

Universitat de Lleida

Glutaredoxines de reticle endoplasmàtic/Golgi de *Saccharomyces cerevisiae*: relació amb l'homeòstasi del calci i la maquinària de secreció proteica

Judit Puigpinós Roig

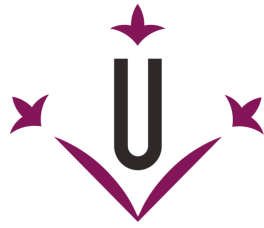
Dipòsit Legal: L.1236-2014
<http://hdl.handle.net/10803/275975>



Glutaredoxines de reticle endoplasmàtic/Golgi de Saccharomyces cerevisiae: relació amb l'homeòstasi del calci i la maquinària de secreció proteica està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

Les publicacions incloses en la tesi no estan subjectes a aquesta llicència i es mantenen sota les condicions originals.

(c) 2014, Judit Puigpinós Roig



Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques

GLUTAREDOXINES DE RETICLE
ENDOPLASMÀTIC/GOLGI DE *Saccharomyces cerevisiae*:
RELACIÓ AMB L'HOMEÒSTASI DEL CALCI I LA
MAQUINÀRIA DE SECRECIÓ PROTEICA

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

Els Directors de la Tesi

Dr. Enrique Herrero Perpiñán

Dra. Celia Casas Herranz

Al meu padrí,

*Més tenaçment que mai, m'esforço a créixer
sabent que tu creixes amb mi:
projectes, il·lusions, prenen volada
per tu i amb tu, per molt distants que et siguin,
i amb tu i per tu somnio d'acomplir-los.*

(Miquel Martí Pol)

Fer una tesi doctoral és un camí i una motivació personal, però es necessita el suport i la participació de molta més gent.

Agrair als meus directors de tesi, l'Enric Herrero i la Celia Casas, que abans d'endinsar-me en el món pràctic del treball en un laboratori, ja van despertar el meu interès per aquesta ciència en les classes que impartien a la carrera de Biotecnologia d'aquesta mateixa Universitat. D'una banda, l'Enric ha estat des de l'inici una gran referència a seguir, per la seva implicació en la feina ben feta i el gran ventall de coneixements i experiència que emmagatzema. Com a cap del laboratori de Biologia Molecular de Llevats, ens ha ensenyat a reflexionar buscant les raons i el perquè de cada cosa, a ser responsables de la nostra feina, i a ser crítics quan fa falta. D'altra banda, la Celia ha estat de gran ajuda en el dia a dia del laboratori, orientant-me en la investigació, ensenyant-me de manera meticulosa moltes de les tècniques que he dut a terme i buscant resposta a totes les preguntes que em sorgien. Gràcies per ajudar-me a madurar professionalment, com personalment.

Agrair també a tots els companys, i sobretot amics, que han passat per aquest laboratori. Sense ells no hauria estat el mateix. A la Gemma Bellí, per la seva capacitat d'anàlisi constructiu. A la Laia Roca, l'Alicia Izquierdo i la Mireia Aresté, per la seva generositat i ajuda en els meus primers mesos al laboratori. Al Paco Ferrezuelo, per la seva paciència, per les seves reflexions constants i per tot el que m'ha ensenyat. A la Maria Pérez, el Carlos María i el Jordi Pijuan, per les hores que hem passat junts, tant dins del laboratori, lligant les nostres recerques i descobrint visions diferents de fer investigació, com fora de la feina, compartint dinars, sopars, llargues xerrades i reflexions... A l'Esther Lamarca, la Silvia Porras i la Meri Martín, per ajudar amb tot el que podien i més, sempre animant i fent de mames en els moments més durs. A l'Andrés Bueno i el David Moreno, per aportar un toc més d'humor al laboratori, amb aquesta habilitat de fer aparèixer un somriure a la cara. Al Fernando Santamaría i Sergi López, amb els quals he compartit els últims mesos d'escriptura de la tesi, per aportar sobretot frescor i joventut.

El meu més profund agraïment per l'Oskar, per la seva ajuda, els seus ànims i el seu suport incondicional en tot els àmbits. M'ha recolzat en totes les meves decisions i sempre m'ha donat la seva sincera opinió quan li he demanat. És una de les persones més bones i honestes que he conegut mai. Gràcies per la companyia necessària al laboratori en hores intempestives i en dies de festa, gràcies per escoltar els meus arguments, la meua manera de veure les coses, les meves queixes, les meves alegries, i en general gràcies per estar allí quan més ho necessitava.

Agrair també, a tots els meus familiars, especialment a la meva padrina (i segona mare) Maria, als meus pares Carme i Ramon, i al meu germà Marc, que durant aquests quatre anys han confiat plenament amb mi, veient sempre amb bons ulls les “grans” decisions de la meva vida. Gràcies per la paciència que heu tingut, per fer-me la vida una mica més fàcil i per donar-m’ho tot i més. També m’agradaria agrair, de manera especial, al meu padrí Juan, que va ser i serà un referent de la meva vida i de qui vaig aprendre moltíssim.

Agrair a les meves amigues de tota la vida, als membres de la cobla Vents de Riella, als amics de la Universitat, als amics de Lleida... per ajudar-me a desconnectar, i tenir sempre temps per disfrutar plegats.

Finalment, volia destacar també la nova incorporació a la família, la gosseta Lluna, adoptada l’últim any de la tesi, amb la qual he compartit moltes hores d’escriptura. Gràcies per la companyia i l’amor que desprens.

A tots, el meu més sincer agraïment.

RESUM

Grx6 i Grx7 són dues glutaredoxines (GRXs) responsables de la reducció dels ponts disulfur mixtes entre el glutatió i les proteïnes, localitzades als compartiments de reticle endoplasmàtic (RE) i Golgi de la via secretora. En aquests compartiments té lloc el plegament i modificació de proteïnes que estan destinades a altres compartiments intracel·lulars com la vacuola o bé són secretades a l'espai extracel·lular. Al RE es formen els ponts disulfur en les proteïnes que entren a la via, un fet estretament lligat amb l'ambient redox d'aquest compartiment. El potencial d'oxidació relativament alt del RE representa l'equilibri entre el procés d'oxidació que permet la formació dels ponts disulfur proteics, on participen les proteïnes essencials Ero1 i Pdi1, i el procés reductor que reorganitza aquests ponts disulfur i n'evita l'excés, on intervé el glutatió i alguns homòlegs de la proteïna Pdi1. A més a més, la formació de ponts disulfur és una font substancial d'estrès oxidatiu. En aquest context, l'activitat de les GRXs podria contribuir a regular l'homeòstasi redox, evitant danys oxidatius en els grups tiols de les proteïnes, i influenciant així l'activitat de determinades proteïnes. L'homeòstasi del Ca^{2+} a la via secretora és important pel plegament, maduració i secreció de les proteïnes, sent la seva desregulació una de les principals causes de l'estrès de RE. En presència d'aquest estrès, la cèl·lula indueix la resposta UPR (Unfolded Protein Response) i una via de senyalització que promou l'entrada de Ca^{2+} al citosol a través del sistema HACCS de la membrana plasmàtica, que a la vegada activa proteïnes com la calcineurina. Ambdues vies operen en paral·lel per restablir l'homeòstasi iònica i permetre la supervivència de la cèl·lula front aquesta situació d'estrès.

El doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ presenta una inducció constitutiva de gens involucrats en l'homeòstasi del fòsfat i en secreció i compartimentalització de proteïnes. D'una banda, el mutant $\Delta grx6$ mostra una inducció constitutiva de la via Crz1-calcineurina, responsable entre d'altres de l'expressió de gens involucrats en el metabolisme del fòsfat, sent l'activitat Grx6 necessària per protegir la cèl·lula de llevat en condicions en què la via de la calcineurina està inhibida. L'absència de Grx6 afecta l'homeòstasi del Ca^{2+} , provocant un increment dels nivells de Ca^{2+} citosòlic. Això es reflecteix en alteracions en la sensibilitat del mutant $\Delta grx6$ als quelants de Ca^{2+} , sent menys susceptible a EGTA, però més sensible a BAPTA-AM que la soca salvatge. A més a més, donada l'estreta relació entre l'homeòstasi de diversos ions a la cèl·lula, el mutant $\Delta grx6$ també acumula un excés de fòsfat, potassi i sodi. D'altra banda, aquest estudi mostra una relació entre l'estrès de RE i Grx6/Grx7, ja que en condicions d'estrès de RE, tant la falta de *GRX6* com de *GRX7* provoquen canvis en la inducció

de la UPR. Es descarta, però, que aquestes GRXs participin directament en la regulació redox de les dues principals proteïnes encarregades del plegament proteic al RE, Ero1 i Pdi1. No obstant, hi ha una implicació d'aquestes GRXs en la maquinària de plegament proteic, ja que l'absència de *GRX6* o *GRX7* contraresta els defectes de creixement d'un mutant condicional amb baixos nivells d'expressió d'Ero1, de manera similar al que succeeix en presència de l'oxidant diamida, creant unes condicions oxidants al RE que compensen l'absència de l'oxidasa Ero1. De manera similar, l'anàlisi per pols i caça mostra que l'absència de *GRX6* o *GRX7* contraresta els defectes de secreció de la proteïna carboxipeptidasa Y (CPY) d'un mutant amb baixos nivells d'expressió d'Ero1. Finalment, es demostra que l'acumulació de Ca^{2+} en el mutant Δgrx6 és l'efecte primari de la mutació, doncs es produeix també en presència de diamida quan la secreció de CPY no està afectada tot i els baixos nivells d'Ero1.

RESUMEN

Grx6 i Grx7 son dos glutaredoxinas (GRXs) responsables de la reducción de los puentes disulfuro mixtos entre el glutatión y las proteínas, localizadas en los compartimentos de retículo endoplasmático (RE) y Golgi de la vía secretora. En estos compartimentos tiene lugar el plegamiento y modificación de proteínas que o bien son destinadas a otros compartimentos intracelulares como la vacuola o bien son secretadas al espacio extracelular. En el RE se forman los puentes disulfuro en las proteínas que entran en la vía, un hecho estrechamente ligado al ambiente redox de este compartimento. El potencial de oxidación relativamente alto del RE representa el equilibrio entre el proceso de oxidación que permite la formación de los puentes disulfuro proteicos, donde participan las proteínas esenciales Ero1 y Pdi1, y el proceso reductor que reorganiza estos puentes disulfuro y evita su exceso, donde interviene el glutatión y algunos homólogos de la proteína Pdi1. Además, la formación de puentes disulfuro es una fuente sustancial de estrés oxidativo. En este contexto, la actividad de las GRXs podría contribuir a regular la homeostasis redox, evitando daños oxidativos en los grupos tioles de las proteínas, e influenciando así la actividad de determinadas proteínas. La homeostasis del Ca^{2+} en la vía secretora es importante para el plegamiento, maduración y secreción de las proteínas, siendo su desregulación una de las principales causas del estrés de RE. En presencia de este estrés, la célula induce la respuesta UPR (Unfolded Protein Response) y una vía de señalización que promueve la entrada de Ca^{2+} en el citosol a través del sistema HACS de la membrana plasmática, que a su vez activa proteínas como la calcineurina. Ambas vías operan en paralelo para restablecer la homeostasis iónica y permitir la supervivencia de la célula frente a esta situación de estrés.

El doble mutante $\Delta grx6\Delta grx7$ presenta una inducción constitutiva de genes involucrados en la homeostasis del fosfato y en secreción y compartimentalización de proteínas. Por otra parte, el mutante $\Delta grx6$ muestra una inducción constitutiva de la vía Crz1-calcineurina, responsable entre otras de la expresión de genes involucrados en el metabolismo del fosfato, siendo la actividad Grx6 necesaria para proteger la célula de levadura en condiciones en que la vía de la calcineurina está inhibida. La ausencia de Grx6 afecta la homeostasis del Ca^{2+} , provocando un incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico. Esto se refleja en alteraciones en la sensibilidad del mutante $\Delta grx6$ a los quelantes de Ca^{2+} , siendo menos susceptible a EGTA, pero más sensible a BAPTA-AM que la cepa salvaje. Además, debido a la estrecha relación entre la homeostasis de varios iones en la célula, el mutante $\Delta grx6$ también acumula un exceso de fosfato,

potasio y sodio. Por otra parte, este estudio muestra una relación entre el estrés de RE y Grx6/Grx7, ya que en condiciones de estrés de RE, tanto la falta de *GRX6* como de *GRX7* provocan cambios en la inducción de la UPR. Se descarta, sin embargo, que estas GRXs participen directamente en la regulación redox de las dos principales proteínas encargadas del plegamiento proteico en el RE, Ero1 y Pdi1. No obstante, hay una implicación de estas GRXs en la maquinaria de plegamiento proteico, ya que la ausencia de *GRX6* o *GRX7* contrarresta los defectos de crecimiento de un mutante condicional con bajos niveles de expresión de Ero1, de manera similar a lo que sucede en presencia del oxidante diamida, creando unas condiciones en el RE que compensan la ausencia de la oxidasa Ero1. De manera similar, los análisis por pulso y caza muestran que la ausencia de *GRX6* o *GRX7* contrarresta los defectos de secreción de la proteína carboxipeptidasa Y (CPY) en un mutante con bajos niveles de expresión de Ero1. Finalmente, se demuestra que la acumulación de Ca^{2+} en el mutante Δgrx6 es el efecto primario de la mutación, puesto que se produce también en presencia del oxidante diamida cuando la secreción de CPY no está afectada a pesar de los bajos niveles de Ero1.

SUMMARY

Grx6 and Grx7 are two glutaredoxins (GRXs) responsible for the reduction of mixed disulphide bridges between glutathione and proteins, localized at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi compartments of the secretory pathway. In these compartments it occurs the folding and modification of proteins that either are destined to other intracellular compartments such as the vacuole or are secreted to the extracellular space. At the RE, disulphide bridges are formed in proteins entering into the secretory pathway, a fact that is closely related to the redox environment of this compartment. The relatively high oxidation potential in the RE represents a balance between the oxidation process that allows the formation of protein disulphide bonds, involving the essential proteins Ero1 and Pdi1, and the reductive process that reorganizes these disulphide bonds and prevents their excess, involving glutathione and some Pdi1 homologues. In addition, disulphide bond formation is a substantial source of oxidative stress. In this context, GRXs activity could help to regulate redox homeostasis, preventing oxidative damage of protein thiol groups, and thus influencing the activity of certain proteins. Ca^{2+} homeostasis in the secretory pathway is important for folding, maturation and secretion of proteins, being its deregulation one of the main causes of ER stress. In the presence of this stress, the cell induces the UPR response (Unfolded Protein Response) and a signalling pathway that promotes the entry of Ca^{2+} into the cytosol through the plasma membrane HACS system, which in turn activates proteins such as calcineurin. Both pathways operate in parallel to restore ionic homeostasis and allow cell survival in these stress situations.

The $\Delta\text{grx6}\Delta\text{grx7}$ double mutant exhibits a constitutive induction of genes involved in phosphate homeostasis and in protein secretion and compartmentalization. On the one hand, the Δgrx6 mutant shows a constitutive induction of the Crz1-calcineurin pathway, responsible among others for the expression of certain genes involved in phosphate metabolism, being Grx6 activity necessary to protect yeast cells under conditions in which the calcineurin pathway is inhibited. The absence of Grx6 affects Ca^{2+} homeostasis, causing an increase in cytosolic Ca^{2+} levels. This is reflected in changes in the sensitivity of the Δgrx6 mutant to Ca^{2+} chelators, being this mutant less susceptible to EGTA, but more sensitive to BAPTA-AM than the wild type strain. Furthermore, given the close relationship between homeostasis of various ions in the cell, the Δgrx6 mutant also accumulates an excess of phosphate, potassium and sodium. On the other hand, this study shows a link between ER stress and Grx6/Grx7, since under ER stress conditions, both the absence of *GRX6* or *GRX7* leads to

changes in the UPR induction. However, the direct involvement of these GRXs in the redox regulation of the two major proteins responsible for protein folding in the ER, Ero1 and Pdi1, is discarded. Nevertheless, there is an implication of these GRXs in the protein folding machinery, since the absence of *GRX6* or *GRX7* counteracts the growth defects of a mutant with *ERO1*-downregulated expression, similar to what happens in the presence of the oxidant diamide, creating oxidizing conditions that compensate for the absence of the ER oxidase Ero1. Similarly, pulse and chase analyses show that the absence of *GRX6* or *GRX7* counteracts carboxypeptidase Y (CPY) secretion defects of a mutant with *ERO1*-downregulated expression. Finally, the study shows that the accumulation of Ca^{2+} in the Δgrx6 mutant is the primary effect of the mutation, since it also occurs when the oxidant diamide rescues the defects in CPY secretion due to low Ero1 levels.

LLISTA D'ABREVIATURES

aa-dUTP	aminoalil-dUTP
ABC	"ATP-Binding Cassette" (Mòdul d'unió a ATP)
AcLi	Acetat de liti
ALPasa	"Alkaline phosphatase" (Fosfatasa alcalina)
AMS	Àcid 4-acetamido-4'-maleimidilstilbene-2,2'-disulfonic
APasa	"Acid phosphatase" (Fosfatasa àcida)
BAPTA-AM	Àcid bis(2-aminofenoxi)-età-N, N, N', N'-tetraacètic amb acetoximetil éster
β-ME	β-mercaptoetanol
CAX	"Ca ²⁺ /H ⁺ Exchanger" (Intercanviador de Ca ²⁺ /H ⁺)
CCE	"Capacitative Ca ²⁺ Entry" (Entrada de Ca ²⁺ capacitadora)
CCS	"Calcium Cell Survival" (Supervivència cel·lular per Ca ²⁺)
CDK	"Cyclin-Dependent Kinase" (Quinasa dependent de ciclins)
CDRE	"Calcineurin-Dependent Response Element" (Element de resposta dependent de la calcineurina)
CIF	"Ca ²⁺ Influx Factor" (Factor d'entrada de Ca ²⁺)
CKI	"Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors" (Inhibidor de quinasa dependent de ciclins)
CPY	Carboxipeptidasa Y
CRT	Calreticulina
DEAE-dextrà	Dietilaminoetil-dextrà
DIG	Digoxigenina
DTNB	Àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic)
DMG	Àcid 3,3-dimetilglutaric
DMSO	Dimetilsulfòxid
DO	Densitat òptica
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Àcid etilenglicol bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacètic
endoH	endoglicosidasa H
ERAD	"ER-Associated Degradation" (Degradació associada a RE)
FAD	Flavina Adenina Dinucleòtid
Fe/S	Centre ferro-sofre
FKBP	"FK506 Binding Protein" (Proteïna d'unió a FK506)
FOA	Àcid 5-fluoroorotic
GFP	"Green Fluorescent Protein" (Proteïna fluorescent verda)
GPX	Glutatió peroxidasa
GR	Glutatió reductasa
GRX	Glutaredoxina
GSH	Glutatió reduït
GSSG	Glutatió oxidat o diglutatió
GST	Glutatió transferasa
HA	Hemaglutinina
HACS	"High Affinity-Ca ²⁺ influx System" (Sistema d'entrada de Ca ²⁺ d'alta afinitat)
HEDS	β-Hidroxietil Disulfur
IAM	Iodoacetamida
ICP-OES	"Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectroscopy" (Espectroscòpia d'emissió òptica acoblada inductivament)
IP	Immunoprecipitació
IP₃R	Receptor de l'Inositol-1,4,5-trifosfat

MAP quinases	“Mitogen-Activated Protein Kinase” (Proteïna quinasa activada per mitògens)
MCU	“Mitochondrial Calcium Uptake Uniporter Pore” (Porus uniportador d’obtenció de calci mitocondrial)
MPT	“Mitochondrial Permeability Transition” (Trànsit de permeabilitat mitocondrial)
MSR	Reductasa de sulfòxid de metionina
MVB	“Multivesicular Bodies” (Cossos multivesiculars)
NF-AT	“Nuclear Factor of Activated T-cells” (Factor nuclear de cèl·lules T activades)
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactosidasa
PACE	“Proteasome-Associated Control Element” (Element de control associat al proteasoma)
PDI	“Protein Disulphide Isomerase” (Isomerasa de disulfurs proteics)
PEG	Polietilenglicol
PHGPX	Glutatió peroxidasa de fosfolípids
Pi	Fosfat inorgànic
PKA	Proteïna quinasa A
PMCA	“Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase” (ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmàtica)
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
PolIP	Polifosfat
PRX	Peroxiredoxina
PTFE	Politetrafluoroetilé
PVDF	Difluorur de polivinilidè
RE	Reticle endoplasmàtic
RE-MP	Reticle endoplasmàtic – Membrana plasmàtica
ROS	“Reactive Oxygen Species” (Espècie reactiva de l’oxigen)
RyR	Receptor de la rianodina
s.d.	Desviació estàndard
SDS-PAGE	SDS-poliacrilamida
SERCA	“Sarcoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase” (ATPasa de Ca ²⁺ del reticle sarcoplasmic)
SGD	“ <i>Saccharomyces</i> Genome Database” (Base de dades del genoma de <i>Saccharomyces</i>)
SLMit	Seqüència de localització mitocondrial
SOD	Superòxid dismutasa
SPCA	“Secretory Pathway Ca ²⁺ ATPase” (ATPasa de Ca ²⁺ de la via secretora)
ssDNA	“Single-Stranded DNA” (DNA de cadena simple)
STIM	“Stromal Interaction Molecule” (Molècula que interacciona amb l’estroma)
STRE	“Stress Response Element” (Element de resposta a estrès)
TCA	Àcid tricloroacètic
TM	Domini transmembrana
TRPC	“Transient Receptor Potential Channel” (Canal potencial receptor transitori)
TRX	Tioredoxina
TS	Tampó de solubilització
UPR	“Unfolded Protein Response” (Resposta a proteïnes mal plegades)
UPRE	“Unfolded Protein Response Element” (Element de la resposta a proteïnes mal plegades)
VGCC	“Voltage-Gated Ca ²⁺ Channel” (Canal de Ca ²⁺ depenent de voltatge)
YMPT	“Yeast Mitochondrial Permeability Transition” (Trànsit mitocondrial de permeabilitat de llevat)
YNB	“Yeast Nitrogen Base” (Base nitrogenada de llevat)

I. INTRODUCCIÓ	1
1. ESTRÈS OXIDATIU	3
1.1. DEFINICIÓ I ORIGEN	3
1.2. DANY SOBRE MOLÈCULES BIOLÒGIQUES	4
1.3. SISTEMES CEL·LULARS DE DEFENSA ANTIOXIDANT	6
1.3.1. Sistemes no enzimàtics	7
1.3.2. Sistemes enzimàtics	8
1.3.2.1. SUPERÒXID DISMUTASES (SODs)	8
1.3.2.2. CATALASES	8
1.3.2.3. PEROXIDASES	8
1.3.2.4. REDUCTASES DE SULFÒXID DE METIONINA	9
1.3.2.5. METALOTIONEÏNES	10
1.3.2.6. FLAVOHEMOPROTEÏNES	10
1.3.2.7. GLUTATIÓ TRANSFERASES	10
1.3.2.8. SISTEMA TIOREDOXINA	10
2. EL SISTEMA GLUTAREDOXINA	11
2.1 PROPIETATS GENERALS DE LES GRXS	11
2.2. CLASSIFICACIÓ	12
2.2.1. GRXs ditiòliques	13
2.2.2. GRXs monotiòliques	15
3. PLEGAMENT I SECRECIÓ DE PROTEÏNES EN EL LLEVAT	20
3.1. ASPECTES GENERALS	20
3.2. FUNCIONS IMPLICADES EN LA FORMACIÓ DE PONTS DISULFUR AL RE	21
3.2.1. Paper de PDI, Ero1 i el GSH	21
3.2.2. Interaccions entre Pdi1 i Ero1	24
3.2.3. Generació de ROS per la maquinària Pdi1-Ero1	26
3.3. CONTROL DE QUALITAT DEL PLEGAMENT DE PROTEÏNES	27
3.3.1. La via UPR	27
3.3.2. La maquinària ERAD	30

ÍNDEX

3.4. LA CARBOXIPEPTIDASA Y COM A MODEL PROTEIC PER L'ESTUDI DE LA SECRECIÓ EN EL LLEVAT.....	32
4. HOMEÒSTASI D'IONS.....	33
4.1. CALCI.....	34
4.1.1. Transportadors de Ca ²⁺ en el llevat.....	35
4.1.1.1. COMPARTIMENTS DE LA VIA SECRETORA.....	35
4.1.1.2. MITOCÒNDRIES.....	38
4.1.1.3. VACUOLES.....	39
4.1.1.4. MEMBRANA PLASMÀTICA.....	41
4.1.1.5. INTERRELACIÓ ENTRE ELS TRANSPORTADORS DELS DIFERENTS COMPARTIMENTS CEL·LULARS.....	43
4.1.1.6. PRINCIPALS DIFERÈNCIES AMB EL REGNE ANIMAL.....	44
4.1.2. Via de la calcineurina.....	47
4.2. FOSFAT.....	51
4.3. POTASSI I SODI.....	56
II. OBJECTIUS.....	59
III. MATERIALS I MÈTODES.....	63
1. MICROORGANISMES UTILITZATS.....	65
1.1. SOQUES DE <i>S. cerevisiae</i>	65
1.2. SOQUES D' <i>Escherichia coli</i>	68
2. PLÀSMIDS.....	68
3. MEDIS DE CULTIU.....	69
4. CULTIU DE MICROORGANISMES.....	71
5. ESTUDIS FENOTÍPICS DEL CREIXEMENT.....	71
5.1. ANÀLISI DEL CREIXEMENT MICROBIÀ EN MEDI SÒLID.....	71
5.2. ANÀLISI DEL CREIXEMENT MICROBIÀ EN MEDI LÍQUID.....	72
6. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	72
6.1. EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC DE <i>S. cerevisiae</i>	72
6.2. TÈCNiques DE DNA RECOMBINANT.....	73

6.2.1. Amplificació i clonació de gens.....	73
6.2.2. Substitució de promotors per recombinació homòloga.....	74
6.2.3. Marcatge amb l'epítop HA.....	74
6.2.4. Construcció de mutacions puntuals.....	75
6.2.5. Selecció de mutants resistents a àcid 5-fluoroorotíc.....	75
6.2.6. Purificació de plàsmids a partir de cultius d' <i>E. coli</i>	75
6.2.6.1. MÈTODE DE LA "MINIPREP".....	75
6.2.6.2. MÈTODE RÀPID DE LA "JETPREP".....	75
6.2.7. Transformació d' <i>E. coli</i>	76
6.2.8. Transformació de <i>S. cerevisiae</i>	76
6.3. CONSTRUCCIÓ DE MUTANTS NULS SIMPLES I MÚLTIPLES DE <i>S. cerevisiae</i>	77
6.4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA UTILITZANT MICROORDENAMENTS DE DNA.....	77
6.4.1. Obtenció de mostres.....	77
6.4.2. Extracció del RNA total.....	77
6.4.3. Síntesi del cDNA amb fluorocroms.....	78
6.4.4. Hibridació i rentats.....	78
6.4.5. Escaneig dels microordenaments.....	79
6.4.6. Extracció de dades.....	79
6.5. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER NORTHERN BLOT.....	79
6.5.1. Obtenció de mostres.....	79
6.5.2. Extracció de RNA total.....	80
6.5.3. Síntesi de sondes de DNA marcades amb Digoxigenina-dUTP.....	82
6.5.4. Electroforesi en un gel de formaldehid-agarosa.....	82
6.5.5. Transferència a la membrana de niló i fixació amb rajos UV.....	82
6.5.6. Hibridació i rentats.....	83
6.5.7. Detecció per quimioluminescència.....	83
6.5.8. Quantificació de la imatge obtinguda.....	84
6.6. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER WESTERN BLOT.....	84
6.6.1. Obtenció de mostres.....	84

ÍNDIX

6.6.2. Extracció de proteïna.....	84
6.6.3. Electroforesi en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	85
6.6.4. Transferència a una membrana de PVDF.....	86
6.6.5. Immunodetecció.....	86
6.6.6. Quantificació de la imatge obtinguda.....	87
7. AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE VACUOLES.....	87
8. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS QUÍMICS.....	88
8.1. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE CALCI INTRACEL·LULAR.....	88
8.2. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE FOSFAT INTRACEL·LULAR.....	89
8.3. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS D'ALTRES IONS INTRACEL·LULARS.....	90
9. DETERMINACIÓ DE L'ESTAT REDOX DE LES PROTEÏNES.....	90
10. MESURA DE L'ESTAT REDOX EN TEMPS REAL.....	92
11. ASSAIG DE L'ACTIVITAT β-GALACTOSIDASA.....	92
12. TRACTAMENT D'EXTRACTES PROTEICS AMB ENDOGLICOSIDASA H.....	93
13. MARCATGE RADIOACTIU DE PROTEÏNES (POLS I CAÇA).....	94
14. ANÀLISI ESTADÍSTIC MITJANÇANT EL PROGRAMA JMP11.....	95
IV. RESULTATS.....	97
1. EL MUTANT $\Delta grx6\Delta grx7$ MOSTRA UNA INDUCCIÓ CONSTITUTIVA DE GENS INVOLUCRATS EN L'HOMEÒSTASI DEL FOSFAT I EN SECRECIÓ I COMPARTIMENTALITZACIÓ DE PROTEÏNES.....	99
2. LA MANCA DE GRX6 NO CAUSA DEFECTES EN EL CREIXEMENT EN CONDICIONS DE BAIX FOSFAT.....	103
3. LA VIA DE LA CALCINEURINA ESTÀ CONSTITUTIVAMENT INDUÏDA EN EL MUTANT $\Delta grx6$.....	105
4. LES CÈL·LULES SENSE GRX6 TENEN ALTERATS ELS NIVELLS DE Ca^{2+} INTRACEL·LULAR.....	110
5. L'ABSÈNCIA DE GRX6 RESULTA EN UNA ALTERACIÓ DE LA SENSIBILITAT A QUELANTS DE Ca^{2+}.....	115

5.1. EFECTE DE L'EGTA SOBRE EL CREIXEMENT.....	115
5.2. EFECTE DEL BAPTA-AM SOBRE EL CREIXEMENT.....	119
6. L'ABSÈNCIA DE GRX6 PROVOCA SENSIBILITAT A ALTES CONCENTRACIONS DE Ca²⁺.....	121
7. EL MUTANT $\Delta grx6$ TAMBÉ ACUMULA ALTRES IONS ALS COMPARTIMENTS INTRACEL·LULARS.....	122
8. LA FALTA DE GRX6 O GRX7 PROVOCA CANVIS EN LA INDUCCIÓ DE LA UPR EN CONDICIONS D'ESTRÈS DE RE.....	126
9. Grx6 I/O Grx7 NO REGULEN L'ESTAT REDOX D'Ero1 I Pdi1.....	129
10. L'ABSÈNCIA DE GRX6 O GRX7 CONTRARESTA ELS DEFECTES DE CREIXEMENT D'UN MUTANT EN LA MAQUINÀRIA DE PLEGAMENT PROTEIC AL RE.....	131
11. L'ABSÈNCIA DE GRX6 O GRX7 CONTRARESTA ELS DEFECTES EN LA SECRECIÓ DE CARBOXIPEPTIDASA Y D'UN MUTANT SENSE FUNCIÓ Ero1.....	133
11.1. ANÀLISI PER WESTERN BLOT.....	133
11.2. ANÀLISI PER POLS I CAÇA.....	138
12. LA MANCA DE GRX6 o GRX7 CREA CONDICIONS OXIDANTS AL LUMEN DEL RE.....	142
13. L'ACUMULACIÓ DE Ca²⁺ EN EL MUTANT $\Delta grx6$ ÉS INDEPENDENT DE LA MAQUINÀRIA DE PLEGAMENT PROTEIC.....	143
V. DISCUSSIÓ.....	151
VI. CONCLUSIONS.....	175
VII. BIBLIOGRAFIA.....	181
VIII. ANNEX.....	207

I. INTRODUCCIÓ

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* és una espècie model per estudis bàsics de biologia cel·lular i molecular donat que ens permet realitzar amb relativa simplicitat des de mutacions en el seu genoma, així com combinacions d'aquestes, fins a anàlisis fenotípics i funcionals amb diversos tipus d'aproximacions experimentals. Conseqüentment, aquest organisme, amb els coneixements obtinguts sobre la seva biologia, ens ajuda a establir les bases per altres estudis en organismes multicel·lulars. Entre les línies d'investigació amb el llevat com a model experimental que han aportat més coneixements biològics bàsics destaquen els estudis dels mecanismes d'entrada de cations a través de la membrana plasmàtica i el transport intracel·lular, que contribueixen a mantenir l'homeòstasi d'aquests cations, la regulació d'aquesta homeòstasi quan es veu afectada per factors extracel·lulars o per mutacions, la relació entre la maquinària secretora de proteïnes i l'homeòstasi iònica, així com l'estudi de la resposta cel·lular davant l'estrès oxidatiu i la funció de les proteïnes involucrades en aquesta resposta, entre altres (Ariño et al., 2010; Cunningham, 2011; Forsburg, 2001; Herrero et al., 2008; Moradas-Ferreira et al., 1996). Tots aquests aspectes de la biologia de la cèl·lula seran tractats en la present memòria.

1. ESTRÈS OXIDATIU

1.1. DEFINICIÓ I ORIGEN

Els estudis sobre l'estrès oxidatiu són de vital importància en biomedicina donat que les alteracions genètiques o fisiològiques de les respostes front aquest estrès estan lligades a malalties cardiovasculars, aterosclerosis, porfiries, malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, l'esclerosi lateral amiotròfica o la malaltia de Huntington, així com l'atàxia de Friedrich, diabetis, malalties inflamatòries o càncer. A més a més, el mateix procés d'envelliment cel·lular està accelerat de manera directa en presència d'estrès oxidatiu (Ames et al., 1993; Enns, 2003).

L'oxigen és al mateix temps essencial i perillós per la vida aeròbica. La reducció incompleta de l'oxigen molecular (O_2) condueix a la formació de les espècies reactives de l'oxigen (ROS). Així, quan l' O_2 és reduït amb un electró, es produeix l'anió superòxid ($O_2^{\bullet-}$), un intermediari relativament estable. No obstant, aquest $O_2^{\bullet-}$ dona lloc, espontàniament o mitjançant una reacció catalitzada per l'enzim superòxid

INTRODUCCIÓ

dismutasa, a peròxid d'hidrogen (H_2O_2), que pot ser reduït completament a aigua per diverses peroxidases. En presència de metalls reduïts, la reducció parcial del H_2O_2 genera el radical hidroxil ($OH\bullet$), un dels oxidants més forts de la natura (Toledano et al., 2003).

In vivo, la principal font de ROS és l'escapament d'electrons de la cadena de transport electrònic mitocondrial durant la respiració produint així la reducció incompleta de l' O_2 (Nohl et al., 2003; Turrens, 2003), encara que també es generen ROS degut a l'acció d'enzims peroxisomals crucials pel metabolisme dels àcids grassos, D-aminoàcids i metanol, així com en el procés de plegament proteic al reticle endoplasmàtic (RE), entre altres (Purdue i Lazarow, 2001). Les ROS també es poden generar durant l'exposició de les cèl·lules a radiacions ionitzants, a molècules químiques o a diversos tipus d'ions metàl·lics (entre ells el Fe^{2+}), presents en el medi o a l'interior d'aquestes cèl·lules (Ames, 1983; Brennan i Schiestl, 1996).

1.2. DANY SOBRE MOLÈCULES BIOLÒGIQUES

L'estrès oxidatiu tal i com el coneixem apareix quan el balanç entre la formació de molècules oxidants i l'eliminació d'aquestes pels sistemes de defensa antioxidant dels organismes està afectat. En aquesta situació d'estrès, els radicals lliures causen nombrosos danys al reaccionar amb lípids, proteïnes, DNA, carbohidrats i components de la matriu extracel·lular. La **Figura 1** resumeix el dany que les ROS poden produir sobre les macromolècules cel·lulars. Un dany cel·lular molt extens pot conduir a la mort cel·lular (Imlay, 2003, 2008; Sies, 1993).

D'una banda, el DNA es veu afectat bàsicament per l'acció del radical $OH\bullet$, havent-se descrit diverses modificacions, com la ruptura o entrecreuament de les cadenes que el formen, degut a atacs sobre purines, pirimidines i sucres (Cadet et al., 2003; Rai et al., 2001). Aquestes modificacions, si no són reparades, poden conduir a l'acumulació de mutacions i a alteracions estructurals irreversibles de les dobles cadenes.

D'altra banda, les ROS ataquen als lípids donant lloc a la peroxidació lipídica. La reacció d'atac de les ROS extrau un àtom d'hidrogen de la molècula lipídica i deixa com a resultat un electró desaparellat en un àtom de carboni. Aquest últim tendeix a establitzar-se amb una reordenació dels electrons i una molècula d' O_2 generant un radical hidroperoxil, que a la vegada extrau un àtom d'hidrogen d'altres lípids, i així provoca una reacció en cadena. Aquesta reacció s'aturarà quan dos radicals

hidroperoxils reaccionin entre ells o en presència de molècules capaces d'eliminar-los (Halliwell i Gutteridge, 2007).

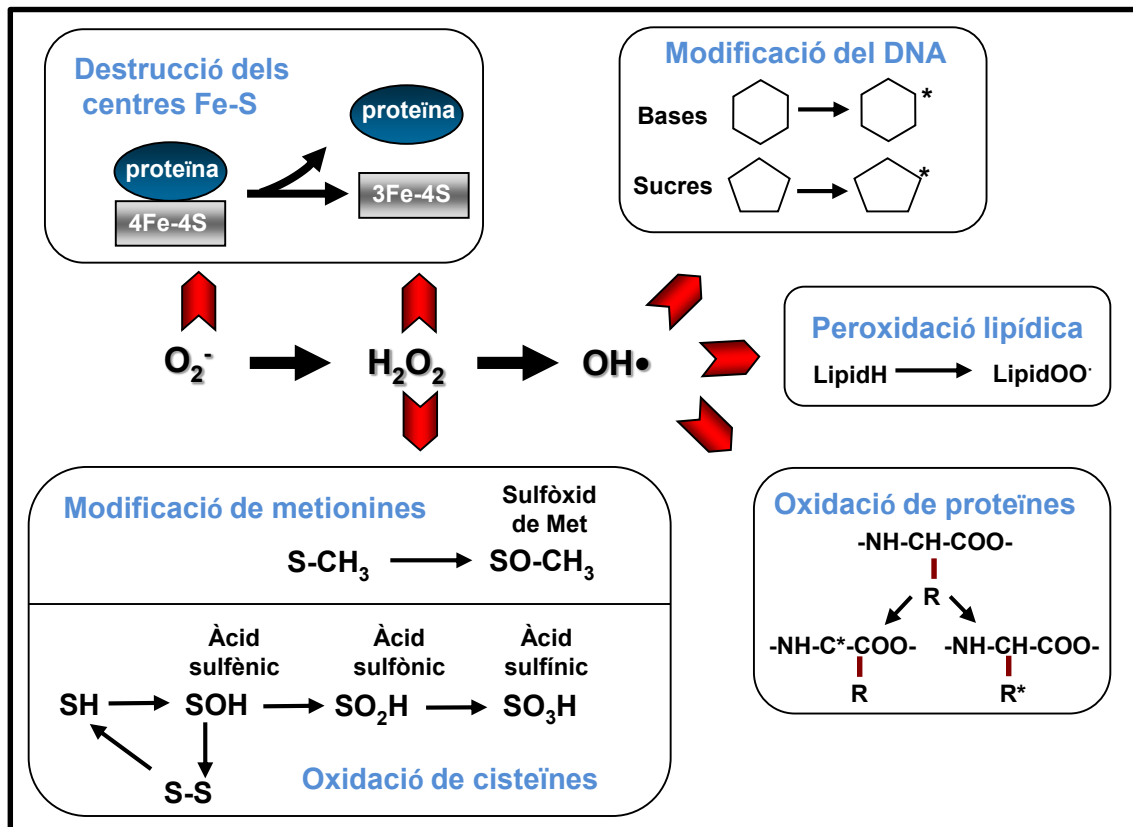


Figura 1. Esquema de l'acció de les ROS sobre les macromolècules biològiques (Herrero et al., 2008).

D'altra banda, l'exposició de les proteïnes cel·lulars a ROS condueix principalment a l'agregació o fragmentació d'aquestes. *In vivo*, el radical $\text{OH}\cdot$ actua sobre el carboni α i/o sobre la cadena lateral dels aminoàcids deixant un radical del carboni que provoca una reacció en cadena similar a la que sofreixen els lípids. El $\text{OH}\cdot$ també modifica per hidroxilació els residus de fenilalanina, tirosina, arginina, histidina i lisina, i actua sobre els centres ferro-sofre (Fe/S) de les proteïnes, inactivant-les (Flint et al., 1993).

El H_2O_2 produeix l'oxidació moderada dels grups sulfhidrils (P-SH) de les cisteïnes formant àcid sulfènic (P-SOH), el qual a la vegada pot oxidar una altra cisteïna i formar finalment un pont disulfur inter- o intramolecular, de manera reversible. Així, l'oxidació dels grups SH pot donar lloc a disulfurs mixtes entre aquests grups, en un procés que es denomina S-tiolació (P-S-S-P), i entre un grup SH i una molècula de baix pes

INTRODUCCIÓ

molecular amb grups tiols disponibles com el glutatió (GSH), en un procés denominat S-glutationilació (P-S-SG). Aquests processos de S-tiolació i S-glutationilació estan descrits com mecanismes de defensa davant l'estrès oxidatiu (Grant et al., 1999). També la reacció amb el nitrogen pot donar lloc a grups S-nitroso (P-S-NO), en un procés denominat S-nitrosilació, de manera reversible. Una major oxidació d'aquests grups SH condueix a la formació d'àcid sulfínic (P-SO₂H) i, de manera irreversible, d'àcid sulfònic (P-SO₃H). Aquest tipus de modificacions poden afectar irreversiblement la funció de proteïnes que contenen cisteïnes importants ja sigui estructuralment o biològicament, bé perquè contribueixen a l'estructura tridimensional de la molècula mitjançant ponts disulfur o interaccions proteïna-proteïna o bé per formar part del propi centre actiu (Michelet et al., 2006; Rouhier et al., 2008; Shelton et al., 2005). Aquests grups tiol també poden participar en la regulació dinàmica d'estructures proteiques en determinades condicions (Barford, 2004; Lill i Mühlenhoff, 2006; Paget i Buttner, 2003). A més a més, els grups tiol són crítics en la coordinació d'ions metàl·lics com el Zn²⁺, Cu²⁺, o Fe²⁺, com també són necessaris per la unió de centres Fe/S i cofactors hemo. Els centres Fe/S són per ells mateixos sensibles a l'acció d'oxidants. La desestructuració d'aquests centres afecta a la funció de les proteïnes que els contenen (Lill i Mühlenhoff, 2006; Lill, 2009; Stehling i Lill, 2013).

A més a més, diverses ROS poden actuar oxidant els residus de metionina per formar sulfòxid de metionina, o d'una manera més dràstica i irreversible, oxidant la metionina per formar un derivat sulfonat d'aquesta. Les reductases de sulfòxid de metionina (MSR) són els enzims encarregats de la reducció d'aquests residus a metionina de nou. Aquesta modificació reversible pot actuar regulant l'activitat de determinades proteïnes (Stadtman i Levine, 2003). Finalment, la carbonilació és una altra modificació irreversible que pot afectar a una proteïna com a conseqüència d'un atac oxidatiu directe catalitzat per metalls en residus de prolina, arginina, lisina i treonina (Dalle-Donne et al., 2006).

1.3. SISTEMES CEL·LULARS DE DEFENSA ANTIOXIDANT

Les cèl·lules de *S. cerevisiae* responen a l'estrès oxidatiu alterant el seu programa transcripcional i el seu proteoma (Gasch et al., 2000; Ikner i Shiozaki, 2005). Així, en presència d'estrès oxidatiu, uns mecanismes sensors detecten canvis en el balanç redox intracel·lular causat per les ROS i els tiols oxidats. Aquests mecanismes sensors poden incloure els propis residus de cisteïna, l'oxidoreducció dels quals ràpidament

transmet una senyal d'estrès activant proteïnes reguladores com els factors transcripcionals Yap1, Skn7 o Msn2/4. Aquests factors transcripcionals experimenten canvis conformacionals i/o de localització subcel·lular promovent així la inducció de l'expressió de gens que codifiquen per antioxidants i per proteïnes que reparen els danys oxidatius produïts en les macromolècules de la cèl·lula, entre ells en els grups tiol de les proteïnes (Gasch et al., 2000; Lee et al., 1999). Com a resultat, les cèl·lules desenvolupen estratègies enzimàtiques i no enzimàtiques per defensar-se davant les ROS. De totes maneres, aquestes estratègies no han de ser contemplades simplement com sistemes de detoxificació i reparació, sinó també com mecanismes que modulen les funcions biològiques, per exemple a través del control redox dels grups SH proteics (Herrero et al., 2008).

1.3.1. Sistemes no enzimàtics

Estan formats per molècules antioxidants petites, com el GSH (Meister, 1994), les fitoquelatines (Coblentz i Wolf, 1994), les poliamines (Balasundaram et al., 1991), l'ascorbat (Huh et al., 1998) o els antioxidants liposolubles com la vitamina E (Mukai et al., 1988). Aquestes molècules ajuden a eliminar els oxidants del medi al ser oxidades per les ROS. Donada la seva especial importància i la relació amb els estudis d'aquesta memòria, ens centrarem en el GSH.

El GSH és un tripèptid sintetitzat al citosol a partir dels aminoàcids glutamat, cisteïna i glicina, mitjançant els enzims γ -glutamyl-cisteïna sintetasa i glutatió sintetasa, codificats per *GSH1* i *GSH2* respectivament en *S. cerevisiae* (Meister, 1994). Pot oscil·lar entre la seva forma reduïda a nivell del grup tiol del residu de cisteïna (és aquesta la forma que abreviem pròpiament com GSH) o la seva forma oxidada de diglutatió (GSSG).

Les mesures de les condicions redox al lumen del RE mostren que el glutatió, el tampó redox més abundant, es troba en un rati [GSH]/[GSSG] de 3:1. En canvi, el rati [GSH]:[GSSG] al citosol és de 30:1 a 100:1, amb una concentració de fins a 10 mM de GSH (Bass et al., 2004; Grant et al., 1996).

La molècula oxidada GSSG es forma d'una manera més pronunciada sota condicions d'estrès oxidatiu, actuant per mantenir els potencials redox normals i protegir les cèl·lules dels efectes tòxics de les ROS mitjançant la S-glutationilació (Cuozzo i Kaiser, 1999; Olafsdottir i Reed, 1988). A més a més, el GSH també actua en processos de catàlisi, metabolisme i transport cel·lular (Meister, 1988). D'acord amb això, la producció global d'ambdues formes de glutatió es veu incrementada durant l'estrès

INTRODUCCIÓ

oxidatiu i l'exposició a metalls pesats (Dormer et al., 2002; Westwater et al., 2002). La glutatió reductasa (GR) és un enzim clau en la conversió de GSSG a GSH en ambdós procariotes i eucariotes (Asnis, 1995).

1.3.2. Sistemes enzimàtics

Centrant-nos en les estratègies enzimàtiques, un primer grup d'enzims actuen directament com a detoxificants generals de ROS mentre que un segon grup consisteix en enzims que actuen com a reguladors redox dels tiols proteics i contribueixen a mantenir el balanç redox a la cèl·lula. No es parlarà aquí dels enzims que reparen altres macromolècules cel·lulars, sinó que ens centrarem en les proteïnes.

1.3.2.1. SUPERÒXID DISMUTASES (SODs)

Les superòxid dismutases (SODs) tenen una funció antioxidant catalitzant el pas d' $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , i la seva activitat requereix ions metàl·lics actius (Culotta et al., 2006; Fridovich, 1995). Les cèl·lules de *S. cerevisiae* posseeixen dos SODs: la Sod1 citosòlica depenent de Cu^{2+} i Zn^{2+} i la Sod2 depenent de Mn^{2+} , que es localitza a la matriu mitocondrial (Culotta et al., 2006). Una fracció de Sod1, de totes maneres, també es troba a l'espai intermembranós de la mitocòndria (Sturtz et al., 2001).

1.3.2.2. CATALASES

S. cerevisiae té dos catalases, una codificada per *CTA1* (catalasa A), que es localitza als peroxisomes, i una altra codificada per *CTT1* (catalasa T), que és citosòlica. Aquests enzims redueixen el H_2O_2 a H_2O i O_2 utilitzant les propietats redox d'un grup hemo unit a la cadena polipeptídica (Izawa et al., 1996).

1.3.2.3. PEROXIDASES

El paper detoxificant de ROS de les SODs i les catalases depèn de les propietats redox del grup metàl·lic associat a l'enzim, però aquest no és el cas de les peroxidases, que redueixen els peròxids inorgànics i orgànics formant els corresponents alcohols utilitzant els tiols de les cisteïnes del centre actiu. L'activitat peroxidasa per tant requereix donants d'electrons pels tiols. Depenent d'això, es distingeixen dos classes de peroxidases: les glutatió peroxidases (GPXs), que utilitzen el GSH, i les peroxiredoxines (PRXs) o tioredoxina peroxidases, que utilitzen la tioredoxina (TRX, veure apartat 1.3.2.8 de la **Introducció**) com agent reductor (Brigelius-Flohé, 2006; Park et al., 2000).

De manera general, hi ha dos tipus de GPXs (Brigelius-Flohé, 2006). Les GPXs clàssiques són multimèriques, solubles i actuen sobre hidroperòxids inorgànics i orgànics. Les GPXs d'hidroperòxids de fosfolípids (PHGPXs) normalment són monomèriques i estan associades a membranes. Aquestes, a més a més de reduir hidroperòxids solubles, també redueixen hidroperòxids de lípids a les membranes (Avery i Avery, 2001). Per tant, les PHGPXs es consideren com els principals enzims que reparen la peroxidació lipídica en membranes, una de les principals conseqüències de l'estrès oxidatiu (Halliwell i Gutteridge, 2007). En el llevat hi ha tres GPXs [Gpx1, Gpx2 i Gpx3 (Inoue et al., 1999)], encara que l'anàlisi comparatiu de les seves seqüències realitzat posteriorment a la seva identificació va indicar que són de fet proteïnes del tipus PHGRXs. Encara que no s'han fet estudis específics sobre la seva localització en *S. cerevisiae*, l'anàlisi sistemàtic del proteoma del llevat indica una localització citosòlica de Gpx2 i Gpx3 (Huh et al., 2003). A més a més de les pròpies proteïnes GPX, hi ha altres enzims en *S. cerevisiae* que tenen activitat GPX sobre el H₂O₂ i/o sobre els hidroperòxids orgànics en assaigs *in vitro*, per exemple, Grx1 i Grx2 (Collinson et al., 2002) (veure apartat 2.2.1 de la **Introducció**).

