-Manzanares, M. T., i Herrero, E. (2004). Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 40405–40411.
- Moore, J. K., i Haber, J. E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(5), 2164–73.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374(6518), 131–4.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., i Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *The EMBO Journal*, 22(18), 4815–25.
- Mühlenhoff, U., i Lill, R. (2000). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1459(2-3), 370–82.
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lilling, C. H., i Lill, R. (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metabolism*, 12, 373–385.

BIBLIOGRAFIA

- Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A. J., i Lill, R. (2011). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 286(48), 41205–41216.
- Myung, K., Datta, A., i Kolodner, R. D. (2001). Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104(3), 397–408.
- Nagley, P., i Linnane, A. W. (1970). Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 39(5), 989–96.
- Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., i Futcher, A. B. (1988). The *WHI1+* gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *The EMBO Journal*, 7(13), 4335–4346.
- Netz, D. J. a, Stith, C. M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Genau, H. M., Stodola, J. L., Lill, R., Burgers, P. M., i Pierik, A. J. (2012). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nature Chemical Biology*, 8(1), 125–32.
- Netz, D. J. A., Mascarenhas, J., Stehling, O., Pierik, A. J., i Lill, R. (2014). Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends in Cell Biology*, 24(5), 303–12.
- Niida, H., Shimada, M., Murakami, H., i Nakanishi, M. (2010). Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Science*, 101(12), 2505–9.
- Northam, M. R., Robinson, H. A., Kochenova, O. V, i Shcherbakova, P. V. (2010). Participation of DNA polymerase zeta in replication of undamaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 184(1), 27–42.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., i Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual Review of Genetics*, 36, 617–56.
- Nyholm, S., Thelander, L., i Gräslund, A. (1993). Reduction and loss of the iron center in the reaction of the small subunit of mouse ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochemistry*, 32(43), 11569–74.
- O'Rourke, T. W., Doudican, N. a, Zhang, H., Eaton, J. S., Doetsch, P. W., i Shadel, G. S. (2005). Differential involvement of the related DNA helicases Pif1p and Rrm3p in mtDNA point mutagenesis and stability. *Gene*, 354, 86–92.
- Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J. C., Lill, R., i Winge, D. R. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 17661–17669.
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G.A, Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A., i Mootha, V. K. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), 112–23.

- Pâques, F., i Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 349–404.
- Paul, V. D., i Lill, R. (2015). Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(6), 1528–1539.
- Pedrajas, J. R., Porras, P., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Miranda-Vizueté, A., i Bárcena, J. A. (2002). Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. *The Biochemical Journal*, 364, 617–623.
- Pedro-Segura, E., Vergara, S. V, Rodríguez-Navarro, S., Parker, R., Thiele, D. J., i Puig, S. (2008). The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase *SDH4* mRNA in response to iron deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28527–35.
- Perlstein, D. L., Ge, J., Ortigosa, A. D., Robblee, J. H., Zhang, Z., Huang, M., i Stubbe, J. (2005). The active form of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit is a heterodimer in vitro and in vivo. *Biochemistry*, 44(46), 15366–77.
- Petrini, J. H. J., i Stracker, T. H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends in Cell Biology*, 13(9), 458–62.
- Phadnis, N., Mehta, R., Meednu, N., i Sia, E. A. (2006). Ntg1p, the base excision repair protein, generates mutagenic intermediates in yeast mitochondrial DNA. *DNA Repair*, 5(7), 829–39.
- Philpott, C. C., i Protchenko, O. (2008). Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 20–7.
- Pimentel, C., Vicente, C., Menezes, R. A., Caetano, S., Carreto, L., i Rodrigues-Pousada, C. (2012). The role of the Yap5 transcription factor in remodeling gene expression in response to Fe bioavailability. *PLoS One*, 7(5): e37434.
- Poli, J., Tsaponina, O., Crabbé, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., i Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *The EMBO Journal*, 31(4), 883–94.
- Pondarré, C., Antiochos, B. B., Campagna, D. R., Clarke, S. L., Greer, E. L., Deck, K. M., McDonals, A., Han, A. P., Medlock, A., Kutok, J. L., Anderson, S. A., Eisenstein, R. S., i Fleming, M. D. (2006). The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Human Molecular Genetics*, 15(6), 953–64.
- Porras, P., Padilla, C., i Krayl, M. (2006). One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 16551–16562.

BIBLIOGRAFIA

- Prakash, S., Johnson, R. E., i Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 317–53.
- Prakash, S., i Prakash, L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation Research*, 451(1-2), 13–24.
- Puig, S., Askeland, E., i Thiele, D. J. (2005). Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell*, 120(1), 99–110.
- Puig, S., Vergara, S. V, i Thiele, D. J. (2008). Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metabolism*, 7(6), 555–64.
- Puigpinós, J., Casas, C., i Herrero, E. (2015). Altered intracellular calcium homeostasis and endoplasmic reticulum redox state in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Grx6 glutaredoxin. *Molecular Biology of the Cell*, 26(1), 104–16.
- Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., i de la Torre-Ruiz, M. A. (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 21), 4554–4564.
- Putnam, C. D., Hayes, T. K., i Kolodner, R. D. (2010). Post-replication repair suppresses duplication-mediated genome instability. *PLoS Genetics*, 6(5): e1000933.
- Rampazzo, C., Ferraro, P., Pontarin, G., Fabris, S., Reichard, P., i Bianchi, V. (2004). Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17019–26.
- Rasmussen, A. K., Chatterjee, A., Rasmussen, L. J., i Singh, K. K. (2003). Mitochondria-mediated nuclear mutator phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 31(14), 3909–17.
- Redon, C., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Orr, A. H., Lowndes, N. F., i Bonner, W. M. (2003). Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Reports*, 4(7), 678–84.
- Rees, D. C. (2002). Great metaloclusters in enzymology. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 221–46.
- Reichard, P. (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 349–74.
- Reinders, J., Zahedi, R. P., Pfanner, N., Meisinger, C., i Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research*, 5(7), 1543–54.
- Rodríguez-Manzaneque, M. T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., i Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 8180–8190.

- Rodríguez-Manzanares, M. T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., i Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1109–1121.
- Rofougaran, R., Crona, M., Vodnala, M., Sjöberg, B.-M., i Hofer, A. (2008). Oligomerization status directs overall activity regulation of the *Escherichia coli* class Ia ribonucleotide reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(51), 35310–8.
- Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*, 11(1), 12–7.
- Rouault, T. A. (2012). Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Disease Models & Mechanisms*, 5(2), 155–64.
- Rouse, J. (2004). Esc4p, a new target of Mec1p (ATR), promotes resumption of DNA synthesis after DNA damage. *The EMBO Journal*, 23(5), 1188–97.
- Ruoppolo, M., Lundström-Ljung, J., i Talamo, F. (1997). Effect of glutaredoxin and protein disulfide isomerase on the glutathione-dependent folding of ribonuclease A. *Biochemistry*, 36(40), 12259–12267.
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., i Liu, D. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science*, 286(11), 1166–1172.
- Sanvisens, N., Bañó, M. C., Huang, M., i Puig, S. (2011). Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency. *Molecular Cell*, 44(5), 759–69.
- Sanvisens, N., de Llanos, R., i Puig, S. (2013). Function and regulation of yeast ribonucleotide reductase: cell cycle, genotoxic stress, and iron bioavailability. *Biomedical Journal*, 36(2), 51–8.
- Sanvisens, N., Romero, A. M., An, X., Zhang, C., de Llanos, R., Martínez-Pastor, M. T., Bañó, M. C., Huang, M., i Puig, S. (2014). Yeast Dun1 kinase regulates ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 in response to iron deficiency. *Molecular and Cellular Biology*, 34(17), 3259–71.
- Schofield, M. J., i Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual Review of Microbiology*, 57, 579–608.
- Schwartz, M. F., Lee, S.-J., Duong, J. K., Eminaga, S., i Stern, D. F. (2003). FHA domain-mediated DNA checkpoint regulation of Rad53. *Cell Cycle*, 2(4), 384–96.
- Seguin, A., Ward, D. M., i Kaplan, J. (2011). Regulation of ribonucleotide reductase during iron limitation. *Molecular Cell*, 44(5), 683–4.
- Segurado, M., i Diffley, J. F. X. (2008). Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes & Development*, 22(13), 1816–27.
- Sekito, T., Liu, Z., Thornton, J., i Butow, R. A. (2002). RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), 795–804.

BIBLIOGRAFIA

- Sena, E. P., Welch, J. W., Halvorson, H. O., i Fogel, S. (1975). Nuclear and mitochondrial deoxyribonucleic acid replication during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 123(2), 497–504.
- Shadel, G. S. (1999). Yeast as a model for human mtDNA replication. *The American Journal of Human Genetics*, 65(5), 1230–1237.
- Shakoury-Elizeh, M. (2004). Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of Cell*, 15(3), 1233–1243.
- Sheftel, A. D., Stehling, O., Pierik, A. J., Elsässer, H.-P., Mühlenhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., i Lill, R. (2010). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11775–80.
- Sheftel, A., Stehling, O., i Lill, R. (2010). Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(5), 302–14.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 350, 3–41.
- Shi, Y., Ghosh, M., Kovtunovych, G., Crooks, D. R., i Rouault, T. A. (2012). Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(2), 484–92.
- Shor, E., Fox, C. A., i Broach, J. R. (2013). The yeast environmental stress response regulates mutagenesis induced by proteotoxic stress. *PLoS Genetics*, 9(8): e1003680.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschill, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., i Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13207–12.
- Siede, W., Allen, J. B., Elledge, S. J., i Friedberg, E. C. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* *MEC1* gene, which encodes a homolog of the human *ATM* gene product, is required for G1 arrest following radiation treatment. *Journal of Bacteriology*, 178(19), 5841–3.
- Siede, W., Friedberg, A. S., Dianova, I., i Friedberg, E. C. (1994). Characterization of G1 checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents. *Genetics*, 138(2), 271–81.
- Silva, R. D., Sotoca, R., Johansson, B., Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M. T., Peinado, J. M., i Côte-Real, M. (2005). Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 58(3), 824–834.
- Stehling, O., i Lill, R. (2013a). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(7), 1–17.
- Stehling, O., Mascarenhas, J., Vashisht, A. A., Sheftel, A. D., Niggemeyer, B., Rösser, R., Pierik, A. J., Wohlschlegel, J. A., i Lill, R. (2013b). Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B

- integrate iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins. *Cell Metabolism*, 18(2), 187–98.
- Stehling, O., Vashisht, A. A., Mascarenhas, J., Jonsson, Z. O., Sharma, T., Netz, D. J., Pierik, A. J., Wohlschlegel, J. A., i Lill, R. (2012). *MMS19* assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science*, 337(6091), 195–9.
- Stehling, O., Wilbrecht, C., i Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie*, 100, 61–77.
- Stone, J. E., Kumar, D., Binz, S. K., Inase, A., Iwai, S., Chabes, A., Burgers, P. M., i Kunkel, T. A. (2011). Lesion bypass by *S. cerevisiae* Pol ζ alone. *DNA Repair*, 10(8), 826–34.
- Stumpf, J. D., Bailey, C. M., Spell, D., Stillwagon, M., Anderson, K. S., i Copeland, W. C. (2010). *mip1* containing mutations associated with mitochondrial disease causes mutagenesis and depletion of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Human Molecular Genetics*, 19(11), 2123–33.
- Su, D., Novoselov, S., i Sun, Q. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26491–26498.
- Sweeney, F. D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., i Durocher, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Current Biology*, 15(15), 1364–75.
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., i Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, 17(18), 5497–508.
- Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., i Ros, J. (2006). Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Analytical Biochemistry*, 351(1), 149–151.
- Taylor, S. D., Zhang, H., Eaton, J. S., Rodeheffer, M. S., Lebedeva, M. A., O’rourke, T. W., Siede, W., i Shadel, G. S. (2005). The conserved Mec1/Rad53 nuclear checkpoint pathway regulates mitochondrial DNA copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(6), 3010–8.
- Tercero, J. A., i Diffley, J. F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, 412(6846), 553–7.
- Teschner, J., Lachmann, N., Schulze, J., Geisler, M., Selbach, K., Santamaria-Araujo, J., Balk, J., Mendel, R. R., i Bittner, F. (2010). A novel role for Arabidopsis mitochondrial ABC transporter *ATM3* in molybdenum cofactor biosynthesis. *The Plant Cell*, 22(2), 468–80.
- Toh, G. W., O’Shaughnessy, A. M., Jimeno, S., Dobbie, I. M., Grenon, M., Maffini, S., O’Rorke, A., i Lowndes, N. F. (2006). Histone H2A phosphorylation and H3 methylation are required for a novel Rad9 DSB repair function following checkpoint activation. *DNA Repair*, 5(6), 693–703.

BIBLIOGRAFIA

- Traven, A., Wong, J. M., Xu, D., Sopta, M., i Ingles, C. J. (2001). Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial dna mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4020–7.
- Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., i Zheng, X. F. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature Communications*, 5, 3446.
- Tsaponina, O., Barsoum, E., Aström, S. U., i Chabes, A. (2011). Ixr1 is required for the expression of the ribonucleotide reductase Rnr1 and maintenance of dNTP pools. *PLoS Genetics*, 7(5):e1002061.
- Tyers, M., i Futcher, B. (1993). Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), 5659–5669.
- Uchiki, T., Dice, L. T., Hettich, R. L., i Dealwis, C. (2004). Identification of Phosphorylation Sites on the Yeast Ribonucleotide Reductase Inhibitor Sml1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11293–11303.
- Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K., i Yamaguchi-Iwai, Y. (2012). Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression. *Molecular and Cellular Biology*, 32(24), 4998–5008.
- Ulrich, H. D. (2005). The RAD6 pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO. *Chembiochem*, 6(10), 1735–43.
- Uzarska, M. A., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Lill, R., i Mühlenhoff, U. (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Molecular Biology of the Cell*, 24(12), 1830–41.
- Valencia, M., Bentele, M., Vaze, M. B., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, S. E., Schär, P., i Haber, J. E. (2001). NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 414(6864), 666–9.
- Van der Lelij, P., Oostra, A. B., Rooimans, M. A., Joenje, H., i de Winter, J. P. (2010). Diagnostic Overlap between Fanconi Anemia and the Cohesinopathies: Roberts Syndrome and Warsaw Breakage Syndrome. *Anemia*, 2010, 565268.
- Veatch, J. R., McMurray, M. A., Nelson, Z. W., i Gottschling, D. E. (2009). Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell*, 137(7), 1247–58.
- Viikov, K., Jasnovidova, O., Tamm, T., i Sedman, J. (2012). C-terminal extension of the yeast mitochondrial DNA polymerase determines the balance between synthesis and degradation. *PLoS One*, 7(3): e33482.
- Viikov, K., Väljamäe, P., i Sedman, J. (2011). Yeast mitochondrial DNA polymerase is a highly processive single-subunit enzyme. *Mitochondrion*, 11(1), 119–26.