Les PRXs redueixen peròxids i peroxinitrits, utilitzant les TRXs com a donants d'electrons, encara que en alguns casos altres reductors com el GSH poden ser importants per la seva activitat (Rhee et al., 2005; Wood et al., 2003). Les PRXs es divideixen en tres grups. Les PRXs típiques amb dues cisteïnes necessiten les dos cisteïnes conservades evolutivament, formant un pont disulfur intersubunitats durant el cicle catalític. Les PRXs atípiques amb dues cisteïnes tenen també un centre actiu amb dos cisteïnes, però només la cisteïna N-terminal està conservada, i el pont disulfur es forma entre ambdós residus durant la reducció del substrat. Per últim, les PRXs amb una cisteïna utilitzen l'única cisteïna activa. *S. cerevisiae* té 5 PRXs: Tsa1 (cTPxI), Tsa2 (cTPxII) i Ahp1 (cTPxIII), localitzades al citosol, i Dot5 (nTPx), localitzada al nucli, totes membres del grup PRXs amb una cisteïna, així com una Prx1 mitocondrial (mTPx) del grup PRXs clàssiques amb dues cisteïnes (Park et al., 2000).

1.3.2.4. REDUCTASES DE SULFÒXID DE METIONINA

L'oxidació dels residus de metionina per ROS condueix a la barreja dels epímers R i S. Aquest sistema de MSR consisteix en dos enzims, MsrA i MsrB, que reparen els epímers S i R respectivament, utilitzant la TRX com a donant d'electrons (Moskovitz, 2005).

INTRODUCCIÓ

1.3.2.5. METALOTIONEÏNES

Són proteïnes petites, riques en cisteïnes, amb propietats antioxidants i amb la capacitat d'unir un determinat nombre d'ions metàl·lics. En el llevat, les metal·lotioneïnes estan codificades pels gens *CUP1* i *CRS1* (Culotta et al., 1994).

1.3.2.6. FLAVOHEMOPROTEÏNES

Són proteïnes monomèriques formades per una sola cadena polipeptídica que conté un domini d'unió a hemo en l'extrem N-terminal i un domini d'unió a flavina en el C-terminal. En *S. cerevisiae*, els nivells intracel·lulars de la flavohemoproteïna Yhb1 incrementen quan hi ha problemes a la cadena de transport electrònic o en condicions d'estrès oxidatiu (Zhao et al., 1996).

1.3.2.7. GLUTATIÓ TRANSFERASES

Les glutatió transferases (GSTs) són enzims evolutivament conservats i importants en la detoxificació de nombrosos compostos xenobiòtics. Aquests enzims catalitzen la conjugació del GSH amb substrats electrofílics, produint compostos que, en general, són menys reactius i més solubles, facilitant així la seva eliminació de la cèl·lula (Hayes et al., 2005). *S. cerevisiae* presenta dos GSTs denominades clàssiques, Gtt1 i Gtt2 (Choi et al., 1998), la seqüència de les quals no permet adscriure-les a cap de les classes de GSTs d'eucariotes pluricel·lulars (Bourbouloux et al., 2000; Hayes et al., 2005), i tres GSTs de classe Omega, Gto1, Gto2 i Gto3 (Garcerá et al., 2006). Els membres de la classe Omega mostren una baixa activitat, o bé nul·la, pels substrats estàndards de les GST, mentre que són actives en l'assaig glutaredoxina (GRX) (Board et al., 2000; Whitbread et al., 2005). Per tant, existeixen varies similituds entre les GRXs i les GST de classe Omega, que indiquen que aquestes últimes podrien actuar també com a reguladores redox dels residus de cisteïna de les proteïnes (Herrero et al., 2008).

1.3.2.8. SISTEMA TIOREDOXINA

El sistema tioredoxina està format per les TRXs i les TRX reductases. Les TRXs són tiol oxidoreductases de mida petita que contenen dos residus de cisteïna conservats al centre actiu (CGPC) i que participen en la reducció de tiols proteïcs. Les TRX reductases utilitzen NADPH per reduir les TRXs oxidades a nivell d'aquests dos residus del centre actiu fins a la forma tiol activa (Holmgren, 1989). Per tant, les TRXs participen en la reducció d'enzims que formen un pont disulfur durant el seu cicle

catalític, com la ribonucleòtid reductasa, entre altres. A un nivell més general, actuen modulant l'estat redox dels grups SH proteics de la cèl·lula i conseqüentment el plegament proteic (Rietsch i Beckwith, 1998). Les TRXs tenen un domini TRX compartit amb les GRXs i altres famílies proteiques com les proteïnes disulfur isomerasas, les GPXs i les GSTs. Aquest domini té aproximadament 11-13 kDa, està molt conservat al llarg de l'evolució i està format per quatre o cinc cadenes β centrals envoltades per tres o més hèlixs α (Martin, 1995). *S. cerevisiae* conté dos TRXs citosòliques (Trx1, Trx2) i una mitocondrial (Trx3) (Gan, 1991; Pedrajas et al., 1999). En paral·lel, en les cèl·lules de *S. cerevisiae* hi ha una TRX reductasa citosòlica (Trr1) i una mitocondrial (Trr2), per tant definint dos sistemes separats citosòlic i mitocondrial (Pedrajas et al., 1999).

2. EL SISTEMA GLUTAREDOXINA

Aquest sistema està format per les GRXs i les GRs (Fernandes i Holmgren, 2004). Encara que també és un sistema enzimàtic com els descrits a l'apartat 1.3.2 de la **Introducció**, se li dedica un apartat especial per la seva importància en relació als estudis descrits en aquesta memòria.

2.1 PROPIETATS GENERALS DE LES GRXS

Les GRXs són tiol oxidoreductases responsables de la reducció dels disulfurs proteics o disulfurs mixtes entre el GSH i les proteïnes. La reacció també involucra residus de cisteïna del centre actiu de l'enzim, encara que, a diferència de les TRXs, el GSH actua com a donant directe d'electrons (Herrero et al., 2010; Lillig et al., 2008). Les GRXs presenten especificitat pel GSH, ja que tenen uns aminoàcids moderadament conservats que interaccionen amb el grup carboxil de la molècula de GSH (Bushweller et al., 1994; Yang et al., 1998). Les diferències estructurals més importants entre les isoformes de GRX i de TRX, tot i compartir el mateix tipus de domini, es troben en el centre actiu i en l'extrem N-terminal, degut a una cadena β addicional en les TRXs (Lillig et al., 2008). Les GRs utilitzen els electrons del NADPH per regenerar GSH a partir del GSSG format durant la reacció de les GRXs (Fernandes i Holmgren, 2004) **[Figura 2]**. *S. cerevisiae* conté dos isoformes de la GR anomenada Glr1, una

INTRODUCCIÓ

localitzada al citosol i l'altra a la mitocòndria, degut a uns inicis de traducció alternatius (Outten i Culotta, 2004).

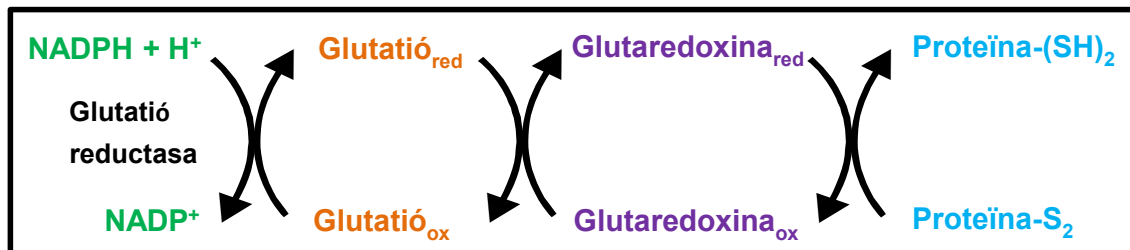


Figura 2. Components del sistema GRX reductor dels grups ditiòlics de les proteïnes (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007).

Considerant que l'estrès oxidatiu causa l'oxidació dels grups SH de les proteïnes, les GRXs tindrien també un paper en la reversió d'aquest dany oxidatiu. Més específicament, les GRXs tenen varies funcions, per exemple, actuar com a donants d'electrons (Holmgren, 1976, 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-Manzaneque 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 immune, la hipertròfia cardíaca, la hipòxia-reoxigenació, la neurodegeneració i el desenvolupament del càncer, així com en el tractament d'aquests (Lillig et al., 2008).

2.2. CLASSIFICACIÓ

Durant la última dècada s'ha evidenciat que les GRXs constitueixen una família proteica heterogènia, els membres de la qual mostren una gran diversitat estructural i funcional (Alves et al., 2009; Couturier et al., 2009a; Lillig et al., 2008). Les GRXs s'han subdividit tradicionalment en monotiòliques i ditiòliques, depenent del número de residus de cisteïna al motiu CxxC/S del centre actiu. D'una banda, 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). L'activitat de les GRXs ditiòliques es mesura normalment a través de la seva habilitat per desglutacionar els disulfurs mixtes formats entre el GSH i un motiu mercaptoetanol del substrat β -hidroxietil disulfur (HEDS) (Holmgren i Aslund, 1995). D'altra banda, les GRXs monotíoliques tenen el motiu CGFS, o altres variacions com CSYS i CPYS (Couturier et al., 2009b; Deponte et al., 2005; Mesecke et al., 2008a). La majoria de les GRXs monotíoliques (més concretament les del tipus CGFS) no presenten activitat a l'assaig HEDS, no obstant les dues localitzades a la via secretora de *S. cerevisiae* (amb centre actiu CS/PYS) sí que tenen tal activitat (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007; Mesecke et al., 2008a).

El nombre de GRXs presents a les cèl·lules varia segons l'espècie. Per exemple, el bacteri *Escherichia coli* té 4 GRXs, dos GRXs ditiòliques clàssiques (Grx1 i Grx3), una GRXs ditiòlica inusual (Grx2) i una GRXs monotíolica (Grx4) (Fernandes i Holmgren, 2004; Vlamis-Gardikas i Holmgren, 2002). Les cèl·lules humanes també tenen 4 GRXs, dos ditiòliques (Grx1 i Grx2) i dos monotíoliques (Grx3 i Grx5) (Johansson et al., 2004; Lillig et al., 2005; Lönn et al., 2008; Su et al., 2005; Witte et al., 2000). Altrament, el llevat *S. cerevisiae* posseeix tres GRXs ditiòliques (Grx1/2/8) i cinc GRXs monotíoliques (Grx3-7) (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007; Lillig et al., 2008; Mesecke et al., 2008a; Mesecke et al., 2008b).

2.2.1. GRXs ditiòliques

Centrant-nos en el llevat, d'una banda, els enzims ditiòlics Grx1 i Grx2 tenen un motiu CPYC al centre actiu i comparteixen un 64% d'identitat de seqüència (Luikenhuis et al., 1998) [**Figura 3A i B**]. 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 (β 1, β 3 i β 4) i la cadena β 2 paral·lela a l'adjacent β 1, embolcallades per cinc hèlixs α [**Figura 4**] (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 mitocòndria degut a 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

INTRODUCCIÓ

vegada, aquesta isoforma mitocondrial es pot processar per una peptidasa mitocondrial resultant en una forma soluble de la matriu mitocondrial, o quedar sense processar com a forma associada a la membrana mitocondrial externa.

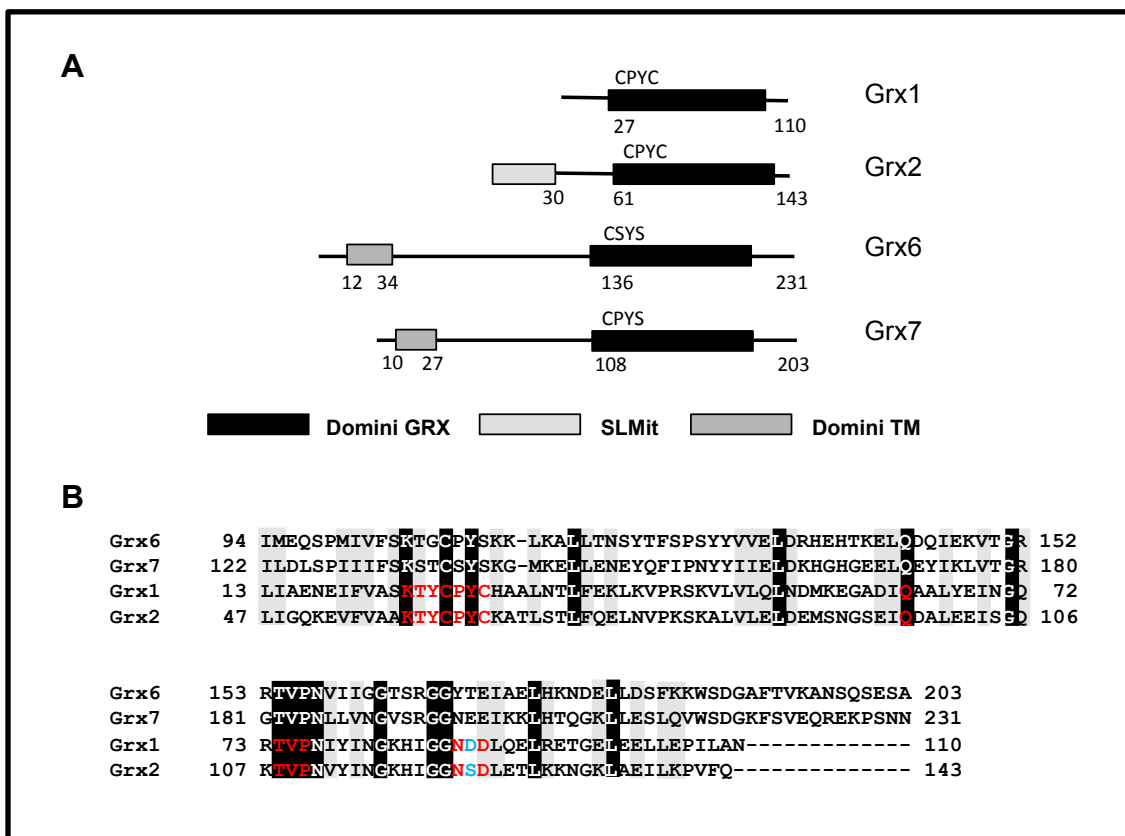


Figura 3. A) Comparació de l'estructura en forma de dominis de quatre GRXs de *S. cerevisiae*, dos ditiòliques (Grx1 i Grx2) i dos monitiòliques (Grx6 i Grx7). La posició de la cisteïna més N-terminal del centre actiu està indicada en cada cas, com també el lloc de tall de la seqüència de localització mitocondrial (SLMit) i els residus limitants del domini transmembrana (TM) (Herrero et al., 2010). **B)** Alineament múltiple de les seqüències de les GRXs ditiòliques Grx1 i Grx2 i les monitiòliques Grx6 i Grx7. Comparant Grx1 i Grx2, els residus marcats amb color vermell estan implicats en la unió amb el GSH, entre els quals el color blau indica l'aminoàcid diferencial entre ambdues GRXs. Comparant les molècules ditiòliques amb les monitiòliques, els residus amb ombra negra estan altament conservats, els residus amb ombra gris corresponen a la mateixa família d'aminoàcids i els residus no ombrejats són els diferencials (Izquierdo et al., 2008).

A més a més, les tres GRXs ditiòliques tenen activitat GSH:disulfur oxidoreductasa, mesurada amb l'assaig HEDS (Eckers et al., 2009; Luikenhuis et al., 1998). D'aquesta manera, aquestes GRXs actuen reduint els grups SH de cisteïnes essencials pel cicle 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 part del mecanisme protector de les proteïnes vers l'oxidació irreversible dels grups tiols, o per regular la funció proteica (Biswas et al., 2006; Ghezzi, 2005). L'alineament de seqüència de Grx1 i Grx2 demostra que els residus involucrats en la unió de GSH estan altament conservats, excepte per un canvi d'un únic residu, Asp en Grx1 i Ser en Grx2, resultant en diferències en l'activitat reductasa de glutatió-disulfurs d'ambdós GRXs (Li et al., 2010) [Figura 3B]. Aquestes dos GRXs també tenen activitat GPX (Collinson et al., 2002) i GST (Collinson i Grant, 2003). Tot i que no es coneixen els seus substrats exactes ni les vies metabòliques en que participen, aquestes GRXs protegeixen les cèl·lules de llevat d'agents oxidants i altres electròfils (Eckers et al., 2009; Luikenhuis et al., 1998; Pedrajas et al., 2002).

2.2.2. GRXs monotioliques

Per un altre costat, la GRX monotiolica Grx5, amb el motiu CGFS al centre actiu, és una proteïna que es localitza a la matriu de la mitocòndria (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). Com altres GRXs monotioliques, Grx5 no mostra activitat a l'assaig HEDS (Tamarit et al., 2003). També, l'absència de Grx5 resulta en una acumulació d'ions de ferro i una disminució de l'activitat dels enzims que contenen centres Fe/S (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007; Rodríguez-Manzaneque et al., 2002), mostrant així que participa en el metabolisme del ferro. 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 deguda a tenir unes condicions basals oxidants (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007). Recentment, s'ha demostrat que Grx5 actua com a component de la maquinària d'acoblament de centres Fe/S (sistema ISC), unint la reacció de síntesi de centres Fe/S en Isu1 amb la transferència d'aquests centres Fe/S a les apoproteïnes (Uzarska et al., 2013). Per tal de que Grx5 porti a terme la seva funció, és necessari que tant Isu1 com Grx5 interaccionin amb la xaperona Ssq1. Així, es produeix la transferència dels centres Fe/S de Isu1 a la pròpia Grx5, i aquesta i els seus centres Fe/S permetran la maduració de totes les proteïnes Fe/S cel·lulars, independentment del tipus d'unió al centre Fe/S i de la localització subcel·lular (Uzarska et al., 2013).

INTRODUCCIÓ

Les GRXs monotiòliques Grx3 i Grx4, també amb el motiu CGFS al centre actiu, es localitzen al citosol i al nucli, en aquest segon degut a 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; Mühlenhoff et al., 2010). Aquestes GRXs tampoc mostren activitat a l'assaig HEDS. Grx3 i Grx4 també estan involucrades en el metabolisme del ferro (Mühlenhoff et al., 2010; Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006), ja que ambdós interaccionen amb el factor de transcripció Aft1, el qual respon als nivells de ferro. En condicions de baixa disponibilitat d'ions ferro intracel·lulars, Aft1 es localitza al nucli i activa la transcripció de gens d'un reguló implicats en l'assimilació de ferro. La inhibició de la síntesi de centres Fe/S mitocondrials també causa l'activació del reguló Aft1 (Bellí et al., 2004; Foury i Talibi, 2001; Hausmann et al., 2008), de manera que algunes proteïnes Fe/S mitocondrials podrien actuar com a sensors de l'estat de ferro intracel·lular transferint la senyal corresponent a Aft1 via Grx3/4 (Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006; Rutherford et al., 2005). En absència de Grx3 i Grx4, el factor de transcripció Aft1 està localitzat constitutivament al nucli, desregulant així l'homeòstasi del ferro. En canvi, en presència de Grx3 i Grx4, Aft1 canvia de localització del nucli cap al citosol, sent aquesta redistribució deguda al domini GRX d'aquestes proteïnes (Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006). A part de la interacció amb Aft1, els centres Fe/S que contenen aquestes GRXs *in vivo* tenen un paper important com a sensors de ferro i en el lliurament d'aquest al citosol (Mühlenhoff et al., 2010). Així doncs, les GRXs monotiòliques Grx3 i Grx4 difereixen significativament de la Grx5 mitocondrial, tot i que tenen funcions reguladores interrelacionades respecte a l'expressió genètica depenent de ferro al nucli i que influencien la disponibilitat intracel·lular d'ions de ferro per processos biosintètics (Deponte, 2013).

Contràriament a les Grx3-5, les GRXs monotiòliques Grx6 i Grx7 tenen una activitat oxidoreductasa significativa en l'assaig HEDS tant *in vitro* com *in vivo*. De fet, Grx7 presenta més activitat que Grx6 en aquest assaig (Izquierdo et al., 2008; Luo et al., 2010; Mesecke et al., 2008a; Mesecke et al., 2008b), però considerablement menys que l'activitat de les ditiòliques Grx1 i Grx2 (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008a). A més a més, Grx6 també presenta activitat GST, fins i tot més alta que la de Grx1 i Grx2 (Luo et al., 2010). De fet, l'estructura cristal·lina del domini GRX C-terminal de Grx6 mostra l'estructura GRX típica amb un plegament tipus TRX, i només es diferencia de les GRXs ditiòliques Grx1 i Grx2 per la presència de dos cadenes β antiparal·leles ($\beta 2$ i $\beta 6$) al costat oposat al lloc d'unió del GSH (Luo et al., 2010)

[Figura 4]. Per tant, tant l'estructura primària com l'activitat enzimàtica d'aquestes indica que Grx6 i Grx7 són més semblants a les GRXs ditiòliques que a les GRXs monotioliques [Figura 3A i B]. Grx6 i Grx7 consten de 231 i 203 aminoàcids, amb els centres actius CSYS i CPYS, respectivament, i mostren un 45% d'identitat de seqüència entre elles (Mesecke et al., 2008b).

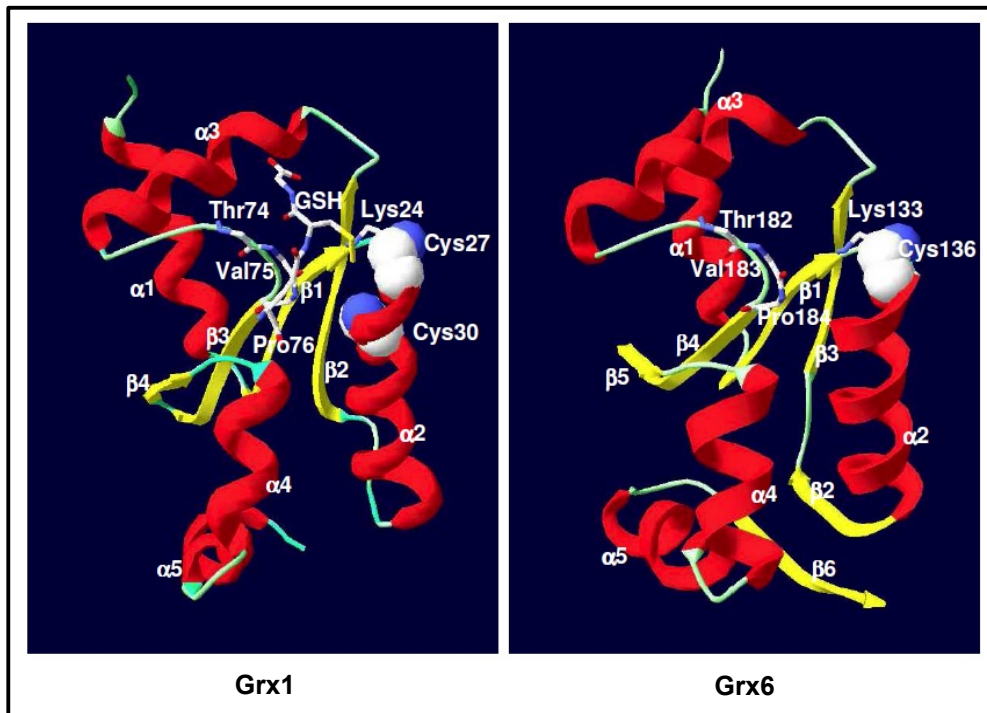


Figura 4. Estructura tridimensional de la proteïna Grx1 glutationilada (codi PDB 3C1S) i de la Grx6 monomèrica (3L4N) de *S. cerevisiae*, representades utilitzant el programa “Swiss-PdbViewer 4.0.1” (Herrero et al., 2010). Els residus de cisteïna del centre actiu, així com altres residus importants per la interacció amb el GSH, estan indicats. Els dominis de l'estructura secundària també estan marcats. Veure Luo et al. (2010) i Yu et al. (2008) per més detalls de l'estructura de Grx1 i Grx6 respectivament. En el cas de Grx6 només s'ha determinat l'estructura del domini GRX.

Aquestes GRXs estan localitzades a la via secretora, amb una distribució de Grx6 entre les vesícules del RE i l'aparell de Golgi, mentre que Grx7 es troba majoritàriament sinó completament 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., 2008b). Tot i que es coneixen homòlegs d'aquestes GRXs en fongs, plantes i *Caenorhabditis elegans*, aquest domini TM (i per tant la localització subcel·lular de les molècules) sembla característic dels fongs (Izquierdo et al., 2008). Cal destacar també que Grx6,

INTRODUCCIÓ

però no Grx7, està modificada post-traduccionalment per l'addició d'O-oligosacàrids als compartiments de la via secretora. La seva distribució asimètrica a la cèl·lula explica aquestes diferències en el patró d'O-glicosilació, el qual és més extens en Grx6. El que no es coneix és si hi ha molècules de Grx6 que s'estan movent contínuament del RE a l'aparell de Golgi i viceversa, o bé hi ha subpoblacions permanents en ambdós compartiments (Izquierdo et al., 2008) [Figura 5].

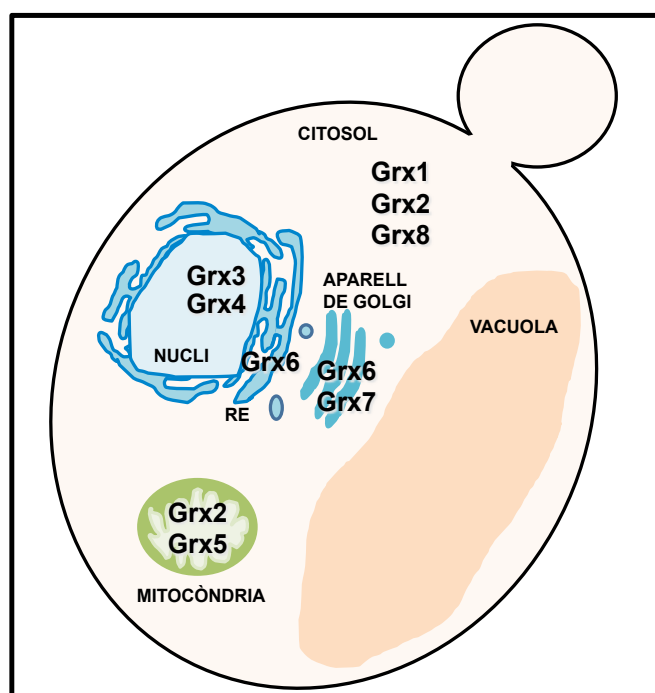


Figura 5. Localització cel·lular de les GRXs descrites en *S. cerevisiae*.

A més a més, l'anàlisi de les seqüències dels seus respectius promotors (Izquierdo et al., 2008) indica que el promotor de *GRX6* té un element de resposta a la via de la calcineurina (veure apartat 4.1.2 de la **Introducció**). En determinades condicions d'estrès, com l'exposició a alts nivells de Ca^{2+} o Na^+ , o bé un xoc tèrmic, la via de la calcineurina permet que el factor de transcripció Crz1 reconegui aquests elements en els promotors de determinats gens per induir-ne l'expressió (Yoshimoto et al., 2002). En canvi, el promotor de *GRX7* posseeix un element de resposta a estrès (STRE), el qual es reconegut pel factor de transcripció Msn2/Msn4, que regula una resposta general a un estrès ambiental, com ara l'exposició a un xoc tèrmic, osmòtic o oxidatiu, entre altres (Estruch, 2000). Així doncs, els factors de transcripció Crz1 (per *GRX6*) i

Msn2/Msn4 (per GRX7) podrien regular directament l'expressió d'aquestes GRXs a nivell transcripcional en determinades condicions d'estrès (Izquierdo et al., 2008).

Grx6 i Grx7 són les primeres GRXs monotioliques en les quals s'ha demostrat la formació de dímers units no-covalentment (Mesecke et al., 2008a). No obstant, aquestes tenen diferents propietats d'oligomerització. De fet, Grx6, però no Grx7, també pot formar dímers via un enllaç disulfur intermolecular. A més a més, només Grx6 pot formar tetràmers amb l'ajut d'un centre Fe/S. Així, els dímers associats no-covalentment es poden oxidar resultant en un pont disulfur intermolecular, o poden unir un centre Fe/S provocant la unió de dímers. En canvi, la conversió del tetràmer de Grx6 al dímer estable es produeix amb la pèrdua del centre Fe/S. Aquesta pèrdua pot ser deguda a una oxidació, donat que el GSH (però no el GSSG) estabilitza el centre Fe/S, com també ho fa l'àcid ascòrbic i l'agent reductor ditiotreitòl (DTT), encara que aquests últims més dèbilment (Luo et al., 2010; Mesecke et al., 2008a). Així doncs, Grx6, a diferència de Grx7, uneix un centre Fe/S estabilitzat per GSH *in vitro*, resultant en la pèrdua de l'activitat oxidoreductasa (Mesecke et al., 2008a). També s'ha descrit que Grx6 uneix ions de ferro *in vivo*, però amb baixa afinitat (Izquierdo et al., 2008), fet que fa especular un possible paper de Grx6 en el metabolisme del ferro. El fet que Grx6 pugui unir centres Fe/S, mentre Grx7 no, és degut a les diferències en el centre actiu que existeixen entre elles, en concret al residu de Pro del centre actiu de Grx7 que dificultaria la interacció amb el centre Fe/S (Berndt et al., 2007; Mesecke et al., 2008a; Rouhier et al., 2007).

Varis experiments genètics suggereixen que ambdues proteïnes contribueixen *in vivo* a l'homeòstasi redox en l'ambient oxidant de la via secretora (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008b). De fet, s'han descrit possibles relacions funcionals entre aquestes GRXs i l'estrès d'aquests compartiments. Per exemple, treballs previs del nostre grup mostren que l'estrès de RE causat per l'agent tunicamicina (un inhibidor de la N-glicosilació) causa una inducció de l'expressió d'aquestes GRXs (Izquierdo et al., 2008).

Per tant, Grx6 i Grx7 són GRXs monotioliques enzimàticament actives amb funcions hipotètiques a la via secretora, de les quals en principi encara no es coneixen ni els substrats fisiològics ni les seves possibles interaccions amb altres proteïnes.

3. PLEGAMENT I SECRECIÓ DE PROTEÏNES EN EL LLEVAT

3.1. ASPECTES GENERALS

El citosol i el RE són els principals compartiments on té lloc el plegament de proteïnes en les cèl·lules eucariotes (Ellgaard i Helenius, 2003), sent el RE el primer orgànel de la via secretora de proteïnes, ja sigui destinades a compartiments membranosos intracel·lulars com la vacuola o bé secretades cap a l'espai extracel·lular. Les proteïnes es sintetitzen als ribosomes. Seguidament, es transloquen al RE tant co-traduccionament, de manera associada a ribosomes, com és el cas de la proteïna invertasa, o post-traduccionament, no associada a ribosomes, com és el cas de la carboxipeptidasa Y, tot depenent de la hidrofobicitat i la composició dels aminoàcids del pèptid senyal ja traduït (Zimmermann et al., 2011). *S. cerevisiae* té dos translocons diferents, Sec61 i Ssh1. Mentre que el complex Sec61 accepta un gran espectre de seqüències senyal, les interaccions amb el complex Ssh1 estan més limitades a les seqüències senyals més hidrofòbiques (Wittke et al., 2002). Aquest procés de translocació involucra una gran quantitat de xaperones, que afavoreixen el plegament i la maduració d'aquestes proteïnes (Delic et al., 2013).

Un cop al lumen del RE es formen els ponts disulfur en les proteïnes que s'estan plegant. Potser la característica més distintiva del plegament proteic al RE és l'abundància de ponts disulfur en les proteïnes que entren a la via secretora, en comparació amb la gairebé absència d'aquests en les proteïnes citosòliques. Aquesta formació de ponts disulfur inter- i intramoleculars, lligada a l'ambient oxidant del lumen del RE, és un pas crucial pel plegament i la funció de moltes d'aquestes proteïnes amb destinació cap a l'exterior cel·lular, ja que actuen estabilitzant dominis proteics i connectant subunitats de proteïnes oligomèriques (Ellgaard, 2004). Sota condicions altament reductores, com les del citosol, la majoria dels residus de cisteïna es mantenen en estat reduït, ja que la formació de disulfurs és cinètica i termodinàmicament desfavorable (Ellgaard, 2004; Østergaard et al., 2004). No obstant, les condicions altament oxidants al RE resulten en mal plegaments degut a la formació de ponts disulfur inter- i intramoleculars en excés i incorrectes (Marquardt et al., 1993). Per tant, ha d'existir un sistema oxidoreductasa que reguli i mantingui el RE a un potencial d'oxidació adequat (relativament alt respecte al citosol) pel que fa a assegurar el correcte plegament proteic.

També en el RE s'inicia la N-glicosilació, amb la transferència d'un complex oligosacàrid sobre un residu Asn, i l'O-glicosilació, amb la transferència d'una manosa sobre un residu Ser/Thr de les proteïnes. Els passos inicials de la glicosilació al RE estan altament conservats, però l'eliminació i incorporació de diferents sucres varia significativament entre espècies (Goto, 2007). A més a més, en aquest compartiment s'exerceix un control de qualitat sobre les proteïnes, que impedeix que cap proteïna l'abandoni si no ha assolit el plegament adequat per aquest nivell.

Seguidament, les proteïnes passen a l'aparell de Golgi, que està dividit en tres subcompartiments, cis-, mitjà- i trans-Golgi, on es continua la maduració, mitjançant l'addició de més residus de carbohidrats a les cadenes polisacàridiques, i conseqüentment l'empaquetament final d'aquestes (Delic et al., 2013). Finalment, les proteïnes madures es dirigeixen a la seva destinació final a la cèl·lula a través del transport vesicular. Es pot diferenciar varis tipus de transport vesicular: el transport anterògrad (del RE al cis-Golgi) mitjançant vesícules COP-II, el transport retrògrad (des del cis-Golgi al RE o del trans- al cis-Golgi) mitjançant vesícules COP-I i l'exocitosi de les vesícules secretores (des del trans-Golgi a la vacuola o membrana plasmàtica) a través de vesícules de clatrina (Delic et al., 2013; Myers i Payne, 2013). Tot aquest procés de transport/secreció de les proteïnes, que va ser estudiat en detall per primera vegada en el llevat (Schekman, 1985; Stevens et al., 1982), està àmpliament conservat en totes les cèl·lules eucariotes.

3.2. FUNCIONS IMPLICADES EN LA FORMACIÓ DE PONTS DISULFUR AL RE

3.2.1. Paper de PDI, Ero1 i el GSH

L'eficient formació de ponts disulfur requereix d'un agent oxidant, com l'oxidoreductina 1 del RE (Ero1), i un catalitzador, com la isomerasa de disulfurs proteics (PDI), per portar a terme la transferència d'electrons des dels substrats proteics a l'O₂ (Sevier i Kaiser, 2002; Tu i Weissman, 2004; Wilkinson i Gilbert, 2004), i oxidar així la majoria, sinó tots, els residus de cisteïna dels polipèptids durant o després de la seva translocació al lumen del RE [Figura 6]. La funció d'Ero1 i PDI està evolutivament conservada, i molts dels estudis a nivell molecular sobre la seva funció han estat realitzats en *S. cerevisiae*.

Cal destacar també el paper tant del GSH com del GSSG en el RE, ja que actuen tamponant l'ambient redox del RE en front a canvis transitoris (Frandsen i Kaiser, 1998). A

INTRODUCCIÓ

part del seu paper com a tampó redox, el GSH també ajuda en la formació de ponts disulfur (Chakravarthi et al., 2006). Tu et al. (2000) van observar, en experiments *in vitro*, una producció gradual de GSSG resultant de la reducció dels ponts disulfur de les proteïnes en procés de plegament. D'acord amb això, el GSH participa en la formació de ponts disulfur proteïcs actuant com a reductor net en el RE, tant mantenint les oxidoreductases del RE en un estat reduït com mitjançant la reducció directa de ponts disulfur de proteïnes en fase de plegament (Chakravarthi et al., 2006). De la mateixa manera, Molteni et al. (2004) van demostrar que el GSH actua com a principal antagonista d'Ero1. De fet, en cèl·lules de mamífer, la sobreexpressió d'*ERO1* provoca un augment significatiu en el contingut intracel·lular de GSH, indicant la necessitat de mantenir unes condicions redox òptimes per la cèl·lula (Molteni et al., 2004). Per tant, el rati GSH:GSSG del RE representa l'equilibri entre les conseqüències de l'oxidació, on actua Ero1, i els processos de reducció, on s'utilitza el GSH (Tu i Weissman, 2004).

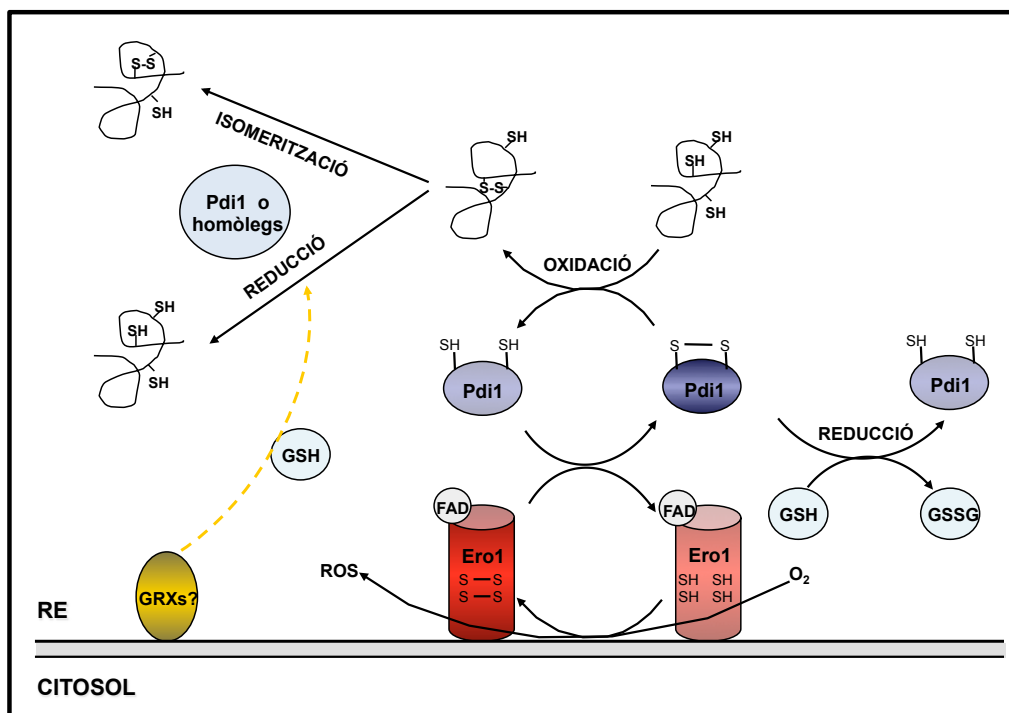


Figura 6. Model esquemàtic del plegament oxidatiu al RE del llevat. La formació de ponts disulfur al RE requereix Ero1. Aquesta proteïna oxida Pdi1 que, a la vegada, actua sobre el plegament de les proteïnes. A continuació, Ero1 unit al cofactor flavina adenina dinucleòtid (FAD) passa els electrons a l'O₂ podent produir ROS. La reducció i/o isomerització es pot portar a terme per la pròpia Pdi1 o algun dels seus homòlegs. També en la reducció pot intervenir el GSH, resultant en una producció de GSSG [adaptat de Chakravarthi et al. (2006) i Tu i Weissman (2004)].

El catalitzador de la formació i isomerització de ponts disulfur al RE que més s'ha estudiat és PDI (LaMantia i Lennarz, 1993; Oka i Bulleid, 2013; Wilkinson i Gilbert, 2004). PDI presenta dos dominis catalítics relacionats amb el centre actiu de les TRXs, cadascun dels quals conté un parell de cisteïnes en un motiu CXXC, de manera que pot participar en les reaccions d'intercanvi ditiol-disulfur. Aquests dos dominis TRX catalítics estan separats per dos dominis TRX no-catalítics (Hatahet i Ruddock, 2009). Així, PDI és capaç de catalitzar l'oxidació, reducció i isomerització de ponts disulfur. En el llevat, hi ha una forma majoritària de PDI (Pdi1) i quatre homòlegs d'aquesta (Eug1, Mpd1, Mpd2 i Eps1), però només Pdi1 és essencial per la viabilitat cel·lular. Aquests homòlegs de Pdi1 s'expressen a uns nivells relativament baixos en la cèl·lula (Nørgaard et al., 2001), però es pot induir la seva expressió quan hi ha defectes en l'activitat Pdi1 (Nørgaard et al., 2003; Xiao et al., 2004). Pdi1 es troba predominantment en forma oxidada *in vivo*, essent la seva funció principal la d'oxidar proteïnes que s'estan plegant. No obstant, quan les cisteïnes del centre actiu estan en la forma reduïda, Pdi1 també es capaç de catalitzar la reducció o isomerització de determinats ponts disulfur, depenent del substrat i les condicions redox de l'assaig (Hatahet i Ruddock, 2009; Karala et al., 2010; Wilkinson i Gilbert, 2004). Per exemple, algunes proteïnes mal plegades necessiten reduir els seus ponts disulfur per tal de ser redirigides cap al proteasoma, on seran degradades (Fagioli et al., 2001). En cèl·lules eucariotes superiors, existeixen uns 20 membres d'aquesta família PDI (Ellegaard i Ruddock, 2005; Mezghrani et al., 2001).

També és necessari un enzim tiol oxidasa com Ero1, inicialment caracteritzat en el llevat (Frandsen i Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998). Ero1 és una N-glicoproteïna estretament associada a les membranes del RE però sense un motiu KKXX o HDEL obvi per la seva retenció, i encarada al lumen d'aquest orgànul. Aquesta proteïna també té un centre actiu similar al de les oxidoreductases TRXs i uneix no-covalentment un cofactor FAD. Ero1 s'encarrega d'oxidar Pdi1, transferint els electrons dels ditiols de Pdi1 a l'O₂ a través del cofactor FAD (Gross et al., 2006; Tu i Weissman, 2002). Per tant, *ERO1* és un gen essencial i codifica per una proteïna necessària pel plegament i transport de proteïnes des del RE a través de la ruta secretora [Figura 6]. Ero1, actuant com a agent oxidant, sembla definir un component crític del mecanisme que manté l'estat redox oxidatiu al RE (Frandsen i Kaiser, 1998). D'aquesta manera, una disminució en l'activitat d'Ero1 provoca l'acumulació de proteïnes mal plegades i en conseqüència, la inducció d'una via de senyalització degut a aquestes proteïnes (Frandsen i Kaiser, 1998), que es descriu més endavant (apartat 3.3.1 de la **Introducció**).

INTRODUCCIÓ

Mentre que el llevat té un únic gen *ERO1*, les cèl·lules eucariotes superiors en tenen dos ortòlegs, *ERO1α*, que s'expressa en tots els teixits, i *ERO1β*, que mostra una expressió específica de teixit (Benham et al., 2000; Pagani et al., 2000).

La funció oxidativa d'Ero1 en el RE de *S. cerevisiae* va ser demostrada per primera vegada per Frand i Kaiser (1998). Aquests autors van estudiar la resposta de soques afectades en la funció de la proteïna Ero1 a la presència d'agents oxidants i reductors que difonen lliurement a través de les membranes cel·lulars. D'una banda, l'agent reductor DTT afegit al medi de cultiu penetra les membranes cel·lulars i inhibeix ràpidament i reversiblement l'oxidació proteica al RE provocant acumulació de proteïnes mal plegades encara que sense afectar la síntesi proteica, la translocació cap al RE, o el transport intracel·lular de proteïnes que no contenen ponts disulfur (Jämsä et al., 1994). Una disminució de l'activitat d'Ero1, degut a una mutació que causa sensibilitat a la temperatura, provoca hipersensibilitat a DTT, mentre que un increment de l'activitat d'Ero1, causat per la sobreexpressió del gen, determina hiperresistència a DTT (Frand i Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998). D'altra banda, l'agent oxidant diamida (un compost diazina), que condueix a la formació de ponts disulfur en cèl·lules vives (Kosower i Kosower, 1995), és capaç de rescatar els defectes de creixement i els defectes en el processament de proteïnes del mutant *ero1-1* sensible a la temperatura (Frand i Kaiser, 1998). Aquests resultats recolzen que la funció d'Ero1 és proveir els equivalents oxidants necessaris pel plegament proteic oxidatiu al RE (Frand i Kaiser, 1998; Tu i Weissman, 2004).

3.2.2. Interaccions entre Pdi1 i Ero1

Les interaccions entre Pdi1 i Ero1 s'han confirmat detectant els disulfurs mixtes resultants (Frand i Kaiser, 1999). De fet, Ero1 oxida Pdi1 directament a través d'un intercanvi de disulfurs (Tu et al., 2000), i Pdi1 catalitza subseqüentment la formació de disulfurs en les proteïnes en plegament. Ero1 no actua eficientment com a oxidant directe de substrats en plegament i per tant, requereix Pdi1 per transferir els equivalents oxidants (Tu et al., 2000). En conseqüència, la transferència d'equivalents oxidants succeeix via Ero1 a Pdi1 i d'aquesta a la proteïna en procés de plegament [Figura 6], mentre que la transferència d'electrons succeeix via les proteïnes substrat cap a Pdi1 i de Pdi1 a Ero1 (Frand i Kaiser, 1999; Mezghrani et al., 2001; Sevier i Kaiser, 2006; Tu et al., 2000).

Ero1 té dos parells de cisteïnes catalítiques essencials, Cys352-Cys355 (cisteïnes del centre actiu), pròximes al cofactor FAD, i Cys100-Cys105 (cisteïnes llançadores o

“shuttle”) [Figura 7] (Sevier et al., 2007). Ero1 oxida Pdi a través del disulfur “shuttle”, i aquestes cisteïnes reduïdes són reoxidades per les cisteïnes del centre actiu. Així, el moviment inicial de les cisteïnes “shuttle” facilita la transferència d'electrons de les cisteïnes de Pdi1 a les cisteïnes amagades del centre actiu d'Ero1. A més a més, s'ha descrit el paper de tres parells de cisteïnes reguladores: Cys90-Cys349, C143-C166 i Cys150-Cys295, que detecten l'estat d'oxidació al RE i modulen l'activitat d'Ero1. Si les cisteïnes reguladores formen un pont disulfur, limiten la mobilitat de les cisteïnes “shuttle”, disminueixen l'activitat d'Ero1 i baixen el flux d'equivalents oxidants als tiols proteics del RE. En canvi, si les cisteïnes reguladores estan reduïdes, augmenten l'activitat de l'enzim Ero1 i promouen la formació de ponts disulfur (Kim et al., 2012a; Sevier i Kaiser, 2008; Sevier et al., 2007). Kim et al. (2012a) han descrit que la principal proteïna reguladora de l'activitat d'Ero1 és la pròpia Pdi1 [Figura 7]. La proteïna Pdi1 reduïda activa Ero1 mitjançant una reducció directa dels ponts disulfur reguladors, i de manera contrària, la falta de substrats tiol i l'acumulació de la proteïna Pdi1 oxidada resulta en una Ero1 inactiva, degut a la formació dels ponts disulfur reguladors tant per una oxidació autònoma com per una oxidació dependent de Pdi1. Per tant, Pdi1 respon a la disponibilitat de tiols lliures i als nivells relatius de GSH i GSSG al RE per controlar l'activitat d'Ero1 i assegurar que les cèl·lules generin el mínim nombre de ponts disulfur necessaris per un plegament proteic eficient (Kim et al., 2012a).

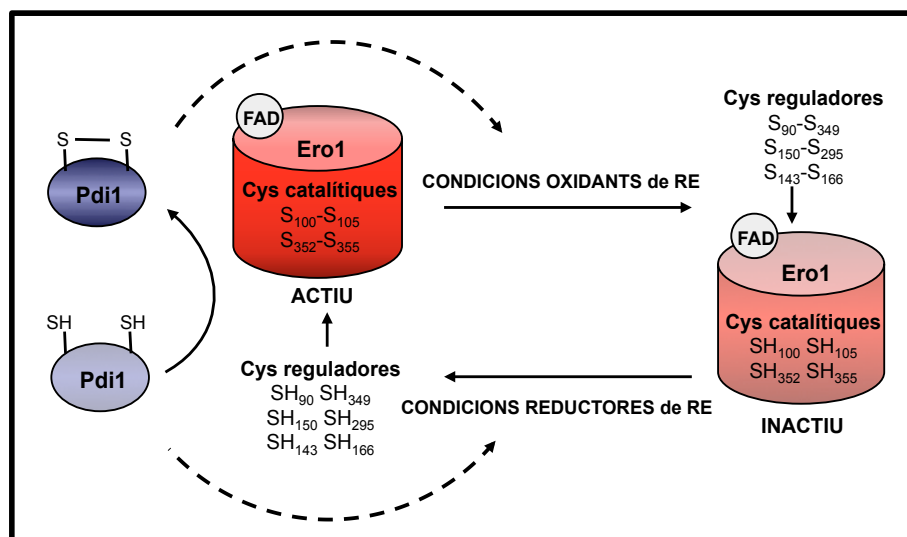


Figura 7. Model de regulació de l'activitat d'Ero1. En funció de la disponibilitat de tiols lliures i dels nivells de GSH i GSSG al RE, la proteïna Pdi1 actua oxidant o reduint les cisteïnes reguladores d'Ero1. Quan aquestes cisteïnes reguladores estan reduïdes, s'activa Ero1 i pot aleshores oxidar Pdi1.