- Volker, M., Moné, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., van Driel, R., van Zeeland, A. A., i Mullenders, L. H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Molecular Cell*, 8(1), 213–24.
- Volz, K. (2008). The functional duality of iron regulatory protein 1. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(1), 106–11.
- Vongsamphanh, R., Fortier, P. K., i Ramotar, D. (2001). Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1647–55.
- Vongsamphanh, R., Wagner, J. R., i Ramotar, D. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Ogg1 prevents poly(GT) tract instability in the mitochondrial genome. *DNA Repair*, 5(2), 235–42.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., i Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(13), 1793–1808.
- Walden, W. E., Selezneva, A. I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., Theil, E. C., i Volz, K. (2006). Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science*, 314(5807), 1903–8.
- Walker, J. R., Corpina, R. A., i Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), 607–14.
- Wallander, M. L., Leibold, E. A., i Eisenstein, R. S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(7), 668–89.
- Waters, L. S., Minesinger, B. K., Wiltout, M. E., D'Souza, S., Woodruff, R. V, i Walker, G. C. (2009). Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(1), 134–54.
- Westermann, B., i Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(15), 1421–7.
- Williamson, D. H., i Moustacchi, E. (1971). The synthesis of mitochondrial DNA during the cell cycle in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 42(2), 195–201.
- Witte, S., Villalba, M., Bi, K., Liu, Y., Isakov, N., i Altman, A. (2000). Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1902–9.
- Wolter, R., Siede, W., i Brendel, M. (1996). Regulation of *SNM1*, an inducible *Saccharomyces cerevisiae* gene required for repair of DNA cross-links. *Molecular & General Genetics*, 250(2), 162–8.

BIBLIOGRAFIA

- Wu, X., i Huang, M. (2008). Dif1 controls subcellular localization of ribonucleotide reductase by mediating nuclear import of the R2 subunit. *Molecular and Cellular Biology*, 28(23), 7156–67.
- Xiao, W., Chow, B., Broomfield, S., i Hanna, M. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics*, 155(4), 1633–41.
- Yao, R., Zhang, Z., An, X., Bucci, B., Perlstein, D. L., Stubbe, J., i Huang, M. (2003). Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6628–33.
- Yoboue, E. D., Mougeolle, A., Kaiser, L., Averet, N., Rigoulet, M., i Devin, A. (2014). The role of mitochondrial biogenesis and ROS in the control of energy supply in proliferating cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837(7), 1093–8.
- Yoshitake, S., i Nanri, H. (1994). Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *Journal of Biochemistry*, 116(1), 42–46.
- Yu, J., Zhang, N., i Yin, P. (2008). Glutathionylation-triggered conformational changes of glutaredoxin Grx1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins*, 72(3):1077–83.
- Zhang, Y., Lyver, E. R., Knight, S. A. B., Pain, D., Lesuisse, E., i Dancis, A. (2006). Mrs3p, Mrs4p, and frataxin provide iron for Fe-S cluster synthesis in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22493–502.
- Zhang, Z., An, X., Yang, K., Perlstein, D. L., Hicks, L., Kelleher, N., Stubbe, J., i Huang, M. (2006). Nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit requires a karyopherin and a WD40 repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1422–7.
- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., i Rothstein, R. (2001). The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *The EMBO Journal*, 20(13), 3544–3553.
- Zhao, X., Muller, E. G., i Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Molecular Cell*, 2, 329–340.
- Zhao, X., i Rothstein, R. (2002). The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 3746–3751.
- Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H., i Dean, D. R. (1998). Assembly of Iron-Sulfur Clusters. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 13264–13272.
- Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E. Y., Lee, S. E., i Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell*, 134(6), 981–94.

Zou, L., i Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300(5625), 1542–8.

VIII. ANNEX

**Impairment of mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis causes DNA lesions
and promotes upregulation of ribonucleotide reductase by different DNA
damage response signaling mediators**

Jordi Pijuan, Carlos María, Enrique Herrero and Gemma Belli*

Department of Basic Medical Sciences, IRBLleida, University of Lleida, 25198 Lleida, Spain.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +34-973702940; Fax: +34-973702426; Email:
gemma.belli@cmb.udl.cat

ABSTRACT

Mitochondrial iron-sulfur cluster (ISC) biogenesis is required for multiple DNA metabolism processes. In this work we show that defects at different stages of the ISC biosynthesis result in increased spontaneous mutagenesis and hyperrecombination, accompanied by an increment in Rad52-associated DNA repair foci and a higher phosphorylated state of γ H2A histone, altogether supporting the presence of constitutive DNA lesions. Furthermore, ISC deficiency elicits a DNA damage response pathway that upregulates the activity of ribonucleotide reductase by promoting the reduction of Sml1 levels and the cytosolic redistribution of Rnr2/4 enzyme subunits. Depending on the impaired stage of the ISC machinery, different signaling pathway mediators contribute to such response, converging in Dun1. Thus, Grx5 glutaredoxin-minus cells, which are compromised at the core stages of ISC biogenesis, show a Mec1 and Rad53-independent Dun1 activation, whereas both Mec1 and Chk1 are required when the non-core ISC member Iba57 is deleted. Also, Grx5-less cells exhibit a strong dependence on the error-free post-replication repair and the homologous recombination pathways for cell survival, especially when additional DNA damage is induced by external genotoxic agents, overall demonstrating that a DNA damage response is required to be activated upon ISC biogenesis impairment to preserve cell viability.

INTRODUCTION

Cellular DNA is exposed to extracellular and intracellular factors that may compromise its integrity, leading to genomic instability. Cells preserve the genetic information integrity through diverse DNA repair systems. Genome instability may occur at any step of the cell cycle, but it is prone to be caused by failures in DNA replication and in the DNA damage response (1). This response integrates mechanisms that co-ordinately regulate diverse cellular events, such as cell cycle arrest and replication/transcription block, to activate in parallel the DNA repair pathways in response to the DNA damage. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the DNA damage checkpoint is the main responsible for enabling cells to confront DNA damage and DNA replication stress (2). The signaling cascade of the checkpoint is conventionally mediated by Mec1 and Rad53 kinases, which regulate several processes to safeguard the genome integrity. One of these is Dun1 kinase activation, responsible of the upregulation of the ribonucleotid reductase (RNR) activity (3), which promotes dNTP synthesis. The yeast RNR enzyme is a tetrameric heterocomplex composed by a large and a small subunit, consisting of a Rnr1 homodimer and a Rnr2/Rnr4 heterodimer, respectively. RNR activity takes place at the cytoplasm and upon DNA damage it becomes tightly regulated at multiple levels, most of them depending on Dun1. Thus, Dun1 controls the expression levels of *RNR2*, *RNR3* (encoding an alternative component of the R1 subunit) and *RNR4*, by inhibiting the transcriptional repressor complex Crt1-Ssn6-Tup1 (4). Dun1 also mediates the degradation of the Rnr1 inhibitor, Sml1, during S phase and after DNA damage (5, 6), resulting in increased dNTP pools (7). Another RNR regulation level lays on the subcellular distribution of the Rnr2/Rnr4 subunit, which must be cytoplasmic to bind to the Rnr1 subunit. This distribution is regulated

by Wtm1 and Dif1 proteins, which operate in two independent branches of the Rnr2/Rnr4 localization pathway. Dif1 is required for the nuclear import of Rnr2/4, while Wtm1 anchors the complex inside the nucleus once imported (8-10). As Sml1, Dif1 contains a phosphodegron that confers Dun1-dependent regulation. Dif1 degradation causes cytoplasmic Rnr2/4 enrichment. On the other hand, *WTM1* mRNA levels are negatively regulated in response to iron scarcity by Cth2, an mRNA binding protein that provokes *WTM1* mRNA destabilization (11). In addition, RNR is activated by iron-limited conditions (12, 13) in a Dun1-dependent but Mec1/Rad53-independent manner (13).

The DNA repair systems include mechanisms involved in single strand (ss) DNA repair, as are the Base Excision Repair (BER) for repairing damaged/lost bases, the Nucleotide Excision Repair (NER), active on UV light-induced DNA crosslinks and other bulky lesions, and the Mismatch Repair (MR). Other conserved repair mechanisms involve recombinatorial repair strategies, such as the homologous recombination (HR), the non-homologous end-joining (NHEJ), and the Interstrand Cross-Linked repair (ICL) systems (14). HR underlies processes as the repair of DNA-double stranded breaks (DSBs), maintenance of rDNA copy number and rescue of collapsed replication forks. In HR the sequence information from a homologous DNA molecule is used as a template for restoring lost genetic information. As a side effect, HR may lead to the loss of heterozygosity (15). HR occurs during S phase and is initiated by DNA nicks and ssDNA regions, rather than by DSBs (16). HR requires the proteins of the Rad52 epistasis group, and Rad52 foci formation at 3'-DNA ends is needed for the recruitment of all other HR proteins into the repair foci. Alternatively, DSBs can be also repaired through the NHEJ pathway (17).

In addition to the above repair pathways, cells display tolerance mechanisms, such as the translesion synthesis (TLS) pathway that allows replication across DNA lesions (18). TLS is mediated by specialized DNA polymerases that are able to insert nucleotides opposite to damaged templates, which may increase the mutagenesis rate. Rad6 is an E2 ubiquitin-conjugating enzyme required for DNA-lesion bypass in yeast cells (19, 20). In complex with Rad18, it ubiquitylates the DNA polymerase auxiliary factor Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). Depending on the specific ubiquitylated Lys residues in PCNA and the length of the ubiquitin chain, PCNA participates in the Rad5-dependent error-free TLS branch or in the Rev3-dependent error-prone branch of this same pathway, also described globally as post-replication repair (PRR) pathway (20).

Several studies have connected mitochondrial dysfunctions with nuclear genomic instability. Thus, a reduction of mitochondrial membrane potential, which compromises the iron-sulfur clusters (ISC) biogenesis, assembly and/or export, causes genome instability (21). Also, depletion of Zim17 (affecting the ISC-biogenesis component Ssq1) provokes hyperrecombination and increases mutation rate (22). Rudolf *et al.* (23) identified ISC domains in the human helicase Xpd (homologue of *S. cerevisiae* Rad3) involved in the NER repair system, implicating an ISC protein in DNA repair functions. ISCs play important roles in essential cell functions such as respiration, ribosome biogenesis, regulation of gene

expression and DNA-RNA metabolism (24). Their evolutionary conserved biogenesis occurs in the mitochondria, where some ISCs are assembled into mitochondrial proteins. Alternatively, other ISCs are then exported to the cytosol by the Atm1 transporter (*S. cerevisiae* nomenclature), for their assembly into extramitochondrial apoproteins (cytosolic and nuclear) by the cytoplasmatic ISC assembly (CIA) machinery. Mitochondrial ISC synthesis involves their formation on the Isu1/2 scaffold, which requires among others the cysteine desulfurase complex Nfs1-Isd11, ferredoxin reductase Arh1, ferredoxin Yah1 and frataxin Yfh1 (24). Cluster dislocation from Isu1/2 is executed by the chaperone system Ssq1/Jac1/Mge1 and by the monothiol glutaredoxin Grx5. Ssq1 acts together with Grx5 by transferring the [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters to target apoproteins (25). Lack of Grx5 and Ssq1 in yeast cells leads to mitochondrial iron accumulation, inability to grow in non-fermentable or minimal media and hypersensitivity to oxidants (26). The mentioned components constitute the ISCs synthesis core machinery, being required for both, mitochondrial and extramitochondrial ISC proteins (24). Mutants defective in any of such components activate Aft1, which controls the high affinity system for iron uptake. On the other hand, the ISC targeting factors (Isa1, Isa2 and Iba57) are not required for the biogenesis of [2Fe-2S] clusters but act specifically for transferring [4Fe-4S] clusters to mitochondrial target apoproteins (27-29). None of the mitochondrial [4Fe-4S] proteins is essential for yeast viability, but alterations in this branch of ISC biosynthesis results in the loss of aconitase activity and impairment of lipoic acid synthesis and the lysine and glutamic acid biosynthesis pathways. Although assembly of cytosolic ISC proteins by the CIA machinery does not apparently depend on this Isa-Iba57 branch, impairment of some cytosolic activities (Leu1) occurs in Isa- or Iba57-minus mutants (28).

In this work we have characterized the genetic instability caused by impairment in the ISC biogenesis machinery, especially in Grx5-minus cells, and determined the DNA repair pathways required for survival. We show that in these conditions, a DNA damage checkpoint pathway operates which differs from the canonical one that becomes activated upon treatment with genotoxic agents.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, growth media and culture conditions

Strains employed in this study are listed in Supplementary Table 1. They are in the W303-1A (30) or FY1679 (31) genetic backgrounds. Plasmids pMM25 and pMM27 contain *GRX5* and *GRX5-C60S* under the own promoter (32). YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), YPGal (as YPD except 2% galactose instead of glucose), or synthetic SC medium (33) with 2% glucose were usually employed for *S. cerevisiae* cell growth. Doxycycline (5 µg/ml) was added to inhibit expression of genes under control of the *tetO* promoter. Cultures were incubated at 30°C unless otherwise indicated. Bathophenanthroline (BPS) treatment was done at 100 µM (final concentration) for 6 hours. For anaerobic growth the Genbox anaer system (bioMérieux) was used.

General genetic methods

Standard protocols were used for DNA manipulations and transformation of yeast cells. Single null mutants were generated using the short-flanking homology approach after PCR amplification of the *kanMX4* (34), *natMX4* (35), *hphNT1* (36) or *CaURA3MX* (37) cassettes and selection for geneticin, nourseothricin or hygromycin B resistance, or for uracil prototrophy respectively. Gene disruptions were confirmed by PCR analysis. Null mutations in some genes were moved between genetic backgrounds after PCR amplification of the corresponding disruption cassette plus about 300 bp flanking genomic regions in the donor mutant, and subsequent transformation of the amplified fragment into target cells. Multiple mutants were obtained by crossing the parental mutant strains, followed by diploid sporulation, tetrad analysis, and selection of the mutant combinations (33).

Determination of growth sensitivities

Sensitivity to chemicals was determined in plate growth assays by spotting serial 1:10 dilutions of exponential cultures onto YPD plates containing the corresponding agent, and recording growth after 2 or 3 days of incubation at 30°C, except otherwise indicated. Sensitivity to UV light was determined by spotting serial culture dilutions on YPD plates, and irradiating these with a Stratalinker UV Crosslinker Model 2400 apparatus. Growth was recorded as above. Alternatively, sensitivity to UV light was determined in liquid conditions by resuspending exponentially growing cultures in PBS buffer at a concentration of 2×10^7 cells/ml, irradiating them as above, and determining cell survival compared to non-irradiated cells. Growth of several strains in liquid medium under parallel separate treatments was automatically recorded (optical density at 600 nm) at one-hour intervals during 24 hours, using individual 0.5 ml cultures in shaken microtiter plates sealed with oxygen-permeable plastic sheets, in a PowerWave XS (Biotek) apparatus at controlled temperature. Identical cell numbers were inoculated initially in each parallel culture.