3.2.3. Generació de ROS per la maquinaria Pdi1-Ero1

Als compartiments de la via secretora, i en particular al RE, es generen ROS (Chakravarthi et al., 2006; Tu i Weissman, 2004). Diverses observacions suggereixen que Ero1 utilitza l'O₂ com a substrat directe, passant els electrons del seu grup prostètic FAD a l'O₂ (Tu i Weissman, 2002). És lògic que l'O₂ serveixi com a acceptor terminal d'electrons per la formació de ponts disulfur ja que el seu potencial per a ser reduït és més gran que el de tots els altres oxidants biològics.

No obstant, la reducció completa de l'O₂ amb quatre electrons per formar aigua és cinèticament lenta, i per això és relativament fàcil una reducció parcial de l'O₂ a intermediaris com el H₂O₂, contribuint així al conjunt de les ROS cel·lulars (Tu i Weissman, 2004). Assumint que es produeix una molècula de ROS per disulfur format, l'oxidació deguda a Ero1 pot produir més del 25% de les ROS cel·lulars formades durant la síntesi de proteïnes (Princiotta et al., 2003). A més a més, l'activitat d'Ero1 és la principal font de GSSG en la cèl·lula (Cuozzo i Kaiser, 1999; Tu et al., 2000), el qual constitueix una font addicional d'estrès oxidatiu. Per tant, l'activitat d'Ero1 pot ser una font substancial d'estrès oxidatiu, sent necessària una regulació coordinada entre el plegament oxidatiu i la funció dels sistemes reductors al RE.

En condicions anaeròbiques, Ero1 també pot utilitzar acceptors d'electrons alternatius, la identitat dels quals continua sent desconeguda. S'ha descrit que l'oxidació de la pròpia Ero1 es podria portar a terme de manera acoblada a reaccions redox d'àcids grassos o modificacions d'esterols que tenen lloc a la mateixa membrana del RE (Frand i Kaiser, 1998).

Per tant, i de manera aparentment paradoxal, d'una banda la glutatiloniació de proteïnes es pot veure com un mecanisme de protecció temporal vers l'oxidació irreversible de residus de cisteïna, però d'una altra banda, la restauració dels grups tiol és un prerrequisit per la funcionalitat de la proteïna (Biswas et al., 2006; Ghezzi, 2005). La via Ero1-Pdi1 necessita la desglutatiloniació proteica per portar a terme la formació de ponts disulfur (Chakravarthi et al., 2006), tot i generar així ROS i dany oxidatiu (Tu i Weissman, 2004). En aquest context, l'activitat d'una GRX podria regular els possibles danys oxidatius en els grups tiols de les proteïnes (Princiotta et al., 2003). La localització de Grx6 i Grx7 en aquests compartiments inicials de la via secretora les converteix en bones candidates per fer aquesta funció (Izquierdo et al., 2008).

3.3. CONTROL DE QUALITAT DEL PLEGAMENT DE PROTEÏNES

3.3.1. La via UPR

El RE no només és responsable de la maduració estructural de les proteïnes de la via secretora, tal i com s'ha vist en l'apartat anterior, sinó també de controlar la qualitat d'aquestes. Per acomplir això, el RE posseeix un sistema proteic de "control de qualitat" constituït que assegura que les proteïnes no deixin el compartiment abans de que aquestes adoptin el seu estat natiu (Hurtley i Helenius, 1989). Així, un defecte en la maquinària del plegament proteic amb el conseqüent excés de proteïnes mal plegades al RE provoca que la cèl·lula indueixi una cascada senyalitzadora coneguda com a resposta deguda a la presència de proteïnes mal plegades o UPR, per "Unfolded Protein Response" (Bernal et al., 2006; Ellgaard i Helenius, 2003). D'aquesta manera, els tractaments amb DTT, diamida o tunicamicina activen aquesta cascada UPR (Gasch et al., 2000; Mori et al., 1992). A la vegada, una disminució dels nivells de Ca^{2+} al RE també activa aquesta resposta, fet que demostra la necessitat d'aquest catió per una bona funcionalitat de la maquinària de plegament (Bonilla et al., 2002).

La UPR va ser caracteritzada per primera vegada en *S. cerevisiae* (Mori et al., 1992; Patil i Walter, 2001), demostrant-se posteriorment que aquesta via funciona de manera similar i està altament conservada en totes les cèl·lules eucariotes, des de llevats a humans (Cao i Kaufman, 2012).

L'acumulació de proteïnes mal plegades activa doncs la resposta UPR, que s'inicia amb l'activació d'un receptor amb activitat quinasa/endoribonucleasa de la membrana del RE anomenat Ire1. Ire1 té tres dominis funcionals: un domini N-terminal encarat cap al lumen del RE que intervé en la detecció de l'estrès de RE, un domini amb activitat quinasa, i un domini C-terminal amb activitat nucleasa, ambdós últims encarats cap al citosol. L'activació d'Ire1 consisteix en la transautofosforilació, dimerització i posterior oligomerització d'aquest, resultant en un canvi conformacional que permet llavors unir nucleòtids al centre actiu de la seva activitat nucleasa [Figura 8]. Actualment existeixen dos models per explicar com Ire1 detecta aquest estrès de RE, el model directe, en el què Ire1 s'uneix directament a les proteïnes mal plegades i això causa la seva posterior oligomerització (Gardner i Walter, 2011), i el model indirecte dependent de Kar2, segons el qual aquesta xaperona de la família Hsp70 (ortòleg de la proteïna BiP de mamífers) s'associa amb Ire1 per reprimir la seva activació en condicions normals, i en resposta a l'estrès de RE es dissocia d'Ire1 per

INTRODUCCIÓ

unir-se a les proteïnes mal plegades permetent així la seva oligomerització (Ishiwata-Kimata et al., 2013; Kimata et al., 2003).

Una vegada activat, Ire1 reconeix el precursor del mRNA d'*HAC1* (*HAC1^{np}*), i fent ús de la seva activitat nucleasa realitza dos talls específics de seqüència, alliberant així un intró. Seguidament, una lligasa de tRNAs anomenada Rlg1 ajunta els dos exons resultants, completant la maduració del mRNA d'*HAC1* (*HAC1^p*), per un mecanisme no-convencional. L'eliminació de l'intró allibera una seqüència que bloqueja la traducció d'aquest mRNA, i per tant, permet la síntesi del factor de transcripció Hac1. Hac1, un homòleg de la família ATF/CREB de factors de transcripció, es transloca al nucli on controla un extensiu programa d'expressió gènica, mitjançant la unió a una seqüència específica dels promotors, anomenada element de resposta a la presència de proteïnes mal plegades o UPRE (Kawahara et al., 1997; Mori et al., 1996; Walter i Ron, 2011).

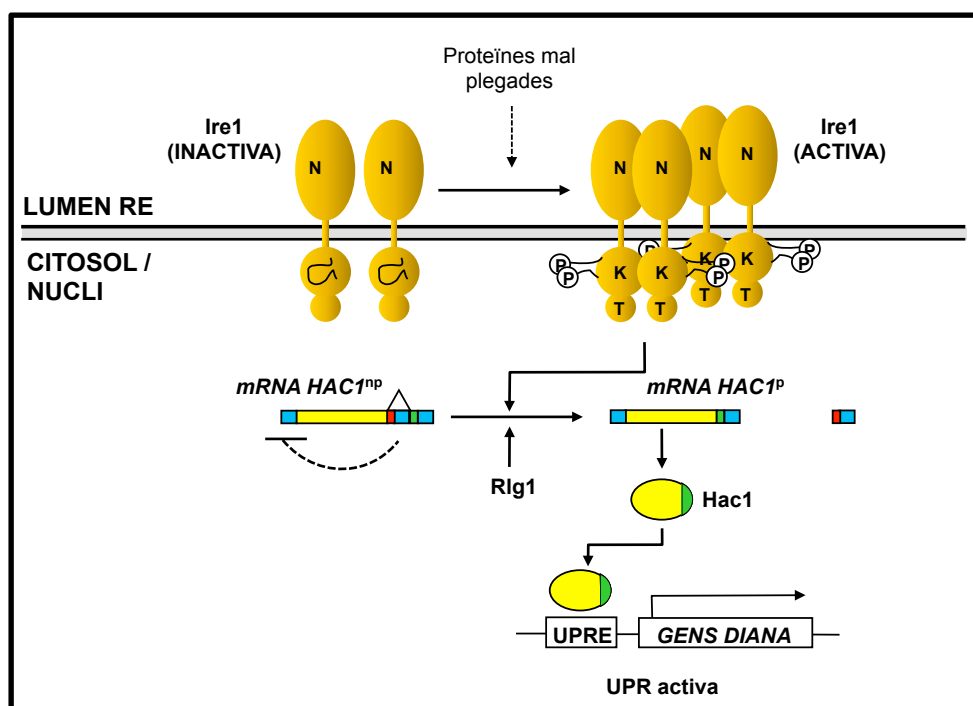


Figura 8. Esquema de l'activació de la UPR en *S. cerevisiae*. Ire1 consta d'un domini N-terminal (N) implicat en la detecció de proteïnes mal plegades orientat cap al lumen del RE, i uns dominis quinasa (K) i endoribonucleasa (T) orientats cap al citosol. En presència de proteïnes mal plegades al RE, Ire1 s'activa i juntament amb Rlg1 processa el mRNA d'*HAC1*. Així, el mRNA no processat (*HAC1^{np}*) allibera un intró, donant lloc a un mRNA processat (*HAC1^p*) que es traduirà eficientment per expressar el factor de transcripció Hac1, que a la vegada induirà l'expressió dels gens diana de la UPR [adaptat de Patil i Walter (2001) i Walter i Ron (2011)].

El mecanisme descrit vol assegurar així que la síntesi d'Hac1 només succeeixi quan hi ha acumulació de proteïnes mal plegades al RE. A més a més, la vida mitjana d'Hac1 és molt curta, i per tant la transcripció dels gens dependents de la UPR s'atura ràpidament quan es restaura la normalitat al RE i s'atura la senyal (Chapman et al., 1998).

En mamífers, la UPR està senyalitzada a través de tres proteïnes transmembrana del RE: Ire1, PERK i Atf6. D'una banda, la família Ire1, consta de dues proteïnes homòlogues, Ire1 α i Ire1 β (Tirasophon et al., 1998), que s'activen de manera similar a la del llevat i llavors maduren varis precursors de mRNAs, a més a més de l'ortòleg d'*HAC1* (*XBP1*). D'altra banda, PERK, que mostra certa homologia amb el domini N-terminal d'Ire1, també conté un domini quinasa, però no presenta el domini nucleasa. En presència d'estrès de RE, PERK oligomeritza, s'autofosforila i fosforila el factor d'iniciació de la traducció eIF2 α , inhibint així la traducció dels mRNAs. D'aquesta manera, PERK ajuda a reduir el flux proteic que entra al RE. No obstant, alguns mRNAs amb una ORF de mida petita es tradueixen igualment, entre els quals destaca el del factor de transcripció Atf4, que controla gens que codifiquen per components involucrats en l'apoptosi cel·lular. Per tant, la via PERK és una via protectora però que pot contribuir a les senyals de mort cel·lular (Shi et al., 1998; Walter i Ron, 2011). D'altra banda, Atf6 és una proteïna que té un domini de factor de transcripció de la família CREB/ATF (Haze et al., 1999; Walter i Ron, 2011), i que en presència de proteïnes mal plegades s'empaqueta en vesícules de transport i es transloca a l'aparell de Golgi, on s'acaba de processar per poder entrar al nucli i activar l'expressió de gens diana de la UPR. Entre les dianes de Atf6 destaca el gen que codifica per la xaperona BiP de la família Hsp70. Aquestes tres proteïnes actuen en paral·lel en resposta a la inducció de la UPR (Cao i Kaufman, 2012).

Subseqüentment a la inducció de la UPR s'expressen tot una sèrie de proteïnes amb diferents funcions en la via secretora, que participen tant en l'entrada al RE (translocació), com en el processament proteic (plegament adequat o modificacions covalents), o com en la sortida de la via (secreció o degradació). Aquestes proteïnes tenen la funció de millorar el plegament de les proteïnes acumulades al lumen del RE, i un cop aconseguit, fer que segueixin la via secretora fins al seu destí final, però en cas de no aconseguir-ho, preparar i dirigir les proteïnes mal plegades per la seva degradació (Travers et al., 2000).

INTRODUCCIÓ

Els canvis en el transcriptoma global degut a la resposta UPR han estat descrits en *S. cerevisiae* (Kimata et al., 2006; Travers et al., 2000). Entre les proteïnes sintetitzades en resposta a la UPR, destaquen en primer lloc les xaperones, que ajuden a desfer els agregats de proteïnes mal plegades i a promoure un plegament adequat d'aquestes, així com enzims amb activitat glucosidasa, que ajuden al plegament de proteïnes que requereixen una correcta addició de carbohidrats per aconseguir l'estructura nativa (Delic et al., 2013). En segon lloc, els components que augmenten la capacitat secretora i faciliten la direccionalització de les proteïnes mal plegades cap a la vacuola per la subseqüent degradació d'aquestes (Hong et al., 1996). Finalment, els enzims que sintetitzen fosfolípids, que generen noves membranes i per tant incrementen el volum del RE, simultàniament diluint les proteïnes mal plegades i preparant el compartiment per a rebre un augment dels factors que participen en el plegament proteic (Cox et al., 1993; Travers et al., 2000).

En *S. cerevisiae*, entre les xaperones específiques de RE, destaquen la xaperona Kar2 i varies xaperones amb domini J, que cooperen regulant l'activitat ATPasa de Kar2 durant la translocació, plegament i direccionalització de les proteïnes. També hi ha les xaperones ciclofilines i les proteïnes d'unió a FK506 (FKBP) implicades en el plegament i la maduració proteica, com la xaperona calnexina, implicada en el procés de glicosilació i maduració de les proteïnes. A més a més, hi ha les proteïnes Pdi1 i Ero1 descrites anteriorment (veure apartat 3.2.1 de la **Introducció**), implicades en el control de qualitat i el balanç redox durant el plegament proteic (Delic et al., 2013).

3.3.2. La maquinària ERAD

La cèl·lula, a part de la vacuola, té un altre sistema encarregat d'eliminar les proteïnes mal plegades no reparables anomenat ERAD (per "ER-Associated Degradation"). No obstant, cal emfatitzar que algunes proteïnes que presenten un plegament adequat utilitzen també aquest sistema com a model per la pròpia regulació fisiològica. Aquest sistema reconeix els substrats proteics a degradar, els direcciona cap a la membrana del RE, on aquests són translocats cap al citosol (retrotranslocació), al mateix temps que incorporen cadenes multiubiquitina per proteïnes integrals de la membrana, i finalment són dirigits al proteasoma on seran degradats (Hampton i Sommer, 2012; Hoseki et al., 2010; Smith et al., 2011).

En la resposta ERAD de *S. cerevisiae* hi participa un factor de transcripció anomenat Son1/Rpn4. Aquest factor s'uneix a elements anomenats PACE (per "Proteasome-Associated Control Element"), degut a la seva presència en els promotors de la família

de gens que codifiquen per les subunitats del proteasoma 26S (Mannhaupt et al., 1999). Per exemple, el gen *PDI1*, regulat per la resposta UPR, també conté l'element PACE al seu promotor, i per tant, pot ser regulat per Son1, a més a més de per Hac1. De fet, Pdi1 també està implicada en la reducció de ponts disulfur de les proteïnes prèviament a la retrotranslocació (Ng et al., 2000; Smith et al., 2011). De manera similar, alguns components específics de la via ERAD estan induïts per la UPR, sent aquesta darrera per tant necessària per l'eficient funció de la resposta ERAD (Casagrande et al., 2000; Friedlander et al., 2000; Ng et al., 2000; Travers et al., 2000).

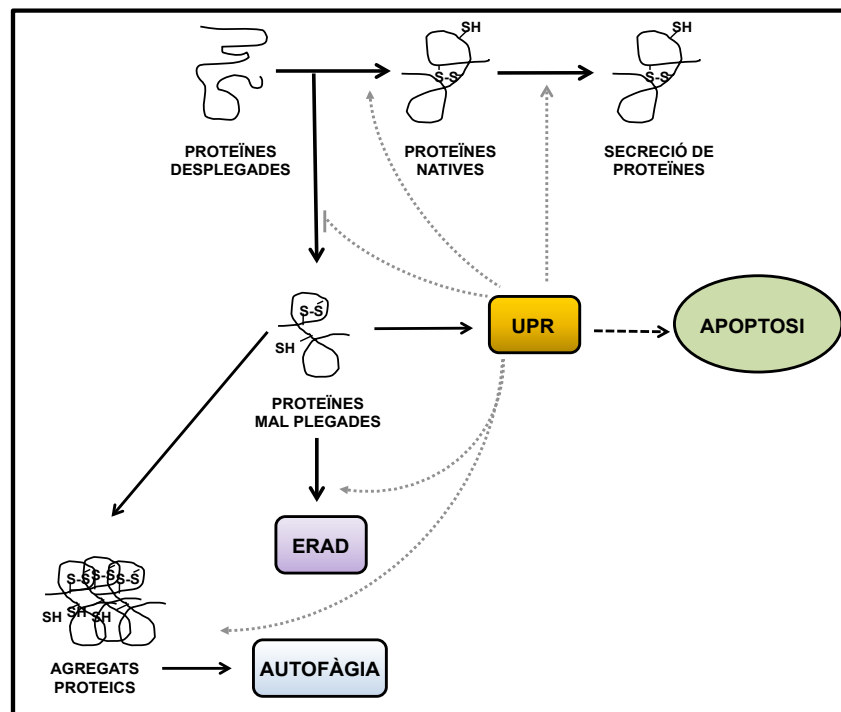


Figura 9. Model esquemàtic que mostra l'acció coordinada de les respostes UPR, ERAD, autofàgia i apoptosi. Les proteïnes entren al RE en una forma desplegada, i allí es pleguen, oligomeritzen, i són secretades. Les proteïnes mal plegades són eliminades per la maquinària ERAD. L'acumulació de proteïnes mal plegades activa la resposta UPR, que a la vegada millora la capacitat de plegament de les proteïnes, facilita el seu trànsit per la via secretora i afavoreix també la resposta ERAD. L'acumulació d'agregats proteïcs difícils de degradar promou la formació d'autofagosomes, també facilitada per la UPR. Finalment, una inducció prolongada de la UPR que no restableix la capacitat de plegament al RE dóna lloc a l'apoptosi cel·lular [adaptat de Patil i Walter (2001) i Travers et al. (2000)].

En conseqüència, ambdós sistemes UPR i ERAD estan íntimament lligats i cooperen per eliminar les proteïnes mal plegades de RE, la UPR induint l'acumulació d'enzims

que tenen un paper corrector i l'ERAD eliminant les proteïnes que ja no es poden reparar [Figura 9].

Quan l'excés de proteïnes mal plegades comporta la formació d'agregats proteics difícils de reparar o degradar pels mecanismes descrits, la cèl·lula activa un mecanisme alternatiu anomenat autofàgia. S'ha identificat també que la resposta UPR facilita l'autofàgia, induint una sèrie de gens que codifiquen per proteïnes que s'encarreguen de la inclusió d'aquests agregats proteics en autofagosomes (Klionsky et al., 2007; Ron i Walter, 2007). Finalment, una inducció prolongada de la UPR que no restableixi la capacitat de plegament del RE donarà lloc a l'apoptosi cel·lular (Tabas i Ron, 2011).

3.4. LA CARBOXIPEPTIDASA Y COM A MODEL PROTEIC PER L'ESTUDI DE LA SECRECIÓ EN EL LLEVAT

Per estudiar la secreció de proteïnes en *S. cerevisiae*, s'han utilitzat bàsicament dos models proteics, la proteïna carboxipeptidasa Y (CPY), localitzada a la vacuola, o la invertasa, localitzada a la paret cel·lular. Ens centrarem en el processament de la CPY, perquè és la que s'ha utilitzat en aquest treball com a proteïna reportera del procés de secreció.

Durant el procés de transport i maduració, la CPY assoleix tres formes subcel·lulars de diferent pes molecular, que es poden separar i distingir clarament per electroforesi en condicions reductores (Jung et al., 1999; Ng et al., 2000). Així, el gen *CPY1* codifica per un pre-proenzim amb 20 residus de pèptid senyal, 91 residus de propèptid i uns 421 residus que corresponen a la forma CPY madura [Figura 10]. La proteïna CPY es sintetitza i s'internalitza post-traduccionalment al RE, on una peptidasa elimina el pèptid senyal. Aquí es porta a terme el plegament i l'inici de la glicosilació de la proteïna, per tal de donar lloc a una forma de 67 kDa anomenada p1-CPY (Stevens et al., 1982). Tot seguit, a l'aparell de Golgi, s'afegeix la resta d'oligosacàrids per donar lloc a una forma de 69 kDa anomenada p2-CPY (Ballou et al., 1990). La pro-CPY resultant es dirigeix cap a la vacuola, gràcies a una senyal de localització vacuolar (Valls et al., 1990). A la vacuola es produeix la maduració d'aquest propèptid, el qual és processat per varies hidrolases vacuolars, resultant en una proteïna de 61 kDa (Sørensen et al., 1994). Cal destacar també que l'estructura de la proteïna m-CPY madura està estabilitzada per un total de cinc ponts disulfur.

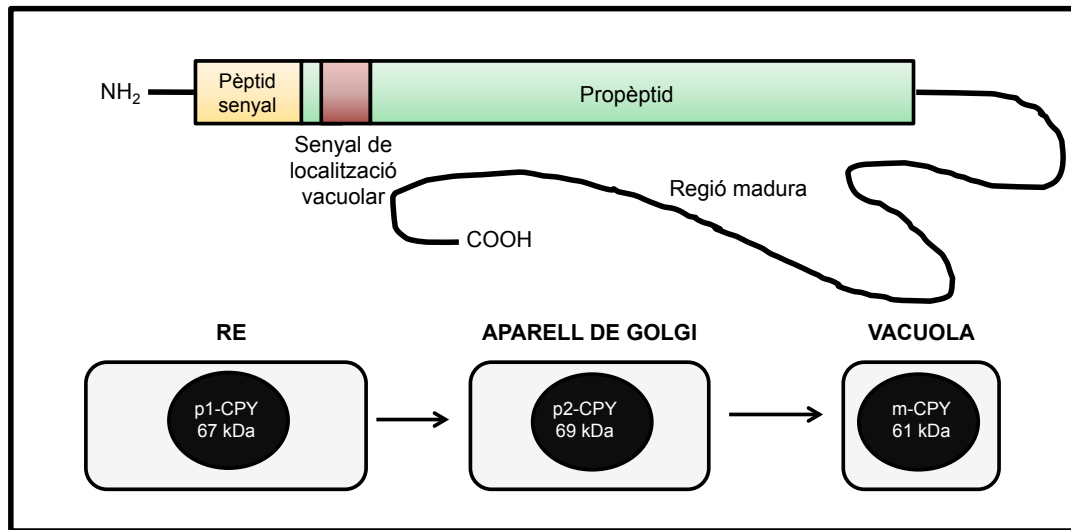


Figura 10. Esquema del transport intracel·lular i processament de CPY *in vivo* (adaptat de Jung et al., 1999).

4. HOMEÒSTASI D'IONS

L'homeòstasi dels ions és fonamental per la fisiologia de la cèl·lula, ja que aquests regulen propietats vitals com el creixement cel·lular, la proliferació, el desenvolupament i les respostes cel·lulars envers diferents estímuls. Tret del carboni, el nitrogen i l'oxigen, les cèl·lules necessiten disponibilitat d'altres elements, ja sigui com a components addicionals de les macromolècules (per exemple, el fosfat), o com a cofactors necessaris per la integritat estructural (per exemple, el zinc) i l'activitat enzimàtica de proteïnes (per exemple, el coure i el ferro), o també com a missatgers secundaris en senyalització cel·lular (com és el cas del calci). Degut a la importància d'aquests elements, la cèl·lula ha desenvolupat mecanismes eficients per obtenir aquests nutrients del medi ambient, utilitzar-los, emmagatzemar-los als orgànuls intracel·lulars, i regular la seva abundància intracel·lular per tal d'evitar la seva sobreacumulació i toxicitat (Eide et al., 2005). Amb aquesta finalitat, un gran nombre de proteïnes transportadores permeten el seu moviment entre els diferents compartiments cel·lulars o entre la cèl·lula i l'exterior (Ariño et al., 2010; Persson et al., 2003).

4.1. CALCI

El calci és un missatger clau que ajuda a traduir els estímuls extracel·lulars en respostes intracel·lulars. Els augments controlats en les concentracions de Ca^{2+} lliure citosòlic regulen nombrosos processos cel·lulars, incloent la fusió de membranes, l'organització del citoesquelet, la transcripció gènica, la polarització cel·lular i la mort cel·lular (Stefan et al., 2013). La importància de l'homeòstasi del Ca^{2+} per la fisiologia dels llevats, incloent el plegament i la secreció proteica, ha estat revisada recentment per Cunningham (2011).

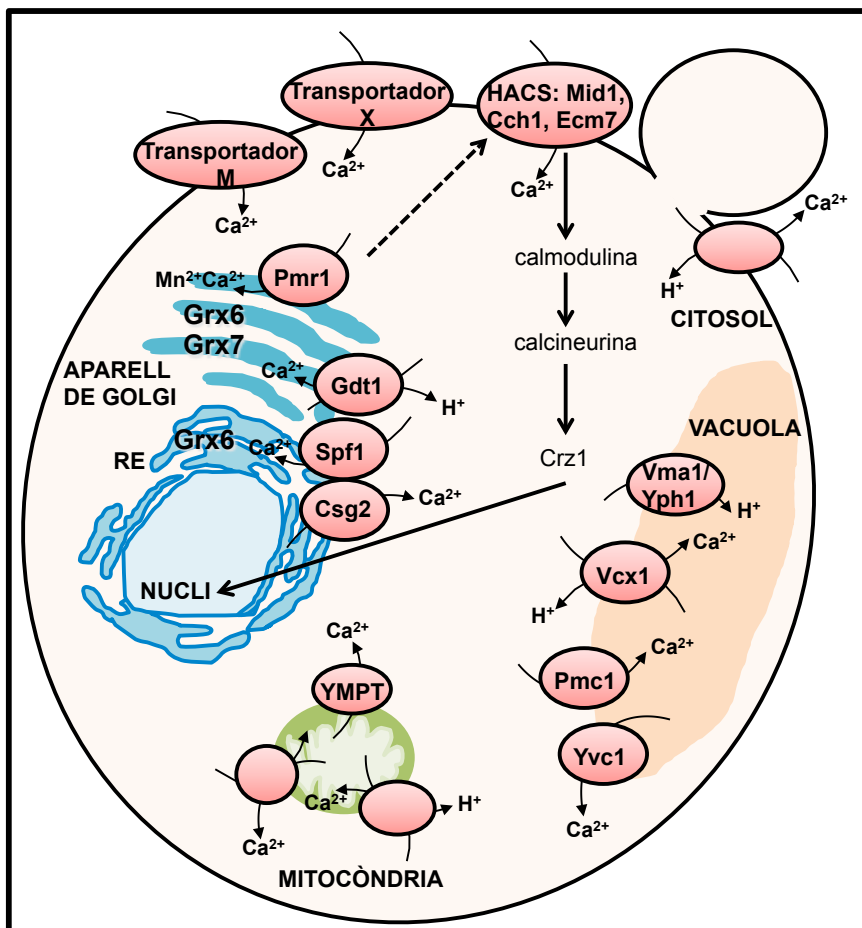


Figura 11. Proteïnes i mecanismes implicats en l'homeòstasi del Ca^{2+} en *S. cerevisiae* (veure el text per més detalls).

La concentració de Ca^{2+} al medi extracel·lular pot variar des de 1 a 100 mM (Dunn et al., 1994; Yoshimoto et al., 2002). En *S. cerevisiae*, la concentració de Ca^{2+} total a la

cèl·lula és de l'ordre de 3 mM. No obstant, els nivells de Ca^{2+} citosòlic estan en un rang de concentració entre 50-200 nM (Halachmi i Eilam, 1989; Miseta et al., 1999a; Nakajima-Shimada et al., 1991), de manera que la resta de Ca^{2+} es troba en compartiments intracel·lulars. La concentració de Ca^{2+} citosòlic es manté per sota dels nivells del medi degut a l'activitat dels transportadors situats als compartiments de la via secretora, a la membrana mitocondrial, a la membrana vacuolar i a la membrana plasmàtica [Figura 11]. Tots aquests transportadors contribueixen a l'homeòstasi del Ca^{2+} , que resulta essencial per mantenir la viabilitat cel·lular (Park et al., 2001; Pittman, 2011).

Cal mencionar que la concentració de Ca^{2+} lliure al lumen del RE de llevats és de 10-100 vegades menor que en el RE de les cèl·lules de mamífers (Pinton et al., 1998; Strayle et al., 1999) i que *S. cerevisiae* pot créixer en baixes concentracions de Ca^{2+} si té disponible una aportació suficient de Mn^{2+} lliure, de la mateixa manera que pot créixer en baixes concentracions de Mn^{2+} gràcies al Ca^{2+} lliure, sense notables defectes en el creixement (Dürr et al., 1998; Loukin i Kung, 1995). Per tant, la demanda i suplementació de Ca^{2+} en el RE de llevats és menor que en les cèl·lules eucariotes superiors. D'acord amb això, el principal magatzem de Ca^{2+} en llevats són les vacuoles (Cunningham, 2011).

4.1.1. Transportadors de Ca^{2+} en el llevat

4.1.1.1. COMPARTIMENTS DE LA VIA SECRETORA

Al lumen de l'envolta nuclear, RE, aparell de Golgi i endosomes existeixen un conjunt d'enzims dependents de Ca^{2+} i altament conservats que tenen funcions importants en el procés de secreció de proteïnes (Cunningham, 2011; Michalak et al., 2002). Aquests enzims catalitzen el plegament, la modificació, el processament i el transport de les proteïnes que s'estan secretant. L'estrès de RE apareix quan algun o alguns d'aquests processos esdevé limitant degut a la falta de nutrients, hipòxia, falta de calci i/o presència de toxines a l'ambient o al mateix RE. De fet, com s'ha esmentat a l'inici d'aquesta memòria, l'estrès crònic de RE està associat amb l'edat i amb algunes patologies humanes com diverses malalties neurodegeneratives (Stefan i Cunningham, 2013).

La falta de Ca^{2+} al lumen dels orgànuls secretors afecta alguns d'aquests enzims resultant en l'acumulació de proteïnes mal plegades i la subseqüent inducció de la resposta UPR, una resposta que s'indueix així mateix per la presència d'altres agents,

INTRODUCCIÓ

com la tunicamicina, que també afecten el plegament proteic. En paral·lel a la UPR, la situació d'estrès de RE també comporta la inducció d'una altra via de senyalització que permet l'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula des de l'exterior per mecanismes no ben coneguts però que són independents a la UPR. Aquesta entrada de Ca^{2+} , tret de servir per reomplir el lumen del RE i/o Golgi, és important perquè implica l'activació de les proteïnes calmodulina i calcineurina, que regulen processos que promouen la supervivència de les cèl·lules que presenten una situació d'estrès de RE (Bonilla et al., 2002; Locke et al., 2000). És per això que aquesta via de senyalització per Ca^{2+} ha estat anomenada comunament en llevant com a CCS (per "Calcium Cell Survival"). Així doncs, mentre la UPR actua alleujant i reparant el dany causat per l'estrès amb la inducció de xaperones moleculars i altres proteïnes implicades en el plegament i la secreció, l'activació de la via CCS té un paper crucial en la supervivència cel·lular, evitant alguns processos com la permeabilització de les membranes vacuolars, quan les cèl·lules de llevant estan exposades a altes concentracions de feromones sexuals, tunicamicina, DTT, i altres estressos (Kim et al., 2012b). Hi ha doncs una clara evidència de la relació entre els nivells de Ca^{2+} i el correcte plegament i processament de proteïnes al RE (Cunningham, 2011).

El RE de *S. cerevisiae* conté una concentració de Ca^{2+} d'aproximadament 200 μM , que correspon a uns nivells cent vegades superiors a la concentració de Ca^{2+} al citosol cel·lular. Això és degut sobretot a l'activitat del transportador de Ca^{2+} Pmr1 (Strayle et al., 1999), una bomba de Ca^{2+} i Mn^{2+} de la família d'ATPases de Ca^{2+} de la via secretora (SPCA) que es troba distribuïda de manera generalitzada entre els fongs, animals i altres eucariotes. Pmr1 es localitza principalment a l'aparell de Golgi (Antebi i Fink, 1992; Rudolph et al., 1989), però aporta Ca^{2+} i Mn^{2+} al RE durant la biogènesi o a través del transport vesicular retrògrad i anterògrad que hi ha entre l'aparell de Golgi i el RE. Els mutants deficients en Pmr1 són hipersensibles a l'agent quelant de Ca^{2+} àcid etilenglicol bis(2-aminoetileter)-N, N, N', N'-tetraacètic (EGTA) i presenten defectes de secreció que es poden atribuir a l'absència de funcionalitat d'alguns enzims que requereixen aquests ions. Aquests defectes es suprimeixen augmentant la concentració de Ca^{2+} del medi de cultiu, suggerint així que són una conseqüència específica de la insuficiència de Ca^{2+} al lumen (Dürr et al., 1998). Per un altre costat, en el mutant existeixen defectes en el processament de carbohidrats de les proteïnes secretades que s'atribueixen a la insuficiència de Mn^{2+} a l'aparell de Golgi (Dürr et al., 1998). Tot això indica que la bomba Pmr1 aporta la majoria de Ca^{2+} i Mn^{2+} necessari per un processament proteic adequat tant al RE com a l'aparell de Golgi (Cunningham,

2011). A més a més, el RE també té una altra bomba d'ions tipus P anomenada Cod1/Spf1, que actua en sinèrgia amb Pmr1 en el transport de Ca^{2+} al lumen del RE. Els mutants deficientes en Cod1/Spf1 presenten alteracions en la via secretora que també es reverteixen amb l'addició de Ca^{2+} al medi de cultiu (Cronin et al., 2000; Cronin et al., 2002; Vashist et al., 2002). Els transportadors Pmr1 i Spf1 tenen una sèrie de semblances funcionals, entre les quals destaca que ambdós són necessaris pel correcte processament dels oligosacàrids al RE, requisit per evitar la degradació via ERAD de les glicoproteïnes mal plegades, i l'adequada extensió de la cadena de carbohidrats a l'aparell de Golgi. No obstant, també presenten certes diferències. Mentre la falta de *SPF1* porta a una activació constitutiva de la UPR, tal activació no es dona en absència de *PMR1*, suggerint que les funcions crítiques de RE no estan tan compromeses com en una soca Δspf1 . En canvi, les modificacions de les cadenes de carbohidrats a l'aparell de Golgi estan més compromeses en el mutant Δpmr1 que en el mutant Δspf1 . Això indica que ambdues proteïnes són necessàries per mantenir l'homeòstasi del Ca^{2+} al sistema membranós de RE/Golgi, sent cada una d'elles més indispensable pel seu orgànul respectivament (Vashist et al., 2002).

Molt recentment s'ha caracteritzat una nova família de proteïnes involucrades en l'homeòstasi del calci, de la qual tant la proteïna TMEM165 (per "Transmembrane Protein 165") de cèl·lules humanes (Foulquier et al., 2012) com la proteïna Gdt1 (per "Gcr1 dependent translation factor 1"), el corresponent ortòleg de llevat, formen part. Gdt1 és una proteïna de membrana, localitzada a la zona -cis i -mitjana de l'aparell de Golgi que contribueix a l'homeòstasi del Ca^{2+} (Demaegd et al., 2013). El mutant Δgdt1 és sensible a elevades concentracions de Ca^{2+} i a la presència d'EGTA (Dudley et al., 2005), i aquesta sensibilitat es suprimeix amb l'expressió de TMEM165, indicant la conservació de la funció entre els membres d'aquesta família. Demaegd et al. (2013) suggereixen que Gdt1 i TMEM15 podrien ser membres de la família d'antiportadors de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CAX, per " $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ Exchangers") localitzats en l'aparell de Golgi. A més a més, Gdt1 col·localitza amb Pmr1 i els respectius mutants mostren fenotips additius pel que fa als defectes en l'homeòstasi del Ca^{2+} , de manera que Gdt1 i Pmr1 estarien involucrades en dos vies paral·leles de transport de Ca^{2+} al lumen dels compartiments de la via secretora (Demaegd et al., 2013).

El RE també té un canal de Ca^{2+} anomenat Csg2 que actua alliberant Ca^{2+} del lumen del RE al citosol (Beeler et al., 1994; Takita et al., 1995; Tanida et al., 1996). L'excés de Ca^{2+} a la via secretora es pot eliminar també via exocitosi (Cui et al., 2009a).

4.1.1.2. MITOCÒNDRIES

Les mitocòndries estan organitzades espacialment i funcionalment formant una xarxa d'òrgànuls dinàmicament interconnectats, sovint properes o en contacte amb el RE i la membrana plasmàtica (Csordás et al., 2010). Aquestes contenen uns nivells de Ca^{2+} que varien des dels 100 nM als 10 μM , sent aquests últims en condicions d'excés de Ca^{2+} citosòlic (Rizzuto et al., 1992). De fet, les mitocòndries mantenen un gradient electroquímic al voltant de la membrana mitocondrial interna degut al bombeig de protons fora de la matriu mitocondrial per la cadena de transport electrònic (Mitchell i Moyle, 1967), que permet el transport d'altres cations cap a l'interior de la matriu mitocondrial. L'entrada de Ca^{2+} produeix unes petites despolaritzacions transitòries del potencial de membrana mitocondrial (Loew et al., 1994) que estimulen el metabolisme oxidatiu mitocondrial i la cadena respiratòria, el qual a la vegada incrementa la concentració d'ATP intramitocondrial (Jouaville et al., 1999) i, subseqüentment, també la del citosol (Rutter i Rizzuto, 2000; Santo-Domingo i Demaurex, 2010).

Existeix encara poca informació sobre els transportadors de Ca^{2+} presents en les mitocòndries del llevat. D'una banda, referent a l'entrada de Ca^{2+} , s'ha descrit que aquests orgànuls obtenen Ca^{2+} a través d'un co-transportador que utilitza la força del gradient electroquímic de protons (Bradshaw et al., 2001). Les cèl·lules eucariotes superiors presenten també un uniportador de Ca^{2+} anomenat MCU (per "Mitochondrial Calcium Uptake Uniporter Pore"), que permet l'entrada de Ca^{2+} de manera ràpida i en grans quantitats, ja sigui per un increment transitori del Ca^{2+} citosòlic o per estar relativament a prop d'un canal de sortida de Ca^{2+} del RE o d'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula a través de la membrana plasmàtica (De Stefani et al., 2011), però en *S. cerevisiae* no s'ha trobat de moment l'homòleg corresponent. D'altra banda, referent a la sortida de Ca^{2+} de la mitocòndria, Bradshaw i Pfeiffer (2006) van mostrar que aquesta sortida està estimulada per una elevada força iònica, com és el cas d'uns alts nivells de clorur de potassi. En cèl·lules de mamífers, un excés de Ca^{2+} a la matriu mitocondrial induïx l'obertura d'uns porus de membrana no-específics, mitjançant una via de permeabilització transitòria (MPT, per "Mitochondrial Permeability Transition"), que permet la ràpida sortida d'aquests ions cap al citosol cel·lular. En llevat, s'ha descrit recentment una via similar anomenada YMPT (per "Yeast Mitochondrial Permeability Transition"), que presenta diferent regulació però que en determinades condicions també respon a la presència de Ca^{2+} (Azzolin et al., 2010; Bradshaw i Pfeiffer, 2013; Yamada et al., 2009).

Quan hi ha una obertura prolongada dels canals de Ca^{2+} mitocondrials, es produeix una despolarització permanent de la membrana mitocondrial interna, la pèrdua de l'homeòstasi iònica, la depleció d'alguns nucleòtids de la matriu, la inflamació de la matriu, i la ruptura de la membrana mitocondrial externa. En conseqüència, les cèl·lules no poden mantenir els seus nivells d'ATP, alliberen citocrom c, i subseqüentment indueixen una via de senyalització que condueix a la mort cel·lular per apoptosi (Azzolin et al., 2010).

4.1.1.3. VACUOLES

Les vacuoles de les cèl·lules fúngiques equivalen als lisosomes de les cèl·lules animals respecte a les seves funcions de degradació i autofàgia, però també són equivalents als acidocalcisosmes, orgànuls àcids d'emmagatzematge d'ions que es troben en una gran varietat de procariotes i protists eucariotes (Armstrong, 2010; Docampo et al., 2005). A diferència dels lisosomes i els acidocalcisosmes, les vacuoles de llevat i de les plantes ocupen gran part del volum total de la cèl·lula i són el principal magatzem de Ca^{2+} (Cunningham, 2011). *S. cerevisiae* pot contenir des d'una a varies vacuoles que porten a terme cicles d'invaginació, fusió i fissió depenents del cicle cel·lular o el medi extracel·lular.

Les vacuoles són orgànuls molt àcids, degut a l'activitat d'una V-ATPasa (codificada pels gens *VMA* i el gen *VPH1*) que bombeja protons a l'interior d'aquestes (Bowers i Stevens, 2005). Una característica important de les vacuoles és la seva habilitat d'emmagatzemar grans quantitats de Ca^{2+} i alliberar-lo en resposta a determinats estímuls (Cunningham, 2011), mostrant així un paper crític en la regulació de l'homeòstasi del Ca^{2+} . En una cèl·lula de llevat, el 95% del Ca^{2+} es troba emmagatzemat a la vacuola (Eilam et al., 1985), podent arribar a una concentració de Ca^{2+} vacuolar total d'aproximadament 3 mM. En condicions de creixement estàndards, la concentració de Ca^{2+} vacuolar lliure és de l'ordre de 30 μM , ja que el 99% d'aquest Ca^{2+} vacuolar es troba formant complexos amb el polifosfat inorgànic, en una forma relativament estable (Dunn et al., 1994). Gran part del Ca^{2+} vacuolar ve directament del citosol degut a l'acció de les bombes de Ca^{2+} d'alta afinitat i intercanviadors de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ de baixa afinitat presents a la membrana vacuolar. No obstant, la vacuola rep també una petita part del Ca^{2+} probablement a través de la fusió de vesícules procedents de l'aparell de Golgi o indirectament de l'exterior via endocitosi (Cunningham, 2011).

INTRODUCCIÓ

En *S. cerevisiae*, la bomba vacuolar de Ca^{2+} Pmc1 és la principal contribuïdora als nivells de Ca^{2+} vacuolar, sobretot en presència d'una elevada concentració de Ca^{2+} citosòlic (Cunningham i Fink, 1994). Pmc1 està conservada en gairebé tots els fongs i està estretament relacionada amb la família d'ATPases de Ca^{2+} de la membrana plasmàtica (PMCA) que es troba en animals, plantes i altres eucariotes (Pittman, 2011). No obstant, Pmc1 no s'ha detectat a la membrana plasmàtica de *S. cerevisiae* i només està present a la membrana vacuolar, tot i que els mutants deficients en Pmr1 que indueixen l'expressió de *PMC1* acumulen una petita fracció d'aquest transportador també als compartiments de la via secretora (Marchi et al., 1999). Els mutants deficients en Pmc1 són hipersensibles a l'augment de la concentració de Ca^{2+} del medi extracel·lular. L'expressió de *PMC1* està regulada a nivell transcripcional, de manera que s'indueix per la via de la calcineurina (veure apartat 4.1.2 de la **Introducció**) en resposta a un increment del Ca^{2+} citosòlic (Cunningham i Fink, 1996; Matheos et al., 1997), mentre que la seva activitat també sembla estar regulada a nivell post-traducciona, mitjançant la interacció amb altres proteïnes (Takita et al., 2001). Existeix també a la membrana vacuolar un intercanviador de $1\text{Ca}^{2+}/2\text{-}3\text{H}^+$ anomenat Vcx1 que, a diferència de Pmc1, té una menor afinitat però una major capacitat pel Ca^{2+} , permetent així la ràpida entrada de Ca^{2+} a l'òrganul gràcies al gradient de protons (Cunningham, 2011; Dunn et al., 1994). Vcx1 forma part de la família CAX, els membres de la qual no es troben en animals però estan àmpliament expressats en plantes i altres eucariotes (Pittman, 2011). Els mutants deficients en Vcx1 mostren uns nivells de Ca^{2+} vacuolar i una tolerància a l'increment del Ca^{2+} extracel·lular similars als de la soca salvatge (Cunningham i Fink, 1996; Pozos et al., 1996). En aquest cas, la via de la calcineurina modula negativament Vcx1, probablement per una regulació post-traducciona de la qual no es coneix el mecanisme molecular exacte (Kingsbury i Cunningham, 2000; Matheos et al., 1997; Pittman, 2011). Aquesta inhibició s'explica tenint en compte que la via de la calcineurina s'indueix per permetre la supervivència cel·lular, i l'eliminació ràpida de l'excés de Ca^{2+} citosòlic inhibiria aquesta via en unes condicions en que aquesta és necessària, és a dir, la inhibició de Vcx1 sembla ser important per propagar de manera eficient les senyals de Ca^{2+} . Així, la via de la calcineurina indueix l'expressió dels dos transportadors d'alta afinitat pel Ca^{2+} , encara que de menor capacitat, *PMC1* i *PMR1*, els quals permeten el creixement cel·lular en condicions d'estrès per Ca^{2+} . Cal destacar en aquest punt que un doble mutant en Pmc1 i Pmr1 és inviable degut a l'acumulació de nivells tòxics de Ca^{2+} al citosol, a no ser que s'inhibeixi la via de la calcineurina i per tant, s'activi el transportador Vcx1 (Cunningham i Fink, 1994; Cunningham, 2011).

La principal sortida regulada de Ca^{2+} de la vacuola succeeix a través d'un canal d'ions anomenat Yvc1, relacionat amb els canals de Ca^{2+} de la família TRPC (per "Transient Receptor Potential Channel") caracteritzats en animals (Palmer et al., 2001). Els mutants deficients en Yvc1 no mostren hipersensibilitat detectable en front a alts nivells de Ca^{2+} extracel·lular (Denis i Cyert, 2002).

4.1.1.4. MEMBRANA PLASMÀTICA

La membrana plasmàtica de *S. cerevisiae* presenta dos mecanismes que incorporen Ca^{2+} : el sistema de baixa afinitat, que actua en presència d'alts nivells de Ca^{2+} extracel·lular, i el sistema d'entrada de Ca^{2+} d'alta afinitat (HACS), que actua en ambdues condicions d'alts i baixos nivells de Ca^{2+} extracel·lular.

El sistema de baixa afinitat està format bàsicament per un transportador anomenat X, i un altre detectat posteriorment, anomenat M (Cui et al., 2009a; Locke et al., 2000). L'entrada de Ca^{2+} per aquesta via es pot inhibir amb la presència d'altres concentracions de Mg^{2+} , el qual competeix amb el Ca^{2+} .

El sistema HACS està format per tres proteïnes que interaccionen entre elles: Cch1, que és un homòleg de la subunitat catalítica α (Fischer et al., 1997; Paidhungat i Garrett, 1997); Mid1, que presenta certa similitud a la subunitat $\alpha\delta$ (Iida et al., 2004); i Ecm7, un homòleg de la subunitat reguladora γ (Martin et al., 2011). Totes tres subunitats amb les quals presenten homologia formen part dels canals de Ca^{2+} depenents de voltatge de les cèl·lules animals (VGCCs).

Varis autors han estudiat els mecanismes d'activació d'HACS. Bonilla i Cunningham (2003) van mostrar que el sistema HACS s'activa d'una manera més aviat lenta en resposta a l'estrès de RE, a través d'una cascada de senyalització de tipus MAP quinases (per "Mitogen-activated Protein Kinases"), entre les quals destaca la quinasa Mpk1, que resulta en la fosforilació de la subunitat Cch1, induint l'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula i conseqüentment l'activació de la via de la calcineurina. A la vegada, aquesta última s'encarrega de desfosforilar Cch1 inactivant el sistema HACS i retornant així a la situació de partida (Locke et al., 2000).

Un altre dels fronts oberts actualment és la ràpida activació d'HACS degut a una despolarització de la membrana plasmàtica, similar al que succeeix en l'homòleg de mamífers (VGCCs), encara que en llevats els dominis sensors de voltatge d'HACS (en la subunitat Cch1) contenen aproximadament la meitat del nombre de residus carregats positivament que el seu homòleg i que el potencial de membrana en repòs

INTRODUCCIÓ

d'aquests és extremadament baix, d'aproximadament -200 mV (Stefan et al., 2013; Stefan i Cunningham, 2013). En aquest sentit, Viladevall et al. (2004) van demostrar que el sistema HACS s'activa en resposta a un augment sobtat del pH del medi. Aquesta ràpida activació d'HACS pel xoc de pH indica que no es necessita la fosforilació ni desfosforilació de Cch1 o les altres dues subunitats per la regulació d'HACS en aquestes condicions, sinó que depèn probablement de la despolarització transitòria de la membrana plasmàtica. Aquests resultats suggereixen que el potencial de repòs fortament negatiu de la membrana plasmàtica del llevat pot requerir menys residus carregats positivament en els dominis sensors de voltatge de Cch1 que les cèl·lules eucariotes superiors per aconseguir sensibilitat al voltatge (Stefan et al., 2013). Recentment, s'ha vist que HACS també s'activa degut a l'activitat dels transportadors Kch1, Kch2, Trk1 i Trk2, que obtenen K^+ extracel·lular, resultant en una despolarització parcial de la membrana plasmàtica (Stefan et al., 2013; Stefan i Cunningham, 2013). Els transportadors Trk1 i Trk2, d'alta-moderada afinitat pel K^+ , i Kch1, de baixa afinitat pel K^+ , participen en l'activació d'HACS sobretot en resposta a determinats estressos de RE, com la presència de tunicamicina o DTT (Stefan i Cunningham, 2013), mentre que els transportadors Kch1 i Kch2, ambdós de baixa afinitat pel K^+ (i sense homòlegs coneguts en animals, plantes o altres espècies eucariotes), tenen un paper més important en resposta a la presència d'alts nivells de feromones sexuals (Martin et al., 2011; Stefan et al., 2013; Stefan i Cunningham, 2013). Finalment, HACS pot activar-se també de manera independent a aquests transportadors de K^+ en les cèl·lules de llevat exposades a determinats antifúngics, com el miconazol, suggerint que altres factors cel·lulars també poden regular la seva activitat (Stefan i Cunningham, 2013). Tot això permet concloure que HACS té un paper crític en el control de la qualitat de la via secretora (Martin et al., 2011).

En l'actualitat hi ha estudis en curs per intentar trobar en *S. cerevisiae* proteïnes sensores dels nivells de Ca^{2+} al RE que també poguessin estar involucrades en l'activació d'HACS, tal com passa en cèl·lules superiors amb les proteïnes STIM (per "Stromal Interaction Molecules"), que activen els canals Orai (veure apartat 4.1.1.6 de la **Introducció**). De fet, algunes regions de la membrana plasmàtica de llevat (aproximadament 20-45%) tenen subjacent una xarxa de membranes de RE, amb una distància mitjana entre orgànuls de 30 nm, amb les quals es comuniquen. Aquestes zones de contacte reticle endoplasmàtic – membrana plasmàtica (RE-MP) en cèl·lules superiors tenen varies funcions, entre les quals destaca un paper regulador de

l'homeòstasi del calci (Manford et al., 2012). No obstant, de moment no hi ha cap clar candidat que pogués fer el paper de STIM en llevats.

En quant a la sortida de Ca^{2+} de la cèl·lula, recentment s'ha detectat en *S. cerevisiae* un intercanviador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Hong et al., 2013) que utilitza la força del gradient de protons generat per l'ATPasa de H^+ de la membrana plasmàtica per transportar el Ca^{2+} cap a l'exterior cel·lular, quan hi ha un excés de Ca^{2+} citosòlic.

4.1.1.5. INTERRELACIÓ ENTRE ELS TRANSPORTADORS DELS DIFERENTS COMPARTIMENTS CEL·LULARS

Els sistemes de transport de Ca^{2+} esmentats anteriorment en *S. cerevisiae* estan interrelacionats. Així, la deficiència de Ca^{2+} en els orgànuls de la via secretora de proteïnes, entre altres estímuls intracel·lulars o extracel·lulars, provoca l'activació d'HACS, que resulta en un increment de la concentració de Ca^{2+} citosòlic. Això conseqüentment senyalitza a través de la via de la calcineurina per regular processos que restauren els nivells de Ca^{2+} al lumen, disminueixen l'estrès i promouen la supervivència cel·lular (Cunningham, 2011; Locke et al., 2000). D'una banda, la deficiència de Ca^{2+} a la via secretora es pot donar per la inactivació o baixa activitat de Pmr1, que a més a més competeix amb els transportadors vacuolars per obtenir el Ca^{2+} citosòlic. En aquestes condicions, com a resultat de l'activació de la via de la calcineurina, hi ha un augment de l'expressió de *PMC1*, com també una certa deslocalització d'aquest, que suprimeix parcialment els defectes del mutant deficient en Pmr1, reomplint de Ca^{2+} en part els orgànuls de la via secretora però sobretot les vacuoles (Cunningham i Fink, 1994). D'altra banda, determinats estímuls extracel·lulars, com els alts nivells de Ca^{2+} ambiental, també activen HACS i provoquen una elevada inducció de l'expressió de *PMC1* i una petita inducció de *PMR1* (Matheos et al., 1997; Stathopoulos i Cyert, 1997), permetent l'eliminació de l'excés de Ca^{2+} que entra al citosol, i així, el creixement cel·lular.

En llevats, encara no es coneixen les molècules a través de les quals els orgànuls secretors es comuniquen amb els canals de Ca^{2+} de la membrana plasmàtica (Bonilla et al., 2002; Cunningham, 2011; Locke et al., 2000). Algunes de les hipòtesis que relacionen la deficiència de Ca^{2+} en el RE amb els transportadors de Ca^{2+} de la membrana plasmàtica involucren tant proteïnes del mateix RE com proteïnes de la membrana plasmàtica. Entre aquestes hipòtesis, destaca l'existència de proteïnes sensores dels nivells de Ca^{2+} del RE, vies de transducció de senyal, i/o l'alliberament de molècules petites que actuen com a missatgers intracel·lulars (Locke et al., 2000).

INTRODUCCIÓ

La deficiència de Ca^{2+} vacuolar, en canvi, no estimula l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular de manera significativa (Locke et al., 2000). Quan la vacuola està afectada, l'aparell de Golgi/RE juga un paper important en mantenir l'homeòstasi del Ca^{2+} cel·lular, tot i que aquest no elimina l'excés de Ca^{2+} del citosol tan ràpid com ho fa un sistema vacuolar actiu (Miseta et al., 1999b).

La importància del paper del Ca^{2+} pel plegament i modificacions de les proteïnes en el RE està emmascarada sovint per l'elevada inducció de *PMC1*, com a conseqüència de l'increment del Ca^{2+} intracel·lular, que suprimeix en part els defectes de la pèrdua d'alguns dels transportadors dels orgànuls de la via secretora, com l'absència de *PMR1*. En mutants deficients en *Pmr1*, no obstant, la inactivació parcial de *Pmc1* (evitant la letalitat del doble mutant) o bé l'eliminació de l'excés de Ca^{2+} del medi porta a una elevada inducció de la resposta UPR, remarcant així la importància del Ca^{2+} en la via secretora (Bonilla et al., 2002).

A més a més, els mateixos ions Ca^{2+} ajuden a controlar la seva pròpia homeòstasi, ja que els augments i disminucions en la concentració de Ca^{2+} intracel·lular ajusten lentament les concentracions dels components claus de la via de senyalització per Ca^{2+} . Com a resultat, la cèl·lula aconsegueix el balanç per ajustar la concentració del Ca^{2+} intracel·lular lliure i del localitzat dins dels orgànuls, tant important per permetre la supervivència cel·lular (Naranjo i Mellström, 2012).

4.1.1.6. PRINCIPALS DIFERÈNCIES AMB EL REGNE ANIMAL

Els mecanismes que assegurin l'homeòstasi del Ca^{2+} es troben altament conservats entre eucariotes, probablement degut a que aquests mecanismes ja existien anteriorment a la divergència entre els fongs i els animals.

No obstant, cal remarcar que existeixen certes diferències entre aquests dos regnes en el tipus de bombes utilitzades per suplementar de Ca^{2+} els orgànuls i els tipus de canals que alliberen el Ca^{2+} d'aquests (Cui et al., 2009b; Locke et al., 2000). A la membrana plasmàtica, els eucariotes superiors tenen bombes de Ca^{2+} tipus PMCA (PMCA1-4), que equivalen a la bomba *Pmc1* de la vacuola dels llevats. A més a més, la subunitat catalítica dels VGCCs de la membrana plasmàtica de les cèl·lules animals mostra homologia amb la subunitat *Cch1* de la membrana plasmàtica de llevats. Els eucariotes superiors utilitzen un mecanisme per estimular l'entrada de Ca^{2+} específicament en resposta a la deficiència de Ca^{2+} al RE anomenat CCE (per "Capacitative Ca^{2+} Entry"), similar al mecanisme CCS utilitzat en llevats a través

d'HACS. També a la membrana plasmàtica, les cèl·lules animals disposen de varis canals TRPCs, dels quals *S. cerevisiae* no presenta cap ortòleg estricte, encara que mostren certa similitud amb el canal de Ca^{2+} vacuolar Yvc1. A la via secretora, els mamífers presenten unes bombes de Ca^{2+} característiques de tipus SERCA (SERCA 1-3, per "Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPasa"), a més a més d'altres dues SPCA (SPCA1-2), sent aquestes últimes les equivalents a la bomba Pmr1 de RE/Golgi existent en llevats. També en aquests compartiments, les cèl·lules eucariotes superiors tenen uns canals especialitzats de sortida de Ca^{2+} , com el receptor de l'inositol-1,4,5-trifosfat (IP_3R) i el receptor de la rianodina (RyR), que responen als alts nivells Ca^{2+} al RE o a la demanda de Ca^{2+} per processos citosòlics alliberant Ca^{2+} cap al citosol, dels quals no es coneixen homòlegs en *S. cerevisiae*. Finalment, destacar la presència de l'uniportador de Ca^{2+} mitocondrial MCU present en cèl·lules animals, del qual tampoc s'ha descrit cap ortòleg en *S. cerevisiae* (Locke et al., 2000; Naranjo i Mellström, 2012; Prole i Taylor, 2012).

En el context del nostre treball és interessant ressaltar els estudis fets en cèl·lules eucariotes superiors que mostren com l'activitat tant de les bombes SERCA com dels canals IP_3R i RyR pot estar sotmesa a una regulació de tipus redox en el lumen del RE. En aquest sentit, Higo et al. (2005) van trobar que ERp44, una proteïna de la família de les tioredoxines prèviament implicada en el plegament proteic oxidatiu, interacciona directament amb el canal IP_3R tipus 1 al lumen del RE, de manera depenent de l'estat redox i la concentració de Ca^{2+} existent [Figura 12]. En unes condicions relativament reductores (presència de grups tiols lliures) i/o de baixa concentració de Ca^{2+} al RE, ERp44 interacciona amb el canal IP_3R afavorint la conformació tancada, mentre que en unes condicions que afavoreixen l'oxidació dels grups tiols a ponts disulfur i/o d'una alta concentració de Ca^{2+} al RE, la dissociació d'ERp44 del canal promou l'obertura d'aquest. El mateix tipus de regulació ha estat descrit per RyR, l'altre canal present a les membranes del RE de les cèl·lules eucariotes superiors (Sun et al., 2001; Xia et al., 2000; Zima i Blatter, 2006).

En el cas de l'ATPasa SERCA 2b del RE, és la proteïna ERp57, una altra tiol oxidoreductasa del lumen del RE que participa en la formació dels ponts disulfur, la que interacciona amb la bomba de manera depenent de l'estat redox i la concentració de Ca^{2+} . En aquest cas, a diferència dels canals, en unes condicions d'alts nivells de Ca^{2+} al lumen del RE, la proteïna calreticulina (CRT) s'uneix a SERCA 2b i permet així el reclutament d'ERp57, que promou la formació de ponts disulfur al bucle luminal de la bomba, disminuint la seva activitat [Figura 12]. Contràriament, en unes condicions

INTRODUCCIÓ

de dèficit de Ca^{2+} , ERp57 es dissocia, afavorint l'activitat de la bomba SERCA 2b (Li i Camacho, 2004).

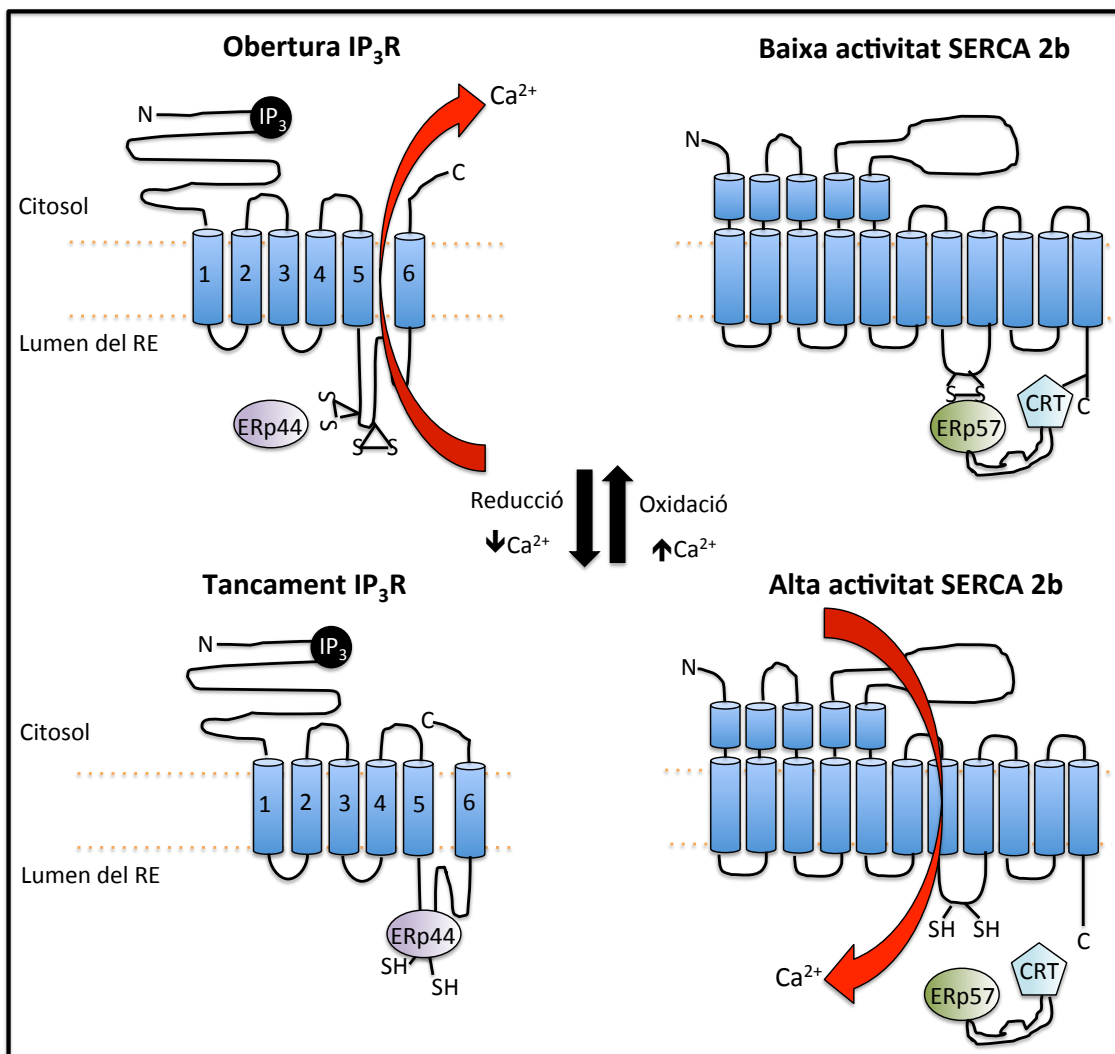


Figura 12. Representació esquemàtica de l'estructura i regulació redox del canal IP_3R i la bomba SERCA 2b. En unes condicions altament oxidants o en presència d'alts nivells de Ca^{2+} al RE, ERp44 no interacciona amb IP_3R , afavorint l'obertura del canal i la sortida de Ca^{2+} del lumen del RE cap al citosol, a la vegada que la CRT permet la interacció d'ERp57 amb SERCA 2b, reduint l'activitat de la bomba. De manera contrària, en unes condicions relativament reductores o de baixos nivells de Ca^{2+} al RE, ERp44 interacciona amb IP_3R , promovent la conformació tancada del canal, mentre que ERp57 es dissocia de SERCA 2b afavorint l'activitat de la bomba (adaptat d'Higo et al., 2005; Li i Camacho, 2004; Mikoshiba, 2007).

D'acord amb això, en un ambient reductor, quan els grups tiols estan majoritàriament reduïts, hi ha un increment de l'activitat SERCA 2b i un tancament del canal IP₃R i RyR, mentre que en un ambient oxidant, hi ha una obertura dels canals i una disminució de l'activitat de les bombes. En altres paraules, SERCA 2b, IP₃R i RyR treballen per incrementar la concentració de Ca²⁺ al RE sota unes condicions relativament reductores. Això és raonable ja que un ambient reduït al lumen del RE no és favorable pel plegament proteic i incrementar la concentració de Ca²⁺ afavoriria la funció de moltes xaperones i oxidoreductases que necessiten unes nivells de Ca²⁺ al RE relativament alts. Aquests estudis marquen la interdependència del plegament proteic oxidatiu i la senyalització per Ca²⁺ (Roderick i Bootman, 2005) **[Figura 12]**.

En eucariotes superiors, s'han descrit varies molècules que detecten els nivells de Ca²⁺ al lumen del RE, i d'acord amb això, interaccionen amb proteïnes de la membrana plasmàtica. Entre aquestes molècules destaquen l'IP₃R, el CIF (per "Ca²⁺ Influx Factor") i les proteïnes STIM (Bolotina i Csutora, 2005; Mori et al., 2002; Putney, 2009; Stathopoulos i Ikura, 2013). D'una banda, s'ha demostrat que el canal IP₃R de la membrana del RE actua com a sensor de Ca²⁺ al RE, interaccionant amb els canals de Ca²⁺ TRPC de la membrana plasmàtica (Zarayskiy et al., 2007). D'altra banda, treballs més recents demostren que les proteïnes STIM de la membrana del RE detecten els nivells de Ca²⁺ al lumen del RE i, en condicions de falta de Ca²⁺, oligomeritzen i es transloquen cap a les zones de contacte RE-MP, on interaccionen amb uns canals de Ca²⁺ de la membrana plasmàtica anomenats Orai. Això resulta en una entrada de Ca²⁺ necessari per la senyalització citoplasmàtica i per reomplir de Ca²⁺ el lumen del RE a través dels transportadors SERCA (Manford et al., 2012). A la vegada, també s'ha vist que les proteïnes STIM senyalitzen per la maquinària de síntesi del factor CIF (Csutora et al., 2008). En conjunt, tots aquests estudis indiquen que existeix una senyalització important entre el RE i la membrana plasmàtica a través del Ca²⁺.

4.1.2. Via de la calcineurina

La via de la calcineurina és una via de senyalització cel·lular que actua en resposta a diversos estressos. En condicions de creixement estàndards, la via de la calcineurina està "apagada" i aquesta és dispensable pel creixement. No obstant, sota condicions mediambientals específiques, com l'exposició a elevades concentracions d'ions (Ca²⁺, OH⁻, Mn²⁺, Na⁺, Li⁺), feromones (factor α), elevades temperatures, o presència de mutacions que afecten a l'estructura de la paret cel·lular, s'indueix la via de la calcineurina activant tot una sèrie de gens (Cunningham i Fink, 1996; Stathopoulos i

INTRODUCCIÓ

Cyert, 1997). Les condicions esmentades generen una senyal de Ca^{2+} directament a través del canal HACS, provocant un increment dels nivells de Ca^{2+} intracel·lulars i l'activació de la via de la calcineurina, una via de senyalització necessària per mantenir la viabilitat cel·lular en presència de l'agent estressant. Per tant, cal una estreta relació entre aquesta via i els transportadors de Ca^{2+} .

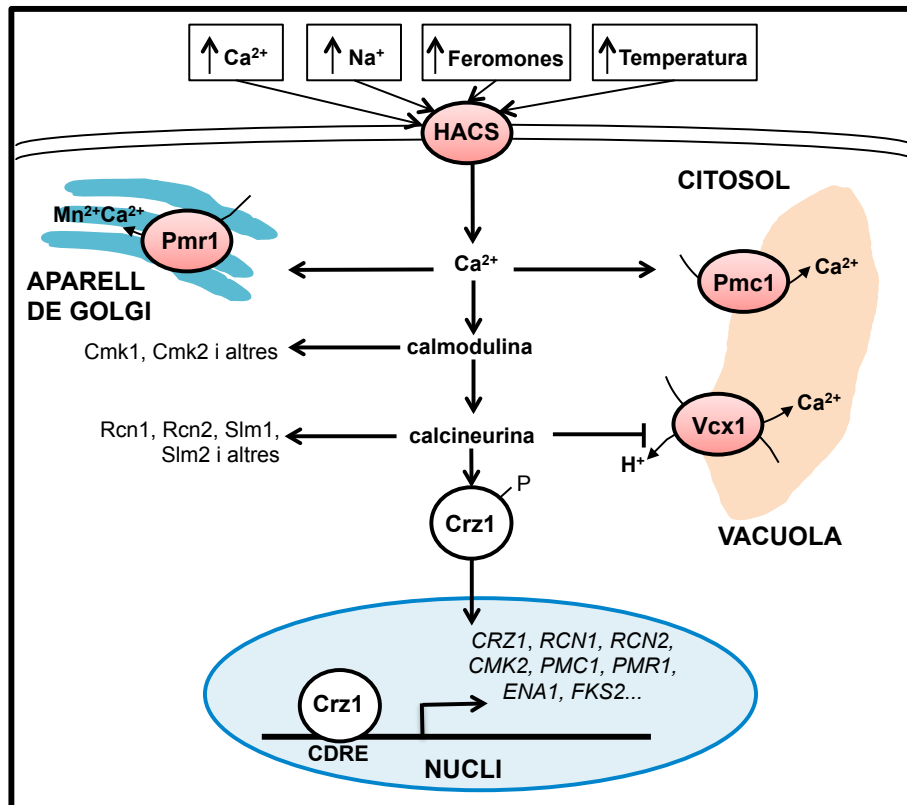


Figura 13. Esquema de la via de la calcineurina en el llevat *S. cerevisiae*. Determinades condicions ambientals provoquen un increment del Ca^{2+} intracel·lular que resulta en l'activació de la calmodulina, la calcineurina, i el factor de transcripció Crz1, que a la vegada indueix nombrosos gens (veure el text per més detalls). Aquesta activació de la calmodulina i la calcineurina també regula post-traduccionals altres factors, com proteïnes quinases (Cmk1, Cmk2), proteïnes reguladores de la calcineurina (Rcn1, Rcn2), proteïnes que intervenen en la secreció proteica (Slm1, Slm2), o el transportador de Ca^{2+} vacuolar Vcx1, entre altres [adaptat de Cunningham (2011) i Yoshimoto et al. (2002)].

La calmodulina és una medidora de la via de la calcineurina [Figura 13]. Es tracta d'una proteïna essencial, que està altament conservada en tots els organismes eucariotes i que uneix ions Ca^{2+} . És, doncs, un important receptor del Ca^{2+} intracel·lular que s'encarrega de regular varis efectes en resposta a aquest ió. A concentracions de Ca^{2+} considerades dins la normalitat, la calmodulina es troba lliure

de Ca^{2+} , en forma de apocalmodulina. En resposta a una senyal de Ca^{2+} , la calmodulina uneix Ca^{2+} i això li permet unir i activar una sèrie d'enzims diana (Davis et al., 1986; Rasmussen et al., 1990; Takeda i Yamamoto, 1987).

La calmodulina consta de dos dominis similars, cadascun amb dos motius anomenats EF, que presenten un bucle d'unió a Ca^{2+} flanquejat per dos hèlixs alfa (Kretsinger, 1980). Diferències puntuals en la composició d'aminoàcids del domini EF de la posició més C-terminal fan que la calmodulina de llevat uneixi un màxim de tres molècules de Ca^{2+} , en front de les quatre que uneix el seu ortòleg en cèl·lules eucariotes superiors (Luan et al., 1987; Matsuura et al., 1991; Starovasnik et al., 1993). La unió del Ca^{2+} a aquests dominis EF provoca un canvi estructural o el pas d'una conformació "tancada" a una conformació "oberta", que resulta en l'exposició de dos superfícies hidrofòbiques que permeten a la molècula de calmodulina interaccionar amb les seves dianes, com la calcineurina i les quinases Cmk1 i Cmk2 (Ton i Rao, 2004; Yap et al., 1999).

La calcineurina és una fosfatasa específica de fosfoerines/fosfotreonines, dependent de l'ió Ca^{2+} i de la calmodulina (Aramburu et al., 2000; Klee et al., 1998), i altament conservada en eucariotes. Es tracta d'un heterodímer format per una de dos possibles subunitats catalítiques A (codificades per *CNA1* o *CNA2* en *S. cerevisiae*) i una subunitat reguladora B (codificada per *CNB1*). Aquesta darrera té un motiu EF relacionat amb la calmodulina (Li et al., 2013). A concentracions normals de Ca^{2+} , les subunitats A i B estan associades, però l'enzim és inactiu degut al domini autoinhibidor de l'extrem C-terminal de la subunitat A. Quan incrementa la concentració de Ca^{2+} , la calmodulina unida a Ca^{2+} s'uneix a la subunitat A i desplaça el domini autoinhibidor, activant consegüentment l'activitat fosfatasa de la calcineurina (Klee et al., 1998).

En cèl·lules eucariotes superiors, la calcineurina activa una família de factors de transcripció anomenats NF-AT (per "Nuclear Factor of Activated T-cells") (Crabtree, 2001; Rao et al., 1997). Els NF-AT es localitzen al citosol quan estan fosforilats, però aquests es transloquen al nucli després de ser desfosforilats per la calcineurina. Per tant, la calcineurina controla l'activitat d'aquests factors de transcripció regulant la seva localització. En *S. cerevisiae*, el factor de transcripció Crz1 és el principal efector de la calcineurina (Yoshimoto et al., 2002). Semblant als factors de transcripció NF-AT, la calcineurina activada desfosforila varis residus de Crz1, i això resulta en un canvi conformacional que amaga la senyal de sortida del nucli i exposa una senyal de localització nuclear (Boustany i Cyert, 2002; Polizotto i Cyert, 2001). Una vegada al nucli, el seu domini de dits de Zn ("Zn-finger") s'uneix específicament al promotor de

INTRODUCCIÓ

determinats gens. De fet, existeix certa homologia de seqüència entre el factor de transcripció Crz1 de llevat i el NF-AT de mamífers, suggerint així la conservació al llarg de l'evolució de la regulació de l'expressió gènica depenent de calcineurina (Miyakawa i Mizunuma, 2007).

Hi ha inhibidors altament específics de la calcineurina, com el FK506, una toxina produïda per *Streptomyces tsukubaensis* en la seva estratègia competitiva (Kino et al., 1987). Aquest és un antifúngic que també actua com a immunosupressor unint-se a la immunofilina FKBP-12, una proteïna citoplasmàtica altament conservada amb activitat prolil isomerasa, de manera que el complex FK506-FKBP-12 resultant interacciona específicament i inhibeix així l'activitat fosfatasa de la calcineurina, tant *in vivo* com *in vitro* (MacMillan, 2013). Aquesta unió es realitza a través de la subunitat A de la calcineurina, pel mateix lloc que reconeix el seu substrat proteic biològic (Rodríguez et al., 2009). En eucariotes superiors, a més a més d'inhibir directament l'activitat de la calcineurina, inhibeix també la sortida de Ca^{2+} del RE, ja que en absència de l'immunosupressor aquesta proteïna està unida al canal IP_3R (MacMillan et al., 2005).

En llevat, la calcineurina porta a terme varies funcions. Entre les funcions relacionades amb les respostes a estressos destaca la regulació de l'homeòstasi d'ions, específicament la del Ca^{2+} , així com la regulació de la biogènesi de la paret cel·lular i del transport vesicular (Cyert, 2001; Cyert, 2003). La via de la calcineurina, de manera independent a la cascada de senyalització de tipus MAP quinases, també regula el cicle cel·lular retardant la transició de la fase G2 a la fase M, en resposta a un estrès de RE, i afavorint així la supervivència cel·lular (Miyakawa i Mizunuma, 2007). No obstant, depenent del tipus d'estrès que activa la via de la calcineurina s'observen diferències en el patró d'expressió gènica resultant (Yoshimoto et al., 2002).

Entre els gens activats en un estrès per Ca^{2+} o Na^+ destaquen els que codifiquen per ATPases que regulen l'homeòstasi d'aquests mateixos ions (*PMC1*, *ENA1*, *PMR1*), transportadors que regulen l'homeòstasi d'ions fosfat (*PHO89*), enzims que contribueixen al manteniment i/o síntesi de la paret cel·lular (*CHS1*, *FKS2*), enzims del metabolisme del lípids i esterols (*CSG2*), o transportadors de vesícules (*GYP7*), entre altres (Stathopoulos-Gerontides et al., 1999; Yoshimoto et al., 2002). Al promotor de tots aquests gens hi ha un element de resposta depenent de la calcineurina (CDRE) de 24 parells de bases, que és necessari i suficient per l'activació d'aquesta expressió genètica, mitjançant la seva unió a Crz1.

Centrant-nos en l'homeòstasi del Ca^{2+} , la via de la calcineurina indueix l'expressió dels gens *PMC1* i *PMR1*, que promouen el segrest de Ca^{2+} a la vacuola i a la via secretora respectivament, i inhibeix l'activitat del transportador *Vcx1*, que acumula Ca^{2+} a la vacuola a través d'un intercanvi de protons (Cunningham i Fink, 1994, 1996; Withee et al., 1997). Cal remarcar que, tal i com s'ha esmentat anteriorment, mentre que la pèrdua d'ambdós *Pmc1* i *Pmr1* és letal en *S. cerevisiae*, aquesta es pot evitar augmentant l'activitat de *Vcx1* o de manera similar, bloquejant la via de la calcineurina (Cunningham i Fink, 1996).

Entre altres fenotips, els mutants de *S. cerevisiae* mancats del factor de transcripció *Crz1* mostren hipersensibilitat a elevades concentracions de cations com el Ca^{2+} , Mn^{2+} , Na^{2+} i Li^+ , degut a que no hi ha inducció dels gens que codifiquen per les bombes d'aquests cations. De la mateixa manera, els mutants deficients en intermediaris de la via de la calcineurina mostren un ventall encara més gran de fenotips degut als defectes en la regulació d'altres fosfoproteïnes a més a més de *Crz1* (Bultynck et al., 2006; Cunningham, 2011; Heath et al., 2004).

Per tant, en resposta a un estrès de RE, destaquem dues vies importants de senyalització, encara que independents una de l'altra, la via de la calcineurina i la UPR, en les quals el Ca^{2+} hi té un paper molt important. Com hem dit anteriorment, la via UPR s'indueix quan hi ha un defecte en la maquinària de plegament proteic, per exemple per una disminució dels nivells de Ca^{2+} al RE, mentre que la via de la calcineurina s'indueix directament per un augment dels nivells de Ca^{2+} al citosol, o bé indirectament per una deficiència de Ca^{2+} en els compartiments de la via secretora, que provoca l'activació del sistema HACS d'entrada de Ca^{2+} cap al citosol cel·lular. Aquestes dues vies operen en paral·lel per restablir l'homeòstasi iònica, protegir la cèl·lula front l'estrès de RE i permetre la supervivència cel·lular.

4.2. FOSFAT

Els ions cel·lulars poden interaccionar amb determinades proteïnes, altres macromolècules orgàniques i inclús compostos inorgànics. Per exemple, hi ha una estreta relació entre l'homeòstasi de determinats ions i el fosfat. De fet, la majoria del Ca^{2+} vacuolar es troba formant complexes amb el polifosfat inorgànic (poliP) (Dunn et al., 1994). També, en determinades condicions, l'obtenció de fosfat extracel·lular comporta l'entrada paral·lela d'ions Na^+ (Martinez i Persson, 1998).

INTRODUCCIÓ

El fòsfat inorgànic (Pi), un nutrient essencial per molts organismes, és necessari per les necessitats estructurals i metabòliques de la cèl·lula, com la síntesi d'àcids nucleics, fosfolípids i altres metabòlits cel·lulars. L'adquisició, l'emmagatzematge, i la integració metabòlica del Pi necessita la participació de nombrosos enzims: les fosfatases àcides (APases) exocel·lulars com Pho5, Pho11, Pho12, els transportadors de fòsfat de la membrana plasmàtica com Pho84 i Pho89, les quinases de poliP com Phm1, les fosfatases alcalines (ALPases) com Pho8, les endopolifosfatases com Ppn1 i les exopolifosfatases com Ppx1 (Dawes i Senior, 1973; Oshima et al., 1996) [**Figura 14**]. L'activitat d'aquests enzims està regulada a través de la via de transducció de senyal de Pi (via *PHO*) (Lagerstedt et al., 2000).

Les cèl·lules han desenvolupat un sistema per obtenir Pi de manera continuada en condicions de baix Pi extracel·lular. Com a estratègia de supervivència, la cèl·lula sintetitza poliP, format per la unió de molècules d'ortofòsfat, i l'acumula a la vacuola i altres compartiments cel·lulars, representant així una font de Pi en condicions de deficiència de Pi extracel·lular (Kulaev i Kulakovskaya, 2000; Rao et al., 1998). A més a més d'actuar com a font de Pi, el poliP té altres papers en el metabolisme cel·lular, com a tampó del pH citosòlic (Pick et al., 1990), detoxificant i osmoregulador (Castro et al., 1995), lligand d'ions metàl·lics com el Ca^{2+} (Dunn et al., 1994), facilitador de l'entrada de DNA a la cèl·lula (Reusch i Sadoff, 1988) o regulador de l'estrès (Kornberg, 1995). Hi ha dos tipus de poliP, el soluble en àcids, format per una cadena de quatre residus d'ortofòsfat, i el insoluble en àcids, que consta des de cinc a més de mil residus de Pi. El 40% del contingut cel·lular de Pi s'acumula en forma de poliP i aquest s'emmagatzema en un 95% a la vacuola. No obstant, una petita part de poliP s'acumula a la superfície cel·lular, al citosol, a la mitocondria i al nucli (Kulaev i Kulakovskaya, 2000).

El poliP es degrada bàsicament per dos enzims, l'enzim Ppx que té activitat exopolifosfatasa i actua eliminant el Pi terminal (Wurst et al., 1995), i l'enzim Ppn1 amb activitat endopolifosfatasa que catalitza el trencament no-processiu de llargues cadenes de poliP per produir cadenes de 60 a 3 unitats de Pi. L'acumulació d'aquests productes de fòsfat, tant Pi com PPI, regula negativament la degradació de més poliP (Kumble i Kornberg, 1996). D'altra banda, les proteïnes Phm1, Phm2, Phm3 i Phm4 semblen estar involucrades en el transport de Pi cap a la vacuola i en el metabolisme del poliP (Ogawa et al., 2000).

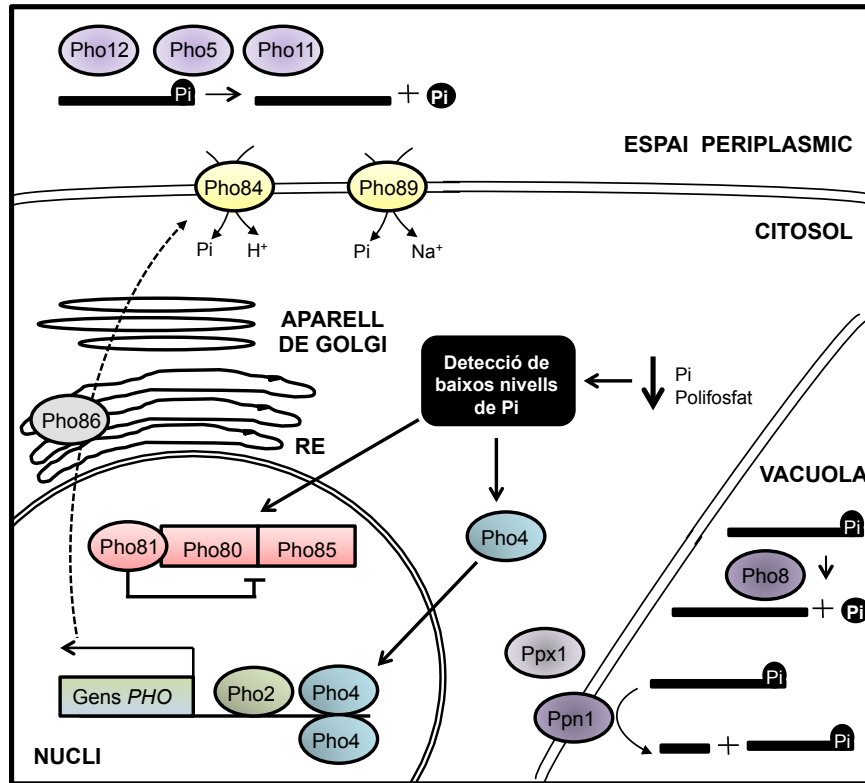


Figura 14. Esquema del metabolisme del fosfat. Quan la cèl·lula detecta baixos nivells de fosfat, Pho81 i l'inositol polifosfat IP_7 inhibeixen l'activitat quinasa del complex Pho80-Pho85, de manera que no pot fosforilar el factor de transcripció Pho4. En aquestes condicions, Pho4, com també Pho2, s'uneix als promotors dels reguló *PHO*, induint l'expressió de gens com *PHO84* i *PHO89*, que codifiquen pels transportadors de Pi d'alta afinitat. Paral·lelament, la cèl·lula obté Pi del poliP, emmagatzemat majoritàriament a la vacuola. Els enzims encarregats de l'alliberament del Pi dels poliPs són les exopolifosfatases Pho5, Pho11 i Pho12 (localitzades a l'espai periplàsmic), Ppx1 (citosòlica) i Pho8 (vacuolar), així com la endopolifosfatasa Ppn1. Una vegada la cèl·lula té Pi suficient, el complex Pho80-Pho85-Pho81 fosforila Pho4, que així és exportat al citosol. A la vegada, Pho84 és endocitat i inactivat a la vacuola [adaptat de Mouillon i Persson (2006) i Persson et al. (2003)].

Com a resposta a una deficiència de Pi, és necessari doncs una estricta regulació de la via *PHO* [Figura 14], que permet una resposta cel·lular coordinada i una adaptació als canvis en la disponibilitat de fosfat lliure a l'exterior cel·lular (Persson et al., 2003). Un complex format per la quinasa depenent de ciclins (CDK) Pho85, la seva ciclina Pho80, així com l'inhibidor de CDK (CKI) Pho81, juntament amb els factors de transcripció Pho4 i Pho2, constitueixen els components principals per a la regulació transcripcional dels gens de la via *PHO* (Huang et al., 2007; Mouillon i Persson, 2006; Persson et al., 2003). Pho85 és una de les cinc CDKs trobades en *S. cerevisiae*, les quals són inactives com a monòmers i necessiten unir-se a les ciclins per activar-se (Morgan, 1995). L'accés dels factors transcripcionals Pho4 i Pho2 a llocs específics del

INTRODUCCIÓ

DNA requereix una determinada estructura de la cromatina, regulada mitjançant l'acetilació, metilació o fosforilació de les seves histones.

En unes condicions de Pi adequades, l'activitat quinasa del complex Pho80-Pho85-Pho81 controla l'expressió del reguló *PHO* mitjançant la fosforilació de Pho4 i altres elements reguladors. La forma fosforilada de Pho4 s'uneix a un receptor exportador del nucli, anomenat Msn5, que conseqüentment transporta Pho4 del nucli al citosol evitant així la inducció dels gens *PHO* (Kaffman et al., 1998). En unes condicions de deficiència de Pi, en canvi, el complex Pho80-Pho85-Pho81 no té activitat quinasa i no fosforila Pho4. La inhibició de l'activitat quinasa requereix de la presència tant de Pho81 com de l'inositol polifosfat IP₇ (Lee et al., 2007a). Aquesta forma no fosforilada de Pho4 s'associa a un receptor importador al nucli, anomenat Pse1, i entra al nucli per induir l'expressió de gens de la via *PHO* (Kaffman et al., 1994; Schneider et al., 1994). Pho2 també és fosforilada per una quinasa (Liu et al., 2000), possiblement per un mecanisme similar al de Pho4. Mitjançant aquest mecanisme regulador, s'expressen gens que codifiquen per transportadors d'alta afinitat, APases i altres proteïnes que permeten a la cèl·lula sobreviure en aquest ambient limitant de fosfat.

A la membrana plasmàtica existeixen dos sistemes de transport de Pi a l'interior de la cèl·lula, un de baixa afinitat i l'altre d'alta afinitat (Persson et al., 2003; Persson et al., 1999). El sistema de baixa afinitat satisfà les necessitats cel·lulars de Pi quan hi ha una concentració extracel·lular de Pi normal o elevada, d'aproximadament 1 mM, mentre que el sistema d'alta afinitat actua en resposta a baixos nivells de Pi extracel·lulars, inferior a 300 µM. El sistema de baixa afinitat pel Pi sembla estar expressat constitutivament (Tamai et al., 1985), mentre que el d'alta afinitat s'indueix quan hi ha una concentració limitant de Pi extracel·lular. Els transportadors d'alta afinitat són Pho84, responsable de l'obtenció de la major part de Pi, i Pho89. Els transportadors de baixa afinitat són Pho87, Pho90 i Pho91. Aquest últim s'ha vist *a posteriori* que és un transportador de fosfat intracel·lular que exporta fosfat des de la vacuola cap al citosol i per tant regula l'homeòstasi del fosfat intracel·lular controlant els nivells de poliP (Hürlimann et al., 2007). L'absència de tots els transportadors de fosfat és letal per la cèl·lula (Wykoff i O'Shea, 2001).

El transportador Pho84 obté Pi utilitzant un gradient de protons, de manera que per cada anió Pi co-transporta 2-3 H⁺ (Borst-Pauwels, 1993; Saier, 2000). En canvi, el transportador Pho89 obté Pi a través d'un gradient de Na⁺, així que per cada anió Pi co-transporta dos ions Na⁺. L'activitat d'aquests dos transportadors d'alta afinitat

depèn del pH, així Pho84 té màxima activitat a pH àcid (aproximadament 5), mentre que Pho89 mostra la seva màxima activitat a pH alcalí (aproximadament 9,5) (Martinez i Persson, 1998). Tot i això, Pho84 també està altament actiu en el rang de pH neutre i alcalí, sobreposant-se parcialment a l'activitat del transportador Pho89. De fet, Pho84 té una activitat 100 vegades superior a la de Pho89. També, mentre que la inducció de *PHO89* és una resposta ràpida i transitòria, la inducció de *PHO84* és més lenta. Això és degut a que el transportador Pho84 no té seqüència senyal i requereix la participació de Pho86 per tal de ser dirigit del RE a la membrana plasmàtica (Lau et al., 2000; Persson et al., 2003).

Alguns estudis genòmics han demostrat que *PHO89* no només s'indueix en unes condicions limitants de fòsfat, sinó també per falta de Mg^{2+} , dany a la paret cel·lular, estrès per Ca^{2+} i alcalinització (García et al., 2004; Viladevall et al., 2004; Wiesenberger et al., 2007). De fet, la inducció de *PHO89*, a diferència de *PHO84*, depèn de la via de la calcineurina, ja que aquest gen conté la seqüència CDRE al seu promotor (Ruiz et al., 2008; Serrano et al., 2002) i, per tant, un augment dels nivells de Ca^{2+} citosòlic indueix l'expressió de *PHO89* (Yoshimoto et al., 2002).

Els transportadors de fòsfat Pho84 i Pho87 formen part de la maquinària encarregada de detectar els canvis en la concentració de fòsfat del medi extracel·lular, a través de l'activació d'una via de senyalització depenent de la proteïna quinasa A (PKA) (Pinson et al., 2004; Samyn et al., 2012). A la vegada, en condicions normals de Pi, aquesta activació de PKA sembla ser essencial per disminuir els nivells d'expressió i degradar Pho84. D'altra banda, s'ha suggerit que Pho81 pot ser el responsable de detectar els canvis en els nivells de fòsfat intracel·lular degut a la seva activitat reguladora sobre la via *PHO* (Auesukaree et al., 2004; Mouillon i Persson, 2006).

Per tant, quan les cèl·lules es troben en un medi deficient en Pi, la primera font de Pi és el poliP emmagatzemat a les vacuoles, i seguidament hi ha una inducció dels transportadors de fòsfat d'alta afinitat. Un cop s'ha obtingut el Pi necessari del medi de creixement, Pho84 s'internalitza per endocitosi i s'envia cap a la vacuola per tal de ser degradat (Lagerstedt et al., 2002).

Més recentment també s'ha demostrat que la interacció d'alguns ions, com el Na^+ , amb el fòsfat intracel·lular pot causar una disminució de la seva biodisponibilitat, amb la conseqüent estimulació dels sistemes de transport d'aquests ions a la cèl·lula, causant la seva acumulació en excés (Rosenfeld et al., 2010).

4.3. POTASSI I SODI

A més a més del Ca^{2+} , en llevats, la via de la calcineurina és també la principal responsable de regular l'homeòstasi dels ions Na^+ i K^+ (Ke et al., 2013; Matsumoto et al., 2002) [Figura 15].

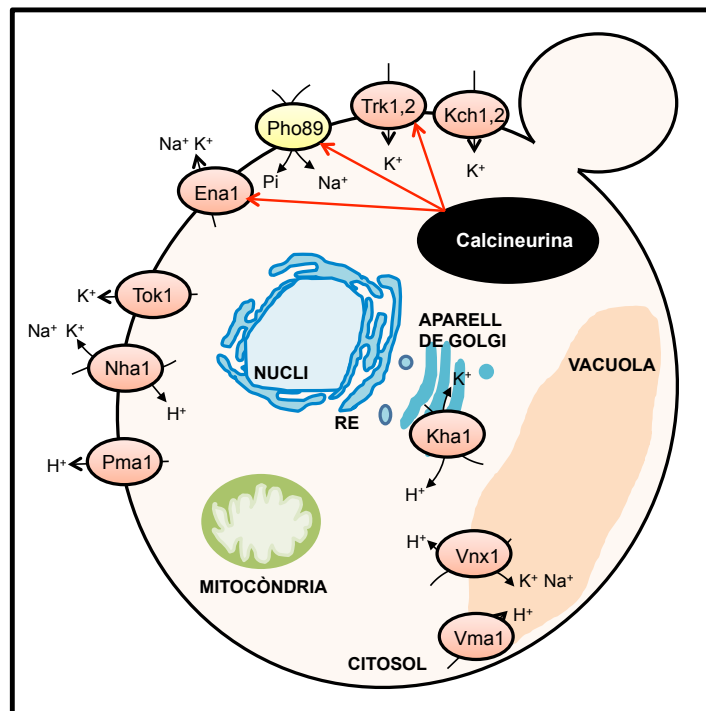


Figura 15. Esquema dels principals transportadors dels cations K^+ i Na^+ en *S. cerevisiae*. S'indica també aquells que estan regulats per la via de la calcineurina [adaptat d'Ariño et al. (2010) i Matsumoto et al. (2002)].

El sistema Trk és el principal mecanisme d'entrada de K^+ a l'interior de la cèl·lula (Ko i Gaber, 1991). Consta de dos importants transportadors involucrats en l'obtenció de potassi, esmentats anteriorment en aquesta memòria, codificats pels gens *TRK1* i *TRK2* (Gaber et al., 1988; Ko et al., 1990; Ko i Gaber, 1991). Trk1 i Trk2 són dues proteïnes no essencials integrals de la membrana plasmàtica del llevat. En una soca salvatge, la principal entrada de potassi es realitza a través de Trk1, el qual treballa com un transportador d'alta – moderada/baixa afinitat segons l'historial de creixement i l'estat de K^+ de la cèl·lula. Trk2 transporta potassi amb una moderada-alta afinitat, i el gen s'expressa a un nivell menor en unes condicions de creixement estàndards. La seva activitat, si n'hi ha, està emmascarada per la presència de Trk1 (Ariño et al.,

2010). Degut a la seva semblança amb el K^+ i la seva abundància a l'ambient, el Na^+ també pot entrar a la cèl·lula a través de diferents transportadors de K^+ , com el mateix sistema Trk (Ke et al., 2013). Més recentment, cal destacar el descobriment d'una nova família de transportadors de K^+ de baixa afinitat, formada per Kch1 i Kch2 (Stefan et al., 2013; Stefan i Cunningham, 2013).

Per un altre costat, per tal d'eliminar l'excés de Na^+ i K^+ , la cèl·lula utilitza tres transportadors diferents, Nha1, Ena1/Pmr2 i Tok1. Nha1 és un antiportador Na^+ , K^+ / H^+ que excreta Na^+ i K^+ gràcies al gradient de protons de la membrana plasmàtica (Bañuelos et al., 1998), Ena1 és una ATPasa que excreta Na^+ i K^+ utilitzant l'energia alliberada de la hidròlisi d'ATP (Haro et al., 1991), i Tok1 bombeja exclusivament K^+ (Ahmed et al., 1999).

La calcineurina té un paper molt important en la resposta adaptativa a l'estrès per cations. D'una banda, aquesta via indueix l'expressió d'*ENA1* per tal de mantenir una baixa concentració de Na^+ intracel·lular [**Figura 15**] (Ke et al., 2013). La inducció d'*ENA1*, a la vegada, afavoreix l'obtenció de fosfat a través del transportador d'alta afinitat Pho89 (Serrano et al., 2002), que necessita el transport d'ions Na^+ per internalitzar el Pi. D'altra banda, la via de la calcineurina activa post-transcripcionalment el sistema Trk resultant en una major obtenció de K^+ i Na^+ , de manera selectiva (Matsumoto et al., 2002; Mendoza et al., 1996; Mendoza et al., 1994).

Resumint, l'acumulació de proteïnes mal plegades i/o la disminució dels nivells de Ca^{2+} al RE del llevat provoca l'activació de la resposta UPR, i també la via d'entrada de Ca^{2+} a través del canal HACS de la membrana plasmàtica. L'entrada de Ca^{2+} per HACS activa la via de la calcineurina i altres factors necessaris per la supervivència cel·lular a llarg termini en una situació d'estrès de RE, així com controla el propi manteniment de la resposta UPR (Bonilla et al., 2002). La via de la calcineurina, a la vegada, manté una estreta relació amb l'homeòstasi d'altres ions a la cèl·lula.

II.OBJECTIUS

OBJECTIUS

L'objectiu genèric d'aquest treball és l'estudi funcional de les glutaredoxines Grx6 i Grx7 associades a les membranes dels compartiments de la via secretora en *S. cerevisiae*. Aquest es concreta en els següents objectius específics plantejats en base als successius resultats:

1. Anàlisi del transcriptoma i de les vies de resposta a estrès activades en els mutants en els gens *GRX6* i *GRX7*.
2. Estudi del paper de Grx6 en l'homeòstasi del calci i la seva relació amb altres transportadors intracel·lulars de calci.
3. Estudi de la relació entre Grx6 i Grx7 i la maquinària de plegament i secreció de proteïnes.

III. MATERIALS I MÈTODES

1. MICROORGANISMES UTILITZATS

1.1. SOQUES DE *S. cerevisiae*

Les soques de *S. cerevisiae* utilitzades es descriuen a la **Taula 1**, en la qual s'inclou el genotip i els comentaris corresponents.

Taula 1. Llista de soques de *S. cerevisiae* emprades.