Determination of recombination and mutation frequencies

Recombination frequencies in strains carrying the chromosomally-integrated *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* cassette were determined from exponentially growing cultures in SC medium by selecting for 5-fluorotic acid-resistant (FOA^R) colonies, as detailed in Ref. 22. Mutation frequencies were obtained (eight independent experiments for each strain) by comparing the number of colonies growing on non-modified SC plates with those growing on SC plates without arginine and containing canavanine at 60 mg/ml (Can^R colonies), after plating exponential cultures from liquid medium.

Quantification of Rad52-YFP foci

Exponentially growing cells in YPD liquid medium expressing Rad52-YFP from a chromosomally-integrated construction (in the case of $\Delta grx5$ mutant cells) or from a centromeric plasmid (pWJ1213; gift from R. Rothstein) were observed with an Olympus BX51 fluorescence microscope equipped with an

Olimpus DP30BW digital camera, using excitation and emission wavelengths of 480 and 527 nm respectively. Foci were inspected and counted by examining all of the focal planes intersecting each cell. Three independent experiments were performed for each strain and condition, and at least 500 cells were counted per sample, discriminating between budded and unbudded cells.

Cell cycle studies

Cells were synchronized in G1 by incubating exponentially growing cells in YPD medium at a concentration of 1×10^7 cells/ml with 4 μ g/ml α -factor during 45 min, followed by addition of the same amount of α -factor and further incubation for additional 45 min. Cells were released from the G1 arrest by filtration and extensive washing with prewarmed YPD medium and resuspension in fresh medium at the original cell concentration. Samples were taken at different times and flow cytometry was performed following standard procedures.

RNA analyses

RNA isolation and electrophoresis, probe labelling with digoxigenin, hybridization and signal detection were done as described previously (38). Gene probes were generated by PCR from genomic DNA, using oligonucleotides designed to amplify internal gene sequences.

Protein analyses

Western blot analyses were done according to Ref. 38, with anti-Sml1 (1:1000 dilution; Agrisera), anti-Rad53 (1:2000 dilution; Abcam), anti-Dif1 (1:1000 dilution; gift from Dr. S. J. Elledge), and anti-H2A phospho S129 (1:1000 dilution; Abcam). Anti-Hxk1 (1:5000 dilution; US biological) was used for loading controls.

Statistical analyses

The Mann–Whitney U and Tukey–Kramer tests were used, using the JMP 10 software. Unless otherwise indicated, values in the mutant strains were compared with those of wild-type cells. *, **, $p < 0.01$, 0.001, respectively.

Miscellaneous methods

Immunofluorescence localization of Rnr2 was done as described in Ref. 39. Rabbit anti-Rnr2 (gift from Dr. J. Stubbe; 1:10000 dilution) and Alexa Fluor488 goat anti-rabbit (Molecular Probes) antibodies were employed for signal detection. Visualization was done with an Olympus BX51 fluorescence microscope, with U-MNUA2 and U-MNUA3 filters respectively for DAPI and GFP staining. Intracellular iron was determined as described in Ref. 40.

RESULTS

Cells lacking Grx5 are hyperrecombinogenic and hypermutagenic and have constitutive high levels of DNA lesions

We initially determined whether the absence of the Grx5 glutaredoxin, which participates in the core pathway for ISC synthesis, causes genomic hyperrecombination. A chromosomal *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* recombination system was employed in which recombinogenic events between the two *leu2-k* direct repeats are recorded by the appearance of FOA^R colonies (41). The $\Delta grx5$ mutant displayed an about 17-fold increase in FOA^R cell frequency compared to wild-type cells (Fig. 1A). This large increase in recombination events was not observed in other mitochondrial function mutants such as $\Delta yfh1$, $\Delta aif1$ or $\Delta cox12$, which exhibited much more moderate increases in recombination rate (Fig. 1A). The hyperrecombinogenic phenotype observed in the absence of Grx5 was accompanied by an elevated frequency of mutation in nuclear genes, since the frequency of Can^R cells was more than 5-fold higher in the mutant compared to the wild-type strain (Fig. 1B). Increased recombination rates and mutation frequencies are associated to genomic instability and DNA lesions such as DSBs (42). Rad52 is a member of the HR-based DSB repair mechanism, being recruited to 3' ssDNA tails upon DSB processing (43). Rad52 is also able to recognize ssDNA lesions (44). We therefore employed Rad52-YFP fluorescent foci to monitor nuclear ssDNA lesions. The $\Delta grx5$ mutant displayed about 4-fold more cells with Rad52 foci than the wild-type in the subpopulation of budded cells, while no foci were observed in unbudded cells (Fig. 1C), supporting that the comparatively high frequency of DNA lesions in the mutant is associated to DNA replication. As a control, wild-type and $\Delta grx5$ cultures exposed to high doses of the oxidant *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) displayed foci in both budded and unbudded cells, but the frequency was higher in the mutant (Fig. 1C), in accordance with the peroxide hypersensitivity of $\Delta grx5$ cells (45).

From the above results, we would expect the $\Delta grx5$ mutant to be hypersensitive to DNA damaging agents. In fact, when cells on solid medium were exposed to increasing doses of UV light, the $\Delta grx5$ mutant was significantly more sensitive than the wild-type (Fig. 1D). However, this was not the case for mutants in other mitochondrial functions, including the $\Delta yfh1$ frataxin mutant. The UV hypersensitivity of $\Delta grx5$ cells was confirmed when cell suspensions in liquid medium were irradiated and cell viability was quantified (Fig. 1E). After 30 sec irradiation, survival of both $\Delta grx5$ and $\Delta ssq1$ cells was about 20% that of wild-type and $\Delta yfh1$ cells. The UV hypersensitivity of $\Delta grx5$ cells could be related to the overloading of iron and subsequent oxidative damage exhibited by this mutant (26). To test this hypothesis, we determined the relative sensitivity to UV light of $\Delta fet3$ cells and the double $\Delta fet3\Delta grx5$ mutant. Fet3 is a component of the plasma membrane-associated transporter complex involved in the high-affinity iron uptake (46) and its absence abrogates the iron accumulation observed in $\Delta grx5$ cells (Supplementary Fig. 1). Cells without Fet3, however, are not iron-deprived, since the Fet4-controlled low-affinity system remains functional. While the $\Delta fet3$ cells are about as sensitive to UV as wild-type cells, the $\Delta fet3\Delta grx5$ mutant is still significantly more sensitive to radiation (Fig. 1F). This UV

hypersensitivity in the absence of Grx5 is therefore mostly independent of the iron overloading in the mutant.

Mutants lacking Grx5 or other components of the mitochondrial ISC machinery are hypersensitive to DNA damaging agents

Most of the previous experiments were done with strains of the W303 genetic background. This strain background carries an original *rad5-G535R* mutation causing partial loss-of-function of the Rad5 protein (47) involved in the error-free branch of the PRR pathway (48). This raised the possibility that at least part of the phenotypes of the null *grx5* mutant could be due to the presence of this *rad5* allele. Consequently, we moved to a different genetic background (FY1679 and derivatives) carrying a wild-type *RAD5* gene. In these conditions, the Δ *grx5* mutant was still hypersensitive to UV (Fig. 2A). We also checked its sensitivity to the DNA alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) and to hydroxyurea (HU), which is a dNTP depletor and consequently delays DNA replication (49). In both cases, the Δ *grx5* mutant was significantly more sensitive than the wild-type strain (Fig. 2A), allowing generalizing that the absence of Grx5 increases the sensitivity to genotoxic agents with different activities. That the hypersensitivity is not due to the constitutive oxidative stress generated in the mutant was confirmed because N-acetyl cysteine does not rescue such hypersensitivity (Fig. 2A). In accordance, the Δ *grx5* cells were also hypersensitive to MMS in anaerobic conditions (Fig. 2B).

We extended the study of sensitivity to DNA damaging agents to other mutants in mitochondrial ISC biogenesis. All mutants tested were hypersensitive to MMS although the Δ *grx5* mutant manifested the most marked phenotype (Fig. 2C). With respect to HU, the mutants were also hypersensitive, although in this case the Δ *iba57* and Δ *isa1* cells displayed the most intense effects (Fig. 2C). Since the absence of the above proteins involved in mitochondrial ISC biogenesis results in defective mitochondrial oxidative phosphorylation, we tested whether Δ *cox12* or Δ *rip1* mutants defective in the mitochondrial electron transport chain were also hypersensitive to MMS, but this was not the case (Fig. 2D). Therefore, the hypersensitivity of the ISC mutants to DNA damaging agents is independent of defective oxidative phosphorylation.

To discard that the constitutive hyperaccumulation of DNA lesions and the sensitivity phenotypes of Δ *grx5* cells is indirectly caused by uncharacterized mutations arising in the null mutant, a conditional mutant expressing *GRX5* under the control of a *tetO₇* promoter was employed. Histone H2A phosphorylation was determined, as a marker of DNA damage (50). Doxycycline-promoted Grx5 depletion provoked a moderate but progressive accumulation of phospho-H2A, which was considerably more intense upon MMS treatment (Fig. 2E). After 24 h. in the presence of doxycycline, when the Grx5 protein is almost totally depleted (26), MMS treatment resulted in a marked viability loss compared to

the control without doxycycline (Fig. 2F). This therefore confirms that it is the absence of Grx5 that directly causes the accumulation of DNA lesions and the hypersensitivity to the genotoxic agent.

The $\Delta grx5$ mutant and other ISC mutants display a delay in S phase progression

Hypersensitivity of the $\Delta grx5$ and other ISC mutants to HU could reflect constitutive DNA replication defects. Consequently, we studied cell cycle progression after G1 arrest followed by synchronized release under control and HU-treatment conditions (Fig. 3A). Compared to wild-type cells, the untreated $\Delta grx5$ and $\Delta iba57$ mutants already showed a constitutive delay in cell cycle progression of 15-30 min. Under treatment with a moderate HU concentration, an additional delay compared to wild-type cells occurred in both mutants, but it was more marked in the $\Delta grx5$ cells. The double $\Delta grx5\Delta iba57$ mutant behaved as the single $\Delta grx5$ one. This epistatic effect is in accordance with the more general and mechanistically earlier function of Grx5 in the ISC machinery compared with the Iba57 function.

To determine more precisely whether S phase progression is affected in the absence of Grx5, we synchronized wild-type and $\Delta grx5$ cells at S phase entry by employing a thermosensitive *cdc7* mutation (51). Thus, cells were first synchronized at G1 with α -factor, then released from this arrest while that they were now arrested at S phase entry by elevating the temperature, and finally released by shifting to low permissive temperature under control and HU-treatment conditions. The experiment confirmed that it is progression through S phase what is delayed in the mutant compared to wild-type cells, and that the effect of HU is also more intense in the mutant (Supplementary Fig. 2).

Since $\Delta grx5$ cells are altered in Fe homeostasis (26) and RNR requires Fe for dNTPs synthesis (52), we explored the possibility that the S phase progression delay in the mutant were due to low RNR activity and consequent dNTPs depletion. Thus, cell cycle progression of $\Delta grx5$ cells also lacking the RNR inhibitor *Sml1* was analyzed. However, the $\Delta sml1$ mutation did not rescue the cell cycle delay of the $\Delta grx5$ cells (Fig. 3B), supporting that this defect is not directly caused by low RNR activity.

Defective Rad6-dependent translesion synthesis pathway has synergistic effects with the absence of Grx5

The cell cycle defects of the $\Delta grx5$ mutant pointed to alterations in chromosomal replication, which in turn would explain the constitutively high recombination and mutation rates of the mutant. We hypothesized that synthetic sick genetic interactions could exist between the $\Delta grx5$ mutation and mutations in pathways responsible for repairing the DNA lesions (or allowing replication across them) arising during chromosomal replication of Grx5-minus cells. Therefore, we constructed double mutants lacking Grx5 and key functions of diverse DNA repair or DNA-lesion bypass pathways. Remarkably, after spore germination from a diploid heterozygous for the *GRX5* and *RAD6* genes, small colonies aroused

corresponding to double $\Delta grx5\Delta rad6$ mutant cells (Supplementary Fig. 3). Exponential growth rates were recorded for $\Delta grx5$ cells additionally mutated in one or both branches of PRR (Figure 4A). Thus, growth rate is severely compromised in the $\Delta grx5\Delta rad6$ mutant, confirming that Rad6 function is constitutively important for Grx5-defective cells. Growth defects were also observed in a $\Delta grx5\Delta rad5\Delta rev3$ mutant defective in both PRR branches (Figure 4A), supporting that the Rad6 protecting function on $\Delta grx5$ cells is associated to its PRR-related role. Comparing the growth rates of the double $\Delta grx5\Delta rad5$ and $\Delta grx5\Delta rev3$ mutants (Figure 4A), we can conclude that the Rad5-dependent branch of PRR carries out a more important function in $\Delta grx5$ cells than the Rev3-dependent branch, although both are additive. Next, we determined whether PRR is also important for $\Delta grx5$ cell survival upon DNA lesion induction by MMS or HU treatments. The $\Delta grx5\Delta rad6$ and $\Delta grx5\Delta rad5\Delta rev3$ cells were significantly more sensitive to both agents than $\Delta grx5$ cells (Fig 4B), supporting such PRR role in repairing the DNA lesions accumulating in the Grx5-minus mutant upon alkylation and/or replication fork arrest.

The Rad5-dependent PRR branch utilizes the HR machinery to restore DNA integrity (53). We therefore determined whether mutations in HR had effects on the sensitivity of $\Delta grx5$ cells to MMS or HU. With this objective, we employed $\Delta rad50$ and $\Delta rad52$ mutants. Rad50 acts at an early step to repair DSB through HR or NHEJ mechanisms, while as noted above Rad52 is specific for HR, acting at a later step of this pathway upon recognition of ssDNA (43, 54). The $\Delta grx5\Delta rad50$ and $\Delta grx5\Delta rad52$ double mutants were hypersensitive to MMS or HU compared to the single $\Delta grx5$ mutant (Fig 4C). Therefore, the HR machinery would participate in translesion repair in $\Delta grx5$ cells upon treatment with genotoxic agents.

Impairment of the ISC and CIA machineries causes constitutive activation of the DNA damage checkpoint response

We next asked whether constitutive DNA lesions in the absence of Grx5 activate the DNA damage checkpoint. With this objective, Sml1 protein levels were analyzed in the conditional $tetO_{\gamma}GRX5$ mutant. Upon doxycycline addition a reduction of Sml1 levels was observed, indicating the activation of the pathway (Fig 5A). In addition, MMS treatment in Grx5-depleted cells aggravated the Sml1 protein decrease. To assess whether the presence of Grx5 molecules without biological activity also leads to Sml1 decrease, Sml1 protein levels were analyzed in mutant cells where Grx5 activity was totally abrogated (Cys60 to Ser change) (32). In these conditions, a decrease in Sml1 protein levels accompanied by hypersensitivity to genotoxic agents also occurred (Supplementary Fig. 4).