Soca	Genotip	Comentaris
W303-1A	MATa <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1</i>	Soca salvatge
W303-1B	MATa <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3-112 his3-11,15 ura3-1</i>	Soca salvatge
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Soca salvatge
MML830	W303-1A [pCM244 (<i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Molina-Navarro et al., 2008
MML842	W303-1A <i>grx6::natMX4</i>	Disrupció de <i>GRX6</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML866	W303-1B <i>grx7::kanMX4</i>	Izquierdo et al., 2008
MML871	W303-1A <i>crz1::kanMX4</i>	Izquierdo et al., 2008
MML887	W303-1A <i>grx7::kanMX4</i>	Izquierdo et al., 2008
MML890	W303-1A <i>grx6::CaURA3</i>	Izquierdo et al., 2008
MML891	W303-1B <i>grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML866 x MML890
MML892	W303-1A <i>grx6::CaURA3 grx7::kanMX4</i>	Izquierdo et al., 2008
MML894	W303-1B <i>grx6::CaURA3 grx7::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML866 x MML890
MML1221	W303-1A <i>tetO₂-ERO1::kanMX4 tetR'-SSN6::LEU2</i>	Soca resultant de la substitució del promotor endogen d' <i>ERO1</i> pel promotor <i>tetO₂</i> en MML830
MML1304	W303-1A <i>pho84::natMX4</i>	Disrupció de <i>PHO84</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>

MATERIALS I MÈTODES

MML1306	W303-1A <i>pho89::natMX4</i>	Disrupció de <i>PHO89</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1313	W303-1A <i>pho89::natMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1306 x MML894
MML1337	W303-1A <i>pho84::natMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1304 x MML894
MML1351	W303-1A <i>crz1::kanMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML871 x MML891
MML1365	W303-1A <i>grx6</i>	Soca resultant de l'exposició de MML890 a àcid 5-fluoroorotic (FOA)
MML1526	W303-1A <i>yvc1::kanMX4</i>	Mòdul <i>yvc1::kanMX4</i> traslladat del mutant en el fons BY4741 a W303-1A
MML1527	W303-1A <i>cch1::kanMX4</i>	Mòdul <i>cch1::kanMX4</i> traslladat del mutant en el fons BY4741 a W303-1A
MML1529	W303-1A <i>csg2::kanMX4</i>	Mòdul <i>csg2::kanMX4</i> traslladat del mutant en el fons BY4741 a W303-1A
MML1530	W303-1A <i>pmr1::kanMX4</i>	Mòdul <i>pmr1::kanMX4</i> traslladat del mutant en el fons BY4741 a W303-1A
MML1531	W303-1A <i>yvc1::kanMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1526 x MML891
MML1534	W303-1B <i>pmr1::kanMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1530 x MML891
MML1535	W303-1A <i>pmr1::kanMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1530 x MML891
MML1538	W303-1A <i>csg2::kanMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1529 x MML891
MML1548	W303-1A <i>cch1::kanMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1527 x MML891
MML1680	W303-1A <i>grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML890 x W303-1B
MML1683	W303-1B <i>spf1::natMX4</i>	Disrupció de <i>SPF1</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>

MML1702	W303-1B <i>spf1::natMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1683 x MML1680
MML1703	W303-1A <i>spf1::natMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1683 x MML1680
MML1710	W303-1A <i>spf1::natMX4 pmr1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1683 x MML1530
MML1716	W303-1A <i>spf1::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1683 x MML1530
MML1721	W303-1A <i>spf1::natMX4 grx6::CaURA3 pmr1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1530 x MML1702
MML1723	W303-1A <i>crz1::kanMX4 grx6::natMX4</i>	Espora provinent del creuament MML871 x MML842
MML1743	W303-1A <i>grx6::CaURA3</i> [YIPlac128]	Soca resultant de la transformació de MML1680 amb YIPlac128
MML1744	W303-1A <i>grx6::CaURA3</i> [pMM1071]	Soca resultant de la transformació de MML1680 amb pMM1071
MML1745	W303-1A <i>grx6::CaURA3</i> [pMM1073]	Soca resultant de la transformació de MML1680 amb pMM1073
MML1789	W303-1B <i>tetO₂-ERO1::kanMX4 tetR'-SSN6::LEU2 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1221 x MML891
MML1791	W303-1A <i>tetO₂-ERO1::kanMX4 tetR'-SSN6::LEU2 grx7::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1221 x MML866
MML1803	W303-1A <i>tetO₂-ERO1::kanMX4 tetR'-SSN6::LEU2 pmr1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1221 x MML1534
MML1807	W303-1A <i>tetO₂-ERO1::kanMX4 tetR'-SSN6::LEU2 pmr1::kanMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1221 x MML1534
MML1884	W303-1A <i>gdt1::natMX4</i>	Disrupció de <i>GDT1</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1907	W303-1A [pMM1091]	Soca resultant de la transformació de W303-1A amb pMM1091
MML1908	W303-1A <i>grx6::CaURA3</i> [pMM1091]	Soca resultant de la transformació de MML1680 amb pMM1091
MML1909	W303-1A <i>grx7::KanMX4</i> [pMM1091]	Soca resultant de la transformació de MML887 amb pMM1091
MML1910	W303-1A <i>grx6::CaURA3 grx7::kanMX4</i> [pMM1091]	Soca resultant de la transformació de MML892 amb pMM1091

MATERIALS I MÈTODES

MML1912	W303-1A <i>gdt1::natMX4 grx6::CaURA3</i>	Espora provinent del creuament MML1884 amb MML894
MML1914	W303-1A <i>gdt1::natMX4 grx7::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1884 amb MML894
MML1916	W303-1A <i>gdt1::natMX4 grx6::CaURA3 grx7::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament MML1884 amb MML894

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-, I-, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*lacZY-argF*), ϕ 80 δ (*lacZ* Δ M15)] (Hanahan, 1983).

2. PLÀSMIDS

Els plàsmids utilitzats en aquest treball i els comentaris respectius es detallen a la **Taula 2**.

Taula 2. Plàsmids utilitzats en aquest treball.

Plàsmid	Plàsmid d'origen	Comentaris
pAG25		Conté un mòdul <i>natMX4</i> per deleccionar gens (Goldstein i McCusker, 1999)
pAMS366		Plàsmid episomal que conté quatre repeticions de la seqüència CDRE controlant l'expressió del gen reporter <i>lacZ</i> , marcador <i>URA3</i> (Stathopoulos i Cyert, 1997)
pAMS364		Plàsmid episomal que conté quatre repeticions de la seqüència CDRE mutades, seguides del gen reporter <i>lacZ</i> , marcador <i>URA3</i> (Stathopoulos i Cyert, 1997)
pCM224		Plàsmid integratiu amb el marcador <i>kanMX4</i> , per substituir el promotor endogen pel promotor <i>tetO₂</i> (Bellí et al., 1998a)

pCM244		Plàsmid integratiu, marcador <i>LEU2</i> , conté el mòdul <i>tetR'</i> - <i>SSN6</i> (Bellí et al., 1998b)
YEplac195		Plàsmid episomal, marcador <i>URA3</i> (Gietz i Sugino, 1988)
YIplac111		Plàsmid integratiu, marcador <i>LEU2</i> (Gietz i Sugino, 1988)
YIplac128		Plàsmid integratiu, marcador <i>LEU2</i> (Gietz i Sugino, 1988)
pMM17	YIplac111	Conté un fragment de 400 pb que codifica per 3 epítops hemaglutinina (3HA) més 6 His
pMM822	YEplac195	Plàsmid episomal que conté <i>GRX6</i> amb el seu propi promotor i la regió terminadora, clonat entre els llocs <i>BamHI-PstI</i> del vector (Izquierdo et al., 2008)
pMM1067	pMM822	Plàsmid episomal que conté <i>GRX6</i> amb un canvi d'aminoàcid Cys>Ser, amb el seu propi promotor i la regió terminadora, clonat entre els llocs <i>BamHI-PstI</i> del vector
pMM1071	pMM1067 i YIplac128	Plàsmid integratiu obtingut per subclonació d'un fragment <i>BamHI-PstI</i> de pMM1067, que conté <i>GRX6</i> amb un canvi d'aminoàcid Cys>Ser, amb el seu propi promotor i la regió terminadora, a YIplac128
pMM1073	pMM822 i YIplac128	Plàsmid integratiu obtingut per subclonació d'un fragment <i>BamHI-PstI</i> de pMM822, que conté <i>GRX6</i> amb el seu propi promotor i la regió terminadora, a YIplac128
pMM1091	pMM17	Conté <i>ERO1</i> amb un segment per l'epítop 3HA-6His en posició 3' i el promotor del gen, entre els llocs <i>BamHI-PstI</i> del vector
pPM28		Plàsmid centromèric que expressa una variant de la proteïna GFP (per "Green Fluorescent Protein") sensible a l'estat redox, dirigida al lumen del RE, marcador <i>URA3</i> (Merksamer et al., 2008)

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.

MATERIALS I MÈTODES

- YPD: glucosa 2%; peptona 2%; extracte de llevat 1%. Per la selecció de les soques portadores dels mòduls *kanMX4* i *natMX4*, s'afegia al medi genètica (200 µg/ml) o nourseotricina (200 µg/ml), respectivament.
- SC (Sherman, 2002): base nitrogenada per llevats sense aminoàcids ("YNB w/o aa", de 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'addicionava els cinc aminoàcids essencials absents en el Drop-out excepte aquell corresponent al marcador del plàsmid.

Per els experiments de marcatge radioactiu es preparava el medi SC tal i com s'ha descrit, però utilitzant el "Drop-out Mix Synthetic Minus Methionine, cysteine w/o Yeast Nitrogen Base" (USBiological), també al 0,2% (veure apartat 12 de **Materials i Mètodes**).

- SD (Sherman, 2002): com el SC però sense Drop-out.

Per tal de controlar la concentració de fosfat en el medi de cultiu, el medi SD amb glucosa 2% sense fosfat (Formedium) va ser utilitzat com a medi basal. A aquest medi s'afegia KH_2PO_4 a una concentració final de 7,3 mM (condicions normals de fosfat, N) o a una concentració de 0,15 mM (condicions deficientes de fosfat, N/50).

Per l'anàlisi de sensibilitat a elevades concentracions de calci es va utilitzar un medi SD sòlid modificat d'acord amb Demaegd et al. (2013).

- Medi d'esperulació: acetat de potassi 1%; extracte de llevat 0,1%; glucosa 0,05%.

Pel cultiu d'*E. coli* es va emprar el medi detallat a continuació.

- 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.

4. CULTIU DE MICROORGANISMES

Les cèl·lules de *S. cerevisiae* s'incubaven generalment a 30°C, excepte en els casos que s'indiquen als corresponents apartats de **Resultats**. Les cèl·lules d'*E. coli* s'incubaven sempre 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 (DO_{600}).

En diversos experiments s'afegien agents als medis de cultiu a les concentracions indicades en cada cas: FOA (Fermentas), diamida (Sigma), EGTA (Sigma), àcid bis(2-aminofenoxi)-età-N, N, N', N'-tetraacètic amb acetoximetil éster (BAPTA-AM, de Life Technologies), DTT (USB Corporation), doxiciclina (Sigma) i FK506 monohidrat (Sigma). Es preparava una concentració patró dels diferents agents en aigua estèril, excepte en el cas del BAPTA-AM i FK506 monohidrat, que es dissolien en dimetilsulfòxid (DMSO, de Sigma), i de la doxiciclina, que es dissolia en etanol.

Quan es prenen mostres dels cultius líquids controls o sotmesos 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.

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 a diferents condicions ambientals (temperatura, agents oxidants, quelants de Ca^{2+} , entre altres). Les cèl·lules es creixien exponencialment en medi líquid fins a una concentració al voltant de 2×10^7 cèl·lules/ml, equivalent a una DO_{600} de 0,6 unitats. Seguidament, es plaquejaven mitjançant dilucions seriades (1:5) sobre medi sòlid. Les plaques s'incubaven durant 48-72 hores a la temperatura indicada en cada cas.

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 s'exposava a diferents condicions ambientals, afegint la concentració adequada de cada agent a analitzar o variant la temperatura. 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 d'unes 30 hores aproximadament. Durant la incubació la placa es mantenia amb agitació constant.

Aquestes 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. Llavors, es calculava el creixement relatiu dividint el valor de DO_{600} de la soca tractada pel valor de DO_{600} de la soca sense tractar. Aquest rati també es podia relativitzar, a la seva vegada, respecte a la soca salvatge, a la qual es donava el valor unitat.

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. Esterilitzat a l'autoclau.
- NaOAc: acetat de sodi 3 M, pH 8.

Procediment:

1. S'inoculava una colònia fresca de la soca corresponent de *S. cerevisiae* en 10 ml de medi YDP i es cultivava durant aproximadament unes 16 hores.
2. El cultiu es centrifugava a 3.000 x g durant 2 min i les cèl·lules es resuspenien en 1 ml d'aigua estèril per passar-les a un tub eppendorf.

3. Les cèl·lules es resuspenien en 200 µl de TNST i 200 µl de FC, i tot seguit s'hi afegien 200 µl de boles de vidre (400-600 µm de diàmetre, de Sigma).
4. La barreja s'agitava amb el vòrtex a velocitat màxima durant 4 min.
5. Posteriorment, s'afegia 200 µl de TE barrejant per inversió. La mescla resultant es centrifugava a 13.200 x g durant 5 min.
6. S'agafava el sobrenedant i es passava a un tub nou, al qual s'hi afegia 1 ml d'etanol 100%. Després de barrejar-ho per inversió, la mescla es centrifugava a 13.200 x g durant 5 min.
7. S'afegia 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 amb 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 4 min, o bé a temperatura ambient durant 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 un gel d'agarosa (Serva) al 0,8%, visualitzant les bandes amb "SYBR™ Safe" (Fisher), i comparant la intensitat de les bandes corresponents amb la intensitat de les bandes patró de quantitat coneguda.

6.2. TÈCNiques DE DNA RECOMBINANT

6.2.1. Amplificació i clonació de gens

Per a la clonació de gens de *S. cerevisiae*, s'amplificaven aquests (amb els oligonucleòtids adequats per cada cas) mitjançant PCR a partir del DNA genòmic de la soca d'interès de *S. cerevisiae* i es duïen 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 fragments de DNA obtinguts de les digestions, així com els productes de PCR, es purificaven utilitzant el sistema “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche) i eren valorats mitjançant electroforesi en un gel d’agarosa al 0,8%. Per determinar la mida aproximada dels fragments de DNA s’usava com estàndard “1 kb DNA Ladder” (Invitrogen). En les lligacions entre l’insert i el vector s’utilitzava l’enzim “T4 DNA ligasa” (Takara), seguint les instruccions del fabricant.

6.2.2. Substitució de promotors per recombinació homòloga

Per tal de substituir el promotor propi d’un gen pel promotor *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* s’amplificava per PCR a partir del plàsmid integratiu pCM224, de tal manera que els fragments de DNA resultants tinguessin en els dos extrems seqüències d’uns 45-48 pb homòlogues de zones de la regió promotora a substituir. Aquests fragments de DNA es purificaven i es valoraven com en l’apartat 6.2.1 de **Materials i Mètodes**. Els fragments de DNA es transformaven (veure apartat 6.2.8 de **Materials i Mètodes**) en la soca MML830, la qual porta el plàsmid integratiu pCM244 linealitzat amb *EcoRV* que restaura l’auxotròfia per leucina, i els transformants es seleccionaven per resistència a genètica. La capacitat de regular l’expressió del gen mitjançant doxiciclina s’anализava per Northern blot (apartat 6.5 de **Materials i Mètodes**).

6.2.3. Marcatge amb l’epítot HA

Pel marcatge del gen *ERO1* amb l’epítot HA es va utilitzar, per una banda, el plàsmid pMM17, que conté una seqüència codificant per 3HA en sèrie (més sis residus His), dos llocs de tall pels enzims *BamHI* i *PstI* i el marcador de selecció *LEU2*. D’altra banda, s’amplificava el gen d’interès i el seu promotor amb uns oligonucleòtids que portaven també el lloc de tall per aquests mateixos enzims de restricció. Després de digerir tant l’insert com el vector amb aquests enzims, ambdós es van relligar amb l’enzim “T4 DNA ligasa”. Seguidament, es van transformar les cèl·lules d’*E. coli* DH5 α amb el plàsmid obtingut, i es van analitzar els transformants per assegurar que contenien l’insert (apartat 6.2.6.2 de **Materials i Mètodes**). Els plàsmids amb l’insert d’interès obtinguts (apartat 6.2.6.1 de **Materials i Mètodes**) i seleccionats per treballs posteriors es van seqüenciar (en un equip “3100 Avant Genetic Analyser”, d’Applied Biosystems) al Servei de Proteòmica i Genòmica de la Universitat de Lleida per comprovar l’absència de mutacions addicionals. Finalment, es van transformar les soques de llevat d’interès.

6.2.4. Construcció de mutacions puntuals

A partir del gen *GRX6* amb la seqüència intacta clonada en pMM822 es va construir un plàsmid derivat d'aquest amb una mutació introduïda a la ORF (*GRX6**, pMM1067), mitjançant el mètode "ExSite" (Weiner i Costa, 1994). Els oligonucleòtids per l'amplificació per PCR i introducció de la mutació es van dissenyar d'acord amb la seqüència al voltant del punt on es volia fer el canvi de nucleòtid, sense que resultés alterat el producte de la traducció ni la resta del marc de lectura. La mutació es detectava gràcies a la creació d'un lloc de restricció i es confirmava per seqüenciació.

6.2.5. Selecció de mutants resistents a àcid 5-fluoroorotic

Es plaquejaven un total de 1×10^7 cèl·lules (portadores del marcador *URA3*) en medi SC amb FOA (0,5 mg/ml) i es seleccionaven les colònies que creixien després de quatre dies d'incubació a 30°C, indicatiu de la presència d'una mutació en el gen *URA3*.

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

6.2.6.1. MÈTODE DE LA "MINIPREP"

Per a la purificació de plàsmids amplificats en *E. coli* es partia de cultius de 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).

6.2.6.2. MÈTODE RÀPID DE LA "JETPREP"

Cada colònia transformant a analitzar s'inoculava en un tub eppendorf 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 BT (Tritó X-100 2%, pH 12,4 amb NaOH) al sediment de cèl·lules, sense resuspendre, i 50 µl més de fenol/cloroform. Aquesta barreja s'agitava vigorosament durant 30 segons. Les mostres es centrifugaven a 20.780 x g durant 5 min. Un total de 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 dels plàsmids després de la corresponent electroforesi.

6.2.7. 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 del 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 a l'expressió fenotípica de la resistència a l'antibiòtic. Els transformants es seleccionaven en medi LB que contenia ampicil·lina.

6.2.8. Transformació de *S. cerevisiae*

Per a 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 d'un cultiu de 10 ml de llevat en fase exponencial de creixement (aproximadament a una DO_{600} de 0,3 unitats). Les cèl·lules es recollien per centrifugació a $1.960 \times g$ durant 4 min a temperatura ambient, es rentaven amb aigua estèril, i es centrifugaven de nou en les mateixes condicions. El sediment es rentava amb 1 ml d'una solució d'AcLi 0,1 M i TE (Tris 10 mM, pH 8 i EDTA 1 mM, pH 8) i es centrifugava a $12.290 \times g$ durant 5 segons. A continuació, les cèl·lules es resuspenien amb 50 μ l de la mateixa solució, a la qual s'afegia 5 μ l de DNA de cadena simple (ssDNA, a 10 mg/ml), 300 μ l de solució de polietilenglicol [TE, pH 8; AcLi 0,1 M; i polietilenglicol (PEG) 40%] i el DNA a transformar (800 ng per plàsmids integratius i 100 ng per plàsmids episomals o centromèrics). Aquesta suspensió s'homogeneïtzava completament i s'incubava amb 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 $17.700 \times g$ durant 5 segons i s'eliminava el sobrenedant. Quan la selecció dels transformants era per auxotròfia, 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 resistents. 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 *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 costat i transformant directament la soca receptora amb el producte amplificat (apartat 6.2.8 de **Materials i Mètodes**).

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

6.4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA UTILITZANT MICROORDENAMENTS DE DNA

Es va seguir el protocol descrit en Ferrezuelo i Futcher (2009), que explicarem en més detall a continuació.

6.4.1. Obtenció de mostres

Inicialment es precultivaven la soca salvatge i la soca d'interès en cultiu líquid, incubant amb agitació a 30°C durant 16 hores. Seguidament, es diluïen els cultius fins a una concentració d' $1,5 \times 10^6$ cèl·lules/ml i es deixaven créixer fins que arribessin a fase exponencial mitjana. A continuació, es recollien unes 6×10^8 cèl·lules per mostra per filtració, utilitzant filtres de nitrocel·lulosa (0,8 μm , *White AAWP*, 25 mm; de Millipore) i xeringues de 50 ml de capacitat (BD Plastipak). El filtre que retenia les cèl·lules es congelava ràpidament amb nitrogen líquid i es guardava a -80°C, o bé es mantenia a 0°C per continuar directament amb l'extracció del RNA.

6.4.2. Extracció del RNA total

Tot el material i les mostres es manipulaven amb guants. Per treballar en condicions lliures de RNases, es podia netejar la superfície de treball amb el detergent "RNase Zap[®] Wipes" (Life Technologies) si es creia convenient. El RNA total s'aïllava emprant el sistema "RiboPure[™]-Yeast" (Ambion), i la mostra obtinguda es tractava amb DNases, seguint les indicacions del fabricant. La concentració final de RNA es

MATERIALS I MÈTODES

determinava utilitzant l'equip "Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer" i la qualitat del RNA es comprovava per electroforesi en un gel d'agarosa a l'1%.

6.4.3. Síntesi del cDNA amb fluorocroms

A partir del RNA obtingut es sintetitzava el cDNA, incorporant durant el procés un nucleòtid modificat aminoalil-dUTP (aa-dUTP). Un total de 40 µg de RNA i 5 µg d'encebador oligo-dT s'incubaven 10 min a 72°C i després es refredaven en gel per evitar les estructures secundàries. A continuació s'afegia 6 µl de tampó 5 x "First Strand", 3 µl de DTT 0,1 M, 1,2 µl d'una barreja de 25 x dNTP/aa-dUTP (2 dTTP: 3 aa-dUTP) i 1,5 µl de transcriptasa reversa a 400 U/µl ("SuperScript™ Direct cDNA Labeling Core Kit", d'Invitrogen). La reacció s'incubava a 48°C durant 3 hores. El RNA restant s'eliminava mitjançant l'addició d'hidròxid de sodi seguit d'una incubació a 70°C durant 30 min. El cDNA amb l'aa-dUTP incorporat es purificava i s'acoblava als marcadors fluorescents Cy3 o Cy5 per reacció química. El cDNA acoblat als fluorocroms també es purificava. Les reaccions de purificació es realitzaven utilitzant el "PCR purification kit" (Qiagen). La incorporació del marcador fluorescent es valorava a l'equip "Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer" i mostrava aproximadament una relació d'un fluorocrom cada 20-30 nucleòtids. En aquest treball es van portar a terme quatre experiments. Per cada experiment, el cDNA obtingut a partir de les soques salvatge i mutant es marcava en paral·lel i s'intercanviaven els fluorocroms de les mostres entre experiments independents per compensar així possibles diferències degudes als fluorocroms.

6.4.4. Hibridació i rentats

Per a les hibridacions, 100 pmols de cDNA marcat amb Cy3 i 100 pmols de cDNA marcat amb Cy5 es resuspenien en un volum de 25 µl de solució d'hibridació [formamida al 30% (v/v), 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrat de sodi 75 mM, pH 7), SDS al 0,1%, ssDNA a 0,1 mg/ml i poli(A) a 0,08 mg/ml]. Les hibridacions es duïen a terme afegint la barreja esmentada entre la superfície del microordenament i un cobreobjectes de 22 x 25 mm (Erie Scientific) a 55°C en una cambra humida durant 16-20 hores.

Els microordenaments hibridats es rentaven dos vegades amb 2 x SSC (NaCl 0,3 M, citrat de sodi 30 mM, pH 7) i SDS 0,1% a 50°C de manera ràpida, dos vegades amb 2 x SSC i SDS 0,1% durant 10 min cada vegada a 50°C, dos vegades amb 0,1 x SSC (NaCl 15 mM, citrat de sodi 1,5 mM, pH 7) i SDS 0,1% durant 10 min cada vegada a

50°C, i quatre rentats ràpids amb 0,1 x SSC a temperatura ambient. Aquestes solucions es filtraven per evitar que el suport que conté el microordenament es contaminés amb artefactes que poguessin interferir amb la lectura a l'escàner de fluorescència. Els microordenaments resultants s'assecaven per centrifugació.

6.4.5. Escaneig dels microordenaments

Els microordenaments s'escanejaven mitjançant l'escàner "GenePix 4100A" (Axon Instruments, Inc) controlat pel "software GenePix Pro 5.1" (Axon Instruments, Inc).

6.4.6. Extracció de dades

Per obtenir les dades dels microordenaments, s'analitzaven en paral·lel les diferents imatges escanejades. Inicialment, la mida, localització i qualitat dels punts o "spots" es determinava automàticament per "GenePix Pro algorithms" (Axon Instruments, Inc). Tot i així, també es feia un control de qualitat manual de tots els "spots". Tot seguit, s'aplicava uns filtres automàtics per eliminar aquells "spots" que tenien menys de 100 píxels o un rati senyal/soroll de menys de tres en ambdós canals. Els paràmetres i valors de cada "spot" també eren calculats pel mateix programa "GenePix Pro" i exportats en un nou fitxer. El programa calculava per cada gen la raó entre la mediana dels píxels de cada canal.

Les dades obtingudes es van normalitzar mitjançant un mètode no lineal per blocs. Per això, es va utilitzar el servidor Web implementat per "GEPAS" (versió 3.1; Bioinformatics Department, CIPF, Valencia, Spain [<http://gepas3.bioinfo.cipf.es>]).

Per cada gen s'obtenia la mitjana de la raó normalitzada de cada un dels quatre experiments. Es considerava que un gen estava expressat diferencialment entre les dues soques quan el resultat del càlcul de la raó era major de 1 (en logaritme de base 2). Finalment, es va utilitzar la web de SGD (per "Saccharomyces Genome Database") per obtenir informació sobre els gens induïts o reprimits.

6.5. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER NORTHERN BLOT

6.5.1. Obtenció de mostres

S'inoculava la soca d'interès en un cultiu líquid i s'incubava amb agitació durant 16 hores a la temperatura indicada en cada cas. A partir d'aquest cultiu de nit, es reinoculava en medi fresc per obtenir el cultiu exponencial fins a una concentració de

1-2x10⁷ cèl·lules/ml. Sovint era necessària l'addició de compostos a assajar al medi de cultiu. Es recollien un mínim de 3x10⁸ cèl·lules per mostra, equivalent a unes 10 unitats de DO₆₀₀. Just després de recollir les cèl·lules, es centrifugaven a 3.000 x g durant 5 min i es rentaven amb aigua Milli-Q a 4°C. A continuació, o bé 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, com 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, de Roche): fragments Fab conjugats amb 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), pH 10 amb HCl 37%.
- CDP-StarTM (Roche): substrat de la ALPasa, la desfosforilació del qual dóna lloc a la formació d'un compost quimioluminescent.
- FC: fenol/cloroform/alcohol isoamílic 25:24:1 amb 0,1% 8-hidroxiquinolina i saturat de TE.
- Fenol àcid: fenol:aigua 3,75:1 (Invitrogen).
- MagicHyb: Na₂HPO₄ 250 mM, pH 7,2; EDTA 1 mM, pH 8,0; SDS 20%; Blocking Reagent 0,5%.
- Membrana de Niló (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%.

Es seguia el protocol indicat a continuació:

1. Es resuspenien les cèl·lules en 25 µl de TE i 25 µl de fenol àcid.
2. La barreja s'incubava a 65°C durant 2 min i posteriorment s'hi agregava un volum igual de boles de vidre.
3. Les cèl·lules es trencaven agitant la barreja amb el vòrtex a velocitat màxima durant 7 min.
4. S'afegien 600 µl de TES i 600 µl de fenol àcid, i després la barreja s'agitava amb 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 amb el vòrtex a velocitat màxima durant 30 segons. Seguidament la mostra s'incubava en gel 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 amb 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 des de 20 min a dues hores. Llavors 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.
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 l'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 (DO₂₆₀). La concentració es calculava tenint en compte que una unitat de DO₂₆₀ correspon aproximadament a 40 µg/µl de RNA. Si el valor del rati [DO₂₆₀/DO₂₈₀] 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 Digoxigenina-dUTP

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), amplificat 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 un gel d'agarosa al 0,8%. La qualitat de la sonda es verificava mitjançant “Dot-blot”, que consistia en la fixació de dilucions seriadades 1:10 de la sonda a analitzar a la membrana de niló mitjançant l'equip Stratalinker 1:800 (Stratagen) irradiant amb llum ultravioleta (12.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$). 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 tenir una idea de la quantitat a emprar de la sonda nova en les posteriors hibridacions.

6.5.4. Electroforesi en un gel de formaldehid-agarosa

1. Es barrejava 0,8 g d'agarosa en 80 ml de 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 on hi havia els pintes que formaran els pous i aquesta es deixava solidificar durant aproximadament 45 min. Com a tampó per l'electroforesi s'utilitzava el NBC.
3. S'afegia de 5 a 10 μg de RNA total en un tub 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 llavors s'hi 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 d'agarosa 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 (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 llavors es cobria la càmera del "VacuBlot" amb aigua Milli-Q fins cobrir completament el gel. El RNA es transferia durant aquests 90 min.
7. Transcorregut aquest temps, es treia la membrana del "VacuBlot" i es col·locava sobre una safata coberta amb paper de filtre humit. La membrana s'exposava a l'equip "Stratalinker 1.800", que aplica llum ultraviolada ($12.000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) per fixar el RNA.
8. Usant un transiluminador UV convencional es verificava la transferència i la posició dels rRNA.
9. Per tal d'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 junt amb 7 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 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 fins un total de tres rentats.

6.5.7. Detecció per quimioluminescència

Aquests passos es realitzaven a temperatura ambient.

MATERIALS I MÈTODES

1. Es rentava la membrana dos vegades amb 50 ml de B1 durant 5 min.
2. Per bloquejar la membrana s'incubava en 50 ml de B2 amb agitació suau durant 60 min.
3. L'anticòs anti-DIG es diluïa en una proporció 1:15.000 en B2 i s'incubava amb 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 en 50 ml de B3 durant 5 min i després amb 1 ml de B3 que contenia el 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 [(senyal del mRNA d'interès-senyal del fons)/(senyal del mRNA del gen *SNR19*-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

Es partia de 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} . 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, o bé es congelaven amb nitrogen líquid i es conservaven a -80°C o bé es continuava amb l'extracció de la proteïna.

6.6.2. Extracció de proteïna

Les proteïnes s'extreien pel mètode de la urea. El sediment de cèl·lules es resuspenia en 15 µl d'urea 5M i s'escalfava 3 min a 90°C per tal d'afavorir la lisi cel·lular. Seguidament, s'afegia l'equivalent de dos volums de boles de vidre i la suspensió s'agitava vigorosament amb el vòrtex durant 7 min. A continuació, s'afegia 50 µl de SR (2% SDS i Tris-HCl 125 mM, pH 6,5), s'agitava 30 segons més, i es tornava a incubar a 90 °C durant 2 min. El lisat cel·lular es passava a un altre tub eppendorf, per eliminar

així les restes i els agregats cel·lulars, foradant el primer d'aquests tubs i centrifugant a baixa velocitat (3.070 x g durant 2 min). A continuació, la mostra es centrifugava a més velocitat (13.680 x 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. Electroforesi en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

S'agafava un total de 10 µg de proteïna per cada mostra i es portava a un volum final de 12 µl, on s'afegia 4 µl de 4 x SS (sacarosa 20% i blau de bromofenol 0,02%) amb β-mercaptoetanol (β-ME) 4%. Quan es treballava en condicions no reductives, no s'afegia β-ME a la mostra. 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. 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 es descriu en la **Taula 3**. Depenent de la mida de la proteïna a estudiar, es canviava el percentatge d'acrilamida/BIS-acrilamida del gel separador.

Taula 3. Composició dels gels de SDS-PAGE utilitzats.

GEL SEPARADOR			
	<u>10%</u>	<u>9 % no reductor</u>	<u>8%</u>
Acrilamida 40%	1,25 ml	1,35 ml	0,97 ml
BIS-acrilamida 2%	0,67 ml	0,36 ml	0,535 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	1,25 ml	1,5 ml	1,25 ml
H ₂ O	1,73 ml	2,69 ml	2,17 ml
SDS 10%	50 µl	60 µl	50 µl
Persulfat amònic 10%	40 µl	40 µl	25 µl
TEMED	5 µl	4 µl	5 µl
GEL EMPAQUETADOR			
	<u>5%</u>		
Acrilamida 40%	0,375 ml		
BIS-acrilamida 2%	0,2 ml		
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	0,75 ml		
H ₂ O	1,625 ml		
SDS 10%	30 µl		
Persulfat amònic 10%	20 µl		
TEMED	5 µl		

6.6.4. Transferència a una membrana de PVDF

Es mullava una membrana de difluorur de polivinilidè (PVDF, de Millipore) en metanol ràpidament, 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", de Biorad), seguint les instruccions del fabricant.

6.6.5. Immunodetecció

Procediment:

1. La membrana amb les proteïnes es bloquejava durant una hora en tampó B (llet en pols Molico 5% en TBST).
2. Es rentava la membrana tres vegades, 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 en 25 ml de tampó I (llet desnatada en pols al 0,25% en TBST) en el qual s'havia afegit l'anticòs primari desitjat.
4. Seguidament, es tornava a rentar la membrana una vegada durant 15 min, i una segona vegada durant 5 min, en abundant TBST.
5. La membrana es preincubava durant 10 min en tampó I.
6. Es tornava a incubar la membrana durant 30 min en 25 ml de tampó I, on 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 abundant TBST.
8. Finalment, s'incubava la membrana en 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".

Els anticossos primaris utilitzats en aquesta memòria van ser els següents: anti-Grx6 (1:500, procedent de conill i proporcionat per J. Hegemann, Universitat de Kaiserslautern, Alemanya), anti-CPY (1:500, procedent de ratolí, d'Invitrogen), anti-porina 1 (1:1000, procedent de ratolí, de Millipore), anti-hexoquinasa 1 (1:5000, procedent de conill, de Millipore), anti-HA (1:5000, procedent de rata, de Roche) i anti-Pdi1 (1:1000, procedent de conill i proporcionat per Jacob R. Winther, Universitat de Copenhagen, Dinamarca). Els anticossos secundaris emprats són els següents: anti-

IgG de conill-HRP (1:10.000, de Pierce), anti-IgG de ratolí-HRP (1:10.000, de Pierce) i anti-IgG de rata-HRP (1:10.000, de Millipore).

6.6.6. 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. AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE VACUOLES

L'aïllament i purificació de vacuoles es basa en protocols descrits per Conradt et al. (1992), Li et al. (2001), i Ohsumi i Anraku (1981), però amb algunes modificacions. Es partia d'un cultiu en fase de creixement exponencial. S'agafaven aproximadament 1×10^{10} cèl·lules, es centrifugaven, es resuspenien en 30 ml de tampó Tris-sulfat 0,1 M, pH 9,3 amb DTT 10 mM, i s'incubaven a 30°C durant 30 min. Les cèl·lules es rentaven dos vegades amb tampó fosfat potàssic 20 mM, pH 7,4 amb sorbitol 1,2 M, i es resuspenien en 4 ml d'aquest mateix tampó, més l'enzim Zymolyasa 20T (ICN) (3 mg per g de cèl·lules). La formació d'esferoplasts es controlava al microscopi òptic i una vegada formats, aquests es recuperaven per centrifugació a baixa velocitat (1.800 x g, 5 min), i es resuspenien en 3,5 ml d'una solució d'HEPES-KOH 10 mM, pH 6,8 i sorbitol al 0,2 M amb Ficoll 15%. Aquests esferoplasts es lisaven després de l'addició de dietilaminoetil-dextrà (DEAE-dextrà, de Sigma) a 50 µg/ml en la solució tampó HEPES/sorbitol amb Ficoll 15%. Els esferoplasts lisats es mantenien a 0°C durant 2 min i després a 30°C durant 5 min amb agitació suau. A continuació, s'afegia MgCl₂ a 1,5 mM i el lisat es transferia a un tub d'ultracentrífuga. Aquesta solució es cobria amb 3 ml de tampó HEPES/sorbitol amb Ficoll 8%, 4 ml de tampó amb Ficoll 4% i 1 ml de tampó sense Ficoll. Les mostres es centrifugaven a la ultracentrífuga a 110.000 x g durant 90 min amb el rotor Beckman SW55Ti. S'obtenien fraccions de 0,4 ml. Es separava una quarta part de cada fracció per precipitar les proteïnes amb acetona i posteriorment analitzar el fraccionament per Western blot, en gels de SDS-PAGE al 10%. En l'anàlisi per Western blot s'utilitzaven proteïnes reporteres de diversos compartiments: CPY per la vacuola, porina 1 per la mitocòndria i hexoquinasa 1 pel citosol. La resta de la mostra s'utilitzava per determinar la concentració intracel·lular de

fosfat (veure apartat 8.2 de **Materials i Mètodes**), o bé per determinar la concentració iònica per espectroscopia d'emissió òptica acoblada inductivament (ICP-OES, veure apartat 8.3 de **Materials i Mètodes**), en el compartiment vacuolar o l'anomenat compartiment extravacuolar/citosòlic. La fracció vacuolar es recollia a la interfase entre les concentracions de 0% i 4% de Ficoll.

8. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS QUÍMICS

8.1. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE CALCI INTRACEL·LULAR

La concentració de Ca^{2+} lliure al citosol cel·lular es determinava utilitzant la sal pentapotàssica indo-1 i mesurant fluorescència, tal i com es descriu en Halachmi i Eilam (1989, 1993), amb algunes modificacions. Es partia de cultius creixent en fase exponencial. Un total de 5×10^8 cèl·lules (equivalent a 15 unitats de DO_{600}) es recollien per centrifugació a $1.520 \times g$ durant 4 min, es rentaven tres vegades amb aigua Milli-Q i es resuspenien en 1 ml de solució d'incubació [àcid 3,3-dimetilglutaric (DMG) 10 mM, pH 4,5; KCl 50 mM; glucosa 100 mM]. Cada mostra es dividia en dos parts iguals, que s'incubaven amb i sense indo-1 (20 μM , de Sigma), sent la mostra sense indo-1 el control. La incubació es realitzava a 30°C durant 90 min. En aquest pas d'incubació, el pH àcid de l'ambient facilitava la internalització de l'agent indo-1 al compartiment citosòlic de la cèl·lula. Tot seguit, es recollien les cèl·lules per centrifugació a velocitat moderada ($850 \times g$ durant 3 min), es rentaven tres vegades amb tampó D (DMG 10 mM, pH 4; EDTA 0,1 mM) i es resuspenien finalment en un total de 500 μl d'aquest mateix tampó per mesurar la fluorescència emesa. Les mostres es mantenien en fred fins al moment de la mesura de fluorescència (des de 15 min a un màxim d'una hora). Abans de mesurar, però, s'igualava la quantitat de cèl·lules de cada mostra i condició amb tampó D, de manera que a l'agafar 100 μl de mostra per mesurar fluorescència correspongués a un total de 1,5 unitats de DO_{600} de cèl·lules. La mesura es realitzava en una placa de 96 pouets ("Microtiter™ 96-well Assay Plate, Optilux™ White/Clear Bottom, TC Surface, Sterile, With Lid", de BD Falcon™), utilitzant el programa "I-control 1.4 (for infinite Reader)" acoblat a l'aparell que mesura la fluorescència ("Infinite M200", de TECAN). Per cada mostra, s'obtenia l'espectre d'emissió a 410 nm (quan indo-1 forma un complex amb Ca^{2+}) i a 480 nm (quan indo-1 es troba en estat lliure), excitant a una longitud d'ona de 355 nm. Posteriorment, es calculava el rati de

fluorescència 410/480 nm d'acord amb el protocol descrit en Gryniewicz et al. (1985). Els valors es relativitzaven respecte al valor unitat donat a la soca salvatge. En alguns casos, les 1,5 unitats de DO_{600} de cèl·lules es tractaven amb DEAE-dextrà (2 mg/ml, concentració final) durant 2 min, fet que permeabilitzava les membranes vacuolars i permetia mesurar el Ca^{2+} cel·lular total (Halachmi i Eilam, 1989).

8.2. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE FOSFAT INTRACEL·LULAR

El fosfat inorgànic es va mesurar per un mètode basat en la reactivitat al molibdat, tal i com es descriu en Reddi et al. (2009).

Inicialment, es feia una corba patró a partir de concentracions conegudes de fosfat. Per això, es preparaven 8 dilucions d'àcid fosfòric, des de 0,08 mM a 0 mM, en un total de 3 ml. A cada una d'aquestes dilucions s'afegia llavors 1 ml de NaCl 0,1 M; 0,5 ml de H_2SO_4 0,5 M; 0,5 ml de molibdat amònic ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot H_2O$) 50 mM; i 3 ml de 1-butanol. Aquesta barreja s'agitava amb el vòrtex cada vegada després de l'addició dels diferents reactius, resultant en dues fases de color groguenc. A un altre tub, es passava 2 ml de la fase superior i es barrejava amb 1 ml de $SnCl_2 \cdot H_2O$ 9 mM (es preparava al moment ja que s'oxida molt ràpid). La barreja s'agitava i es deixava separar en dues fases, aquest cop de color blavós. La fase superior es mesurava a l'espectrofotòmetre, a una densitat òptica de 700 nm (DO_{700}). El valor corresponent al tub sense àcid fosfòric s'utilitzava com a blanc de la mesura.

Per a l'obtenció de les mostres problema a mesurar, es partia de 10 ml d'un cultiu creixent en fase exponencial a una DO_{600} de 1,0 (medi YPD). El cultiu es rentava dues vegades amb aigua Milli-Q i es resuspensia en 500 μ l de Tritó X-100 0,1%. Tot seguit, aquest volum es dividia en dos eppendorfs per tal de facilitar el lisat, on s'hi afegien les boles de vidre, i s'agitava amb el vòrtex durant 7 min, comprovant el trencament al microscopi. Llavors, la totalitat de la mostra es passava a un altre eppendorf fent un forat al primer amb una agulla incandescent i centrifugant a 3.000 x g durant 2 min. Finalment, les mostres s'ajuntaven altra vegada i el conjunt es centrifugava a 14.500 x g durant 15 min. Es mesurava la concentració de proteïna d'acord amb l'assaig descrit en l'apartat 6.6.2 de **Materials i Mètodes**. Per a la mesura de fosfat intracel·lular en forma d'ortofosfat, s'agafava 30 μ g de proteïna de cada mostra, o de la fracció cel·lular (vacuolar o extravacuolar/citosòlic), i es portava a un volum final de 3 ml amb aigua Milli-Q. A partir d'aquí, es continuava l'assaig igual que amb les dilucions d'àcid fosfòric

de la corba patró, i finalment s'obtenia el valor de la mesura espectrofotomètrica. Per mesurar el fosfat intracel·lular total (ortofosfat i poliP), es tractava la fracció cel·lular amb àcid sulfúric 2 M a 100°C durant 10 min abans de l'anàlisi. Finalment, els nivells de poliP s'obtenien de la diferència entre els nivells de fosfat totals menys els nivells d'ortofosfat.

8.3. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS D'ALTRES IONS INTRACEL·LULARS

La concentració intracel·lular d'altres ions inorgànics es va determinar per ICP-OES, com es descriu en Cronin et al. (2002) i Eide et al. (2005), amb algunes modificacions. Per això, abans de començar, tot el material a utilitzar es rentava amb una solució de HNO₃ 5%, i s'esbandia després amb aigua Milli-Q. Es determinava la concentració intracel·lular de diversos ions en les fraccions vacuolars i extravacuolars/citosòliques obtingudes (veure apartat 7 de **Materials i Mètodes**). Per això, es partia de 75 µg de proteïna, i el volum de cada mostra s'igualava amb el Ficoll corresponent (0-4% o 15%) segons la fracció, sent del 0-4% de Ficoll per a la fracció vacuolar i del 15% de Ficoll per a la fracció extravacuolar. Tot seguit, s'afegia el volum d'àcid nítric necessari perquè aquest quedés a una concentració final del 30% en un volum final de 500 µl. Aquesta barreja s'incubava a 65°C, durant tota la nit, en un bany d'aigua. Posteriorment, s'hi afegia 500 µl d'aigua Milli-Q i la barreja resultant s'agitava vigorosament amb el vòrtex. Els anàlisis es van dur a terme al servei d'Anàlisi Elemental (Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Lleida), utilitzant un espectrofotòmetre ICP-OES (Horiba Scientific). Les solucions de Ficoll al 0-4% o al 15% s'utilitzaven com a blanc de la fracció vacuolar o extravacuolar, respectivament.

9. DETERMINACIÓ DE L'ESTAT REDOX DE LES PROTEÏNES

Per la determinació de l'estat redox de les proteïnes Ero1-HA i Pdi1, es va elaborar un protocol a partir d'un seguit de modificacions dels protocols descrits en Delaunay et al. (2002), Frand i Kaiser (1998), Kumar et al. (2011), Sevier et al. (2007) i Xiao et al. (2004).

Per obtenir les mostres en què es va determinar l'estat redox, es partia de cultius en fase de creixement exponencial. Un total de 6 unitats de DO_{600} de cultiu en fase de creixement exponencial (aproximadament 2×10^8 cèl·lules) s'afegien a un tub que contenia 2 ml d'àcid tricloroacètic (TCA) 100%, prèviament col·locat en gel. Les cèl·lules es centrifugaven a 4°C i el sediment de cèl·lules resultant es resuspenia en 100 μl de TCA 20%, al qual s'afegien les boles de vidre per lisar les cèl·lules, alternant l'agitació amb el vòrtex (un total de 5-7 min) amb el manteniment de la mostra en gel. Un cop lisades les cèl·lules, la totalitat de la mostra es passava a un eppendorf nou, i les boles de vidre restants es rentaven amb 100 μl de TCA 5% dues vegades, volum que també s'afegia a l'anterior. La mostra es deixava 20 min en gel per precipitar la proteïna. Seguidament, aquests extractes cel·lulars es centrifugaven a $16.000 \times g$ durant 3 min a 4°C , i el sediment resultant es rentava amb 200 μl d'acetona freda, per eliminar les restes de TCA. Aquest rentat es repetia dues vegades més. Finalment, es deixava assecar el sediment a temperatura ambient.

Amb aquestes mostres es realitzaven 4 tractaments en paral·lel. En el primer tractament, es resuspenia la mostra en 70 μl de tampó de solubilització (TS) [Tris-HCl 200 mM, pH 8, SDS 3% i fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM] contenint iodoacetamida (IAM, de Sigma) a 14 mg/ml, s'incubava 20 min a 25°C i es centrifugava a $16.000 \times g$ durant 5 min. En el segon tractament, es resuspenia la mostra inicialment en 100 μl de TS contenint DTT 50 mM, s'incubava 1 hora a 37°C , es precipitava la proteïna afegint TCA 10%, es centrifugava a $16.000 \times g$ durant 3 min a 4°C , i es feia tres rentats amb acetona; a continuació es resuspenia aquesta mateixa mostra en 40 μl de TS contenint àcid 4-acetamido-4'-maleimidilstilbene-2,2'-disulfonic, sal dissòdica (AMS, de Fisher) a 15 mM, s'incubava 2 hores a 37°C , i finalment es centrifugava a $16.000 \times g$ durant 5 min. En el tercer tractament, es resuspenia la mostra directament en 40 μl de TS amb AMS 15 mM, s'incubava 2 hores a 37°C i es centrifugava a $16.000 \times g$ durant 5 min. Finalment, en el quart tractament, es resuspenia la mostra en 70 μl de TS modificat (tampó fosfat 100 mM, EDTA 0,1 mM, SDS 3%, 1 mM PMSF) contenint 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic àcid) (DTNB, d'Aldrich) a 2 mg/ml, s'incubava 30 min a temperatura ambient i es centrifugava a $16.000 \times g$ durant 5 min.

Del sobrenedant obtingut després de les centrifugacions que seguien els diferents tractaments, es carregava una quantitat equivalent de proteïna en un gel de SDS-PAGE al 9% en condicions no reductores, i es seguia el protocol de Western blot (des

MATERIALS I MÈTODES

de l'apartat 6.6.4 en endavant de **Materials i Mètodes**) per a detectar les proteïnes d'interès amb els anticossos anti-HA i anti-Pdi1.

10. MESURA DE L'ESTAT REDOX DEL RE EN TEMPS REAL

L'estat redox al lumen del RE es va mesurar segons es descriu en Merksamer et al. (2008), utilitzant una variant de la proteïna fluorescent GFP, localitzada al RE i sensible a l'estat redox, expressada a partir del plàsmid pPM28 (GFP*). Per això, es partia de cultius creixent exponencialment en medi SC, suplementat amb els quatre aminoàcids essencials (adenina, triptòfan, leucina i histidina) menys uracil, i a la temperatura que s'indica en l'apartat 12 de **Resultats**. Les mesures de fluorescència per excitació a 488 nm i 405 nm es feien durant un total de 3 hores, en l'aparell "BD FACSCanto™ II Flow Cytometer, de BD Biosciences" (Servei de Citometria de Flux, IRBLleida).

11. ASSAIG DE L'ACTIVITAT β -GALACTOSIDASA

Per aquest assaig es seguia els protocols descrits en Guarente (1983) i Zhang et al. (1991), amb algunes modificacions.

Es partia de cultius exponencials de soques de llevat transformades amb els plàsmids pAMS366 i pAMS364 (Stathopoulos i Cyert, 1997), els quals portaven el gen reporter *lacZ* que codifica per la proteïna β -galactosidasa. 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 tampó Z (fosfat sòdic 120 mM, pH 7,0; KCl 10 mM; $MgSO_4$ 1 mM; β -ME 30 mM), i tot seguit s'afegia 67 μ l de cloroform i 45 μ l de SDS 0,1%, i s'agitava amb el vòrtex a velocitat màxima durant 10 segons. Les mostres es preincubaven a 28°C durant 5 min. La reacció s'iniciava amb l'addició de 0,2 ml del substrat sintètic de la β -galactosidasa o-nitrofenil- β -D-galactosidasa (ONPG, de Sigma), a 4 mg/ml en tampó Z, el qual després de ser hidrolitzat per l'enzim alliberava el producte o-nitrofenol de color groguenc. La reacció s'aturava amb l'addició de 0,5 ml de Na_2CO_3 1 M quan la mostra aconseguia aquest

color groc pàl·lid, anotant el temps que transcorria des de l'inici de la reacció fins al final d'aquesta. Posteriorment, s'eliminava les restes cel·lulars per centrifugació a $17.700 \times g$ durant 10 min, i es mesurava la densitat òptica a 420 nm (DO_{420}) del sobrenedant com a indicador de la concentració del producte de la reacció. La unitat d'activitat β -galactosidasa es calculava com $[DO_{420}]/[DO_{600} \text{ del cultiu} \times \text{volum de cultiu utilitzat en l'assaig (ml)} \times \text{temps transcorregut en l'assaig (min)}]$.

Quan es mesurava l'activitat enzimàtica dels cultius després d'un tractament amb $CaCl_2$, aquest tractament s'aturava de manera immediata per immersió dels cultius en gel.

12. TRACTAMENT D'EXTRACTES PROTEICS AMB ENDOGLICOSIDASA H

Per tal d'eliminar els N-oligosacàrids de la proteïna d'interès, es tractaven els extractes proteics totals amb l'enzim endoglicosidasa H (endoH). Amb aquest objectiu, es partia d'un total de 10 unitats de DO_{600} de cultiu en fase de creixement exponencial (aproximadament 3×10^8 cèl·lules), a la temperatura indicada en cada cas. Les cèl·lules es resuspenien en 50 μ l de tampó de lisi BL [Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM, SDS 1%, i un còctel d'inhibidors de proteases ("cComplete, EDTA-free", de Roche)]. En aquesta solució, s'afegien dos volums de boles de vidre per lisar les cèl·lules mecànicament agitant amb el vòrtex un total de 12 min. Durant la ruptura de les mostres, aquestes s'anaven calentant a 95°C durant 1 minut (3-4 vegades) per assegurar la desnaturalització de les proteïnes. A continuació, s'afegia 150 μ l de tampó de l'enzim endoH (PBS 50 mM, pH 5,5; β -ME 50 mM, inhibidors de proteases) i es tornava a agitar la barreja un minut més. El lisat cel·lular es centrifugava durant 5 minuts a $5.000 \times g$. Del sobrenedant, s'agafaven 10 μ l de l'extracte proteic i es portaven a un total de 18 μ l amb tampó endoH, en el cas de la mostra control no processada, i en paral·lel uns altres 10 μ l de l'extracte es barrejaven amb 3 μ l (equivalent a 15 mU) d'endoH (Roche) i aquests també es portaven a un total de 18 μ l amb el tampó de l'enzim, en el cas de la mostra processada. Aquestes mostres s'incubaven a 37°C durant 16 hores. Passat aquest temps, les mostres es barrejaven amb tampó de càrrega i es bullien 2 min a 95°C . Seguidament, les mostres es carregaven en un gel de SDS-PAGE al 8% per la posterior electroforesi, transferència i detecció per Western blot (apartat 6.6 de **Materials i Mètodes**).

13. MARCATGE RADIOACTIU DE PROTEÏNES (POLS I CAÇA)

Els experiments de marcatge radioactiu i posterior immunoprecipitació es basen en els protocols descrits en Frand i Kaiser (1998) i Xiao et al. (2004), en els quals es va introduir certes variacions.

Es partia de cultius creixent exponencialment en medi SC, suplementat amb els cinc aminoàcids essencials (adenina, triptòfan, leucina, uracil i histidina), i a la temperatura que s'indica en cada cas (30°C o 36°C). Es recollien un total de 12 unitats de DO₆₀₀ (equivalent a unes 4x10⁸ cèl·lules), es rentaven dos vegades en medi SC preparat amb el Drop-out sense cisteïna ni metionina, i s'incubaven seguidament en 10 ml del mateix medi durant 30 min, i a la mateixa temperatura de creixement. A continuació, s'afegien 500 µCi d'una barreja de cisteïna/metionina marcada amb ³⁵S ("Easy Tag Express Protein Labelling Mix ³⁵S", de Perkin Elmer). El pols durava 5 o 6 min (per una temperatura d'incubació de 36°C o 30°C, respectivament), moment en què s'addicionava una barreja dels aminoàcids cisteïna i metionina freds en excés (2 mM final cadascun) al cultiu, que frenava la incorporació de la radioactivitat. Tot seguit, es recollien 1x10⁸ cèl·lules de cada cultiu cada 7 minuts, considerant el temps 0 min els 30 segons després d'afegir la barreja de metionina i cisteïna fredes. Els tubs eppendorfs en què es recollien les mostres contenien azida sòdica (20 mM, concentració final) per aturar immediatament el metabolisme cel·lular i aquests es mantenien en fred fins acabar de recollir totes les mostres. Seguidament, es procedia al lisat de les cèl·lules i immunoprecipitació de la proteïna d'interès. Les cèl·lules marcades es rentaven amb aigua Milli-Q freda (600 x g durant 3 min) i es resuspenien en 100 µl de tampó de lisi BL [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM, SDS 1%, urea 6 M, i inhibidors de proteases]. Tot seguit, s'hi afegien les boles de vidre i les cèl·lules es trencaven mecànicament agitant amb el vòrtex durant un total de 12 min. Per facilitar la ruptura i assegurar la desnaturalització de les proteïnes, es combinava l'agitació amb el vòrtex amb l'escalfament de les mostres a 95°C durant 1 min (3-4 vegades). A *posteriori*, s'obtenia tot l'extracte proteic i es diluïa en un volum deu vegades més gran de tampó d'immunoprecipitació (IP) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 0,5%, i inhibidors de proteases). Paral·lelament a l'obtenció de la mostra, es preparaven les boles magnètiques ("Protein G dynabeads", de Lifetech) (35 µl de boles magnètiques per IP) en un volum quatre vegades més gran de tampó fosfat (pH 7), i s'incubaven en aquest mateix tampó amb l'anticòs anti-CPY durant 15

minuts a temperatura ambient (3 µg d'anticòs anti-CPY per IP). A continuació, es sedimentava les boles magnètiques associades a l'anticòs, s'eliminava el tampó fosfat i s'afegia l'extracte proteic. La barreja s'incubava a 4°C durant 2 hores amb agitació suau. Passat aquest temps, es sedimentaven les boles magnètiques associades a l'anticòs i s'eliminava el sobrenedant. Aquestes boles es rentaven tres vegades amb el mateix tampó IP i seguidament es resuspenien en 15 µl de tampó IP més 15 µl de tampó de càrrega (SDS 4% en Tris-HCl 250 mM, pH 6,8; sacarosa 10%; blau de bromofenol 0,01%; β-ME 2%). La mostra s'escalfava a 95°C durant 2-3 min per ajudar a eluir el material immunoprecipitat. Finalment, tot el volum de la mostra es carregava en un gel de SDS-PAGE al 8%. Després de l'electroforesi, el gel s'assecava en un aparell de buit ("Slab Gel Dryer SGD4050", de Savant) i s'exposava en contacte amb un film ("Fuji Medical X-Ray film Super RX 100 NIF 18 x 24", de Rosex Medical) entre set i deu dies. Finalment, el film es revelava en l'equip "Optimax X-ray film processor" (Protec GmbH), i la imatge resultant es quantificava mitjançant el programa "ImageJ".

14. ANÀLISI ESTADÍSTIC MITJANÇANT EL PROGRAMA JMP11

Es recollien les dades corresponents a un mínim de tres experiments independents. Aquestes s'analitzaven estadísticament amb l'ajut del programa JMP11 (Statistical Software). Per això, es comparava cada parell de soques mitjançant la *t*-Student, per determinar la probabilitat *p* de que un valor sigui diferent al proposat per la hipòtesi nul·la. Quan la comparació entre dues soques donava un valor *p* < 0,001, la diferència era considerada com estadísticament molt significant, i això es representava al gràfic com ***, quan el valor *p* era < 0,01 com **, i quan el valor *p* era < 0,05 com *.

IV. RESULTATS

1. EL MUTANT $\Delta grx6\Delta grx7$ MOSTRA UNA INDUCCIÓ CONSTITUTIVA DE GENS INVOLUCRATS EN L'HOMEÒSTASI DEL FOSFAT I EN SECRECIÓ I COMPARTIMENTALITZACIÓ DE PROTEÏNES

Per tal d'avançar amb la caracterització funcional de Grx6 i Grx7, iniciada tant per aquest mateix laboratori (Izquierdo et al., 2008) com per altres autors (Mesecke et al., 2008b), es van realitzar anàlisis transcriptòmics de la soca mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892), mancada de les dues GRXs, comparada amb la soca salvatge W303-1A, creixent exponencialment ambdues en medi YPD líquid a 30°C, segons es descriu en l'apartat 6.4 de **Materials i Mètodes**. Els resultats mostrats aquí corresponen a la mitjana de quatre experiments independents.

Considerant el transcriptoma global de les dues soques comparades, un total de vint-i-sis gens estaven induïts constitutivament almenys dues vegades més en el mutant en comparació amb la soca salvatge, mentre que un total de set gens estaven reprimits també dues vegades o més en el mutant [Taula 4 i 5].

Taula 4. Gens induïts constitutivament almenys dues vegades en el mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ en comparació amb la soca salvatge.

Nom del gen	Inducció mutant/salvatge (Log ₂)	Descripció (segons SGD, http://www.yeastgenome.org)
<i>PHO89</i>	2,10	Co-transportador Na ⁺ /Pi, actiu en fase de creixement exponencial. Regulat per la concentració de Pi i el factor de transcripció Pho4.
<i>PHO5</i>	1,64	APasa reprimible que regula la hidròlisi de fosfat extracel·lular. Glicoproteïna de la superfície cel·lular processada a través de la via secretora. Induïda per la manca de fosfat i regulada de manera coordinada per <i>PHO4</i> i <i>PHO2</i> .
<i>PHM6</i>	1,46	Proteïna de funció desconeguda, l'expressió de la qual està regulada pels nivells de fosfat.
<i>CSM1</i>	1,30	Proteïna nucleolar que forma un complex amb Lrs4 i Mam1 als cinetocors durant la meiosi i ajuda a una segregació homòloga acurada.
<i>OCA4</i>	1,25	Proteïna citoplasmàtica necessària per la replicació del virus del mosaic <i>Brome</i> en <i>S. cerevisiae</i> .

RESULTATS

<i>ATG15</i>	1,25	Lipasa necessària per la lisi intravacuolar de cossos autofàgics i altres cossos provinents del citosol cel·lular. Proteïna dirigida cap a les vesícules intravacuolars durant l'autofàgia a través de la via mitjançada per cossos multivesiculars (MVB).
<i>PHO11</i>	1,23	APasa reprimible que regula la hidròlisi de fosfat extracel·lular. Induïda per la manca de fosfat i regulada de manera coordinada per <i>PHO4</i> i <i>PHO2</i> . Paràloga de <i>PHO12</i> .
<i>YCR087C-A</i>	1,22	Proteïna putativa de funció desconeguda. La fusió amb GFP es localitza al nuclèol.
<i>SSK22</i>	1,21	MAP quinasa quinasa quinasa de la via de senyalització activada pel mitògen Hog1. Interacciona i és activada per Ssk1 i fosforila Pbs2. Paràloga de <i>SSK2</i> .
<i>THR4</i>	1,14	Treonina sintetasa, proteïna conservada que catalitza la formació de treonina a partir de O-fosfohomoseïna. La seva expressió està regulada per la via de control general d'aminoàcids, a través de Gcn4.
<i>PAT1</i>	1,13	Factor de decapitació del mRNA depenent de la deadenilació. Associat a la topoisomerasa II. Necessari per una transmissió cromosòmica adequada, manteniment de l'estabilitat del locus rDNA, i protecció de l'extrem 3'-UTR dels mRNA.
<i>ERS1</i>	1,09	Proteïna similar a la cistinosina humana, que és un transportador que utilitza el gradient de protons per exportar la L-cistina dels lisosomes.
<i>IMG1</i>	1,08	Proteïna de la subunitat gran ribosomal mitocondrial, necessària per la respiració i el manteniment del genoma mitocondrial.
<i>SOL2</i>	1,06	Proteïna amb un possible paper en l'exportació del tRNA. Paràloga de <i>SOL1</i> .
<i>ARE1</i>	1,06	Aciltransferasa d'acil-coenzimA:esterol. Enzim del RE que aporta la principal activitat d'esterificació d'esterols en absència d'O ₂ . Paràloga d' <i>ARE2</i> .
<i>PHO3</i>	1,04	APasa expressada constitutivament, similar a Pho5. Secretada a la superfície cel·lular a través del transport vesicular. Hidrolitza els fosfats de tiamina de l'espai periplàsmic, incrementant l'obtenció de tiamina cel·lular.
<i>IMG2</i>	1,04	Proteïna de la subunitat gran ribosomal mitocondrial.
<i>HCM1</i>	1,04	Factor de transcripció <i>forkhead</i> que regula l'expressió de gens específics de la fase S involucrats en la segregació de cromosomes i la gemmació. També presenta un paper en el manteniment dels telòmers. Supressor dels mutants en la calmodulina.
<i>YIH1</i>	1,03	Proteïna que inhibeix l'activació de la quinasa de l'eIF2 Gcn2.
<i>CPR4</i>	1,03	Isomerasa cis-trans de peptidil-prolil (ciclofilina), catalitza la isomerització cis-trans de la unió peptídica N-terminal en residus prolina. Té un paper potencial en la via secretora.
<i>BUD23</i>	1,03	Metiltransferasa, metila residus G1575 de rRNA 18S, necessària pel processament del rRNA i l'exportació nuclear de les subunitats 40S del ribosoma independentment de l'activitat de metilació.
<i>PHO12</i>	1,02	APasa reprimible. Glicoproteïna que és transportada a la superfície cel·lular a través de la via secretora. Està induïda per la manca de fosfat. Paràloga de <i>PHO11</i> .
<i>YCR061W</i>	1,01	Proteïna de funció desconeguda. La fusió amb GFP es localitza al citosol cel·lular. Induïda per tractaments amb radiació ultraviolada.

<i>ARG1</i>	1,00	Sintetasa d'arginosuccinat, catalitza la formació de L-arginosuccinat a partir de citrul·lina i L-aspartat en la via de biosíntesi d'arginina.
<i>YCR045C</i>	1,00	Proteasa de la família de la subtilisina amb un paper en la formació d'una capa de tirosina a la paret de l'espore. Es localitza a la paret de la espore i també en la membrana nuclear i el RE en les espores madures.
<i>PER1</i>	1,00	Proteïna del RE, necessària per l'activitat GPI-fosfolipasa A2.

Taula 5. Gens reprimits constitutivament almenys dues vegades en el mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ en comparació amb la soca salvatge W303-1A.

Nom del gen	Repressió mutant/salvatge (Log ₂)	Descripció (segons SGD, http://www.yeastgenome.org)
<i>MNN4</i>	-1,00	Regulador positiu de la manosilfosfat transferasa (Mnn6), involucrada en la manosilfosforilació de N-oligosacàrids.
<i>YJR028 W</i>	-1,00	Retrotransposó TYA
<i>SLM1</i>	-1,00	Proteïna d'unió a fosfatidilinositol 4,5-bifosfat. Forma un complex amb Slm2. Actua per sota de Mss4 a la via reguladora de l'organització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès. Està fosforilada pel complex TORC2.
<i>ADR1</i>	-1,00	Factor de transcripció amb dits de Zn responsable de la utilització de la font de carboni. Necessari per la transcripció del gen <i>ADH2</i> reprimat per la presència de glucosa, de gens que codifiquen per proteïnes peroxisomals, i de gens necessaris per la utilització d'etanol, glicerol i àcids grassos.
<i>YGR111 W</i>	-1,07	Proteïna de funció desconeguda. La fusió amb GFP es localitza en ambdós citosol i nucli de la cèl·lula.
<i>YBT1</i>	-1,11	Transportador de la família proteica amb mòduls d'unió a ATP (ABC).
<i>FRE7</i>	-1,61	Reductasa fèrrica amb similitud a Fre2. La seva expressió està induïda per baixos nivells de coure.

Per als estudis posteriors ens vam centrar bàsicament en els gens que es mostraven induïts, entre els quals predominen gens involucrats en el metabolisme del fosfat (*PHO89*, *PHO5*, *PHM6*, *PHO11*, *PHO3*, *PHO12*) o relacionats amb la secreció i compartimentalització de proteïnes (*ATG15*, *ARE1*, *CPR4*, *PER1*).

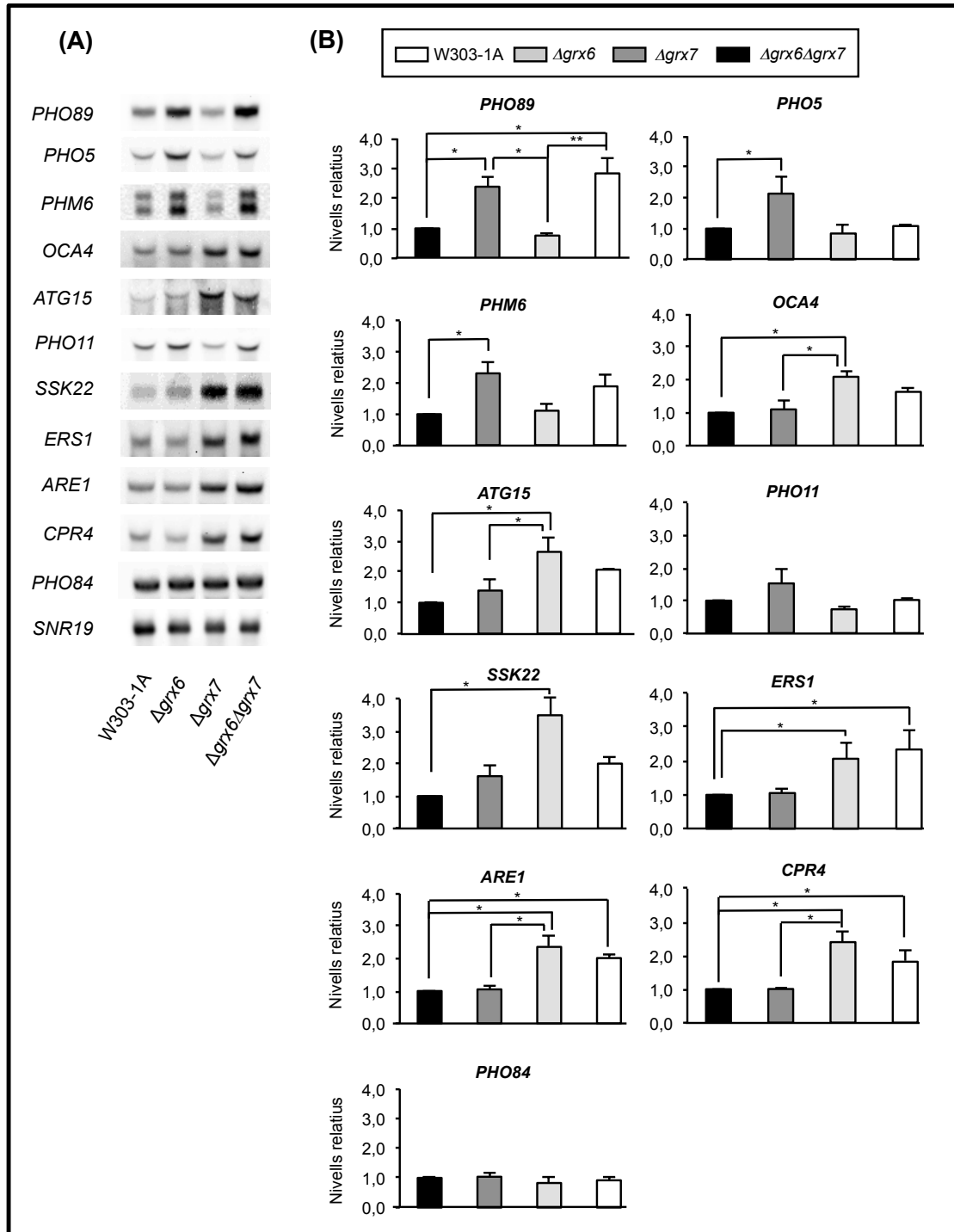


Figura 16. Anàlisi mitjançant Northern blot de l'expressió d'alguns dels gens induïts en l'estudi del transcriptoma [Taula 4] en soques deficientes en Grx6 i Grx7. **A)** Expressió dels gens indicats en les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887) i $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892), creixent exponencialment en medi YPD a 30°C. L'expressió del gen *SNR19* es va utilitzar com a control de càrrega. **B)** Quantificació de l'expressió dels gens anteriors. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats (eix y) respecte a la soca salvatge, a la qual se li ha atorgat el valor unitat.

Es van seleccionar alguns d'aquests gens induïts en el doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ per tal de confirmar l'augment de la seva expressió mitjançant Northern blot, estenent també l'estudi als mutants simples $\Delta grx6$ i $\Delta grx7$ [Figura 16A]. Els resultats indiquen que la inducció dels quatre gens analitzats involucrats en l'homeòstasi del fòsfat (*PHO89*, *PHO5*, *PHM6* i *PHO11*) és deguda a la mutació $\Delta grx6$, mentre que la inducció dels altres sis gens analitzats és conseqüència de la mutació $\Delta grx7$. Els gens *PHO89* i *PHO84* codifiquen pels dos transportadors de fòsfat d'alta afinitat en llevat (Mouillon i Persson, 2006; Persson et al., 2003). Donada la significativa inducció del gen *PHO89* en les soques $\Delta grx6$ i $\Delta grx6\Delta grx7$, es va voler comprovar també per Northern blot si l'expressió de *PHO84* estava afectada en absència de Grx6 i/o Grx7, tot i no aparèixer entre els gens induïts en l'estudi del transcriptoma [Taules 4 i 5]. Així, es va confirmar que l'expressió de *PHO84* no està alterada en els mutants [Figura 16A]. La Figura 16B mostra les dades quantitatives relatives de l'expressió dels gens estudiats en les quatre soques (relativitzades respecte a la soca salvatge), a partir de tres experiments independents. Els resultats confirmen la dependència diferencial de l'expressió dels gens analitzats respecte a les mutacions $\Delta grx6$ i $\Delta grx7$.

2. LA MANCA DE GRX6 NO CAUSA DEFECTES EN EL CREIXEMENT EN CONDICIONS DE BAIX FOSFAT

Donat que entre els gens induïts en el doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ destaquen nombrosos gens involucrats en el metabolisme del fòsfat i que la majoria d'aquests mostren una clara dependència de la mutació $\Delta grx6$ [Figura 16A i B], es va plantejar la possibilitat que la inducció constitutiva de gens de la via *PHO* fos deguda a un dèficit de fòsfat intracel·lular en absència de *GRX6*. Si així fos, caldria esperar que el mutant $\Delta grx6$ resultés sensible a baixos nivells de fòsfat en el medi, el què es manifestaria en forma de defectes pronunciats en el creixement en aquestes condicions.

En conseqüència, es van fer créixer tant la soca salvatge com el mutant $\Delta grx6$ en medi mínim preparat amb dos concentracions diferents de fòsfat: uns nivells considerats normals (7,3 mM) i uns nivells deficients en fòsfat (0,15 mM). Paral·lelament, com a control es van utilitzar també els mutants en els dos transportadors de fòsfat per la via d'alta afinitat ($\Delta pho89$ i $\Delta pho84$), així com els corresponents derivats $\Delta grx6$. La soca

RESULTATS

$\Delta pho84$ presenta baixos nivells de fosfat intracel·lular, és sensible a la manca de fosfat en el medi i té induïda la via *PHO* (Mouillon i Persson, 2006; Wykoff i O'Shea, 2001).

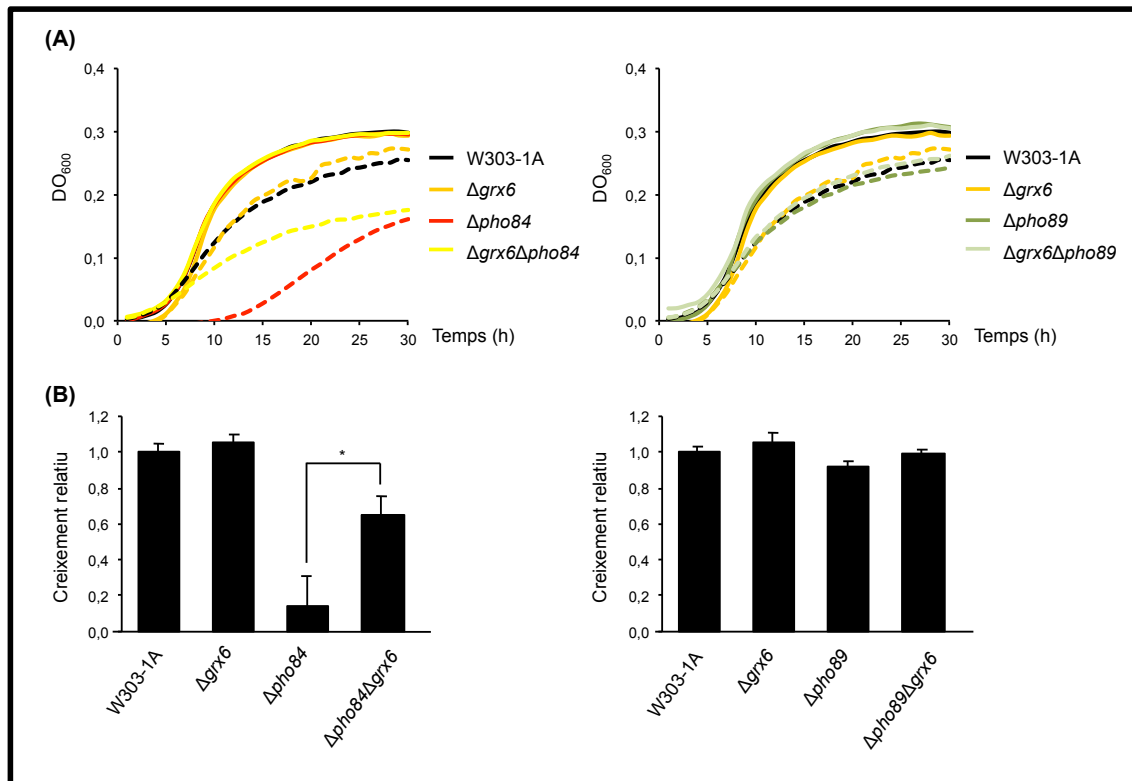


Figura 17. A) Creixement en medi mínim SD amb diferents concentracions de fosfat (7,3 mM o 0,15 mM, indicat amb línies contínues o discontinues respectivament) de la soca salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta pho84$ (MML1304), $\Delta pho89$ (MML1306), $\Delta pho84\Delta grx6$ (MML1337) i $\Delta pho89\Delta grx6$ (MML1313) a 30°C. **B)** Quantificació del creixement de les soques indicades en la part A, expressat com creixement de la soca en medi amb nivells deficientes de fosfat *versus* creixement en nivells normals de fosfat i relativitzat respecte a la soca salvatge (valor unitat), utilitzant les dades de DO₆₀₀ després de 15 hores de creixement del cultiu definint unes corbes com les de la part A. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d).

Els resultats mostren que la soca $\Delta grx6$ no presenta defectes en el creixement quan creix en un medi deficient en fosfat en comparació amb la soca salvatge [Figura 17A i B]. De la mateixa manera, ni el mutant $\Delta pho89$ ni el corresponent doble mutant $\Delta pho89\Delta grx6$ mostren problemes observables en el creixement. No obstant, mentre que el mutant $\Delta pho84$ presenta una clara afectació del creixement quan hi ha un dèficit important de fosfat en el medi extracel·lular, el doble mutant $\Delta pho84\Delta grx6$ rescata notablement aquest defecte de creixement. Això indica que la falta de *GRX6*

probablement no només no provoca una disminució dels nivells intracel·lulars de fosfat sinó que crea unes condicions intracel·lulars que faciliten el creixement d'una soca mancada de *PHO84* en condicions deficientes de fosfat. Així, la inducció d'alguns gens de la via *PHO* en la soca $\Delta grx6$ no seria deguda a uns baixos nivells de fosfat intracel·lular, sinó conseqüència probablement d'altres factors. Els resultats mostrats a la **Figura 17** respecte al doble mutant $\Delta pho84\Delta grx6$ podrien ser indicatius de l'acumulació d'un excés de fosfat intracel·lular quan falta Grx6.

3. LA VIA DE LA CALCINEURINA ESTÀ CONSTITUTIVAMENT INDUÏDA EN EL MUTANT $\Delta grx6$

L'expressió de *PHO89* i *PHM6*, però no de *PHO84*, també està induïda per un estrès per Ca^{2+} , de manera depenent de la via Crz1-calcineurina (Ruiz et al., 2008; Serrano et al., 2002; Yoshimoto et al., 2002). Addicionalment, anàlisis bioinformàtics realitzats pel nostre grup van mostrar que *THR4* i *CPR4*, dos altres gens induïts en el doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$, presenten el motiu consens CDRE (reconegut pel factor Crz1) als seus promotors. Aquestes observacions suggerien que la via de la calcineurina podria estar induïda en absència de Grx6 i/o Grx7.

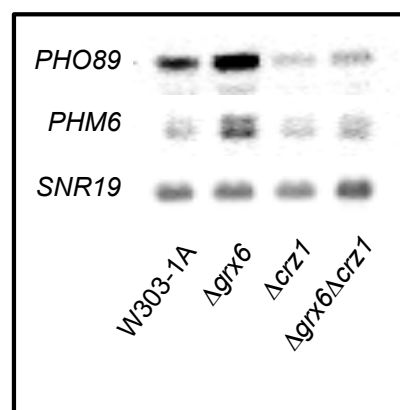


Figura 18. Anàlisi mitjançant Northern blot de l'expressió dels gens *PHO89* i *PHM6*, en cultius exponencials de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta crz1$ (MML871) i $\Delta grx6\Delta crz1$ (MML1351) en medi YPD a 30°C. L'expressió del gen *SNR19* es va utilitzar com a control de càrrega.

RESULTATS

En primer lloc, es va confirmar que la inducció de *PHO89* i *PHM6* està regulada per la via de la calcineurina, ja que la seva expressió depèn de la presència del factor de transcripció Crz1 [Figura 18]. A la vegada, la inducció d'aquests dos gens és considerablement major en el mutant $\Delta grx6$ que en la soca salvatge, indicant una possible inducció constitutiva d'aquesta via en absència de *GRX6*.

A continuació, per confirmar que la via de la calcineurina està induïda de manera general en aquestes condicions, es va determinar si l'expressió d'un gen reporter a partir d'un promotor sintètic dependent de Crz1 està constitutivament induïda en absència d'una o ambdues GRXs, utilitzant per això els plàsmids pAMS366 (amb la seqüència CDRE salvatge en el promotor dirigint l'expressió del gen reporter *lacZ*) i pAMS364 (control amb la seqüència CDRE mutada). El doble mutant $\Delta grx6\Delta crz1$ s'utilitzava com a control negatiu, ja que no expressa Crz1, el principal efector de la via de la calcineurina. La Figura 19A mostra que en absència de Grx6, però no de Grx7, el promotor que conté la seqüència CDRE intacta està induït. Donat que aquesta inducció depèn de la unió del factor Crz1 al promotor, els resultats indiquen que la via Crz1-calcineurina està constitutivament induïda en el mutant $\Delta grx6$. Aquests resultats corresponen a experiments realitzats en un medi amb concentracions normals de fosfat, però aquest mateix experiment es va realitzar també en un medi sintètic deficient en fosfat (0,15 mM). En aquestes altres condicions, el promotor amb la seqüència CDRE intacta es manté induït en absència de Grx6, de manera que aquesta inducció no depèn dels nivells extracel·lulars, ni probablement tampoc intracel·lulars, de fosfat [Figura 19A].

A més a més, donat que la via Crz1-calcineurina s'indueix per un estrès per Ca^{2+} , entre altres estressos ambientals, es van exposar les cèl·lules a una elevada concentració de Ca^{2+} durant 60 min. Aquest estrès per Ca^{2+} indueix fortament l'expressió del promotor amb la seqüència CDRE intacta per sobre dels nivells basals tant en la soca salvatge com en el mutant $\Delta grx7$, però no provoca una inducció addicional significativa sobre els alts nivells basals constitutius en la soca mutant $\Delta grx6$ [Figura 19B]. En altres paraules, l'activació constitutiva del promotor sintètic regulat per Crz1 quan manca Grx6 és comparable a la inducció d'aquest mateix promotor causada per un estrès per excés de calci en una soca salvatge.

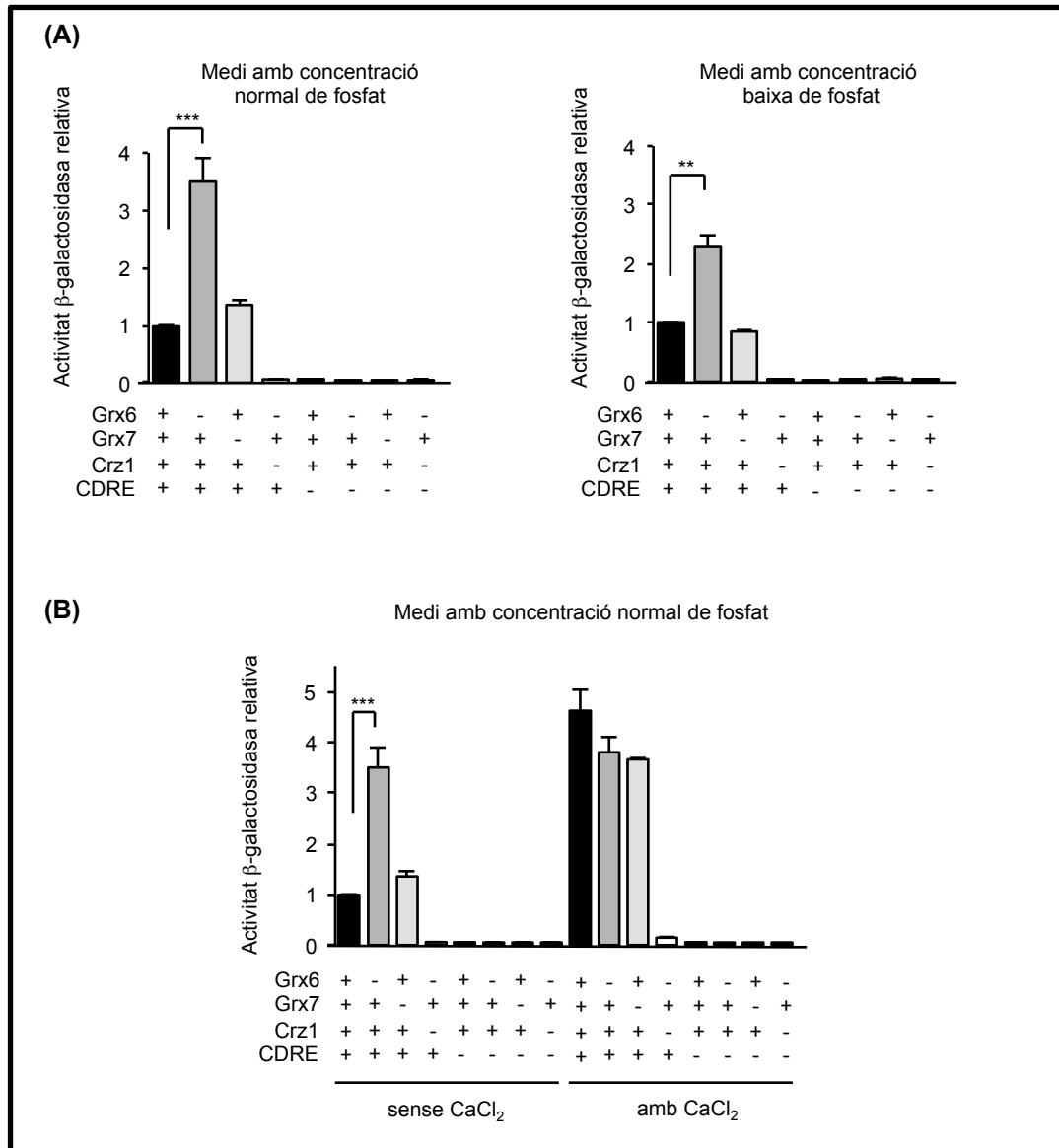


Figura 19. A) Anàlisi de l'expressió gènica depenent de la via de la calcineurina en soques deficientes en Grx6 i Grx7. Les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1365), $\Delta grx7$ (MML887) i $\Delta grx6\Delta crz1$ (MML1723) es van transformar amb el plàsmid reporter (amb el gen *lacZ*) pAMS366, que conté el motiu CDRE funcional (+), i amb el plàsmid pAMS364, que conté el motiu CDRE no funcional (-). Les mostres per determinar l'activitat β -galactosidasa s'obtenien de cultius exponencials en medi SD amb nivells normals de fosfat (7,3 mM) o en medi SD amb nivells baixos de fosfat (0,15 mM). **B)** Efecte de l'estrès per excés de calci en les soques analitzades en la part **A**. Els cultius exponencials dels transformants en medi SD amb nivells normals de fosfat es van dividir en dos meitats tractant una d'aquestes amb CaCl_2 (0,2 M) durant 60 min. L'activitat β -galactosidasa representada en aquests gràfics correspon a la mitjana de tres experiments independents. Les barres indiquen les mitjanes (\pm s.d), relativitzades respecte a la soca salvatge transformada amb el plàsmid pAMS366 en medi SD sense tractar amb CaCl_2 (valor unitat).

RESULTATS

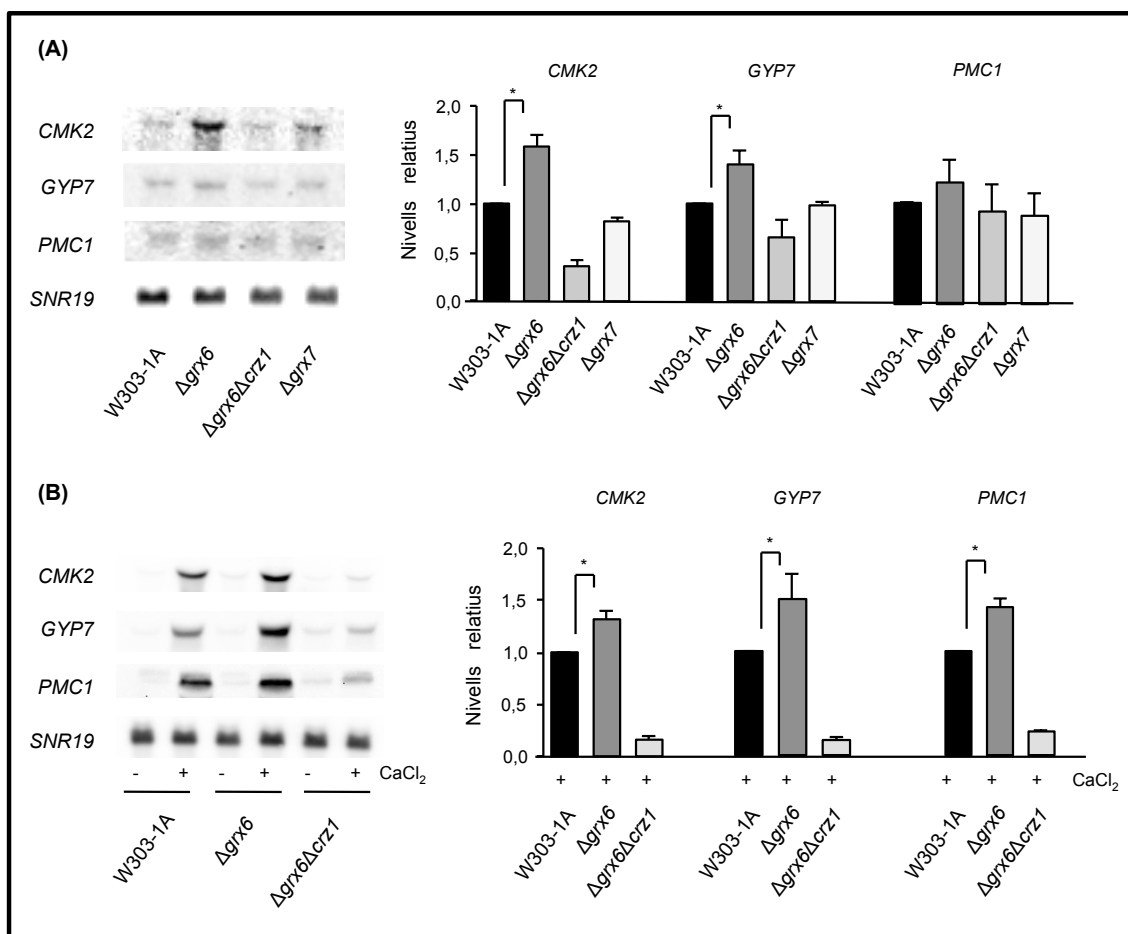


Figura 20. A) Imatge i quantificació de l'expressió dels gens indicats a partir de l'anàlisi per Northern blot, amb mostres de cultius exponencials de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887) i $\Delta grx6\Delta crz1$ (MML1351) en medi YPD a 30°C. Els valors quantitius estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat). **B)** Imatge (Northern blot) i quantificació de l'expressió dels gens indicats en condicions d'estrès per excés de calci. Els cultius exponencials de les soques anteriors en medi YPD es van dividir en dos meitats, tractant una d'aquestes amb CaCl₂ (0,2 M) durant 30 min. Per tal d'evitar la saturació de les senyals, les imatges corresponen a exposicions més curtes que en la part **A**. L'expressió de cada gen es va normalitzar utilitzant l'expressió del gen *SNR19* com a control de càrrega. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge sense tractar (valor unitat).

Finalment, mitjançant l'anàlisi per Northern blot, es va confirmar que tres gens que estan induïts per estrès per Ca²⁺ d'una manera dependent de la via Crz1-calcineurina (Yoshimoto et al., 2002) [*CMK2* (que codifica per una proteïna quinasa dependent de la calmodulina amb un paper en la resposta a estrès), *GYP7* (que codifica per una proteïna involucrada en la secreció proteica a través de vesícules), i *PMC1* (que codifica per l'ATPasa vacuolar transportadora de Ca²⁺, veure més detalls en l'apartat 4.1.1.3 de la **Introducció**)] també estan induïts constitutivament en les cèl·lules $\Delta grx6$ i

que aquesta inducció s'aboleix amb la mutació $\Delta crz1$ [Figura 20A]. Addicionalment, després d'exposar les diferents soques a un estrès per elevats nivells de Ca^{2+} durant 30 min, l'anàlisi per Northern blot indica que en les soques salvatge i $\Delta grx6$ els tres gens estan fortament induïts respecte als nivells basals i que aquesta inducció depèn de la via de la calcineurina [Figura 20B]. En aquest cas, l'expressió màxima dels tres gens en condicions d'estrès per calci és encara una mica superior en el mutant $\Delta grx6$ en comparació amb la soca salvatge.

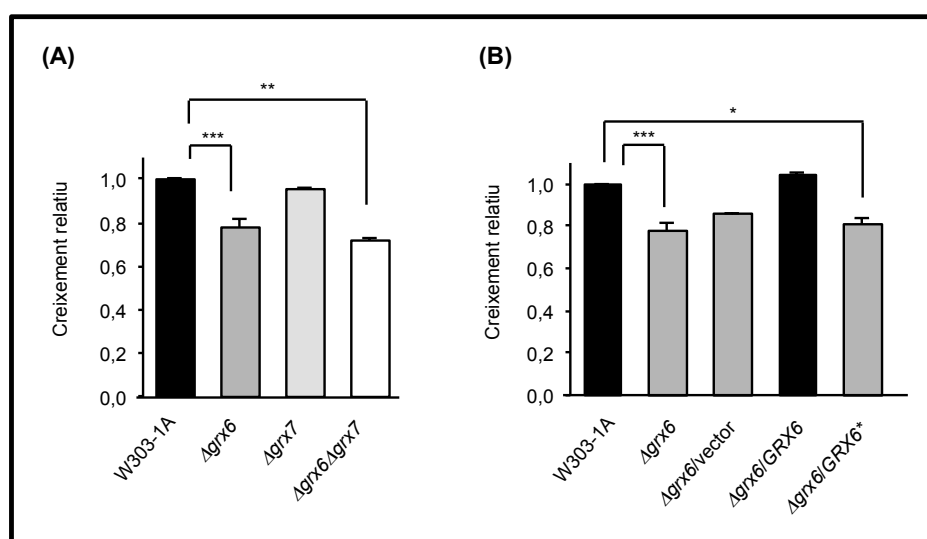


Figura 21. A) Efecte del tractament amb FK506 (2,5 $\mu\text{g/ml}$) de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887) i $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892), en cultius en medi YPD a 30°C. Les mesures de creixement (DO_{600}) es van fer a les 12 hores de tractament. Les barres corresponen a la mitjana de sis experiments independents (\pm s.d). **B)** Com en l'apartat **A**, amb la soca salvatge i el mutant $\Delta grx6$ no transformat o bé transformat amb els plàsmids integratius YIplac128 (vector sol), pMM1073 (expressa el gen *GRX6* salvatge) o pMM1071 (expressa el gen *GRX6** mutat en el centre actiu, substitució C136S). Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

Per tal de confirmar que la inducció constitutiva de la via de la calcineurina en les cèl·lules $\Delta grx6$ té un significat biològic, es va determinar la sensibilitat de la soca salvatge i les cèl·lules mutants a l'inhibidor de la calcineurina FK506. Els cultius dels mutants $\Delta grx6$ i $\Delta grx6\Delta grx7$ mostren un creixement defectiu quan es tracten amb FK506 comparats amb la soca salvatge i les cèl·lules $\Delta grx7$ [Figura 21A]. Tot i que les diferències en les soques portadores de la mutació $\Delta grx6$ són moderades, aquestes són estadísticament significatives. A continuació, per confirmar que els defectes de

creixement són deguts a l'absència de l'activitat enzimàtica de Grx6 i no a defectes indirectes causats per l'absència de la proteïna en el mutant nul, es va mesurar el creixement de les cèl·lules tractades amb FK506 que expressen una proteïna Grx6 mutada en el centre actiu, amb una substitució del residu Cys136 per una Ser, en lloc de la forma salvatge de la proteïna. Comparat amb les cèl·lules que expressen la forma salvatge de Grx6, les que expressen la forma mutada tenen els mateixos defectes de creixement que un mutant sense cap forma de Grx6 [Figura 21B]. Per tant, es necessita una proteïna Grx6 enzimàticament activa per protegir les cèl·lules de llevat en condicions en què la via de la calcineurina està inhibida.

4. LES CÈL·LULES SENSE GRX6 TENEN ALTERATS ELS NIVELLS DE Ca^{2+} INTRACEL·LULAR

Les anteriors observacions suggereixen que l'absència de Grx6 causa un estrès constitutiu per calci a la cèl·lula i la subseqüent inducció de la via de la calcineurina, possiblement per l'acumulació intracel·lular de Ca^{2+} . Per tant, es va mesurar la concentració de Ca^{2+} citosòlic utilitzant el reporter indo-1 (Halachmi i Eilam, 1989, 1993, 1996). Els nivells de Ca^{2+} són aproximadament el doble en el mutant $\Delta grx6$ respecte a la soca salvatge, mentre que el mutant $\Delta grx7$ no en mostra diferències [Figura 22]. El doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ es comporta com el mutant simple $\Delta grx6$, confirmant que l'absència de Grx7 no influencia l'homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular. L'acumulació de Ca^{2+} en les cèl·lules sense Grx6 és quantitativament comparable amb l'acumulació en les cèl·lules del mutant $\Delta pmr1$ [Figura 22], les quals no expressen la bomba tipus SPCA del RE i aparell de Golgi (Halachmi i Eilam, 1996; Locke et al., 2000). A més a més, l'absència d'ambdós Pmr1 i Grx6 mostra un efecte additiu en l'acumulació de Ca^{2+} citosòlic [Figura 22]. Tal i com es descriu en estudis previs (Cronin et al., 2002), es va confirmar que l'absència de la bomba tipus P Spf1 no provoca cap alteració en els nivells intracel·lulars de Ca^{2+} , i es va demostrar que l'eliminació de Spf1 en un mutant $\Delta grx6$ tampoc mostra efectes additius [Figura 22]. En resum, l'absència de Grx6 causa acumulació de Ca^{2+} al citosol de manera similar a l'absència de la bomba Pmr1, però independentment d'aquesta.

Molt recentment, s'ha descrit l'antiportador de Ca^{2+}/H^+ Gdt1 de l'aparell de Golgi, la manca del qual té un efecte additiu amb la de Pmr1 en l'alteració de l'homeòstasi del

Ca²⁺ intracel·lular, de manera que l'absència dels dos transportadors a la vegada provoca una major sensibilitat que la dels mutants simples a l'estrès tant per excés com per dèficit de calci (Demaegd et al., 2013). En conseqüència, es va determinar també els nivells de Ca²⁺ citosòlic en el mutant mancat d'aquest transportador, a més a més del doble mutant mancat així mateix de Grx6. L'absència de Gdt1 no altera els nivells intracel·lulars de Ca²⁺, i l'eliminació de Gdt1 en un mutant $\Delta grx6$ tampoc mostra efectes additius, de manera similar al que succeeix amb el transportador Spf1 [Figura 23].