Degradation of Sml1 is a cell cycle-dependent process that takes place in S phase. To assert that Sml1 decreased levels were not due to the longer S phase occurring in the absence of Grx5, Sml1 levels were determined in a time course in G1-synchronized wild-type and $\Delta grx5$ cells. The mutant displayed a

delay in Sml1 accumulation (Fig 5B), which parallels the delayed cell cycle progression (see Fig 3). Nevertheless, a significant decrease in the Sml1 protein levels was observed compared to wild-type cells along the entire time course (Fig 5B), which indicates that constitutive activation of the DNA damage checkpoint occurs independently of the affectation of the cell cycle S phase length (Fig 5B).

Given that impairment of the iron-deprivation signaling pathway leads to activation of Dun1 (see Introduction) the possibility existed that the decrease of Sml1 in the absence of Grx5 were exclusively due to such impairment. To test it, mutant cells lacking other ISC biogenesis proteins not pertaining at the ISC core machinery (and consequently not participating in the control of iron homeostasis) were also studied. We focused on those that specifically transfer [4Fe-4S] clusters to mitochondrial apoproteins, such as Iba57 and Isa1. Δcox12 mutant cells were also analyzed as a control of a mitochondrial protein not related to ISCs biosynthesis. Our results showed a significant decrease of Sml1 protein abundance in the absence of any of the tested ISCs proteins, in contrast to the lack of Cox12 (Fig 5C). Based on it, we analyzed the presence of Rad52-YFP foci in ΔIba57 cells, and observed 4.9-fold more foci in ΔIba57 than in wild-type budded cells (Fig 5D). In contrast, Δcox12 or iron-depleted cells upon treatment with the iron chelator BPS did not show differences compared to wild-type cells. The spontaneous mutation rate in ΔIba57 cells was also higher (x7.1) than in wild-type ones (Fig. 5E). In summary, DNA damage also occurs in the absence of Iba57, with the consequent checkpoint activation.

Sml1 protein levels were also analyzed in conditions where the expression of the essential CIA component Nbp35 was conditionally switched-off, by using the *tetO₇* promoter. These levels decreased in the absence of Nbp35 (Fig. 5F), indicating that compromising the CIA machinery also leads to Sml1 amount decrease. These results contrast with the studies of Sanvisens *et al.*, (13) reporting that Sml1 levels remain as those of wild-type cells upon CIA biogenesis impairment, which were done using *GAL1* promoter-driven expression of the CIA proteins Nbp35 and Nar1. Because of such disagreement, we studied Sml1 levels in wild-type cells from two different genetic backgrounds, CML235 and W303, and in *GAL1-NBP35* (55) mutant cells. Important differences in Sml1 protein abundance exist depending on the sugar source, glucose or galactose, in the W303 background (Supplementary Fig. 6), which might interfere with interpretation of results when using the *GAL1* promoter-based conditional mutants.

Finally, we analyzed Rad52-associated foci in the absence of Nbp35 by using the same *tetO₇*-based expression system, and observed 3.6-fold more foci when Nbp35 was absent (Fig. 5G), confirming that defects in the CIA machinery also lead to DNA damage.

Rnr2 displays a predominantly cytoplasmic distribution pattern upon impairment of the ISC and CIA machineries.

Similarly to Sml1 levels, a significant reduction of Dif1 was also expected in Δgrx5 mutant cells, pointing to a consequent subcellular redistribution of the Rnr2/4 complex. We first determined Dif1 protein levels in wild-type and ISC biosynthesis mutant cells. A decrease in Dif1 abundance was observed in

both, *Δgrx5* and *Δiba57* cells, similarly to MMS-treated wild-type ones (Fig. 6A). Next, we analyzed the subcellular localization of the Rnr2 protein in *Δgrx5* cells. A constitutive cytoplasmic distribution of Rnr2 was observed in most of the Grx5-minus cells, while almost all Rnr2 protein remained nuclear or nucleocytoplasmic in the non-treated wild-type cells and relocated to the cytoplasm upon MMS treatment (Fig 6B). Although quantitatively different from the *Δgrx5* mutant, cells without Iba57 also displayed constitutive nucleocytoplasmic (44%) or exclusively cytoplasmic (49%) distribution of Rnr2 (Fig. 6B). Taken together, these results demonstrate a predominantly cytoplasmic distribution pattern for Rnr2 upon ISC biogenesis impairment, pointing to a more efficient assembly of the active RNR complex. To investigate whether this effect also occurred upon CIA impairment, we analyzed Rnr2 distribution in the conditional CIA mutant *tetO_γ-NBP35*. A significant cytoplasmic or nucleocytoplasmic Rnr2 compartmentalization in the absence of Nbp35 was observed (Fig 6C), indicating that not only ISC but also CIA machinery impairment leads to a prevalent Rnr2 cytoplasmic distribution to upregulate RNR activity.

Cells lacking Grx5 or Iba57 regulate differently Rnr2 distribution

Dysfunctions of the ISC core machinery members lead to constitutive activation of the Aft1-dependent high affinity system for iron uptake, consequently resulting in iron accumulation (56). A member of the Aft1 regulon is *CTH2*, whose product destabilizes specific mRNAs for iron-consuming proteins, being the *WTM1* mRNA one of its targets (11). In contrast, defects in ISC biogenesis downstream of such core components do not cause Aft1 activation (56). Consequently, this could result in differences between *Δgrx5* and *Δiba57* mutants concerning Wtm1 functional levels. Therefore, we studied the levels of both, *CTH2* and *WTM1* mRNAs in wild-type, *Δgrx5* and *Δiba57* cells. Our results confirmed an important increase in *CTH2* mRNA levels in *Δgrx5* cells, coupled with a concomitant decrease of *WTM1* mRNA, changes that do not occur in *Δiba57* cells (Supplementary Fig. 5A).

To further ascertain the role of Wtm1 in the cytoplasmic distribution of Rnr2, location of the latter was also analyzed in a *Δcth2* mutant conditionally expressing Grx5. When this was depleted, a predominantly nuclear distribution pattern of Rnr2 was observed in the absence of Cth2, with only a minor fraction of cells with cytoplasmic or nucleocytoplasmic Rnr2 distribution. In the presence of *CTH2*, doxycycline-treated or untreated cells showed identical results as *Δgrx5* and wild-type cells, respectively (Supplementary Fig. 5B). These results support that Cth2-mediated *WTM1* mRNA degradation exerts an important regulatory role on the Rnr2 subcellular distribution by avoiding its nuclear anchoring retention, an event that takes place when Grx5 is missing. The higher levels of *WTM1* mRNA in *Δiba57* cells, in contrast, would explain the increased nuclear retention of Rnr2 compared to *Δgrx5* cells, despite of the constitutive decrease of Dif1 protein levels in *Δiba57* cells.

Slightly higher amounts of Dif1 still remained in *Δiba57* cells compared to *Δgrx5* ones (Fig. 6A). We wondered if a partial degradation/inactivation of Dif1 in the mutant could contribute to the predominant nucleo-cytoplasm Rnr2 localization. Therefore, we studied the Rnr2 distribution in *Δiba57Δdif1* mutant cells. In the absence of the importin facilitator the fraction of cells displaying exclusively nuclear Rnr2 increased only moderately compared to *Δiba57* cells (Fig. 6B). In contrast, as it has been described (8, 9), *Δdif1* cells showed a nearly entirely cytoplasmic localization of Rnr2. The low gain in exclusively nuclear location of Rnr2 in the double mutant discards a partial inactivation of Dif1 as the cause of such co-localization, and strongly suggests that Wtm1-dependent nuclear Rnr2 retention should be the main responsible of the effect. In this sense, expression levels of *WTM1* mRNA are higher in *Δiba57* cells than in wild-type ones (Supplementary Fig. 5A), which could explain the increased nuclear retention of Rnr2 when Iba57 is absent.

The *Δgrx5* and *Δiba57* mutants differ in the mediators required to activate the DNA damage checkpoint

In order to investigate the mediators of the constitutive DNA damage checkpoint response in ISC mutants, we determined whether it was dependent on the canonical Mec1/Rad53/Dun1 pathway, which is responsible of the checkpoint activation upon treatment with genotoxic agents. Recent studies have shown that in iron-deprivation conditions and other situations affecting iron sensing, reduction of Sml1 levels occurs in a Dun1-dependent but Mec1/Rad53-independent manner (13). Consequently, we studied Dun1 kinase involvement in Sml1 degradation in both, *Δgrx5Δdun1* and *Δiba57Δdun1* mutants. In the absence of Dun1, Sml1 levels reduction was abrogated when either Grx5 or Iba57 were missing (Fig. 7A), indicating the Dun1 dependence of the process. In accordance, both *Δgrx5Δdun1* and *Δiba57Δdun1* mutant cells exhibited slower growth rate and higher sensitivity to MMS than single *Δdun1*, *Δgrx5* or *Δiba57* mutants (Fig. 7B). Next, no constitutive hyperphosphorylation of Rad53 was observed in either *Δgrx5* or *Δiba57* cells, although upon MMS treatment, accumulation of the hyperphosphorylated Rad53 species was more intense in both mutants compared to wild-type cells (Fig. 7C). In a following step, we studied the involvement of Mec1 in the checkpoint activation in both ISC mutants by using a *Δdif1Δmec1* strain, in which deletion of *DIF1* suppresses the lethality of the *Δmec1* mutation (9). Wild-type, *Δdif1* and *Δdif1Δmec1* cells shared the same levels of Sml1. As expected, these levels decreased identically upon MMS treatment in wild-type and *Δdif1* cells, while in the absence of Mec1 (*Δmec1Δdif1*) Sml1 levels were maintained (Fig. 7D, E). The *Δgrx5Δdif1* mutant cells showed the same decreased Sml1 levels as *Δgrx5* cells, corroborating that the lack of Dif1 does not affect the Sml1 amount in these mutant cells. The triple *Δgrx5Δdif1Δmec1* mutant, however, showed no recovery of Sml1 levels, indicating that the Sml1 protein decrease in the absence of Grx5 is Mec1-independent (Fig. 7D). On the contrary, in *Δiba57Δdif1Δmec1* cells Sml1 levels remained similar to wild-type cells, indicating that in the absence of Iba57 the signaling process is Mec1-dependent (Fig. 7E).

In addition to activating Rad53, Mec1 can also activate the Rad53-paralogue Chk1, which is a mitosis inhibitor upon DNA damage through Rad53-independent pathways (57). To determine the participation of Chk1 in the constitutive checkpoint response of the two ISC mutants, we analyzed Sml1 levels when Chk1 was also missing. These levels were still reduced in a double $\Delta grx5\Delta chk1$ mutant (Fig. 7F). In contrast, analysis of the Sml1 protein levels in synchronized cultures showed that these were similar in the $\Delta iba57\Delta chk1$ mutant as in wild-type (Fig. 7G) (supplementary Fig. 7 shows that $\Delta chk1$ mutant displayed similar Sml1 levels as wild-type cells along the cell cycle), altogether pointing to a Chk1 dependence for decreasing Sml1 protein levels in $\Delta iba57$, but not in $\Delta grx5$ cells. This result would implicate Chk1 as a mediator of the signaling pathway in cells lacking Iba57. In conclusion, different mediators participate in the constitutive checkpoint response in $\Delta grx5$ and $\Delta iba57$ cells.

Finally, we investigated the signaling mediators responsible of the reduced levels of Sml1 when the CIA machinery becomes impaired, using the mutant conditionally expressing *NBP35* under the *tetO* promoter. The results showed the requirement of both Dun1 (Fig. 7H) and Mec1 (Fig. 7I) for activating the checkpoint upon *NBP35* expression downregulation.

DISCUSSION

Genomic integrity in eukaryotic organisms is constantly challenged by endogenous and exogenous stresses. Thus, failures in DNA replication and DNA damage response compromise such integrity. Defects in ISC biogenesis at mitochondria are connected with nuclear genome instability (58). In this sense, several ISC proteins have been revealed as key players in different nuclear DNA metabolism processes, such as replicative ($Pol\alpha$, $Pol\epsilon$, $Pol\delta$) and TLS ($Pol\zeta$) DNA polymerases (59), DNA primase, DNA helicases, and components of several DNA repair systems (23, 58, 60). Functional failures in them in human cells lead to neurodegenerative and cancer-linked diseases such as xeroderma pigmentosum, Fanconi anemia, and the Warsaw breakage (24). The recently discovered NEET family of [2Fe-2S] proteins is also related to cancer, cell proliferation and tumour growth (61). Furthermore, defects in the frataxin protein cause genomic instability and defective BER in mammals (62), and the Mms19 protein (necessary for maturation of ISC proteins involved in DNA metabolism) affects DNA repair, chromosome segregation and heterochromatin silencing (58).

This work is focused on the genomic instability associated to failures at different steps of the mitochondrial ISC biogenesis, especially when the core machinery member Grx5 is absent. Since several components of the ISC core machinery are essential for cell viability, the viable Grx5-minus cells constitute a suitable model to further study such relationship. In addition, the genomic instability effects of the absence of Iba57, not dealing with impaired ISC core machinery, have also been studied. Our findings show that Grx5-minus cells display hyper recombination and high spontaneous mutagenesis, accompanied by an increase in spontaneous Rad52 DNA repair foci, and also a moderate gain in the phosphorylated state of γ H2A histone, which becomes exacerbated upon treatment with external genotoxic agents, phenotypes that are shared by others ISC machinery mutants analyzed. We have also

shown that the DNA damage alterations of $\Delta grx5$ cells are independent of intracellular iron loading and of constitutive oxidative stress, which are additional phenotypes caused by the absence of Grx5. On the other hand, impaired respiration is not the direct cause of the nuclear DNA instability, as mutants defective in the mitochondrial electron transport chain are not hyperrecombinogenic or hypersensitive to DNA damaging agents. Therefore, the genomic instability of $\Delta grx5$ cells and other ISC mutants is a primary defect due to impairment of ISC formation. Interestingly, the DNA defects are not shared by Yfh1 frataxin-defective cells, what is compatible with a non-direct role of frataxin in ISC formation at mitochondria, as already proposed by others (63).

DNA damage in ISC mutants arises during S phase, since budded $\Delta grx5$ cells but not unbudded ones exhibit an increase in spontaneous Rad52-associated foci. In accordance, S phase progression is delayed in the ISC mutants, especially in the case of $\Delta grx5$ cells. These results support that constitutive defects in DNA replication may be the source of this damage and consistently with this, ISC mutant cells are hypersensitive to HU. ISC reduced availability in the absence of Grx5 would decrease the activity of DNA polymerases requiring functional [4Fe-4S] clusters, leading therefore to the DNA replicative complex destabilization, and likely to the loss of accessory subunits (59), which are essential for function at replicative forks. The exact nature of the DNA damage in the ISC mutants analyzed in this study is not known. The increase in foci formation implies the repair of spontaneous DNA lesions such as DSBs, nicks and/or ssDNA gaps (64, 65), being all of these lesions recognized by Rad52 (66). Furthermore, the moderate increase in the phosphorylated state of histone γ H2A in $\Delta grx5$ cells suggests that the primary DNA damage events may consist of DSB or large ssDNA gaps, which are substrates for HR (67, 68) and can trigger the DNA damage response (69).

We have explored the DNA repair/lesion bypass pathways that may participate in repairing such damage or allow replication across DNA lesions in the case of Grx5-minus cells, and have demonstrated genetic synthetic interference with components of the PRR pathway. In this sense, $\Delta grx5\Delta rad6$ mutant cells, where both error-prone and -free PRR branches are compromised, display severely affected growth, which is aggravated in the presence of DNA damaging agents, even at low dose. This effect could be explained by failures in Rad6-dependent PRR-independent ubiquitylation and degradation of Sml1, leading to low RNR activity (70). However, the $\Delta grx5\Delta rad5\Delta rev3$ cells, with both PRR branches disrupted but still harboring Rad6, display identical growth failures, corroborating the PRR requirement for cell survival in the absence of Grx5. In a $\Delta grx5$ background, the Rad5-minus cells exhibit a more compromised growth compared to the $\Delta rev3$ ones, meaning that the PRR error-free branch would play a more critical role in $\Delta grx5$ cells. Grx5-minus cells define a scenario where Rev3, which requires a [4Fe-4S] cluster (59), may be injured. Since Grx5-minus cells are viable, it is likely that low ISC synthesis may still occur, meaning that Rev3 would still be partially functional in them. In this sense, the impaired growth caused when disrupting the error-free pathway is aggravated when both, Rev3 and Rad5 are absent, indicating that Rev3 still exerts a subsidiary function in these conditions.

The HR pathway plays an important role in the PRR error-free branch (71). Consistent with this, when components of the HR pathway are absent in $\Delta grx5$ cells, hypersensitivity to DNA damaging agents is critically increased. Thus, both mutant strains, $\Delta rad50\Delta grx5$ (with both HR and NHEJ pathways disrupted) and $\Delta rad52\Delta grx5$ (where only HR is impaired) exhibit severe hypersensitivity at low doses of genotoxic agents, emphasizing the function of HR in $\Delta grx5$ cells. In agreement, as above indicated, the formation of Rad52-associated foci, which are a HR marker (as Rad52 is required for the recruitment of all other HR components), increases in the mutant. Thus, DNA repair and recombination systems would work coordinately to prevent genome instability caused by failures in DNA replication in Grx5-minus cells. Unstable complexes at the replicative forks might accumulate aberrant DNA structures in the absence of Grx5, requiring the HR system for being repaired. In addition, $\Delta rad50$ cells do not display aggravated hypersensitivity compared to $\Delta rad52$ ones, suggesting that the NHEJ pathway may not be involved in the DNA replication repair of Grx5-minus cells.

Constitutive DNA repair in $\Delta grx5$ cells would need a plus of dNTPs. The marked extension of S phase in HU-treated mutant cells (compared to wild-type ones) would reflect the higher dNTPs requirement in the mutant. Thus, disrupting the ISC biogenesis machinery by depleting Grx5 elicits a DNA damage response that triggers upregulation of RNR activity, by promoting degradation of the Rnr1-inhibitor, Sml1. Consistently, the nuclear impotin Dif1 also shows constitutively reduced levels in Grx5-minus cells, leading to the cytosolic redistribution of the Rnr2/4 complex, in addition to reduced levels of *WTM1* mRNA, encoding a Rnr2/4 nuclear anchoring protein, altogether increasing the RNR activity. Except for the last one, these effects are qualitatively shared with Iba57-minus cells. Since *WTM1* downregulation is dependent on the mRNA destabilizing role of Cth2, a member of the Aft1 regulon, which is activated in $\Delta grx5$ cells but not in $\Delta iba57$ ones, this would account for the differences between both mutants, which include less dramatic cytosolic redistribution of Rnr2 in Iba57-minus cells. In any case, our results support the existence of nuclear DNA damage also in the absence of Iba57, therefore pointing to a direct or indirect role of this lateral branch member of the mitochondrial ISC machinery outside the mitochondria. Interestingly, the conditional knock out of *NBP35* also displays constitutive reduction of Sml1 protein and cytosolic redistribution of Rnr2, confirming that impairment of the CIA machinery also may trigger the upregulation of the RNR activity.

The increment of dNTP content in response to endogenous DNA damage in the ISC mutants may serve to promote tolerance to such damage. Thus, high dNTP levels result in cell survival (72), possibly by decreasing spontaneous fork stalling, by promoting DNA chain elongation in the presence of replication stress, or by increasing the translesion DNA synthesis (73). Since similar response was observed in mutants with reduced genomic integrity, such as $\Delta rad54$, $\Delta rad55$, and $\Delta tsa1$, it has been suggested that the upregulation of RNR could be a general response to genome instability (74). Constitutively high dNTP levels, in turn, may increase spontaneous mutation rate (72), which might correspond to the mutator phenotype of the ISC mutants. High intracellular dNTP concentrations have been proposed to induce mutagenesis through misincorporation by replicative polymerases, by

mismatch extension, or possibly through an increase of DNA synthesis by error-prone polymerases (72, 75).

The signaling pathway triggered by DNA damage in the ISC mutants differs from the canonical one mediated by Mec1/Rad53/Dun1. Although all three mutants analyzed in the present study require the activation of Dun1, this activation, however, is Rad53-independent in all three cases. In addition, the absence of Iba57 or Nbp35 triggers Mec1 activation, since the absence of Mec1 totally abrogates the reduction of Sml1 protein. Moreover, the lack of the Rad53-paralogue Chk1 abrogates the Sml1 decrease in *Δiba57* cells, which strongly supports the Chk1 participation in the pathway. In contrast, Mec1 or Chk1 are not required to activate Dun1 in Grx5-minus cells. These data are surprising, since all three ISC mutants exhibit similar increased levels of Rad52 foci, suggesting similar levels of DNA damage. A reasonable possibility might be that two different signaling pathways would contribute in this signal transduction, converging both at Dun1: on one hand (in *Δiba57* and in conditional *NBP35* cells), the DNA damage checkpoint-like pathway mediated by the Mec1/Chk1/Dun1 signaling transduction pathway, and on the other (in *Δgrx5* cells), the Mec1-independent activation of Dun1 already shown to operate upon impairment of iron-signaling components (13). Only the second pathway would operate in Grx5-minus cells, since no differences in Sml1 levels are appreciated in *Δmec1Δgrx5* cells, compared to the single *Δgrx5* mutant. However, Dun1 activation in iron deprivation conditions seems not to be associated to DNA damage, as no increase of Rad52 foci are detectable in these conditions (13), contrary to the *Δgrx5* mutant.

Other situations exist where the DNA damage signaling pathway differs from the canonical one, underscoring different roles of the components. Thus, *Δrad53Δchk1* cells exhibit less gross chromosome rearrangement rate than either *Δmec1* or *Δdun1* single mutants, which suggests that not all the signals from Mec1 to Dun1 go through Chk1 or Rad53 (76). Moreover, reduced ability to silence gene expression at telomeres depends on Mec1 and Dun1, but is Rad53- and Chk1-independent (77). Similarly, Mec1/Dun1-dependent phosphorylation of Sod1 leads to its nuclear redistribution to become active as a ROS-response transcriptional factor (78). Furthermore, some Mec1-specific substrates in the replisome are required for the resumption of DNA synthesis from stalled forks (79). Additionally, Rad53-independent functions for Mec1 are expected because *Δmec1* cells are more sensitive to fork stalling agents than *Δrad53* ones (80). Finally, Mec1, but not Rad53, is required to stabilize Pol α at the stalled forks (81), pointing again to different functions at the stalled replication fork.

Summarizing, this study demonstrates that defects at different stages of ISC synthesis result in nuclear DNA damage and cause (through pathways different from those acting upon treatment with external genotoxic agents) activation of the DNA damage checkpoint and RNR upregulation, with Dun1 as a central actor in this response. Upstream transducers of the DNA damage signal remain to be elucidated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sílvia Porrás and David Moreno for their excellent assistance. We also thank S. J. Elledge, J. Stubbe, G. de Piccoli, R.E. Wellinger, R. Lill, R. Bermejo and J. Torres for the gift of biological material and for discussions and suggestions.

FUNDING

This work was supported by grants BFU2010-17656 and CSD2007-0020 from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain). Jordi Pijuan was the recipient of a predoctoral grant from MINECO.

REFERENCES

1. Aguilera, A. and García-Muse, T. (2013) Causes of genome Instability. *Annu. Rev. Genet.*, **47**, 1-32.
2. Davidson, M.B., Katou, Y., Keszthelyi, A., Sing, T.L., Xia, T., Ou, J., Vaisica, J. A., Thevakumaran, N., Marjavaara, L., Myers, C.L., Chabes, A., Shirahige, K., Brown, G.W. (2012) Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J.*, **31**, 895-907.
3. Zhou, Z. and Elledge, S.J. (1993) DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell*, **75**, 1119-27.
4. Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1998) The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell*, **94**, 595-605.
5. Uchiki, T., Dice, L.T., Hettich, R.L., and Dealwis, C. (2004) Identification of phosphorylation sites on the yeast ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *J Biol Chem.*, **279**, 11293-303.
6. Zhao, X. and Rothstein, R. (2002) The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc Natl Acad Sci.*, **99**, 3746-51.
7. Zhao, X., Muller, E.G., and Rothstein, R. (1998) A suppressor of two essential genes checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell*, **2**, 329-340.
8. Lee, Y.D., Wang, J., Stubbe, J., Elledge, S. J. (2008) Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Mol Cell*, **32**, 70-80.
9. Wu, X. and Huang, M. (2008) Dif1 controls subcellular localization of ribonucleotide reductase by mediating nuclear import of the R2 subunit. *Mol Cell Biol.* **28**, 7156-7167.
10. Lee, Y.D., and Elledge, S.J. (2006) Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes Dev.*, **20**, 334-344.
11. Sanvisens, N., Bañó, M.C., Huang, M., Puig, S. (2011) Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency. *Mol Cell*, **44**, 759-69.
12. Azad, G. K., Singh, V., Golla, U., Tomar, R. S. (2013) Depletion of cellular iron by Curcumin leads to alteration in histone acetylation and degradation of Sml1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, **8**(3): e59003.
13. Sanvisens, N., Romero, A.M., An, X., Zhang, C., de Llanos, R., Martínez-Pastor, M.T., Bañó, M.C., Huang, M., Puig, S. (2014) Yeast Dun1 kinase regulates ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 in response to iron deficiency. *Mol Cell Biol.*, **34**, 3259-71.
14. Boiteux, S., and Jinks-Robertson, S. (2013) DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**, 1025-1064.
15. Lisby, M. and Rothstein, R. (2004). DNA damage checkpoint and repair centers. *Curr Opin Cell Biol.*, **16**, 328-334.

16. Lettier, G., Feng, Q., de Mayolo, A.A., Erdeniz, N., Reid, R.J., Lisby, M., Mortensen, U. H., Rothstein, R. (2006.) The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*. *PlosOne Genet.*, **2**(11):e194.
17. Lieber, M.R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.*, **79**, 181-211.
18. Ulrich, H.D. (2005) The Rad6 pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO. *Chembiochem.*, **6**, 1735-1743.
19. Broomfield, S., Hryciw, T., and Xiao, W. (2001) DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **486**, 167-184.
20. Zhang, W., Qin, Z., Zhang, X., and Xiao, W. (2011) Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. *FEBS Lett.*, **585**, 2786-2794.
21. Veatch, J.R., McMurray, M.A., Nelson, Z.W., Gottschling, D.E. (2009). Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell*, **137**, 1247-58.
22. Diaz de la Loza, M.C., Gallardo, M., García-Rubio, M.L., Izquierdo, A., Herrero, E., Aguilera, A., and Wellinger, R. (2011) Zim17/Tim15 links mitochondrial iron-sulfur cluster biosynthesis to nuclear genome stability. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6002-6015.
23. Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W.J., Stark, M.J., White, M.F. (2006). The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol Cell*, **23**, 801-8.
24. Paul, V.D., Lill, R. (2015) Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim Biophys Acta*, **1853**, 1528-1539.
25. Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.A., Lill, R., Mühlenhoff, U. (2013) The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol Biol Cell*, **24**, 1830-41.
26. Rodríguez-Manzaneque, M.T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell*, **13**, 1109-1121.
27. Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008) Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol Cell Biol.*, **28**, 1851-1861.
28. Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J., and Lill, R. (2011) Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol Chem.*, **286**, 41205-41216.
29. Sheftel, A.D., Wilbrecht, C., Stehling, O., Niggemeyer, B., Elasser, H.P., Mühlenhoff, U., Lill, R. (2012) The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for (4Fe-4S) protein maturation. *Mol Biol Cell* **23**, 1157-1166.
30. Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**, 619-30.
31. Winston, F., Dollard, C., Ricupero-Hovasse, S.L. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, **11**, 53-55.
32. Bellí, G., Polaina, J., Tamarit, J., De La Torre, M.A., Rodríguez-Manzaneque, M.T., Ros, J., Herrero, E. (2002) Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *J Biol Chem.*, **277**, 37590-6.
33. Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.*, **350**, 3-41.
34. Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1793-1808.
35. Goldstein, A.L., McCusker, J.H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 1541-1553.

36. Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, **21**, 947-62.
37. Goldstein, A.L., Pan, X. and McCusker, J.H. (1999) Heterologous *URA3MX* cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 507-511.
38. Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 942-947.
39. Vergés, E., Colomina, N., Garí, E., Gallego, C., and Aldea, M. 2007. Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol Cell.*, **26**, 649-662.
40. Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Ros, J. (2006) Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Anal Biochem.*, **351**, 149-51.
41. Prado, J., and Aguilera, A. (1995) Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and single-strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the *RAD1*, *RAD10* and *RAD52* genes. *Genetics*, **139**, 109-123.
42. Aguilera, A., and Gómez-González, B. (2008) Genomic instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Rev. Genetics*, **9**, 204-217.
43. Mortensen, U.H., Lisby, M., and Rothstein, R. (2009) Rad52. *Curr. Biol.*, **19**, R676-677.
44. Lambert, S., Mizuno, K., Blaisonneau, J., Martineau, S., Chanut, R., Fréon, K., Murray, J.M., Carr, A.M., and Baldacci, G. (2010) Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol. Cell*, **39**, 346-359.
45. Rodríguez-Manzanares, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 8180-8190.
46. Philpott, C.C. and Protchenko, O. (2008). Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, **7**, 20-27.
47. Fan, E.G., Cheng, K.K., and Klein, H.L. (1996) Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1Δ* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **142**, 749-759.
48. Prakash, S., Johnson, R.E., and Prakash, L. (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Ann. Rev. Biochem.*, **74**, 317-353.
49. Alvino, G.M., Collingwood, D., Murphy, J.M., Delrow, J., Brewer, B.J., and Raghuraman, M.K. (2007) Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 6396-6406.
50. Downs, J.A., Lowndes, N.F., and Jackson, S.P. (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, **408**, 1001-1004.
51. Amon A., Surana U., Muroff I. and Nasmyth K. (1992). Regulation of p34CDC28 tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*. *Nature*, **355**, 368-371.
52. Reichard, P. (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 349-374.
53. Ball, L.G., Zhang, K., Cobb J.A., Boone, C., and Xiao, W. (2009) The yeast Shu complex couples error-free post-replication repair to homologous recombination. *Mol. Microbiol.*, **73**, 89-102.
54. Mimitou, E.P., Symington, L.S. (2009) Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem Sci.*, **34**, 264-72.
55. Hausmann, A., Netz, D., Balk, J., Pierik, A.J., Mühlenhoff, U. and Lill, R. (2005) The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: An essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci.*, **102**, 3266-3271.

56. Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Weibert, H., Wilbrecht, C., Mühlenhoff, U. (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1873**, 1491-508.
57. Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., Elledge, S.J. (1999) Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science*, **286**, 1166-71.
58. Stehling, O., Vashisht, A.A., Mascarenhas, J., Jonsson, Z.O., Sharma, T., Netz, D.J., Pierik, A.J., Wohlschlegel, J.A., Lill, R., (2012) MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity, *Science*, **337**, 195-199.
59. Netz, D.J., Stith, C.M., Stumpfig, M., Kopf, G., Vogel, D., Genau, H.M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M., Pierik, A.J. (2012) Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 125-132.
60. Gari, K., Leon Ortiz, A.M., Borel, V., Flynn, H., Skehel, J.M., Boulton, S.J. (2012) MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism, *Science*, **337**, 243-245.
61. Sohn, Y.S., Tamir, S., Song, L., Michaeli, D., Matouk, I., Conlan, A.R., Harir, Y., Holt, S.H., Shulaev, V., Paddock, M.L., Hochberg, A., Cabanchick, I.Z., Onuchic, J.N., Jennings, P.A., Nechushtai, R., Mittler, R. (2013) NAF-1 and mitoNEET are central to human breast cancer proliferation by maintaining mitochondrial homeostasis and promoting tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 14676-14681.
62. Thierbach, R., Drewes, G., Fusser, M., Voigt, A., Kuhlow, D., Blume, U., Schulz, T.J., Reiche, C., Glatt, H., Epe, B., Steinberg, P., Ristow, M. (2010) The Friedreich's ataxia protein frataxin modulates DNA base excision repair in prokaryotes and mammals. *Biochem J.*, **432**, 165-172.
63. Moreno-Cermeño, A., Obis, E., Bellí, G., Cabisco, E., Ros, J., Tamarit, J. (2010) Frataxin depletion in yeast triggers up-regulation of iron transport systems before affecting iron-sulfur enzyme activities. *J Biol Chem.*, **285**, 41653-64.
64. Lisby, M., Rothstein, R., Mortensen, U.H. (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**, 8276-82.
65. Lettier, G., Feng, Q., de Mayolo, A.A., Erdeniz, N., Reid, R.J., Lisby, M., Mortensen, U.H., Rothstein, R. (2006) The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet.* **2**(11):e194.
66. Lisby, M., Mortensen, U.H., Rothstein R. (2003) Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. Lisby M, Mortensen UH, Rothstein R. *Nat Cell Biol.*, **5**, 572-7.
67. Kuzminov, A. (2001) DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 8461-8.
68. Kowalczykowski, S.C. (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci.*, **25**, 156-65.
69. Rouse, J., Jackson, S.P. (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, **297**, 547-51.
70. Andreson, B.L., Gupta, A., Georgieva, B.P., and Rothstein, R. (2010) The ribonucleotide reductase inhibitor, Sml1, is sequentially phosphorylated, ubiquitinated and degraded in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6490-6501.
71. Broomfield, S., Hryciw, T. and Xiao, W. (2001) DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **486**, 167-184.
72. Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R., Thelander, L. (2003) Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase, *Cell*, **112**, 391-401.
73. Poli, J., Tsaponina, O., Crabbé, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., Pasero, P. (2012) dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J.*, **31**, 883-94.

74. Davidson, M.B., Katou, Y., Keszthelyi, A., Sing, T.L., Xia, T., Ou, J., Vaisica, J.A., Thevakumaran, N., Marjavaara, L., Myers, C.L., Chabes, A., Shirahige, K., Brown, G.W. (2012) Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J.*, **31**, 895-907.
75. Kumar, D., Abdulovic, A.L., Viberg, J., Nilsson, A.K., Kunkel, T.A., Chabes, A. (2011) Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1360-71.
76. Myung, K., Datta, A., Kolodner, R.D. (2001) Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, **104**, 397-408.
77. Craven, R.J., Petes, T.D. (2000) Involvement of the checkpoint protein Mec1p in silencing of gene expression at telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, **20**, 2378-84.
78. Tsang, C.K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., Zheng, X. F. (2014) Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun.* **5**, 3446.
79. Rouse, J. (2004) Esc4p, a new target of Mec1p (ATR), promotes resumption of DNA synthesis after DNA damage. *EMBO J.*, **23**, 1188-97.
80. Segurado, M., Diffley, J.F. (2008) Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev.*, **22**, 1816-27.
81. Cobb, J.A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C., Gasser, S.M. (2003) DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J.*, **22**, 4325-36.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The *Δgrx5* mutant has an elevated frequency of recombination and mutation and of DNA lesions in the nuclear genome. (A) Recombination rates of the following strains determined by the *leu2-k* system: wild-type (WFNL-5A), *Δgrx5* (MML1344), *Δyfh1* (MML1346), *Δaif1* (MML1354) and *Δcox12* (MML1352). (B) Mutation frequencies calculated by Can^R colony formation in the following strains: wild-type (CML235) and *Δgrx5* (MML19). (C) Percentage of unbudded and budded cells with Rad52-YFP foci in exponential phase cultures untreated or treated (1 h, 0.5 mM) with *t*-BOOH. Wild-type (W3749-14c) and derivative *Δgrx5* (MML1495) cells were employed. (D) Sensitivity to the indicated doses of UV light of serial dilutions of the following strains plated on YPD medium: wild-type (W303-1A), *Δgrx5* (MML100), *Δyfh1* (MML298), *Δaif1* (MML1166) and *Δcox12* (MML1367). (E) Sensitivity to UV light of liquid cell suspensions of the following strains after UV irradiation with the indicated doses: wild-type (W303-1A), *Δgrx5* (MML100), *Δssq1* (MML997) and *Δyfh1* (MML298). For each strain, survival at each dose of radiation was made relative to the unit value corresponding to non-irradiated cells. (F) Cells of the following strains in liquid suspension were UV-irradiated: wild-type (W303-1A), *Δgrx5* (MML100), *Δfet3* (MML1107) and *Δgrx5Δfet3* (MML1478). Survival compared to non-irradiated cells was made relative to the wild-type (unit value). Bars correspond to the mean (±s.d.) of three independent experiments.

Figure 2. The *Δgrx5* mutant and other ISC mutants are hypersensitive to DNA damaging agents. (A) Wild-type (CML235) and *Δgrx5* (MML19) cultures on YPD plates with the indicated agents and concentrations, without or with N-acetyl cysteine (NAC). In the case of UV treatment, cells were irradiated after spotting on plates. (B) Wild-type and *Δgrx5* cultures on YPD plates without (control) or with MMS and incubated for 2 or 5 days at 30°C respectively in aerobic or anaerobic conditions. (C) The following strains were

incubated on YPD plates with the indicated agents: wild-type, *Δgrx5*, *Δssq1* (MML1623), *Δiba57* (MML1678), and *Δisa1* (MML1732). (D) As (C) with the following strains: wild-type, *Δgrx5*, *Δcox12* (MML1700) and *Δrip1* (MML1701). (E) Cultures of MML1616 (*tetO₇-GRX5Δgrx5*) were grown in liquid YPD medium without doxycycline or with this agent for the indicated times and then treated for 30 min with 0.1% MMS. H2A histone phosphorylation was analyzed from protein extracts by western blot. Hxk1 protein levels are shown as loading control. (F) MMS treatment was applied (0.2%, 60 min) to the same cultures as in (E). Cell survival was recorded after spotting serial dilutions of the respective cultures on YPD plates.

Figure 3. Cell cycle progression is delayed in *Δgrx5* cells. (A) Exponential cultures of wild-type (CML235), *Δgrx5* (MML19), *Δiba57* (MML1678) and *Δgrx5Δiba57* (MML1694) cells in YPD medium were synchronized with α -factor and released into YPD medium without or with HU (15 mM). Samples for flow cytometry analyses were taken at the indicated times, including also controls from exponential non-synchronous cultures. (B) As in (A) for wild-type, *Δgrx5* and *Δgrx5Δsm11* (MML1666) cultures. Synchronized cells were released into YPD medium without HU.

Figure 4. Interactions between the *Δgrx5* mutation and mutations in different DNA damage repair pathways. (A) Exponential growth rates of wild-type (CML235) and the corresponding mutant derivatives (see Supplementary Table 1 for nomenclature), in YPD medium at 30°C. Values (mean of at last three independent experiments, \pm s.d.) were normalized relative to wild-type cells. (B and C) Exponential cultures of wild-type (CML235) and the corresponding mutant derivatives (see Supplementary Table 1) in YPD liquid medium were serially diluted and spotted on YPD plates containing the indicated agents. Growth was recorded after 6 (part A) or 3 (part B) days of incubation at 30°C.

Figure 5. The DNA damage checkpoint is constitutively activated in the absence of ISC proteins. (A) Sml1 levels (analyzed by western blot) in the conditional *tetO₇-GRX5* (MML1616) mutant exponentially growing in YPD medium, untreated (time 0) or treated with MMS (0.1%, 30 min) 12 and 24 hours after doxycycline addition. Hxk1 is shown as loading control. (B) Sml1 levels in synchronous cultures in YPD medium of wild-type (CML235) and *Δgrx5* (MML1500) cells released at time 0 from α -factor arrest. A sample from an asynchronous exponential culture is also shown. The percentage of budded cells at the different time points is indicated. Hxk1 is shown as loading control. (C) Sml1 levels in exponential YPD cultures of wild-type, *Δcox12* (MML1700), *Δgrx5*, *Δisa1* (MML1732) and *Δiba57* (MML1678) cells. Bars represent the mean (\pm s.d.) of three independent experiments, made relative to wild-type cells (unit value). (D) Percentage of budded cells with Rad52-YFP foci in exponential YPD cultures of pWJ1213-transformed wild-type, *Δcox12*, *Δiba57* and BPS-treated wild-type cells. (E) Mutation rates calculated by Can^R colony formation in wild-type (CML235) and *Δiba57* (MML1678) cells. (F) Sml1 levels in exponential YPD cultures of wild-type (CML235) and *tetO₇-NBP35Δnbp35* (MML1923) cells before (time 0) or 55 hours after doxycycline addition. Samples from MMS-treated (0.1%, 30 min) wild-type (CML235) and exponentially growing *Δgrx5* (MML19) cells are also included. Hxk1 is shown as loading control. (G)

Percentage of budded cells with Rad52-YFP associated foci in exponential cultures of pWJ1213-transformed MML1923 (*tetO₇-NBP35Δnbp35*) cells untreated or treated with doxycycline for 55 hours.

Figure 6. Rnr2 relocates at the cytoplasm in *Δgrx5* and *Δiba57* mutants. (A) Dif1 protein levels in wild-type (CML235), wild-type plus MMS (0.1%, 30 min), *Δgrx5* (MML1500) and *Δiba57* (MML1678) cells exponentially growing in YPD medium. Samples from *Δdif1* (MML1894) cells are included as negative control. (B) Left panels: Indirect immunofluorescence studies of Rnr2 location (green) in cultures in YPD medium of the indicated strains. Nuclear DAPI stain (red) and merged images are also shown. Right panel: Percentage of cells with the indicated subcellular location of Rnr2, in exponential cultures of wild-type cells untreated or treated with MMS (0.1%, 30 min), *Δgrx5*, *Δiba57*, *Δdif1* (MML1894) and *Δiba57Δdif1* (MML1902) cells. Bars show the mean (±s.d.) of three independent experiments. N/C: nucleo-cytoplasmic. (C) Percentage of cells with the indicated subcellular location of Rnr2 in MML1923 (*tetO₇-NBP35 Δnbp35*) cells in YPD medium untreated or treated with doxycycline for 55 hours.

Figure 7. Activation of the DNA damage checkpoint does not share the same signaling mediators in *Δgrx5* or *Δiba57* mutant cells. (A) Sml1 levels in wild-type, *Δgrx5* (MML1500), *Δiba57* (MML1678), *Δgrx5Δdun1* (MML1826), *Δiba57Δdun1* (MML1828) and *Δdun1* (MML1798) cells growing exponentially in YPD medium. Hxk1 is shown as loading control. (B) Sensitivity of the same strains as in part (A) to MMS, in liquid YPD medium. Growth (optical density at 600 nm) in shaken microtiter plates was automatically recorded during 24 hours and the exponential growth slope values of each strain and condition were made relative to the one of wild-type cells, which was given the unit value. The mean of three independent experiments (± s.d.) is represented. (C) Phosphorylation levels of Rad53 in untreated and MMS-treated (0.1%, 30 min) wild-type, *Δgrx5* and *Δiba57* cells growing exponentially in YPD medium. (D and E) Sml1 levels in (D) wild-type, *Δdif1* (MML1894), *Δdif1Δmec1* (MML1898), and *Δiba57*, *Δiba57Δdif1* (MML1902), *Δiba57Δdif1Δmec1* (MML1904), or (E) *Δgrx5*, *Δgrx5Δdif1* (MML1899), *Δgrx5Δdif1Δmec1* (MML1901) cells growing exponentially in YPD medium. Some of the cultures were treated with MMS (0.1%, 30 min), prior analysis. (F) As in (D, E) in samples of wild-type, *Δchk1* (MML2019), *Δgrx5Δchk1* and *Δgrx5Δchk1* (MML2030) cells. (G) Sml1 levels in wild-type, *Δiba57* and *Δiba57Δchk1* (MML2032) synchronized cells. Exponential cultures in YPD medium were synchronized with α-factor and released into YPD medium. Samples for Sml1 protein analyses were taken at the indicated times, including also a control from the exponential non-synchronous cultures. Percentage of budded cells along the time course is also indicated. (H) As in (D, E) in samples of wild-type, *Δdun1*, MML1923 (*tetO₇-NBP35Δnbp35*) and MML1997 (*tetO₇-NBP35Δdun1*) cells, these two latter ones in liquid YPD medium untreated or treated with doxycycline for 55 hours. (I) As in (D, E) in samples of wild-type, *Δdif1* (MML1894), *Δdif1Δmec1* (MML1898), MML1923 (*tetO₇-NBP35Δnbp35*) and MML1999 (*tetO₇-NBP35Δdif1Δmec1*) cells, these two latter ones in liquid YPD medium untreated or treated with doxycycline for 55 hours. Some of the cultures were treated with MMS (0.1%, 30 min), prior analysis.