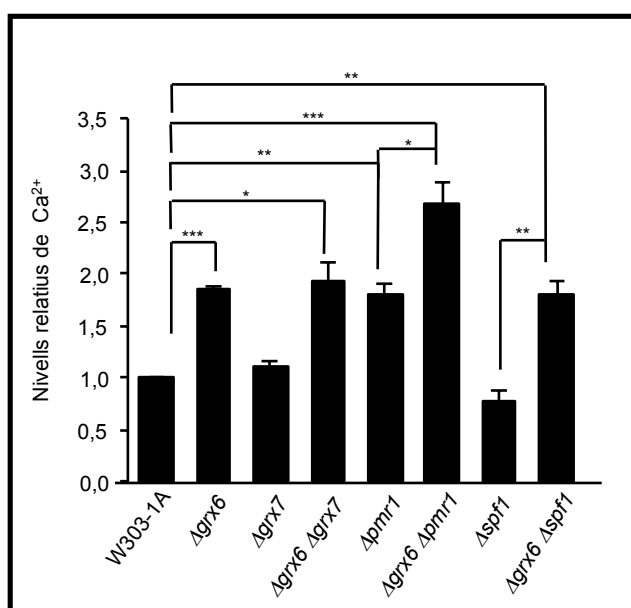


Figura 22. Les soques deficientes en Grx6 presenten uns nivells elevats de Ca²⁺ intracel·lular. Anàlisi dels nivells relatius de Ca²⁺ citosòlic, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887), $\Delta grx6 \Delta grx7$ (MML892), $\Delta pmr1$ (MML1530), $\Delta grx6 \Delta pmr1$ (MML1535), $\Delta spf1$ (MML1716) i $\Delta grx6 \Delta spf1$ (MML1703), en medi YPD a 30°C. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (\pm s.d), i estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

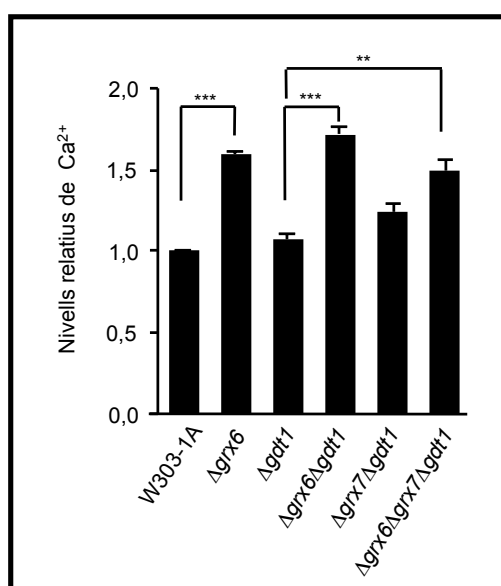


Figura 23. Anàlisi dels nivells relatius de Ca²⁺ citosòlic, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta gdt1$ (MML1884), $\Delta grx6 \Delta gdt1$ (MML1912), $\Delta grx7 \Delta gdt1$ (MML1914) i $\Delta grx6 \Delta grx7 \Delta gdt1$ (MML1916), en medi YPD a 30°C. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (\pm s.d), i estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

RESULTATS

Per tal de confirmar que aquests efectes en l'homeòstasi del Ca^{2+} eren deguts a l'absència de l'activitat enzimàtica de Grx6 i no a la manca de la molècula, es varen determinar els nivells de Ca^{2+} en cèl·lules que expressen la proteïna Grx6 mutada en el centre actiu C136S enlloc de la forma Grx6 salvatge. Aquest mutant acumula Ca^{2+} a nivells similars al mutant nul Δgrx6 [Figura 24], confirmant que es necessita l'activitat tiol oxidoreductasa de Grx6 per mantenir els nivells normals d'aquest ió al citosol.

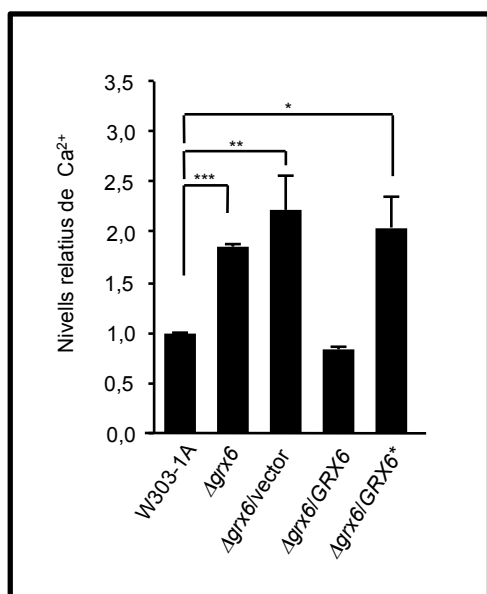


Figura 24. Anàlisi dels nivells relatius de Ca^{2+} citosòlic, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de la soca salvatge (W303-1A) i el mutant Δgrx6 (MML1680), no transformat o bé transformat amb els plàsmids integratius YIplac128 (vector sol), pMM1073 (*GRX6*) i pMM1071 (*GRX6*^{*}, amb la mutació que determina la substitució C136S), en medi YPD a 30°C. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (\pm s.d), i estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

Com ja s'ha indicat, els assajos dels nivells de Ca^{2+} amb indo-1 en cèl·lules intactes determinen els nivells d'aquest ió al citosol. Per tal de discriminar entre el Ca^{2+} citosòlic i aquell localitzat en altres orgànuls, com el RE, l'aparell de Golgi o la vacuola, també es va determinar els nivells de Ca^{2+} després de trencar les membranes internes amb un tractament amb DEAE-dextrà, el qual permetria mesurar els nivells de Ca^{2+} intracel·lulars totals (veure apartat 8.1 de **Materials i Mètodes**). El tractament de permeabilització amb DEAE-dextrà incrementa les diferències en els nivells de Ca^{2+} entre un mutant Δpmr1 i les cèl·lules salvatges [Figura 25], comparat amb els resultats de les cèl·lules no permeabilitzades [Figura 22]. Aquesta observació concorda i recolza els resultats descrits sobre la hiperacumulació de Ca^{2+} en les vacuoles de les cèl·lules Δpmr1 (Halachmi i Eilam, 1996). En canvi, la permeabilització de les membranes no incrementa les diferències entre el mutant Δgrx6 i les cèl·lules salvatges [Figura 25], indicant que l'acumulació de Ca^{2+} en aquest mutant es produeix majoritàriament al citosol. Com era d'esperar, el doble mutant $\Delta\text{grx6}\Delta\text{pmr1}$ mostra una

acumulació additiva dels nivells intracel·lulars de Ca^{2+} totals. En resum, els nostres resultats indiquen que l'alteració dels nivells de Ca^{2+} succeeix a diferents compartiments cel·lulars en absència de Grx6 o Pmr1, majoritàriament al citosol en el mutant Δgrx6 i principalment a la vacuola, però també al citosol, en el mutant Δpmr1 .

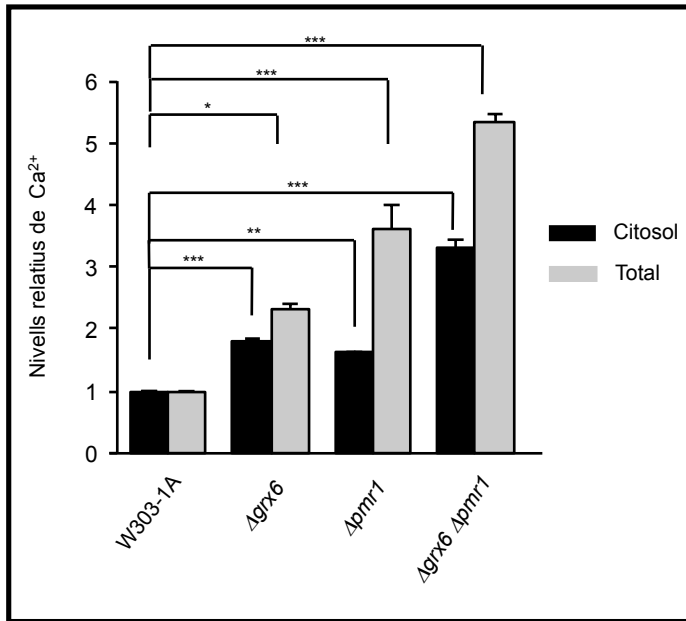
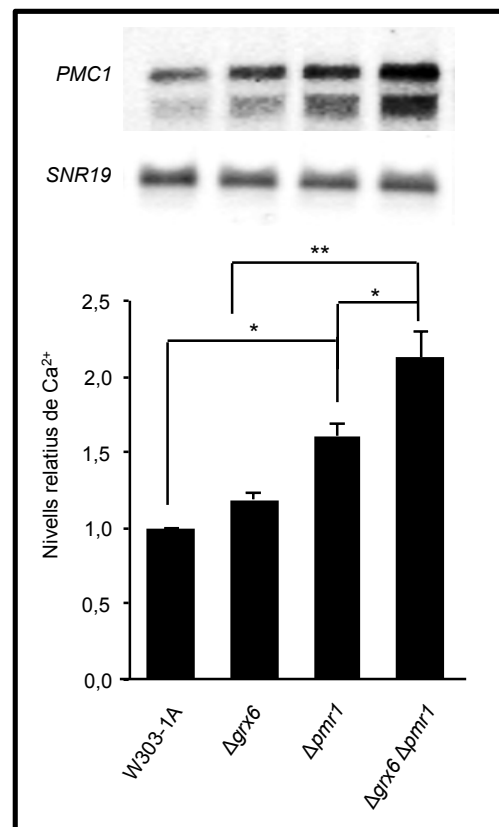


Figura 25. Nivells relatius del Ca^{2+} citosòlic (barres negres) o Ca^{2+} intracel·lular total (barres grises) en les soques indicades. Veure el peu de la **Figura 22** per la nomenclatura de les soques i les condicions de creixement. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (\pm s.d), i estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

Figura 26. Anàlisi per Northern blot dels nivells de mRNA de *PMC1* en les soques W303-1A, Δgrx6 (MML1680), Δpmr1 (MML1530) i $\Delta\text{grx6} \Delta\text{pmr1}$ (MML1535). El mRNA del gen *SNR19* es mostra com a control de càrrega. La gràfica indica la quantificació dels nivells de mRNA de *PMC1* en mostres procedents de tres experiments independents a partir de cultius exponencials en medi YPD a 30°C. Les barres corresponen a la mitjana \pm s.d, després de normalitzar pels nivells de mRNA de *SNR19*. Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).



RESULTATS

L'acumulació de Ca^{2+} intracel·lular indueix els nivells d'expressió de *PMC1*, contribuint aquesta inducció a incrementar l'emmagatzematge de Ca^{2+} a la vacuola com a mecanisme de detoxificació del Ca^{2+} (Cunningham, 2011). En concordança amb els resultats anteriors referents als nivells de Ca^{2+} en els mutants, les cèl·lules Δgrx6 i Δpmr1 expressen nivells de mRNA de *PMC1* més elevats que les cèl·lules salvatges (més acusadament en el mutant Δpmr1), i aquest increment és additiu en el doble mutant [Figura 26].

A continuació, ens vam preguntar la procedència de l'excés de Ca^{2+} citosòlic en el mutant Δgrx6 . Per això, es van construir mutants defectius en les diferents vies d'entrada de Ca^{2+} al citosol descrites en llevat: el canal de calci del RE, *Csg2*, el canal de calci de la vacuola, *Yvc1*, i una subunitat del canal de calci de la membrana plasmàtica, *Cch1*, així com els respectius doble mutants també mancats de *Grx6*. Els nivells de Ca^{2+} dels dobles mutants $\Delta\text{csg2}\Delta\text{grx6}$ i $\Delta\text{yvc1}\Delta\text{grx6}$ són similars als del mutant simple Δgrx6 , mentre que els dels mutants simples Δcsg2 i Δyvc1 ho són als de la soca salvatge [Figura 27], fet que indica que l'excés de Ca^{2+} en absència de *Grx6* no prové directament per aquests transportadors ni del RE ni de la vacuola. En canvi, el doble mutant $\Delta\text{cch1}\Delta\text{grx6}$ no mostra un increment en els nivells de Ca^{2+} en comparació amb la soca salvatge [Figura 27], apuntant a que l'origen de l'excés de Ca^{2+} degut a la manca de *Grx6* és extracel·lular i requereix la funcionalitat del canal HACS de la membrana plasmàtica.

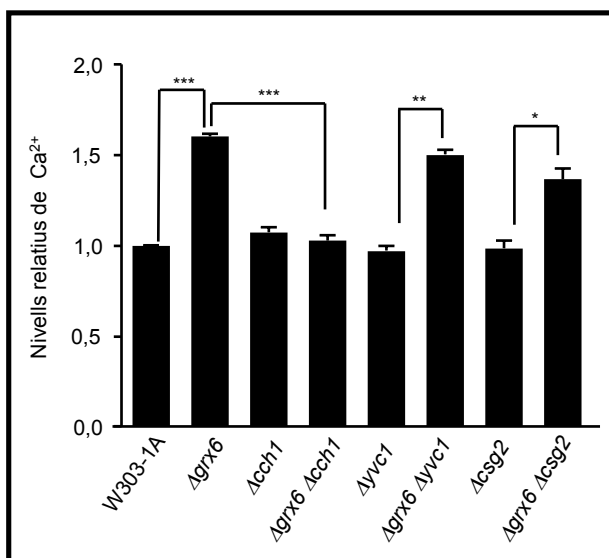


Figura 27. L'excés de Ca^{2+} citosòlic en el mutant Δgrx6 procedeix del medi extracel·lular. Anàlisi dels nivells relatius de Ca^{2+} citosòlic, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), Δgrx6 (MML1680), Δcsg2 (MML1529), $\Delta\text{grx6}\Delta\text{csg2}$ (MML1538), Δcch1 (MML1527), $\Delta\text{grx6}\Delta\text{cch1}$ (MML1548), Δyvc1 (MML1526) i $\Delta\text{grx6}\Delta\text{yvc1}$ (MML1531), en medi YPD a 30°C. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (\pm s.d), i estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

5. L'ABSÈNCIA DE GRX6 RESULTA EN UNA ALTERACIÓ DE LA SENSIBILITAT A QUELANTS DE Ca^{2+}

5.1. EFECTE DE L'EGTA SOBRE EL CREIXEMENT

En *S. cerevisiae*, diversos mutants defectius en la regulació de l'homeòstasi del calci intracel·lular mostren alteracions en la seva sensibilitat a quelants de Ca^{2+} (Cunningham, 2011). Conseqüentment, es va estudiar la sensibilitat de les cèl·lules Δgrx6 a EGTA, que quela els ions Ca^{2+} extracel·lulars.

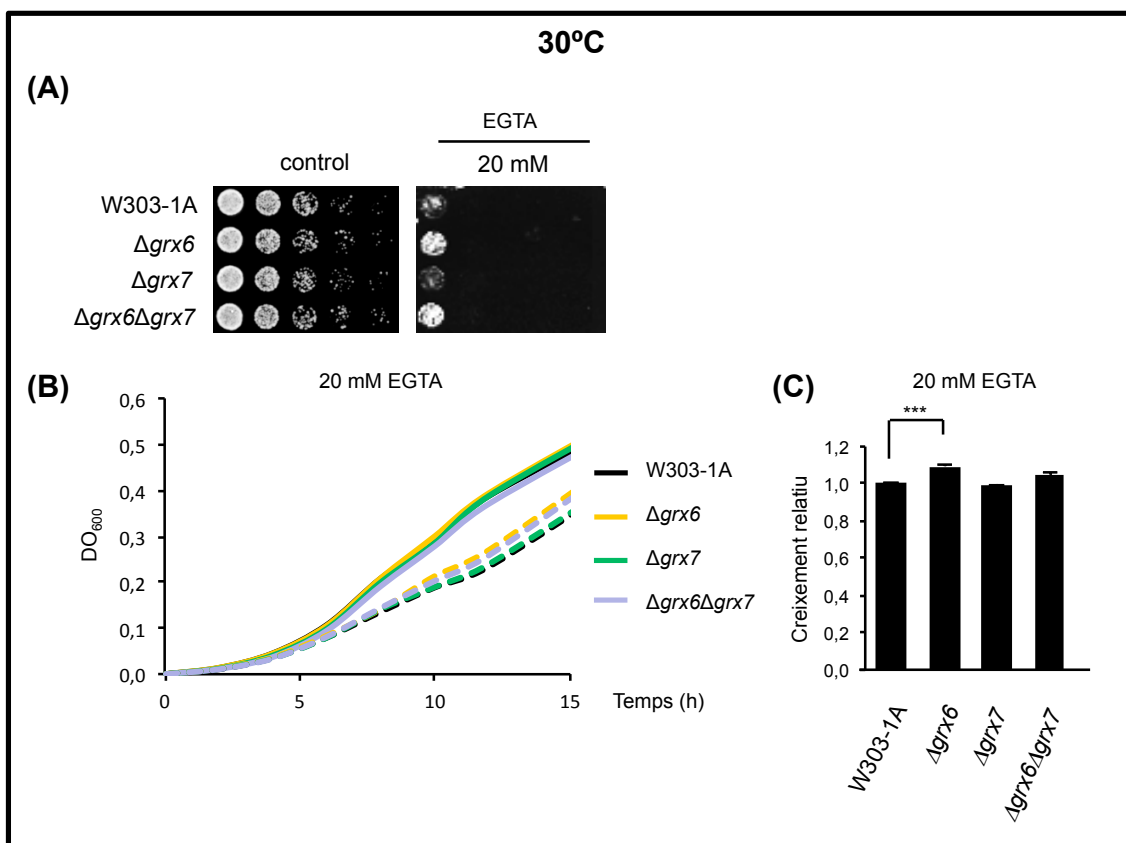


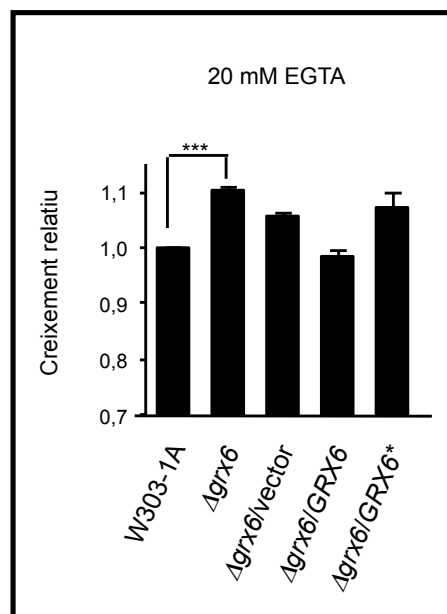
Figura 28. Efecte de l'EGTA sobre el creixement cel·lular a 30°C. **A)** Sensibilitat de la soca salvatge (W303-1A), Δgrx6 (MML1680), Δgrx7 (MML887) i $\Delta\text{grx6}\Delta\text{grx7}$ (MML892) a EGTA. Dilucions seriades (1:5) dels respectius cultius exponencials es van addicionar sobre plaques de medi YPD sòlid que contenien la concentració indicada de l'agent. Es mostra el creixement dels cultius després d'incubar les plaques durant dos dies a 30°C. **B)** Efecte del tractament amb EGTA de les soques utilitzades en l'apartat **A** en medi YPD líquid a 30°C. **C)** Quantificació de l'efecte del quelant a les 15 hores de tractament (creixement de la soca tractada a les 15 hores *versus* creixement de la soca no tractada al mateix temps), a partir de les dades obtingudes en **B**. Les barres corresponen a la mitjana de deu experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

RESULTATS

Encara que en tots els casos la quelació del calci extracel·lular té un efecte inhibitor, a la temperatura fisiològica de creixement (30°C) i en medi sòlid, tant el mutant $\Delta grx6$ com el doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ són menys susceptibles a EGTA que la soca salvatge [Figura 28A]. D'altra banda, es van repetir els experiments en medi líquid, de manera que a partir de corbes de creixement obtingudes mitjançant mesures automatitzades de la DO_{600} [Figura 28B] es quantificava l'efecte del quelant sobre les diferents soques [Figura 28C]. Els resultats confirmen que els mutants $\Delta grx6$ i $\Delta grx6\Delta grx7$ són moderadament menys susceptibles que la soca salvatge al tractament dels cultius amb EGTA, mentre que les cèl·lules $\Delta grx7$ no mostren diferències estadísticament significatives amb la soca salvatge.

Es va determinar també que el mutant amb el canvi C136S en el centre actiu de Grx6 presenta el mateix fenotip de menor sensibilitat a EGTA que el mutant nul $\Delta grx6$ [Figura 29], altra vegada confirmant que aquests efectes estan causats per la falta de l'activitat tiol oxidoreductasa de la proteïna Grx6.

Figura 29. Quantificació de la sensibilitat al tractament amb EGTA (15 hores) de la soca salvatge (W303-1A) i la soca mutant $\Delta grx6$ (MML1680) no transformada o bé transformada amb els plàsmids integratius YIplac128 (vector), pMM1073 (GRX6) o pMM1071 (GRX6*, amb la mutació que determina la substitució C136S), en medi YPD a 30°C. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).



La menor susceptibilitat del mutant $\Delta grx6$ a quelants extracel·lulars de Ca^{2+} podria ser deguda a la seva capacitat per mobilitzar l'excés de Ca^{2+} acumulat per aquest mateix mutant al citosol. Si així fos, i tenint en compte que la mutació $\Delta cch1$ evita la hiperacumulació de Ca^{2+} en absència de Grx6 [Figura 27], es podria esperar que en condicions d'inactivació del sistema HACS d'entrada de Ca^{2+} extracel·lular el mutant

Δgrx6 manifestés la mateixa susceptibilitat a EGTA que la soca salvatge. La **Figura 30** mostra que el mutant *Δgrx6Δcch1* és inclús moderadament més sensible a EGTA que la soca salvatge o que el mutant simple *Δcch1*, confirmant la relació entre l'excés de Ca^{2+} citosòlic i la menor susceptibilitat a EGTA.

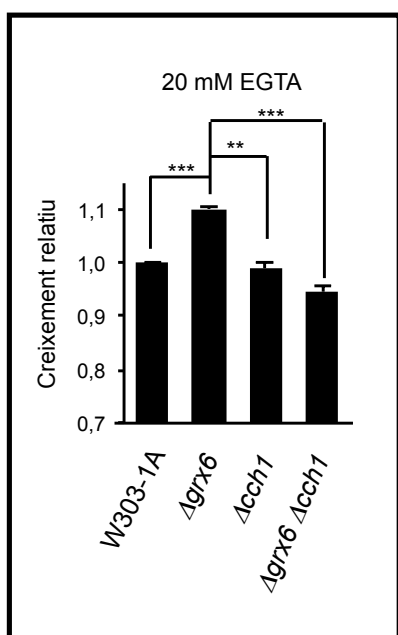


Figura 30. Quantificació de la sensibilitat al tractament amb EGTA (15 hores) de les soques salvatge (W303-1A), *Δgrx6* (MML1680), *Δcch1* (MML1527) i *Δgrx6Δcch1* (MML1548), en medi YPD a 30°C. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

A continuació, es van repetir els estudis de determinació dels nivells de Ca^{2+} i sensibilitat al quelant EGTA, però a una temperatura subòptima de 36°C. En aquesta temperatura, els mecanismes de compartimentalització del calci i la maquinària de plegament/secreció de proteïnes podrien estar parcialment compromesos. Així, tant en medi sòlid com en medi líquid la menor susceptibilitat del mutant *Δgrx6* a l'EGTA en comparació amb la soca salvatge augmenta notablement, de la mateixa manera que la del mutant *Δgrx6Δgrx7* [Figura 31A-C]. En canvi, el mutant simple *Δgrx7* mostra en aquest cas una significativa sensibilitat a EGTA, a diferència del que passava a 30°C. Resumint, a una temperatura subòptima de creixement de 36°C, la depleció de Ca^{2+} del medi per EGTA té efectes contraris en cèl·lules sense Grx6 o sense Grx7, confirmant-se la menor susceptibilitat del mutant *Δgrx6* en aquestes condicions.

Els efectes més dràstics de l'EGTA sobre els mutants en les dues GRXs a 36°C suggerien que a aquesta temperatura efectivament els nivells de Ca^{2+} intracel·lular en els mutants manifesten diferències més significatives respecte a la soca salvatge que

RESULTATS

les observades a 30°C. La **Figura 32** confirma uns nivells de Ca^{2+} superiors en el mutant Δgrx6 respecte la soca salvatge a 36°C, mentre que són inferiors en el mutant Δgrx7 respecte la soca salvatge, a més a més de constatar que la pròpia soca salvatge acumula més Ca^{2+} a 36°C que a 30°C. Els baixos nivells constitutius de Ca^{2+} citosòlic en absència de Grx7 a 36°C explicarien la seva major susceptibilitat a EGTA. Es confirmen, doncs, els fenotips oposats dels mutants en Grx6 i Grx7 a la temperatura subòptima de 36°C pel que fa a l'acumulació de Ca^{2+} citosòlic i a la susceptibilitat a EGTA.

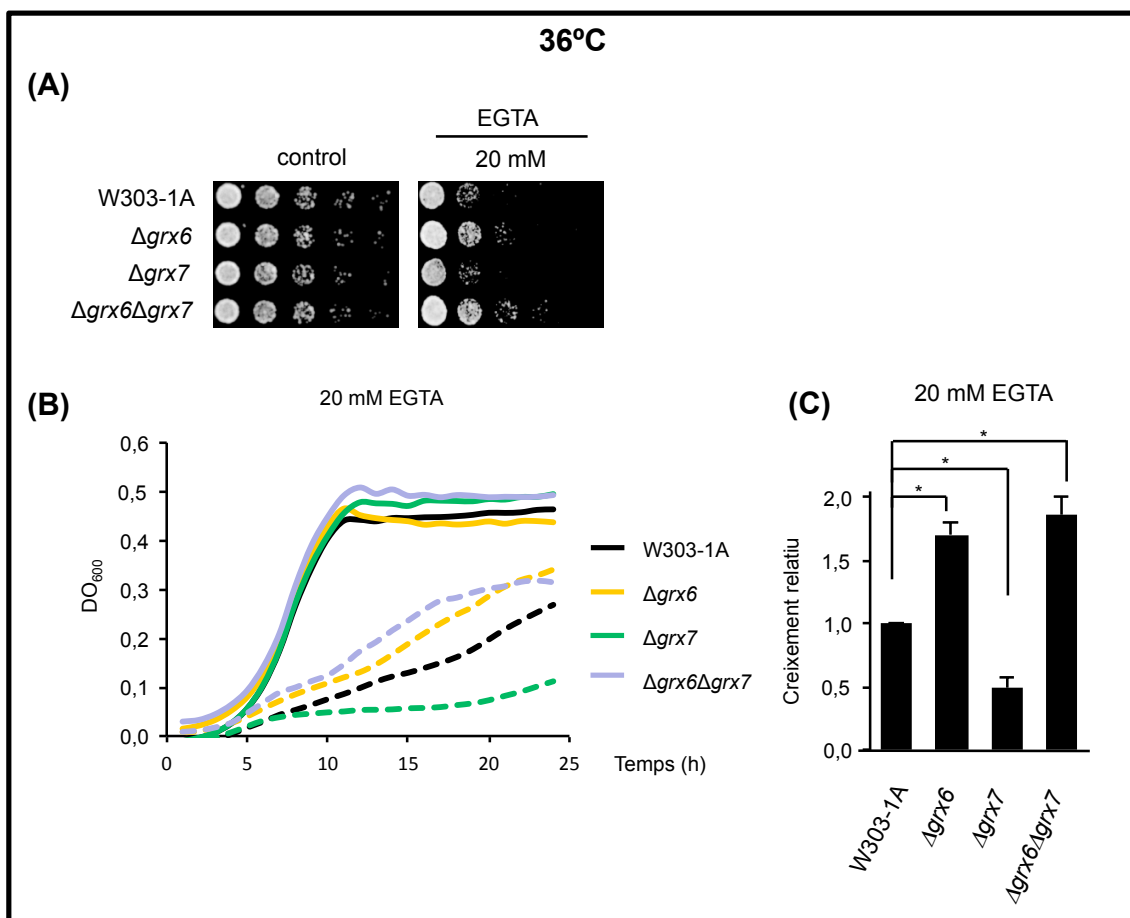


Figura 31. Efecte de l'EGTA sobre el creixement cel·lular a 36°. **A)** Sensibilitat de la soca salvatge (W303-1A), Δgrx6 (MML1680), Δgrx7 (MML887) i $\Delta\text{grx6}\Delta\text{grx7}$ (MML892) a EGTA en medi YPD sòlid. **B)** Efecte del tractament amb EGTA de les soques utilitzades en l'apartat A en medi YPD líquid a 36°C. **C)** Quantificació de l'efecte del quelant a les 20 hores de tractament a partir de les dades obtingudes en B. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

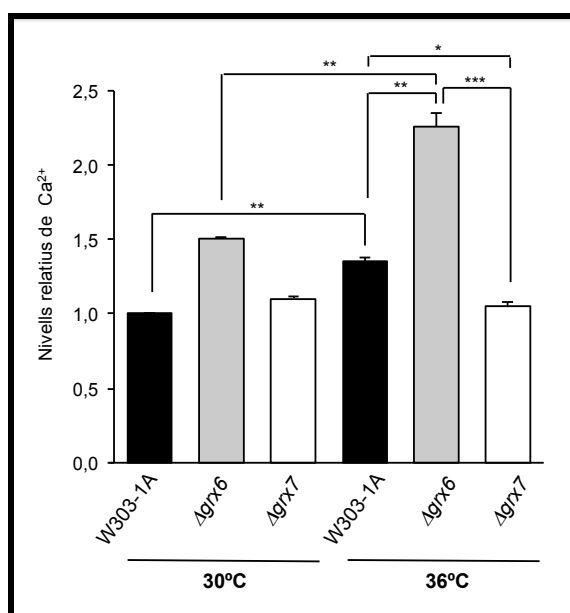


Figura 32. Anàlisi dels nivells relatius de Ca^{2+} citosòlic, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887) i $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892), en medi YPD a 30 i 36°C. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (\pm s.d), i s'han relativitzat respecte a la soca salvatge a 30°C (valor unitat). L'anàlisi es va realitzar a partir de cultius paral·lels a les dues temperatures, per tal de poder fer les comparacions indicades.

5.2. EFECTE DEL BAPTA-AM SOBRE EL CREIXEMENT

Mentre que l'EGTA només quela el calci extracel·lular, el BAPTA-AM és un agent que difon a través de la membrana cap a l'interior de les cèl·lules de llevat, on el seu grup AM és hidrolitzat per esterases, i llavors és capaç de quelar el Ca^{2+} intracel·lular (Li et al., 2011). De manera contrària a l'EGTA, el mutant $\Delta grx6$ és moderadament més sensible al BAPTA-AM que la soca salvatge, amb unes diferències estadísticament significatives, a la temperatura fisiològica de creixement de 30°C [Figura 33]. A més a més, aquesta major sensibilitat també es detecta en el cas del doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$, però no en el mutant simple $\Delta grx7$, indicant que és conseqüència de l'absència de Grx6 però no de Grx7.

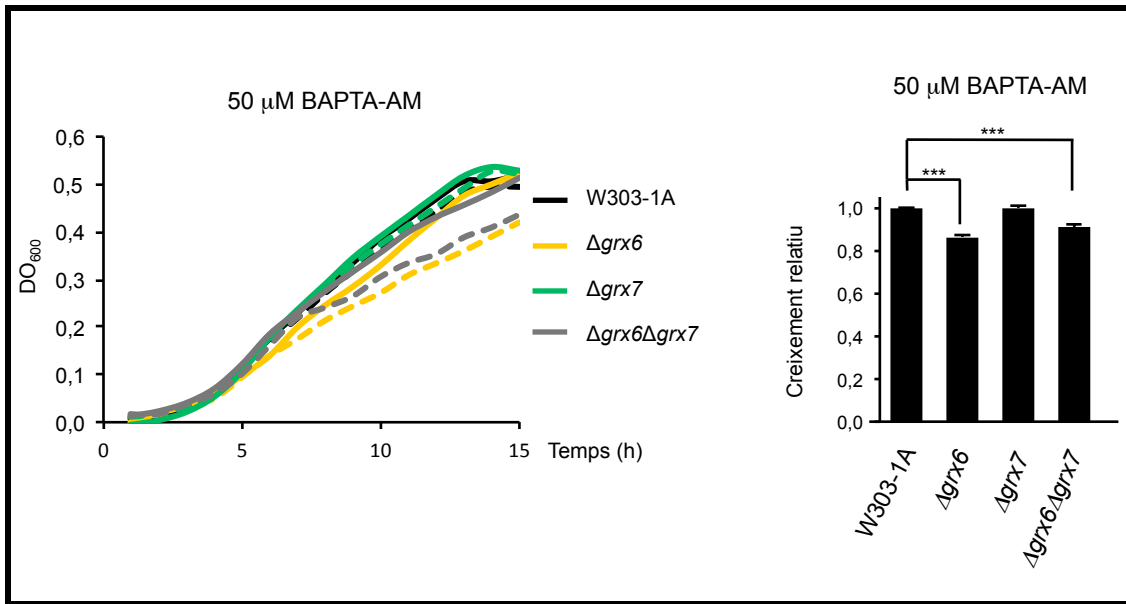


Figura 33. Efecte del BAPTA-AM sobre el creixement cel·lular a 30°. Sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887) i $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892) a BAPTA-AM, en medi YPD líquid a 30°C. Quantificació de l'efecte del quelant a les 15 hores de tractament (creixement de la soca tractada *versus* creixement de la soca no tractada). Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

Els mutants en els transportadors de Ca^{2+} de la membrana del RE $\Delta pmr1$ i $\Delta spf1$ també presenten sensibilitat a BAPTA-AM en comparació amb la soca salvatge, i aquesta es manifesta especialment en el doble mutant $\Delta pmr1\Delta spf1$, confirmant el paper redundat d'ambdós transportadors en la regulació del contingut de Ca^{2+} al lumen del RE (Cronin et al., 2002). En aquest estudi es van confirmar aquests resultats, demostrant a més a més que l'absència addicional del gen *GRX6* en les cèl·lules $\Delta pmr1\Delta spf1$ rescata parcialment la hipersensibilitat d'aquestes al BAPTA-AM [Figura 34]. Aquests resultats indiquen que Grx6 pot tenir funcions independents o paral·leles a Pmr1 i Spf1 en la regulació de l'homeòstasi del calci en els compartiments membranosos intracel·lulars.

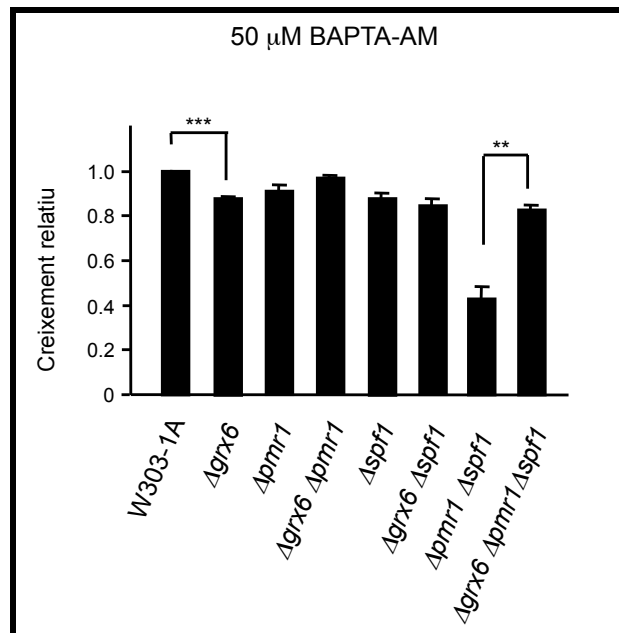


Figura 34. Quantificació de l'efecte de l'agent BAPTA-AM (15 hores) en les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta pmr1$ (MML1530), $\Delta grx6\Delta pmr1$ (MML1535), $\Delta spf1$ (MML1716), $\Delta grx6\Delta spf1$ (MML1703), $\Delta pmr1\Delta spf1$ (MML1710) i $\Delta grx6\Delta pmr1\Delta spf1$ (MML1721), en medi YPD líquid a 30°C. Les barres corresponen a la mitjana de cinc experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

6. L'ABSÈNCIA DE GRX6 PROVOCA SENSIBILITAT A ALTES CONCENTRACIONS DE Ca^{2+}

Els mutants en els transportadors de Ca^{2+} vacuolars o en els de la via secretora presenten defectes de creixement en presència d'elevades concentracions de Ca^{2+} extracel·lular (Cunningham, 2011; Demaegd et al., 2013). A la via secretora, els mutants $\Delta pmr1$ i $\Delta spf1$, i més lleugerament també el mutant $\Delta gdt1$, són sensibles a l'excés de Ca^{2+} , i aquesta sensibilitat s'accentua en els respectius dobles mutants amb $\Delta pmr1$ (Cronin et al., 2002; Demaegd et al., 2013). També el mutant mancat del canal de Ca^{2+} Csg2 es mostra sensible a aquestes condicions (Beeler et al., 1994; Takita et al., 1995). Això suggereix que l'alteració en l'homeòstasi del Ca^{2+} porta a una major sensibilitat a la presència d'una elevada concentració de Ca^{2+} extracel·lular. Amb aquests antecedents es va estudiar la sensibilitat dels mutants en $GRX6$ i/o $GRX7$ als alts nivells de Ca^{2+} extracel·lular.

RESULTATS

La **Figura 35** mostra que tant el mutant $\Delta grx6$ com el doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ són sensibles a la presència d'elevades concentracions de Ca^{2+} extracel·lular, en comparació amb el mutant $\Delta grx7$ i la soca salvatge. Això és probablement degut a un increment encara més gran dels nivells de Ca^{2+} citosòlic en aquests mutants en aquestes condicions, el qual provocaria un major estrès cel·lular. Es confirma així que l'absència de *GRX6*, a diferència de la de *GRX7*, provoca una alteració en l'homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular.

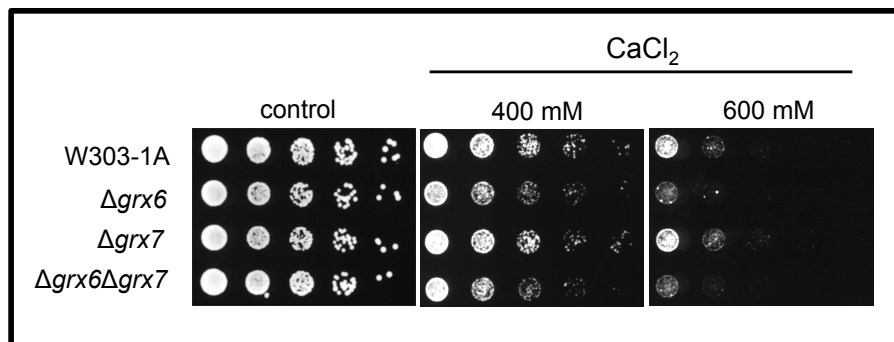


Figura 35. Efecte de les elevades concentracions de Ca^{2+} sobre el creixement cel·lular a 30°C. Sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887) i $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892) a les elevades concentracions de Ca^{2+} , a 30°C. Dilucions serials (1:5) dels respectius cultius exponencials en medi SD es van afegir sobre plaques de medi SD sòlid modificat (Demaegd et al., 2013) que contenien la concentració indicada de $CaCl_2$. Es mostra el creixement dels cultius després d'incubar les plaques durant tres dies a 30°C.

7. EL MUTANT $\Delta grx6$ TAMBÉ ACUMULA ALTRES IONS ALS COMPARTIMENTS INTRACEL·LULARS

Donada la possible relació entre l'homeòstasi del calci i la del fòsfor en cèl·lules de llevat, es van mesurar els nivells d'ortofòsfor intracel·lular en els mutants $\Delta grx6$ i $\Delta grx7$. Les cèl·lules $\Delta grx6$ acumulen el doble d'ortofòsfor respecte les cèl·lules salvatges, en contrast amb les cèl·lules mutants $\Delta grx7$, les quals no hiperacumulen fòsfor [**Figura 36**]. El doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ també acumula ortofòsfor aproximadament als mateixos nivells que el mutant simple $\Delta grx6$, confirmant que aquest fenotip depèn de l'absència de Grx6.

L'absència del transportador de fosfat d'alta afinitat Pho84 disminueix dràsticament els nivells intracel·lulars d'ortofosfat en un fons salvatge [Figura 36], en concordança amb el seu important paper en l'aportació de fosfat a la cèl·lula en les condicions experimentals utilitzades en aquest estudi (Mouillon i Persson, 2006; Pattison-Granberg i Persson, 2000). En contrast, l'absència de l'altre transportador de fosfat d'alta afinitat Pho89 manté uns nivells d'ortofosfat intracel·lular similars als de la soca salvatge. Ara bé, l'absència addicional de la mutació $\Delta grx6$ en el mutant $\Delta pho84$ resulta en un nivell d'ortofosfat intermedi al d'aquests dos mutants simples, encara que una mica més proper als nivells del mutant mancat del transportador Pho84. En altres paraules, la falta de Grx6 determina un augment parcial dels baixos nivells d'ortofosfat del mutant $\Delta pho84$, probablement degut a la inducció constitutiva de l'altre transportador d'alta afinitat Pho89. En canvi, l'absència addicional de Pho89 en el mutant $\Delta grx6$ rescata la hiperacumulació d'ortofosfat intracel·lular observada en el mutant simple $\Delta grx6$ [Figura 36]. Aquests resultats apunten al transportador de fosfat d'alta afinitat Pho89 com a principal responsable de l'acumulació d'ortofosfat en excés en les cèl·lules $\Delta grx6$.

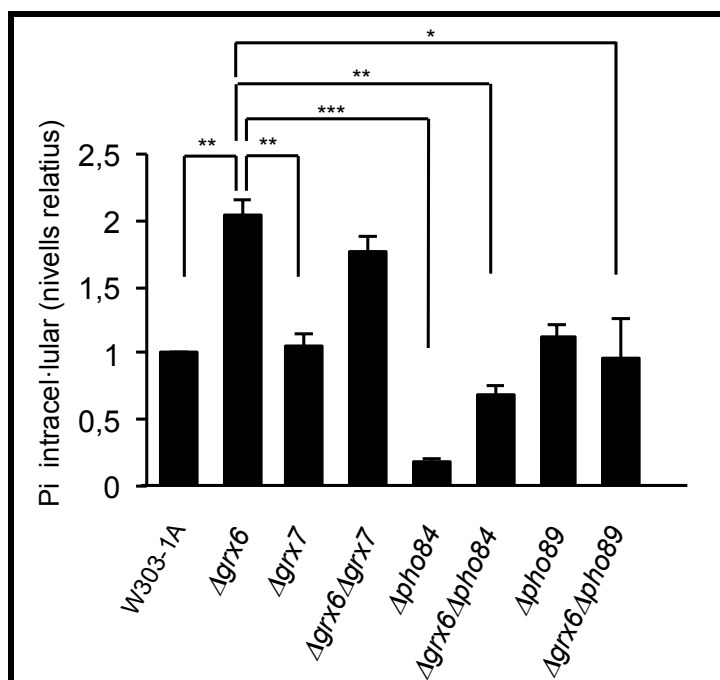


Figura 36. Les cèl·lules deficientes en Grx6 acumulen ortofosfat. Es va mesurar els nivells intracel·lulars d'ortofosfat a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887), $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892), $\Delta pho84$ (MML1304), $\Delta grx6\Delta pho84$ (MML1337), $\Delta pho89$ (MML1306) i $\Delta grx6\Delta pho89$ (MML1313), en medi YPD a 30°C. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents (\pm s.d). Els valors estan relativitzats respecte a la soca salvatge (valor unitat).

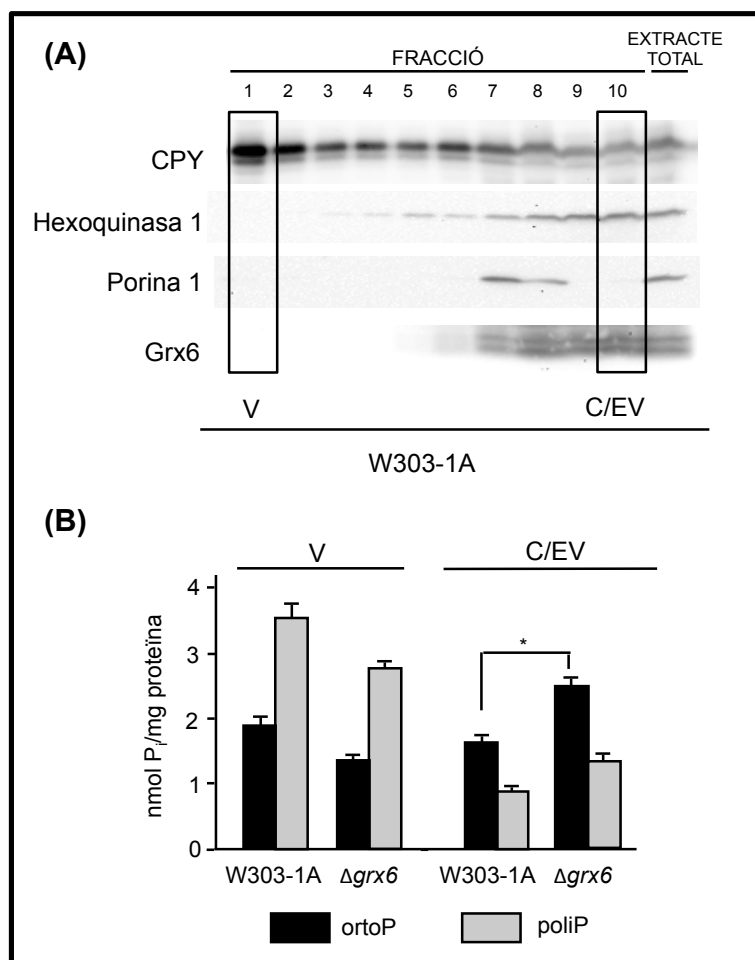


Figura 37. A) Subfraccionament cel·lular en gradient de Ficoll, separant la fracció considerada vacuolar (V) de la citosòlica (C) o extravacuolar (EV). Es va utilitzar un extret de la soca salvatge W303-1A en fase exponencial de creixement en medi YPD a 30°C, comprovant la puresa de les subfraccions per Western blot en gels de SDS-PAGE al 10%, amb anticossos dirigits contra CPY (marcador vacuolar), hexoquinasa 1 (marcador citosòlic), porina 1 (marcador mitocondrial) i Grx6 (marcador de RE/Golgi). **B)** Determinació dels nivells d'ortofosfat (ortoP) i poliP de les fraccions V i C/EV de la soca salvatge i les cèl·lules $\Delta grx6$ (MML1680), a partir de cultius en fase exponencial de creixement en medi YPD a 30°C. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents \pm s.d.

Per avançar en la identificació dels compartiments intracel·lulars on s'acumula l'excés de fòsfat en les cèl·lules $\Delta grx6$, es van aïllar les vacuoles respecte del citosol i de la resta d'altres compartiments membranosos per centrifugació en un gradient de Ficoll. Les fraccions resultants es van analitzar per Western blot, demostrant-se que mentre les fraccions vacuolars no contenen contaminació significativa per proteïnes citosòliques o mitocondrials, les fraccions enriquides en proteïnes citosòliques o extravacuolars en general, en canvi, estaven contaminades per proteïnes vacuolars

[Figura 37A]. De totes maneres, pels següents estudis es van utilitzar les fraccions 1 i 10 (tal com s'indica a la Figura 37A, considerades respectivament com a fracció vacuolar i extravacuolar/citosòlica) procedents de subfraccionaments cel·lulars similars. Es van mesurar els nivells d'ortofosfat i poliP separatament en ambdues fraccions, i els resultats van mostrar que les cèl·lules $\Delta grx6$ presenten (respecte a la soca salvatge) majors nivells de fosfat al citosol o compartiments extravacuolars, majoritàriament en forma d'ortofosfat, mentre que presenten nivells lleugerament menors de fosfat vacuolar [Figura 37B]. Per tant, en un mutant mancat de Grx6 la compartimentalització del fosfat està alterada resultant en una major acumulació principalment d'ortofosfat al citosol o als compartiments extravacuolars de la cèl·lula.

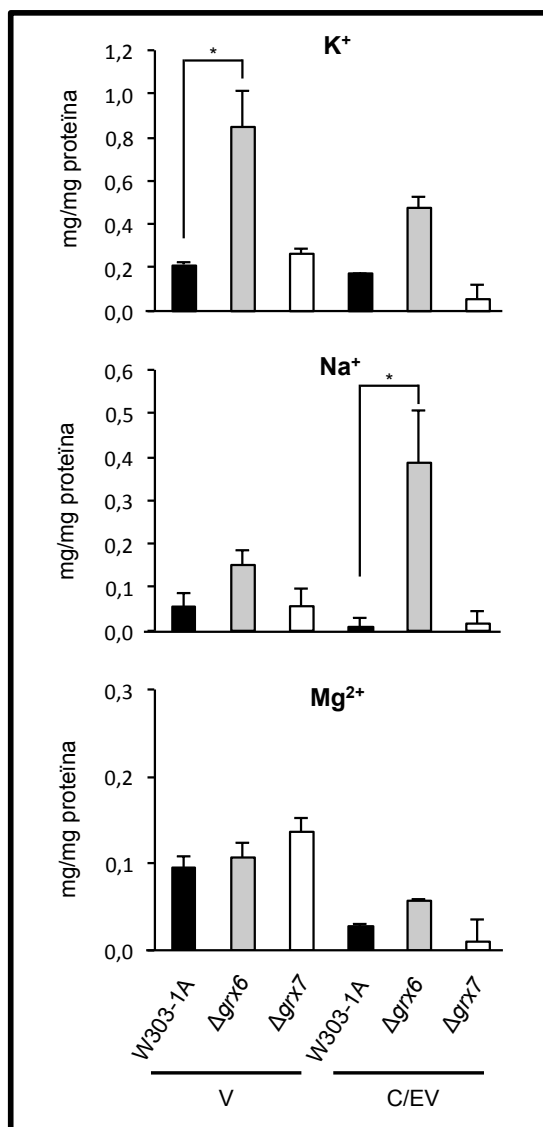


Figura 38. Determinació dels nivells dels ions K^+ , Na^+ i Mg^{2+} per ICP-OES en les fraccions vacuolars (V) i extravacuolars/citosòliques (EV/C), a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680) i $\Delta grx7$ (MML887), en medi YPD a 30°C. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents \pm s.d.