Fig 1

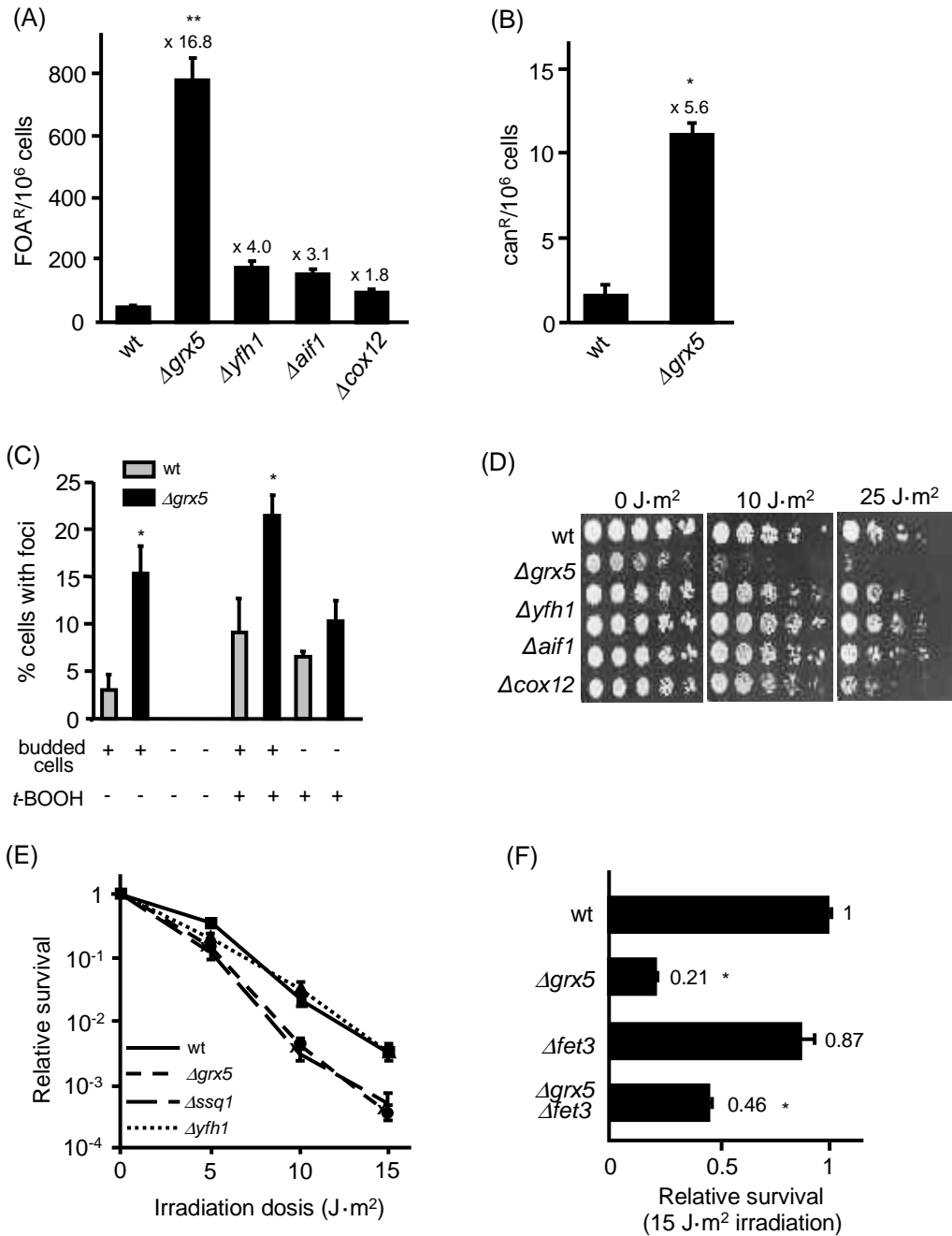


Fig 2

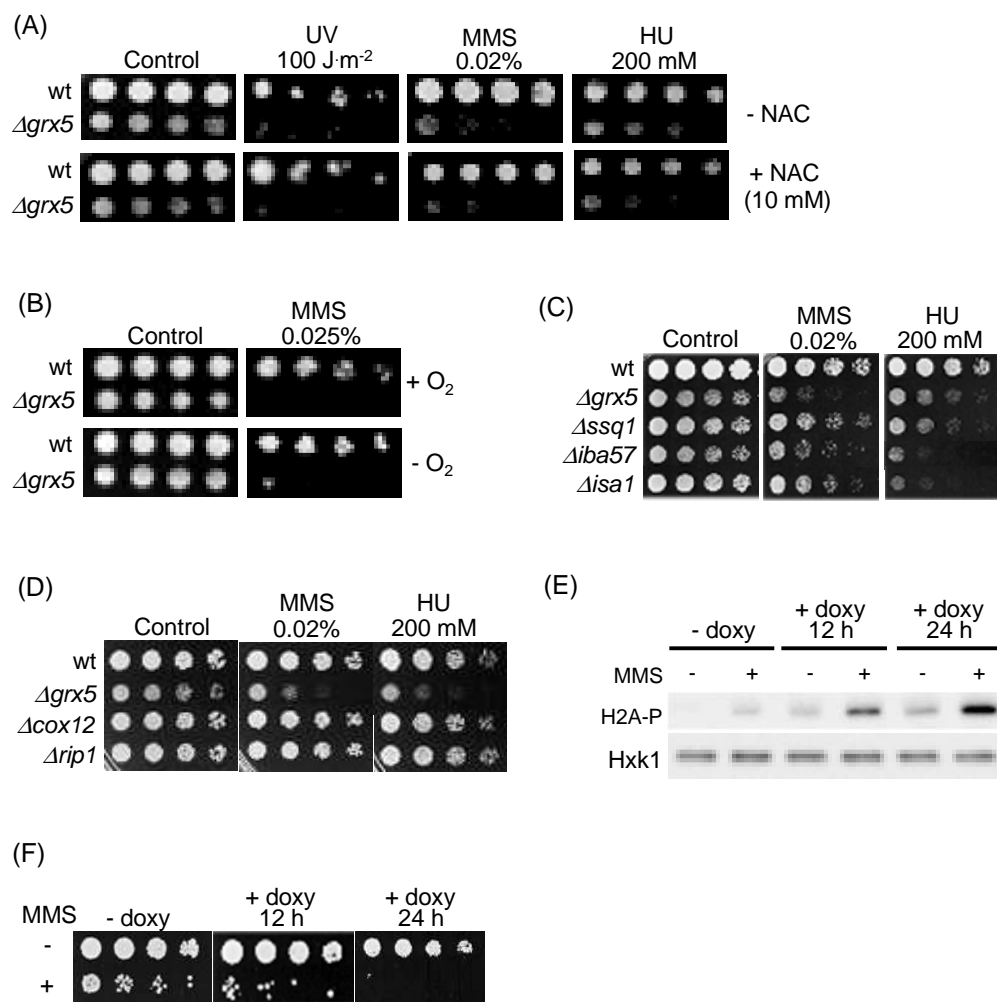


Fig 3

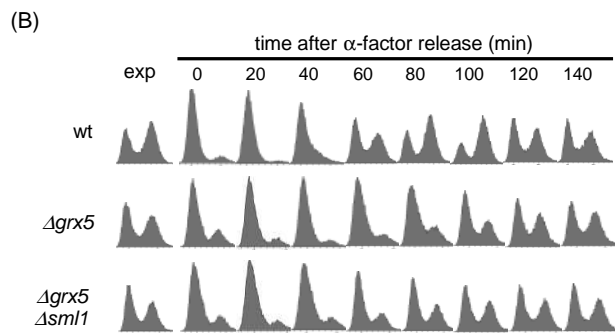
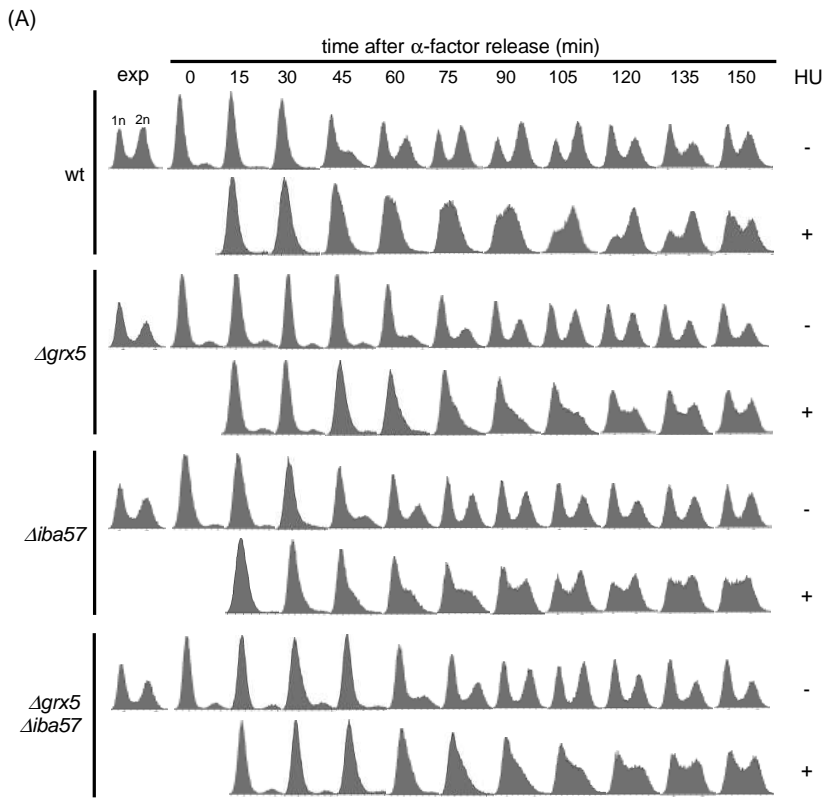


Fig 4

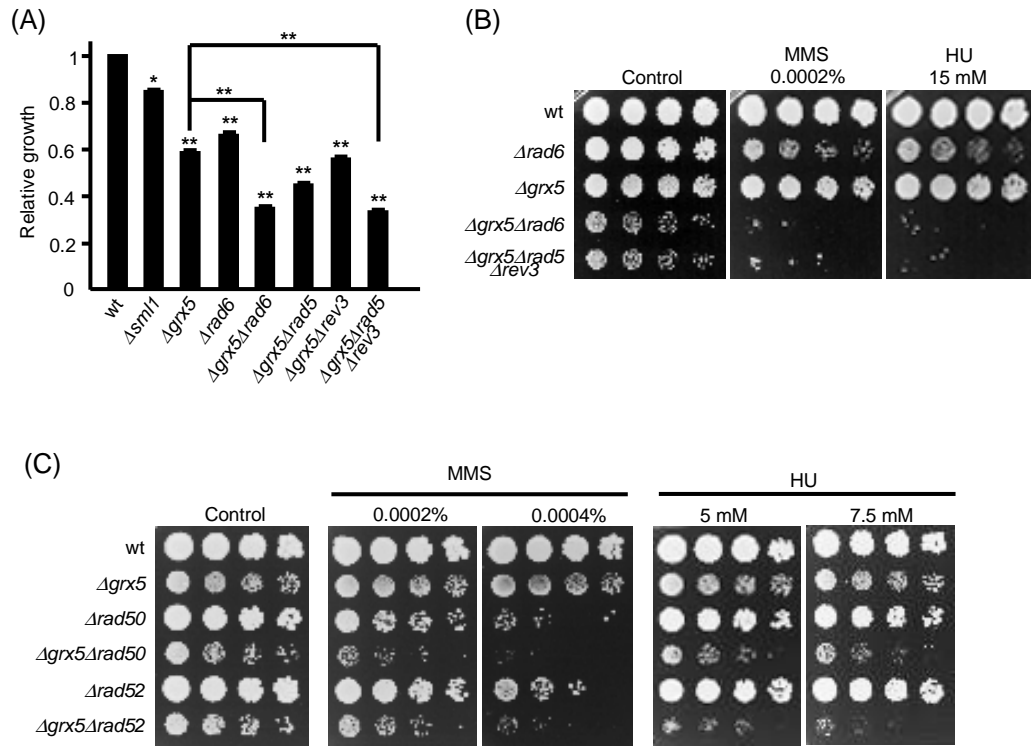


Fig 5

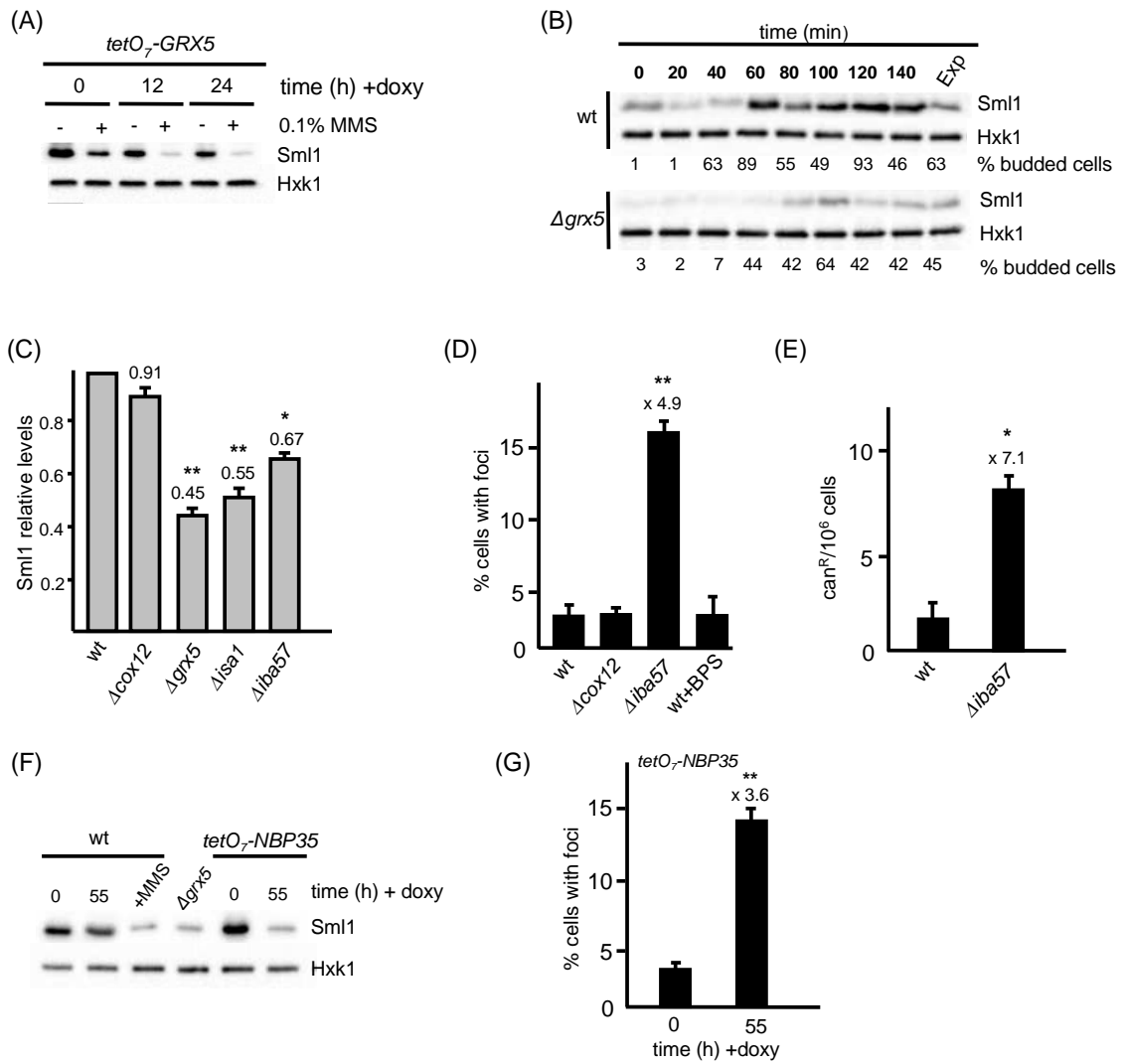


Fig 6

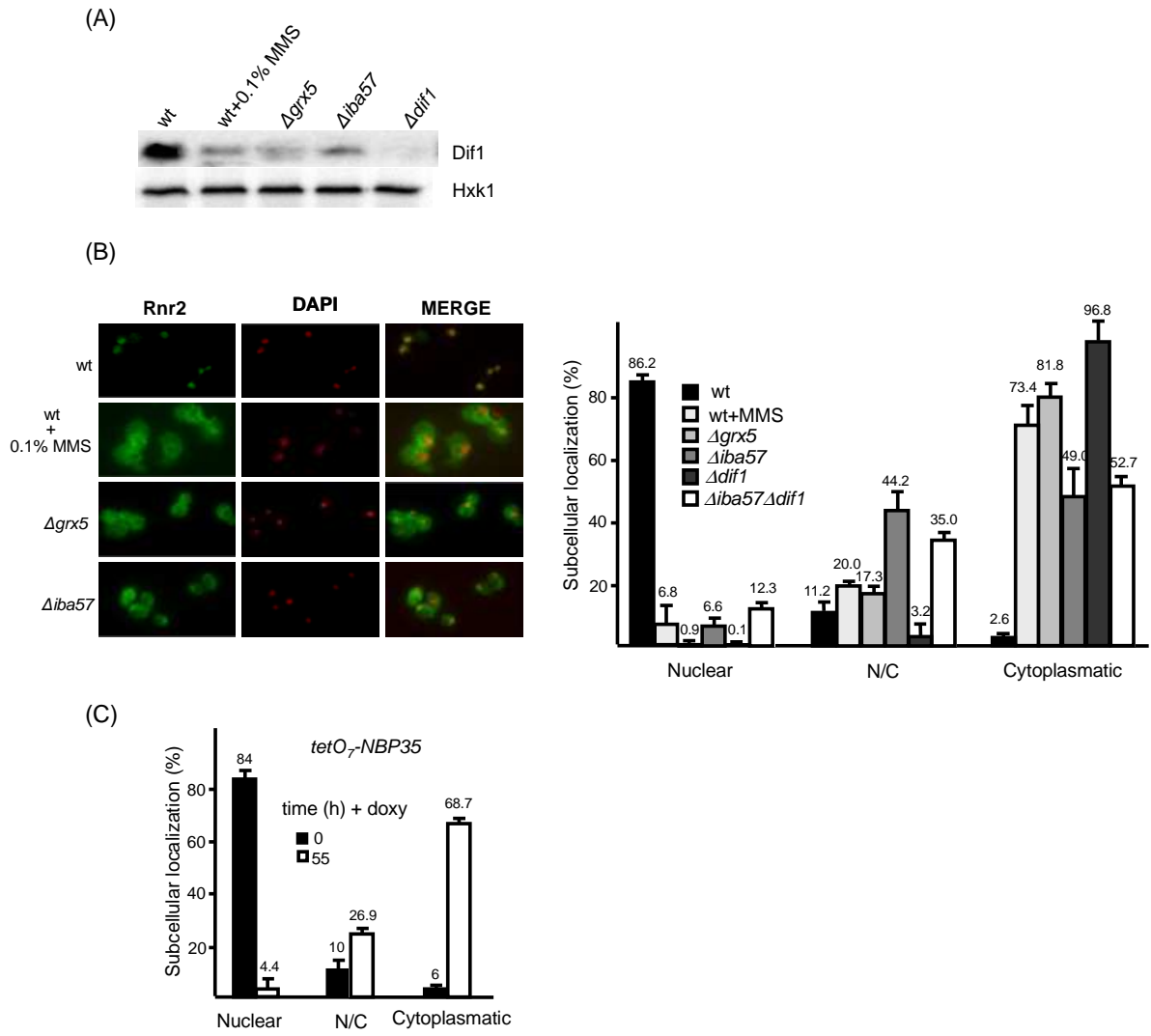
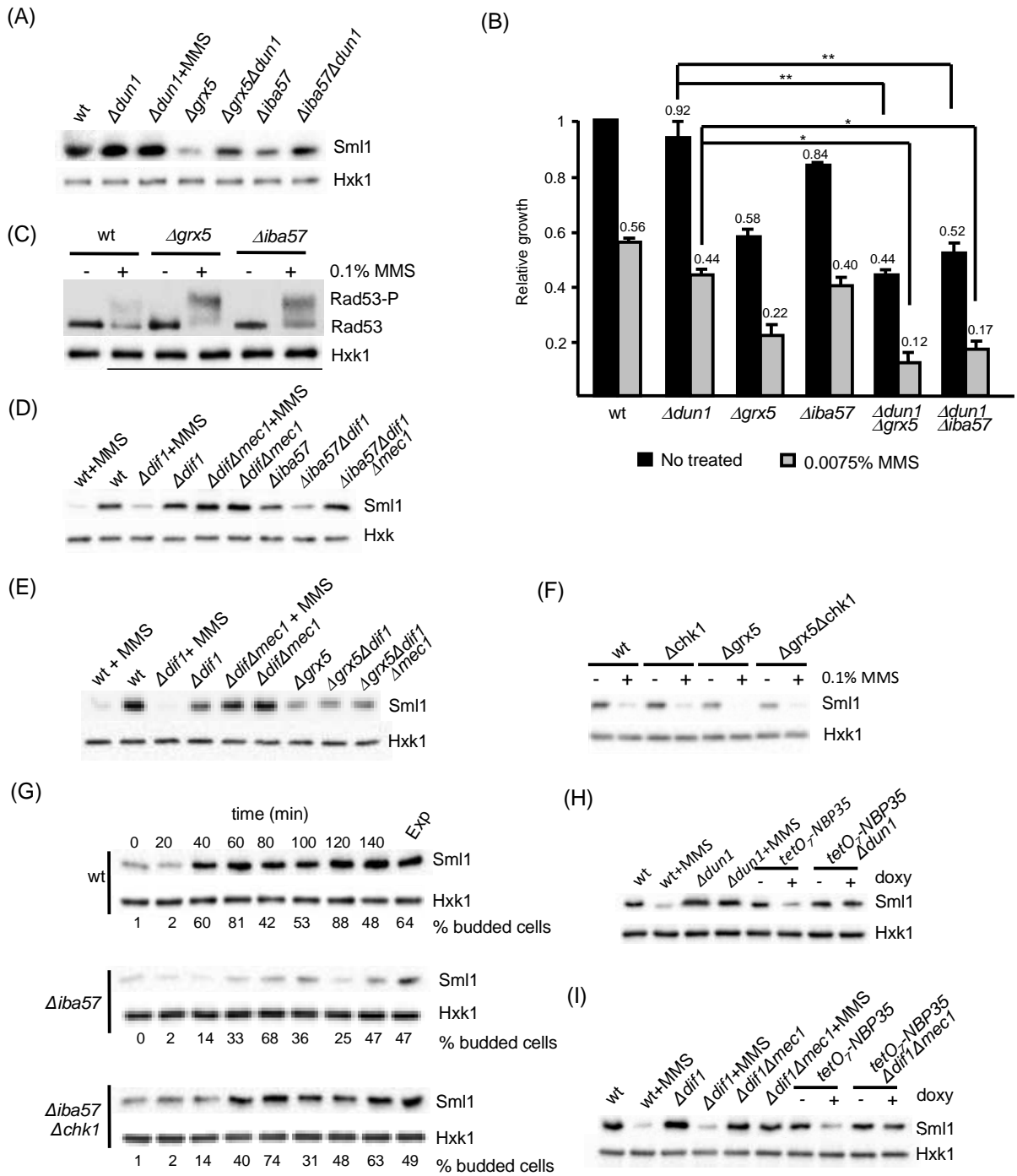


Fig 7



Supplementary Table S1. Strains employed in this study

Strain	Relevant genotype	References and comments
W303-1A	MATa <i>leu2-3,111 ade2-1 trp1-1 his3-11,75 ura3</i>	wild-type, Ref. 30
W3749-14C	W303-1A <i>RAD52-YFP</i>	Gift from R. Rothstein, Ref. 64 (22)
WFNL-5A	W303-1A <i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k cdc7-1</i>	Gift from K. Nasmyth, Ref. 51
CML235	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i>	wild-type (FY1679 background), Ref. 31
CML236	MATalpha <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i>	wild-type (FY1679 background), Ref. 31
MML19	CML235 <i>Δgrx5::kanMX4</i>	(26)
MML100	W303-1A <i>Δgrx5::kanMX4</i>	(26)
MML102	W303-1A <i>cdc7-1 Δgrx5::kanMX4</i>	This work
MML160	CML236 <i>Δgrx5::kanMX4 (Y plac211)::URA3</i>	(32)
MML161	CML235 <i>Δgrx5::kanMX4 [pMM25(Y plac211-GRX5)]::URA3</i>	(32)
MML163	CML235 <i>Δgrx5::kanMX4 [pMM27(Y plac211-GRX5-C80S)]::URA3</i>	(32)
MML298	W303-1A <i>Δyfh1::kanMX4</i>	(26)
MML345	W303-1A <i>Δaft1::URA Δgrx5::kanMX4</i>	(26)
MML348	W303-1A <i>Δaft1::URA</i>	(26)
MML997	W303-1A <i>Δssq1::kanMX4</i>	This work
MML1062	CML236 <i>Δcth1::natMX4 Δcth2::kanMX4</i>	Our laboratory collection
MML1107	W303-1A <i>Δfet3::natMX4</i>	This work
MML1166	W303-1A <i>Δaif1::kanMX4</i>	This work
MML1167	W303-1A <i>Δcox12::kanMX4</i>	This work
GAL-NBP35	W303-1A <i>pNBP35::GAL1-10::HIS3</i>	Gift from R. Lill, Ref. 55
MML1344	W303-1A <i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k Δgrx5::kanMX4</i>	This work
MML1346	W303-1A <i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k Δyfh1::kanMX4</i>	This work
MML1352	W303-1A <i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k Δcox12::kanMX4</i>	This work
MML1354	W303-1A <i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k Δaif1::kanMX4</i>	This work
MML1478	W303-1A <i>Δfet3::natMX4 Δgrx5::kanMX4</i>	This work
MML1500	CML235 <i>Δgrx5::natMX4</i>	This work
MML1502	CML236 <i>Δgrx5::natMX4</i>	This work
MML1516	CML235 <i>Δrad6::kanMX4</i>	This work
MML1525	CML235 <i>Δgrx5::natMX4 Δrev3::kanMX4</i>	This work
MML1545	CML235 <i>Δrad50::kanMX4</i>	This work
MML1495	W303-1A <i>RAD52-YFP Δgrx5::kanMX4</i>	This work
MML1585	CML235 <i>Δrad52::kanMX4</i>	This work
MML1587	CML235 <i>Δgrx5::natMX4 Δrad6::kanMX4</i>	This work
MML1605	CML235 <i>Δgrx5::natMX4 Δrad50::kanMX4</i>	This work
MML1607	CML235 <i>Δgrx5::natMX4 Δrad52::kanMX4</i>	This work
MML1616	CML235 <i>tetO₂-GRX5::URA3 Δgrx5::natMX4 [pCM244(tetR⁺-SSNθ)]::LEU2</i>	This work
MML1620	CML235 <i>Δsml1::CaURA3</i>	This work
MML1623	CML235 <i>Δssq1::kanMX4</i>	This work
MML1648	CML235 <i>Δgrx5::natMX4 Δrad5::kanMX4 Δrev3::kanMX4</i>	This work
MML1652	CML235 <i>Δcth1::genMX4 Δcth2::genMX4 Δgrx5::natMX4</i>	This work
MML1666	CML235 <i>Δgrx5::natMX4 Δsml1::CaURA3</i>	This work
MML1670	CML235 <i>Δgrx5::natMX4 Δrad5::kanMX4</i>	This work
MML1678	CML235 <i>Δiba57::natMX4</i>	This work
MML1700	CML235 <i>Δcox12::natMX4</i>	This work
MML1701	CML235 <i>Δrip1::natMX4</i>	This work
MML1732	CML235 <i>Δisa1::natMX4</i>	This work
MML1798	CML236 <i>Δdun1::hphNT1</i>	This work
MML1814	CML235 <i>tetO₂-GRX5::URA3 Δgrx5::natMX4 [pCM244(tetR⁺-SSNθ)]::LEU2 Δcth2::kanMX4</i>	This work
MML1826	CML235 <i>Δgrx5::natMX4 Δdun1::hphNT1</i>	This work
MML1828	CML235 <i>Δiba57::natMX4 Δdun1::hphNT1</i>	This work
MML1894	CML235 <i>Δdif1::natMX4</i>	This work
MML1898	CML235 <i>Δdif1::kanMX4 Δmec1::hphNT1</i>	This work
MML1899	CML235 <i>Δgrx5::kanMX4 Δdif1::natMX4</i>	This work
MML1901	CML236 <i>Δgrx5::kanMX4 Δdif1::natMX4 Δmec1::hphNT1</i>	This work
MML1902	CML235 <i>Δiba57::natMX4 Δdif1::kanMX4</i>	This work
MML1904	CML236 <i>Δiba57::natMX4 Δdif1::kanMX4 Δmec1::hphNT1</i>	This work
MML1923	CML235 <i>tetO₂-NBP35::URA3 Δnbp35::kanMX4 [pCM244(tetR⁺-SSNθ)]::LEU2</i>	This work
MML1997	CML236 <i>tetO₂-NBP35::URA3 Δnbp35::kanMX4 [pCM244(tetR⁺-SSNθ)]::LEU2 Δdun1::hphNT1</i>	This work
MML1999	CML235 <i>tetO₂-NBP35::URA3 Δnbp35::kanMX4 [pCM244(tetR⁺-SSNθ)]::LEU2 Δdif1::kanMX4 Δmec1::hphNT1</i>	This work
MML2019	CML236 <i>Δchk1::kanMX4</i>	This work, derived from YGDP1104 (gift from G. de Piccoli)
MML2030	CML235 <i>Δchk1::kanMX4 Δgrx5::natMX4</i>	This work
MML2032	CML235 <i>Δchk1::kanMX4 Δiba57::natMX4</i>	This work
MML2064	CML235 <i>Δchk1::kanMX4</i>	This work