La via de la calcineurina regula l'expressió de gens involucrats en l'homeòstasi d'altres ions a més a més del calci (Yoshimoto et al., 2002). Recentment, s'ha afegit una nova relació entre l'homeòstasi del calci i el potassi en *S. cerevisiae* (Stefan et al., 2013; Stefan i Cunningham, 2013) donat que varies evidències experimentals demostren que el sistema HACS s'activa també per una despolarització parcial de la membrana plasmàtica provocada per l'entrada de potassi. D'acord amb aquestes dades, es va estendre l'anàlisi anterior a altres ions mitjançant la tècnica ICP-OES. Es va observar que els cations K^+ i Na^+ també s'hiperacumulen en les cèl·lules $\Delta grx6$, tant en les fraccions vacuolars com extravacuolars o citosòliques, en comparació amb les cèl·lules salvatges [Figura 38]. En canvi, les cèl·lules $\Delta grx7$ no presenten diferències significatives en l'acumulació d'aquests ions respecte les cèl·lules salvatges [Figura 38]. Hi ha doncs, una correlació entre l'acumulació de calci i l'acumulació de K^+ i Na^+ en el mutant sense Grx6. En contrast, en el cas del Mg^{2+} , només es va observar una moderada acumulació en el mutant $\Delta grx6$ en les fraccions extravacuolars/citosòliques.

8. LA FALTA DE GRX6 O GRX7 PROVOCA CANVIS EN LA INDUCCIÓ DE LA UPR EN CONDICIONS D'ESTRÈS DE RE

Estudis anteriors del nostre grup apuntaven a una relació entre l'estrès de RE i Grx6 i Grx7. D'una banda, l'agent tunicamicina, inhibidor de la N-glicosilació de proteïnes i conseqüentment inductor de la UPR, provoca la inducció de l'expressió de *GRX6* i *GRX7* de manera depenent de *Crz1* i *Msn2/4*, respectivament, que es correspon amb un augment dels nivells de les respectives proteïnes (Izquierdo et al., 2008). D'altra banda, però, la proteïna CPY, utilitzada com a reportera del processament de proteïnes que segueixen la via secretora, apareix N-glicosilada correctament en extrems de les cèl·lules mutants en una o ambdues GRXs, i aquests mutants no mostren una inducció constitutiva de la resposta UPR (veure apartat 3.3.1 de la **Introducció**) (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008b). Cap dels dos gens *GRX6* i *GRX7* s'ha descrit tampoc com a diana de la UPR en experiments transcriptòmics (Kimata et al., 2006; Travers et al., 2000).

Amb aquests antecedents, es va plantejar la hipòtesi que en condicions d'inducció de la UPR degut a la presència d'agents que interfereixen amb la maquinària de plegament proteic, la falta de Grx6 o Grx7 podria exacerbar més aquesta resposta. Per

analitzar això, es va utilitzar l'expressió dels gens *ERO1* i *PDI1* com a reporters de l'activació de la UPR (Yoshimoto et al., 2002), i es va utilitzar el DTT com a agent reductor de tiols que interfereix directament en la formació dels ponts disulfur proteics (Travers et al., 2000). Tal i com s'esperava, el DTT activa la UPR en les cèl·lules salvatges d'una manera transitòria, però aquesta activació és més intensa en les cèl·lules $\Delta grx6$ [Figura 39A i B]. En canvi, les cèl·lules $\Delta grx7$ mostren una resposta més dèbil en la inducció de la UPR que les cèl·lules salvatges. L'increment de la inducció de la UPR, degut a la interferència amb la maquinària de plegament proteic, en un mutant en *GRX6* concorda amb l'alteració global observada en l'homeòstasi iònica, i especialment en els nivells de Ca^{2+} , donada la relació entre els nivells de Ca^{2+} intracel·lular i el plegament i secreció de proteïnes (veure més detalls al llarg de la **Introducció**).

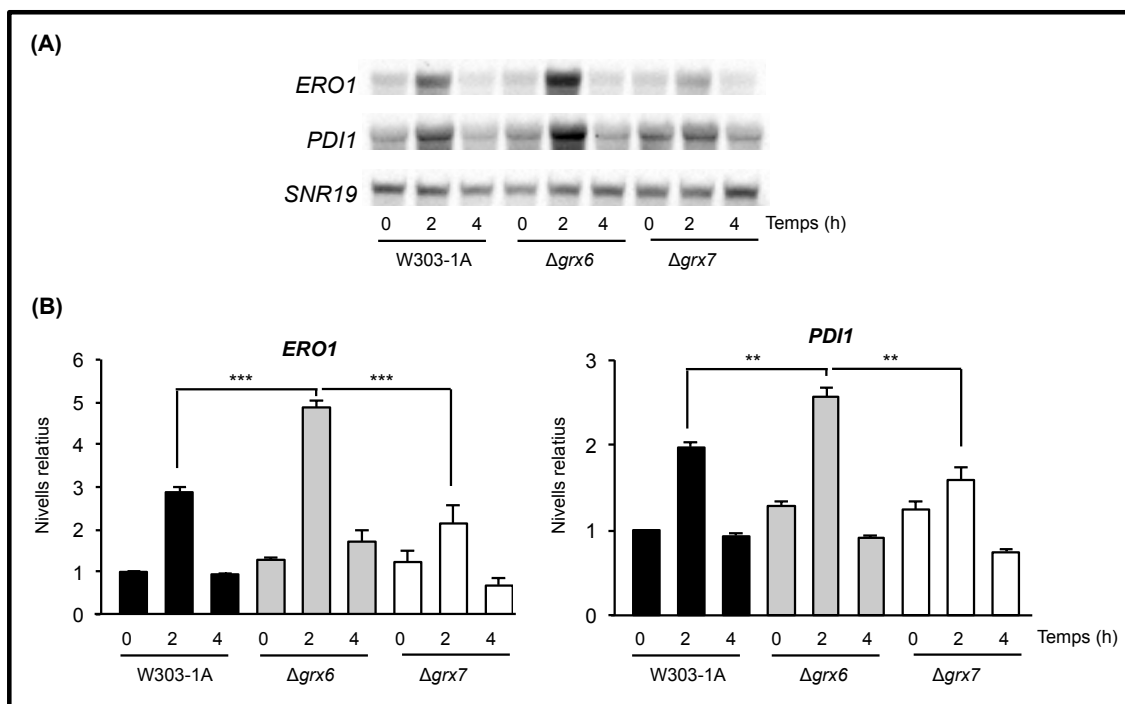


Figura 39. La manca de Grx6 provoca una activació més intensa de la via UPR per DTT. **A)** Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió dels gens especificats, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680) i $\Delta grx7$ (MML887), en medi YPD a 30°C, tractades amb DTT (2 mM) durant els temps indicats. **B)** Quantificació de l'expressió dels gens especificats, a partir de l'anàlisi per Northern blot. L'expressió de cada gen va ser normalitzada amb el gen *SNR19* com a control de càrrega, i a continuació relativitzada respecte a l'expressió de la soca salvatge, a la qual se li va donar el valor unitat. Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents \pm s.d.

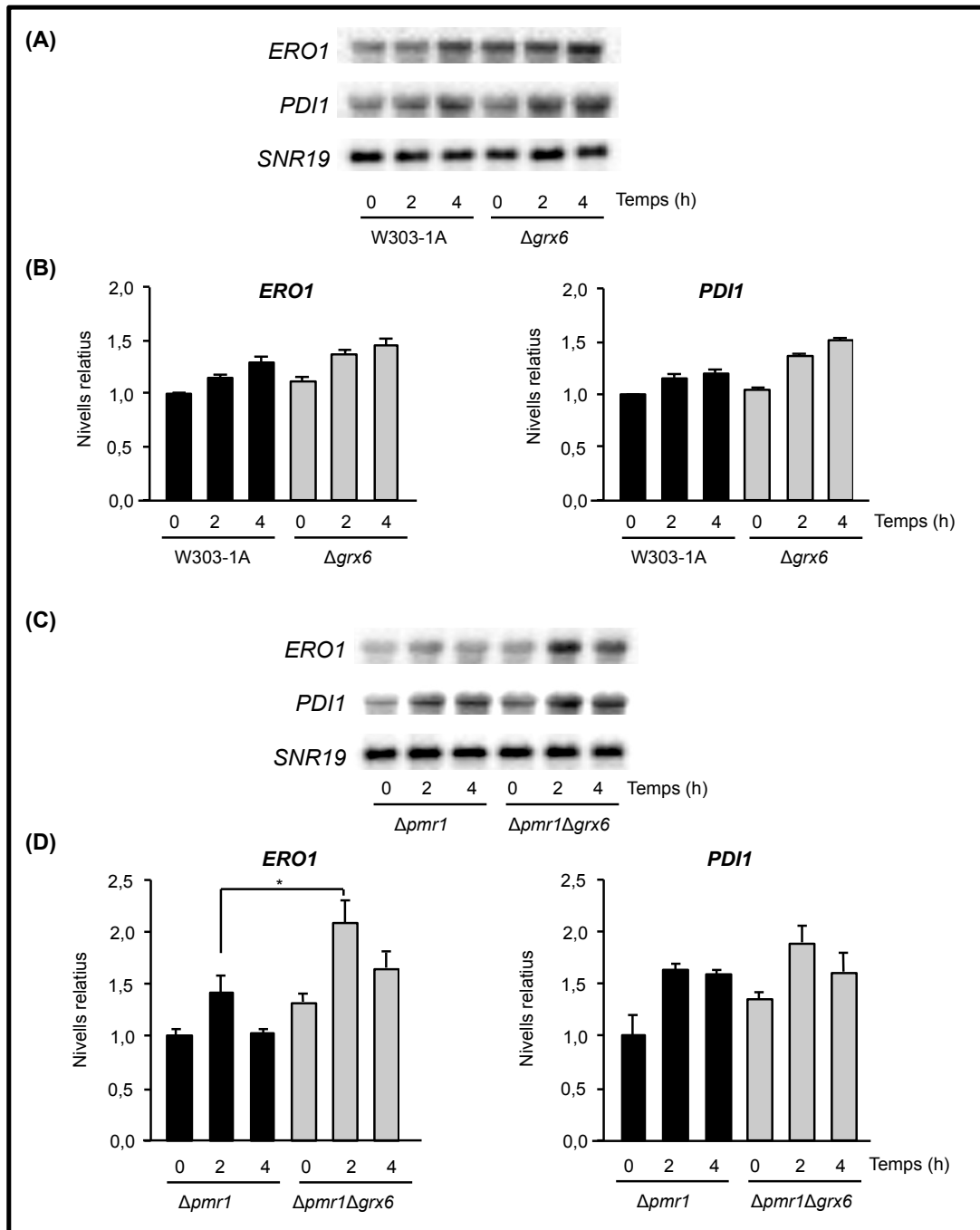


Figura 40. La manca de Grx6 provoca una activació més intensa de la via UPR per EGTA. **A)** Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió dels gens especificats, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (*W303-1A*) i $\Delta grx6$ (MML1680), en medi YPD a 30°C, tractats amb EGTA (20 mM) durant els temps indicats. **B)** Quantificació de l'expressió dels gens especificats, a partir de l'anàlisi per Northern blot. L'expressió de cada gen va ser normalitzada amb el gen *SNR19* com a control de càrrega, i a continuació relativitzada respecte a la soca salvatge (valor unitat). **C)** Com en l'apartat **A**, a partir de cultius de les soques $\Delta pmr1$ (MML1530) i $\Delta pmr1\Delta grx6$ (MML1535) tractades amb EGTA (20 mM) durant els temps indicats. **D)** Quantificació de l'expressió dels gens especificats, a partir dels experiments de l'apartat **C**. L'expressió de cada gen va ser normalitzada i relativitzada respecte a la soca $\Delta pmr1$ (valor unitat). Les barres corresponen a la mitjana de tres experiments independents \pm s.d.

En la mateixa línia de les nostres observacions, Dürr et al. (1998) van demostrar que els mutants deficients en Pmr1, tot i presentar uns defectes moderats en el plegament i processament proteic, tampoc mostren una inducció constitutiva de la resposta UPR. No obstant, quan s'extremen les condicions de creixement degut a un dèficit de Ca^{2+} provocat per l'agent quelant EGTA, els mutants $\Delta pmr1$ sí que manifesten una major inducció de la resposta UPR en comparació amb la soca salvatge (Bonilla et al., 2002).

Considerant la relació de la proteïna Grx6 amb l'homeòstasi del calci, es va analitzar si la presència del quelant EGTA exacerbava també la resposta UPR en mutants mancats de Grx6 [Figura 40A i B]. Els resultats indiquen que la presència d'EGTA indueix la resposta UPR moderadament més en el mutant $\Delta grx6$ que en la soca salvatge. De la mateixa manera, l'absència addicional de *GRX6* en una soca $\Delta pmr1$ també indueix notablement més la resposta UPR en comparació amb el mutant simple $\Delta pmr1$ [Figura 40C i D]. Per tant, la manca de Grx6 exagera la UPR quan les cèl·lules estan sotmeses a determinades condicions d'estrès, que interfereixen directa o indirectament amb l'ambient necessari per un bon funcionament de la maquinària de plegament/secreció proteica, ja sigui amb el tractament amb DTT o amb unes condicions de dèficit de Ca^{2+} .

9. Grx6 I/O Grx7 NO REGULEN L'ESTAT REDOX D'Ero1 I Pdi1

Donada la relació descrita a l'apartat anterior entre la manca de Grx6 i l'estrès de RE, amb la seva manifestació en forma d'activació de la UPR, es va voler estudiar si Grx6 participa en la regulació redox d'Ero1 i Pdi1, dues proteïnes implicades en el plegament proteic oxidatiu en el RE (Frandsen i Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998, veure apartat 3.2.1 de la **Introducció**). Els estudis es van estendre al mutant $\Delta grx7$ i al doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$.

Amb l'objectiu anterior, es va analitzar l'estat redox dels grups tiols presents tant en la proteïna Ero1 com en la proteïna Pdi1 en absència de *GRX6* i/o *GRX7* en comparació amb la soca salvatge, a través de la reactivitat *in vitro* a diversos agents d'aquests grups tiol de les cisteïnes, els quals són un dels grups funcionals més reactius de les proteïnes (Sevier i Kaiser, 2002).

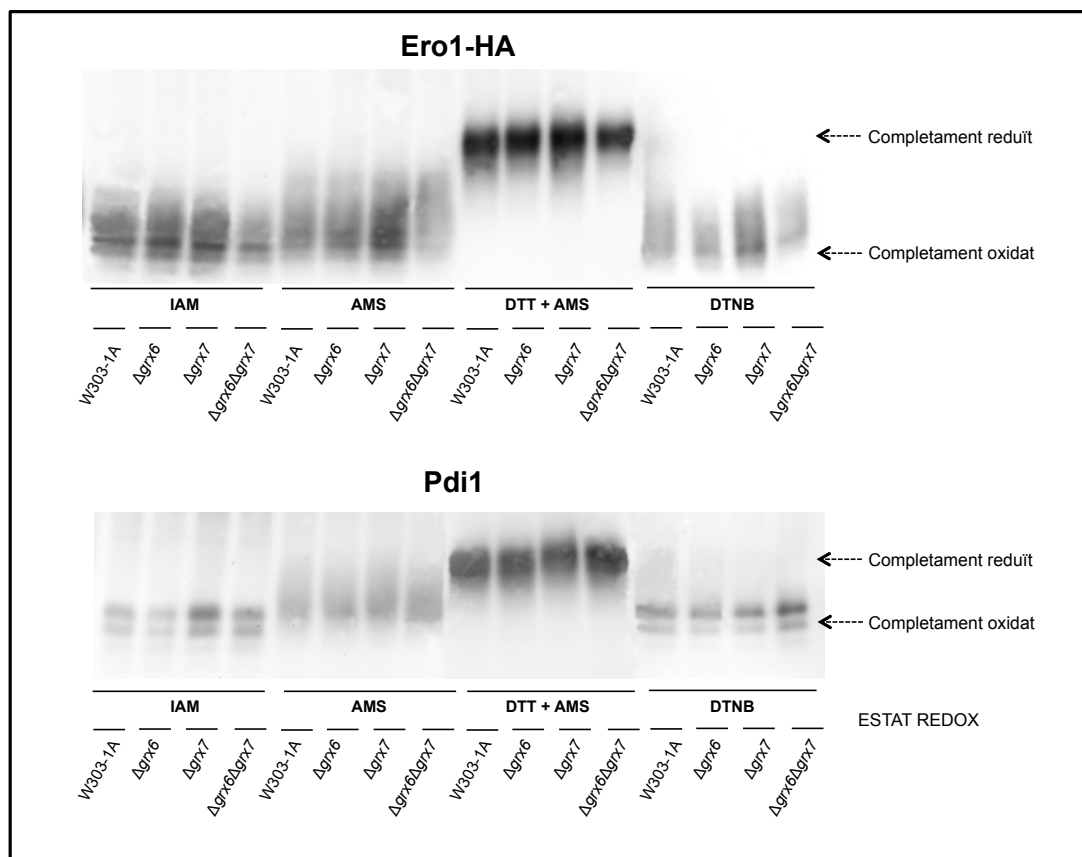


Figura 41. Anàlisi per Western blot, en gels de SDS-PAGE al 9% en condicions no reductores, de l'estat redox de les proteïnes Ero1 i Pdi1. Es van utilitzar les mostres de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $\Delta grx7$ (MML887) i $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892), tractades amb els agents indicats, per l'estudi de Pdi1, i les respectives soques, expressant *ERO1* marcat amb l'epítot HA, W303-1A (MML1907), $\Delta grx6$ (MML1908), $\Delta grx7$ (MML1909) i $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML1910), per l'estudi d'Ero1-HA, en medi YPD a 30°C. Els tractaments amb DTNB i DTT es van utilitzar com a controls de l'estat redox proteic completament oxidat i reduït, respectivament (veure més detalls en el text i en l'apartat 9 de **Materials i Mètodes**).

Per tal d'estudiar l'estat redox d'Ero1 i Pdi1, es va partir d'extractes proteics obtinguts tal i com es descriu en l'apartat 9 de **Materials i Mètodes**. A continuació, per cada soca, alíquotes equivalents dels extractes proteics es van sotmetre als següents tractaments. Una primera alíquota es va tractar amb IAM, agent alquilant que s'uneix i bloqueja els grups tiols lliures sense introduir cap canvi significatiu en el pes molecular de la proteïna, ja que es tracta d'una molècula petita (Hansen i Winther, 2009). Una segona alíquota es va tractar amb AMS, molècula que actua de manera similar a IAM, però que al tenir un mida més gran (0,5 kDa) introdueix un canvi perceptible en la mobilitat electroforètica de les proteïnes (Heldman et al., 2010; Joly i Swartz, 1997;

Sevier et al., 2007). Una tercera alíquota es va tractar amb DTT, per reduir tots els ponts disulfur presents en l'estructura proteica, prèviament a la derivatització dels grups tiols amb AMS. Aquest tractament permetia, per comparació amb l'anterior, determinar la presència de ponts disulfur en les proteïnes estudiades. Finalment, una quarta alíquota es va tractar amb un agent oxidant com el DTNB per observar la mobilitat de les proteïnes en el seu estat completament oxidat (Poynton i Hampton, 2013).

Els resultats indiquen que ambdues proteïnes Ero1 i Pdi1 presenten el mateix estat redox tant en els mutants en *GRX6* i/o *GRX7* com en la soca salvatge, sense diferències aparents entre elles. També s'observa un alt grau d'oxidació d'aquestes proteïnes en la situació de partida ja que la mobilitat observada en les mostres tractades amb IAM o DTNB és aparentment la mateixa [Figura 41].

Per tant, l'absència de diferències en la mobilitat electroforètica de les proteïnes Ero1 i Pdi1 entre les soques utilitzades apunta a que ni Grx6 ni Grx7 participen en la modificació redox d'aquestes proteïnes essencials pel plegament proteic.

10. L'ABSÈNCIA DE GRX6 O GRX7 CONTRARESTA ALS DEFECTES DE CREIXEMENT D'UN MUTANT EN LA MAQUINÀRIA DE PLEGAMENT PROTEIC AL RE

La localització de Grx6 i Grx7, així com els resultats mostrats fins al moment en aquesta memòria, en especial els relatius a la inducció de la UPR (apartat 8 de **Resultats**), ens va portar a estudiar la possible interacció genètica entre *GRX6/GRX7* i *ERO1*, que, com ja s'ha explicat, codifica per una oxidasa de RE implicada en el plegament oxidatiu de les proteïnes. Amb aquest objectiu, i donat que *ERO1* és un gen essencial, es va construir un mutant en el qual el promotor endogen d'*ERO1* es va substituir per un promotor *tetO₂* regulable per doxiciclina (Bellí et al., 1998a). En aquesta soca que expressa condicionalment *ERO1* es van introduir també les mutacions nul·les en *GRX6* i *GRX7*. Tal i com esperàvem, la soca salvatge per *GRX6/GRX7* que expressa *ERO1* sota el promotor *tetO₂* no creix quan aquest promotor es tanca amb l'addició de doxiciclina al medi. La **Figura 42** mostra com l'efecte sobre el creixement és depenent de la concentració de doxiciclina. En medi

RESULTATS

líquid, i a 30°C, la inhibició del creixement era pràcticament total a una dosi de 2 µg/ml després d'un temps d'exposició de setze hores (resultats no mostrats). En els següents experiments de la memòria s'utilitza aquesta dosi de l'antibiòtic per obtenir unes condicions experimentals de baixos nivells d'Ero1, i en tot cas es juga amb el temps d'exposició, que varia segons s'indica en cada cas.

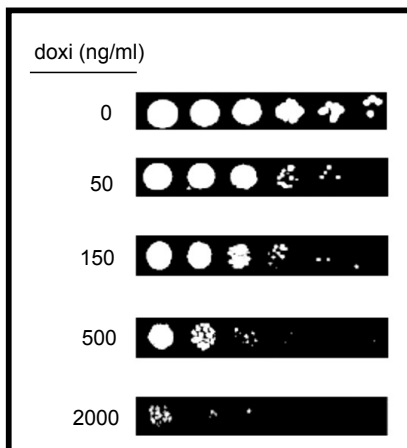


Figura 42. Creixement de la soca *tetO₂-ERO1* (MML1221) en medi SC sòlid amb les concentracions indicades de doxiciclina. Les plaques inoculades amb les dilucions seriades (1:5) es van incubar durant dos dies a 30°C.

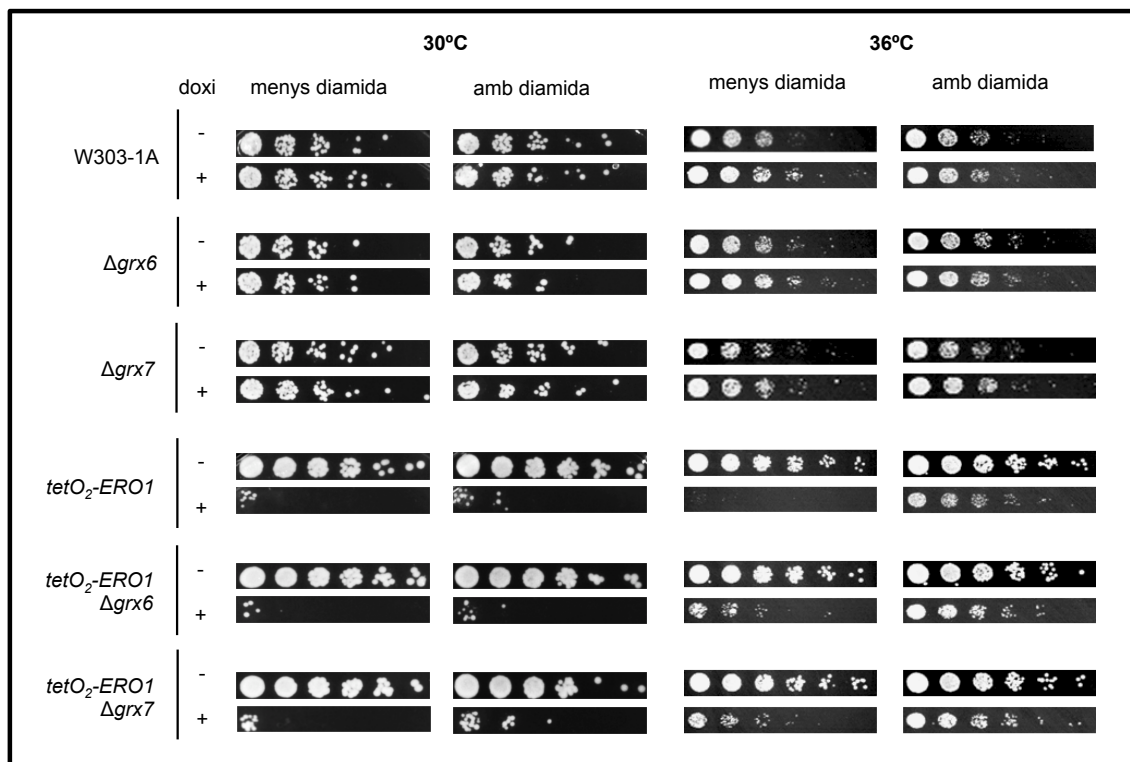


Figura 43. Dilucions seriades de cultius de les soques salvatge (W303-1A), *Δgrx6* (MML1680), *Δgrx7* (MML887), *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789) i *tetO₂-ERO1Δgrx7* (MML1791) creixent exponencialment en medi SC a 25°C, que van ser adicionades sobre plaques de medi SC sòlid amb o sense doxiciclina (2 µg/ml) i amb o sense diamida (0,3 mM). Les plaques es van incubar durant dos dies a 30°C i a 36°C.

Els estudis previs de Frand i Kaiser (1998) amb un mutant termosensible *ero1-1* (amb pèrdua de funció Ero1 a temperatures iguals o superiors a 36°C) mostraven que aquest mutant podia créixer a una temperatura lleugerament inferior a la fisiològica (25°C) i que esdevenia inviable a 36°C, i el que és remarcable, que l'agent oxidant de grups tiol diamida rescatava l'absència de creixement a 36°C. Així doncs, nosaltres vàrem utilitzar els mutants condicionals amb la construcció *tetO₂-ERO1* i els respectius derivats sense *GRX6* o *GRX7* fent-los créixer exponencialment a 25°C i plaquejant-los tant a la temperatura subòptima de 36°C com a la fisiològica de 30°C, en presència i absència de doxiciclina i/o de diamida.

Com es mostra a la **Figura 43**, a 30°C no s'observen diferències significatives pel que fa a l'absència de creixement de la soca que té reprimida l'expressió d'*ERO1* amb doxiciclina i aquelles que a més a més no tenen *GRX6* o bé *GRX7*. A aquesta temperatura la diamida no rescata d'una manera clara els defectes del creixement degut a la falta d'Ero1. En canvi, a 36°C tant la introducció de la mutació $\Delta grx6$ com la mutació $\Delta grx7$ rescaten significativament la letalitat causada per la disminució de l'expressió d'*ERO1*. A més a més, a aquesta temperatura, i tal com succeeix amb la mutació condicional termosensible *ero1-1* (Frand i Kaiser, 1998), la diamida també rescata els defectes de creixement de la soca amb baixos nivells d'Ero1, i el rescat és quasi total en les soques que a més a més dels baixos nivells d'Ero1 no expressen *GRX6* o *GRX7*. En conclusió, aquests resultats suggereixen que l'absència de Grx6, com també la de Grx7, crea unes condicions oxidants al RE que compensen en part els baixos nivells de l'oxidasa Ero1, el qual relaciona funcionalment aquestes GRXs amb la maquinària de plegament proteic.

11. L'ABSÈNCIA DE GRX6 O GRX7 CONTRARESTA ELS DEFECTES EN LA SECRECIÓ DE CARBOXIPEPTIDASA Y D'UN MUTANT SENSE FUNCIO Ero1

11.1. ANÀLISI PER WESTERN BLOT

Estudis previs d'aquest mateix grup van mostrar que la falta de Grx6 i/o Grx7 no afecta els nivells ni les característiques detectables en gel de la proteïna CPY acumulada en

RESULTATS

les cèl·lules (Izquierdo et al., 2008). Cal recordar que CPY és una proteïna vacuolar que és processada mentre és secretada a través del RE i Golgi, com també en el seu destí final a la vacuola (veure apartat 3.4 de la **Introducció**), de manera que s'utilitza habitualment com a proteïna reportera de la funcionalitat de la maquinària de plegament/secreció en les cèl·lules de llevat.

La possible interacció funcional entre les dues GRXs de RE/Golgi i Ero1, i més concretament, la capacitat de rescatar parcialment els defectes de creixement per la falta d'Ero1 quan també falten Grx6 o Grx7, ens va portar a analitzar el processament de CPY en les mateixes soques en què s'havien fet els estudis de creixement [**Figura 43**]. En aquesta línia, Frand i Kaiser (1998) van demostrar que el mutant termosensible *ero1-1* presenta un bloqueig en la maduració de la proteïna CPY a la temperatura restrictiva de 36°C, similar al que es produeix amb el tractament d'una soca salvatge amb DTT (5 mM), indicant que la CPY es reté al RE degut a un defecte en la formació de ponts disulfur en aquestes condicions. Aquests resultats van confirmar, doncs, que l'activitat oxidasa d'Ero1 és necessària pel processament i transport adequat de proteïnes des del RE. En conseqüència, es va voler saber com afectava l'addició de les mutacions en *GRX6* i/o *GRX7* a una soca *tetO₂-ERO1* tractada amb doxiciclina, la qual presenta defectes en el processament i secreció de proteïnes degut als baixos nivells d'Ero1.

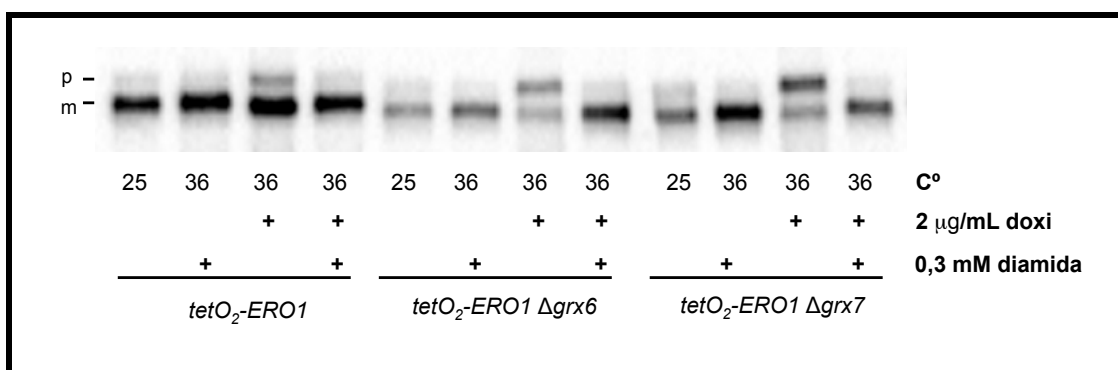


Figura 44. Anàlisi per Western blot de la proteïna CPY acumulada en cultius de les soques *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789) i *tetO₂-ERO1Δgrx7* (MML1791) creixent inicialment en medi SC a 25°C, i a continuació tractats durant 16 hores a 36°C amb/sense doxiciclina (2 μg/ml) i amb/sense diamida (0,3 mM), abans d'obtenir les mostres per l'anàlisi. Es va agafar també una mostra control de cada soca a partir dels cultius a 25°C, prèviament al tractament. "p" indica la posició de la forma precursora (RE/Golgi) acumulada; "m" indica la posició de la forma madura de CPY.

En un principi vàrem estudiar les característiques de la proteïna CPY total acumulada en absència d'Ero1 i de Grx6 o Grx7, amb els respectius controls. Per això, es van tractar el mutant condicional *tetO₂-ERO1* i els respectius derivats Δ *grx6* i Δ *grx7* durant 16 hores amb doxiciclina a 36°C, abans d'obtenir els extractes cel·lulars. Els resultats de l'anàlisi per Western blot mostren diferències en les característiques de la CPY acumulada entre la soca *tetO₂-ERO1* i aquelles que tampoc expressen *GRX6* o *GRX7*, a 36°C i en presència de doxiciclina [Figura 44]. Així, mentre que, com es podia esperar, la falta de funció Ero1 provoca una certa acumulació relativa de la forma precursora de CPY, que és revertida pel tractament amb diamida, aquesta acumulació relativa de la proteïna precursora s'intensifica quan falta Grx6 o Grx7 d'una manera que també és revertida per la diamida. Aquests resultats confirmen l'existència d'una relació funcional entre la manca de Grx6 o Grx7 i la maquinària de plegament/secrèció de proteïnes al RE/Golgi, però semblaven contradictoris amb la capacitat de rescat dels defectes de creixement deguts als baixos nivells d'Ero1 per part de les mutacions Δ *grx6* i Δ *grx7* [Figura 43]. No obstant, cal remarcar que en aquest tipus d'experiment s'anализava i es comparava la proteïna total acumulada en les diferents soques en unes condicions fisiològiques (és a dir, de creixement) no comparables entre elles, i que en particular la soca *tetO₂-ERO1* en presència de doxiciclina havia aturat el creixement i probablement la síntesi i conseqüent acumulació de proteïnes des de varies hores abans de recollir les mostres. En conseqüència, es van planificar experiments de pols i caça, que es mostren més endavant (apartat 11.2 de **Resultats**), els quals permeten fer un seguiment en detall de les molècules de proteïna CPY sintetitzades durant una finestra estreta de temps.

Abans dels experiments de pols i caça, entre altres experiments, vam determinar si aquestes diferències en les formes de proteïna CPY acumulades en les diferents soques s'observaven també a les temperatures de 25°C i 30°C. Efectivament, aquest va ser el cas, de manera que la manca de *GRX6* i *GRX7* també determina per l'acumulació relativa de més forma precursora de CPY a aquestes temperatures en condicions de baixos nivells d'Ero1 [Figura 45].

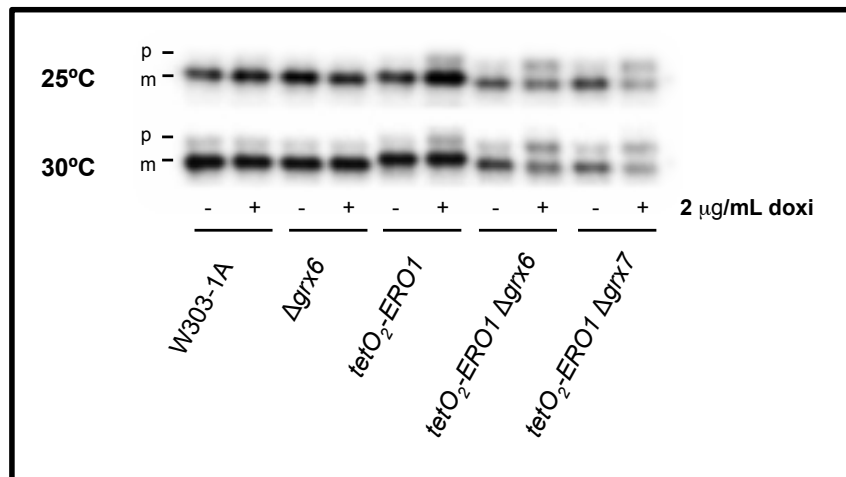


Figura 45. Anàlisi per Western blot de la proteïna CPY acumulada en cultius de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680), $tetO_2-ERO1$ (MML1221), $tetO_2-ERO1\Delta grx6$ (MML1789) i $tetO_2-ERO1\Delta grx7$ (MML1791) creixent inicialment en medi SC a 25°C, i a continuació tractats durant 16 hores a 25°C o 30°C amb/sense doxiciclina (2 $\mu g/ml$), abans d'obtenir les mostres per l'anàlisi. "p" indica la posició de la forma precursora (RE/Golgi) acumulada; "m" indica la posició vacuolar de la forma madura de CPY.

Per una altra banda, el mutant $\Delta pmr1$ presenta un retard en la maduració de la CPY (Antebi i Fink, 1992), fet que suggeriria que el transport vesicular necessita uns nivells adequats de Ca^{2+} i Mn^{2+} als compartiments del RE i/o Golgi. *A posteriori*, Vashist et al. (2002) van mostrar que el mutant $\Delta pmr1$ presenta, més concretament, un defecte en el processament de carbohidrats al RE, concretament en el pas de l'oligosacàrid $Man_9GlcNAc_2$ a $Man_8GlcNAc_2$, sent l'enzim responsable d'aquest pas la manosidasa I de RE, la qual requereix Ca^{2+} per la seva activitat. El mutant també presenta defectes en l'extensió de la cadena de carbohidrats a l'aparell de Golgi, probablement degut a la necessitat de tant Ca^{2+} com Mn^{2+} per les activitats dels enzims processius que se n'encarreguen.

En conseqüència, vàrem ampliar l'estudi sobre les formes de CPY acumulades, introduint la mutació en *PMR1*, i també la derivada doble mutació en *GRX6*, en la soca $tetO_2-ERO1$. Els resultats de l'anàlisi per Western blot [Figura 46] mostren que en condicions restrictives per l'expressió d'*ERO1* la mutació $\Delta pmr1$ no provoca un increment de la quantitat relativa de forma precursora de CPY acumulada, a diferència de la mutació $\Delta grx6$. El doble mutant $\Delta grx6\Delta pmr1$ en condicions de baixos nivells d'*Ero1* es comporta de manera intermèdia entre el mutant simple $\Delta pmr1$ i $\Delta grx6$ en aquestes mateixes condicions. Aquests resultats confirmen les diferències entre *Grx6* i *Pmr1* també pel que fa a la seva interacció funcional amb *Ero1*, suggerint que *Pmr1* no

sembla interaccionar funcionalment amb Ero1, a diferència del que succeeix amb Grx6.

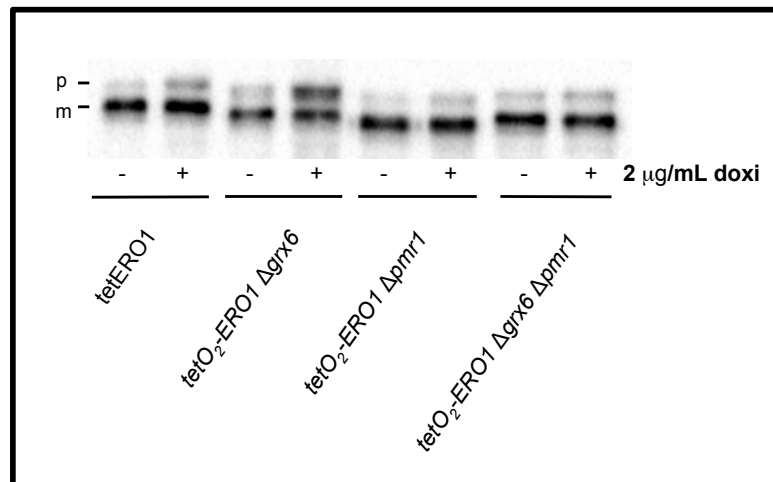


Figura 46. Anàlisi per Western blot de la proteïna CPY acumulada en cultius de les soques *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789), *tetO₂-ERO1Δpmr1* (MML1803) i *tetO₂-ERO1Δpmr1Δgrx6* (MML1807) creixent inicialment en medi SC a 25°C, i a continuació tractats durant 16 hores amb/sense doxiciclina (2 μg/ml) a 36°C, abans d'obtenir les mostres per l'anàlisi. "p" indica la posició de la forma precursora (RE/Golgi) acumulada; "m" indica la posició vacuolar de la forma madura de CPY.

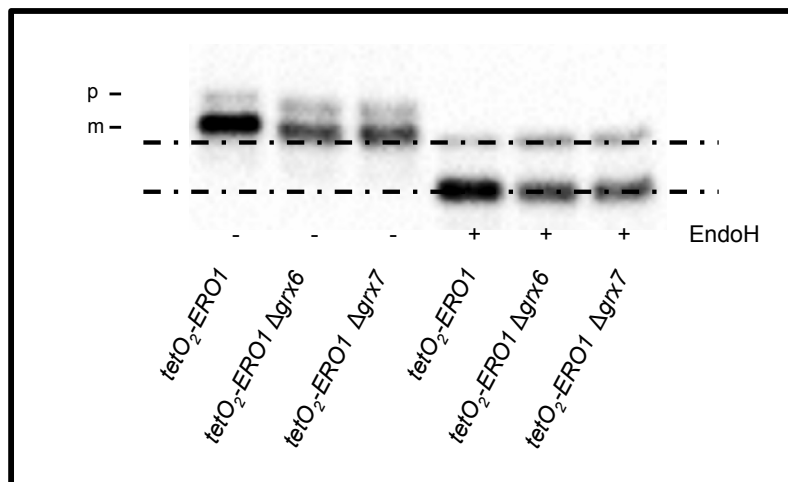


Figura 47. Anàlisi per Western blot de la proteïna CPY acumulada en cultius de les soques *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789) i *tetO₂-ERO1Δgrx7* (MML1791) creixent inicialment en medi SC a 25°C, a continuació tractats durant 16 hores amb/sense doxiciclina (2 μg/ml) a 36°C, i llavors tractats o no amb l'enzim endoH. "p" indica la posició de la forma precursora (RE/Golgi) acumulada; "m" indica la posició vacuolar de la forma madura de CPY.

RESULTATS

Els resultats mostrats a les **Figures 44-46** indiquen una disminució moderada però reproducible de la mobilitat electroforètica de CPY en la soca *tetO₂-ERO1*, que sembla recuperar-se en els respectius mutants en *GRX6* o *GRX7*, tant en presència com en absència de doxiciclina. Aquesta diferència en la mobilitat podria reflectir problemes en l'elongació de les cadenes N-polisacàridiques de les proteïnes, entre elles CPY, a nivell de RE/Golgi. Per comprovar-ho, es van tractar els extractes proteics de la soca *tetO₂-ERO1* i dels respectius mutants sense *GRX6* o *GRX7* amb l'enzim endoH, que elimina els N-carbohidrats de les proteïnes, per a continuació analitzar la mida de la CPY per Western blot. La **Figura 47** indica que la mobilitat de CPY en les tres mostres s'igualava després del tractament amb endoH. Això suggereix que la soca *tetO₂-ERO1* presenta ja de bon principi un desequilibri homeostàtic redox, degut a que *Ero1* s'expressa sota un promotor sintètic regulable, que es reflexa en defectes en l'elongació de la cadena N-polisacàridica, mentre que l'absència addicional de *GRX6* o *GRX7* semblaria millorar aquesta homeòstasi redox cap a una situació d'equilibri, afavorint la correcta elongació dels N-polisacàrids.

11.2. ANÀLISI PER POLS I CAÇA

Com ja s'ha apuntat abans, per tal de determinar amb més exactitud la cinètica de maduració/secreció de la CPY en els diferents mutants estudiats es van plantejar experiments de pols (amb metionina i cisteïna radioactives) i caça posterior en períodes de fins a 14 minuts, seguit de immunoprecipitació de la CPY, separació electroforètica i anàlisi autoradiogràfic (veure apartat 13 de **Material i Mètodes** per als detalls experimentals). Aquests experiments permetien, a més a més, distingir entre la forma precursora p1 pròpia de RE i la p2, amb unes cadenes N-glicosídiques més llargues, pròpia de l'aparell de Golgi (Frand i Kaiser, 1998; Vashist et al., 2002).

Els experiments de pols i caça es van fer inicialment amb la soca salvatge, comparada amb els mutants simples $\Delta grx6$ i $\Delta grx7$, demostrant que la conversió de les formes precursors a la forma madura de la proteïna CPY segueix la mateixa cinètica en els dos mutants que en la soca salvatge a la temperatura fisiològica de 30°C [**Figura 48**]. Donat que el mutant $\Delta grx6$ té la via de la calcineurina constitutivament induïda, i que la inhibició d'aquesta resulta en un lleuger defecte en el creixement, es va voler examinar si l'activació de la via de la calcineurina era necessària per rescatar possibles defectes de secreció en el mutant. La **Figura 48** mostra que la inhibició de la via amb FK506 no provoca defectes aparents en la secreció de la proteïna CPY en el mutant $\Delta grx6$ en

comparació amb la soca salvatge. Per tant, l'activació de la via de la calcineurina en la soca $\Delta grx6$ no sembla estar lligada amb un possible rescat dels defectes en secreció. Tal i com era d'esperar, el mutant $\Delta grx7$, el qual no té aquesta via constitutivament induïda, tampoc mostra diferències en la secreció proteica quan aquest es tracta amb l'inhibidor FK506 [Figura 48].

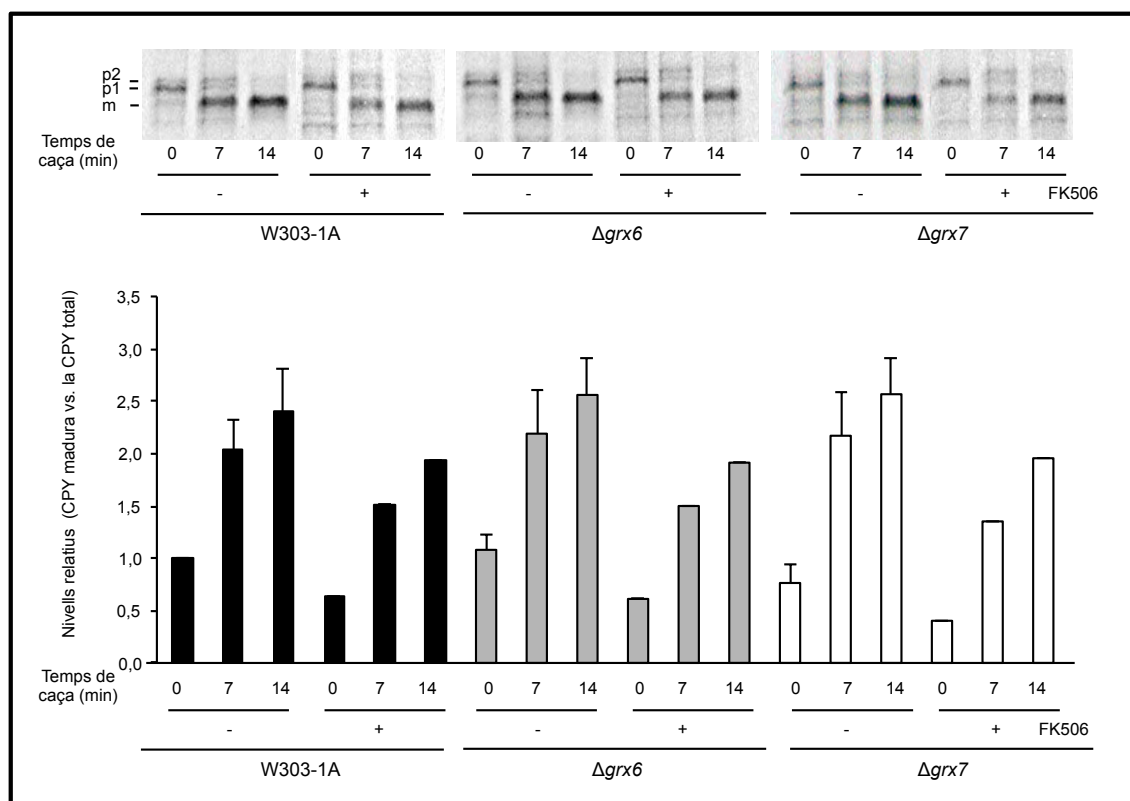


Figura 48. Anàlisi per pols i caça del processament de CPY a 30°C, a partir dels cultius de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680) i $\Delta grx7$ (MML887), creixent prèviament en medi SC a 25°C. Els cultius es van mantenir durant 10 hores a 30°C, en presència/absència de FK506 (2 µg/ml) en els casos indicats. A continuació, es van sotmetre a un pols de 6 minuts amb precursors radioactius, seguit de l'addició d'un excés d'aminoàcids no radioactius a temps 0, el qual marca l'inici del període de caça, agafant mostres als temps indicats. "p1" i "p2" indiquen les posicions de les formes precursors del RE i aparell de Golgi, respectivament. "m" indica la posició de la forma madura de CPY (vacuola). Els valors del rati entre els nivells de forma CPY madura vs. la forma CPY total per cadascun dels punts es van relativitzar respecte la soca salvatge sense tractament a temps de caça 0 min, a la qual se li va donar el valor unitat.

Havent confirmat l'absència de diferències en la cinètica de maduració de CPY entre els mutants simples $\Delta grx6$ o $\Delta grx7$ i la soca salvatge, es va estudiar aquesta cinètica en els mutants $\Delta grx6$ i $\Delta grx7$ que tenen regulada l'expressió d'*ERO1* per doxiciclina.

RESULTATS

Amb aquest objectiu, es va realitzar primerament una cinètica de creixement en medi líquid de les diferents soques en les mateixes condicions experimentals a aplicar en els experiments de marcatge radioactiu. D'aquesta manera s'intentava trobar un temps de tractament amb doxiciclina (disminució dels nivells d'Ero1) suficient per manifestar defectes significatius en el creixement però en el qual les cèl·lules es mantinguessin encara metabòlicament actives. La **Figura 49** confirma, inclús amb més claredat, els resultats obtinguts en medi sòlid [**Figura 43**], demostrant que les mutacions $\Delta grx6$ o $\Delta grx7$ rescaten molt significativament els defectes de creixement per la manca d'Ero1. A partir de les cinètiques obtingudes es va escollir un temps de 10 hores de tractament amb doxiciclina a 36°C per realitzar els experiments de pols i caça amb aquestes soques.

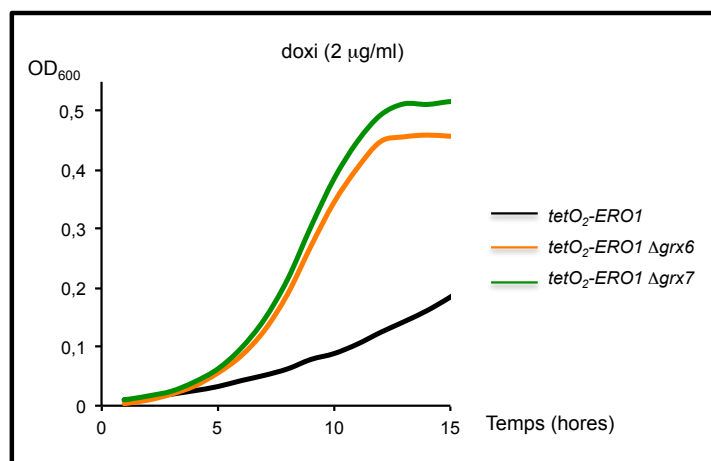


Figura 49. Cinètica de creixement de les soques *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789) i *tetO₂-ERO1Δgrx7* (MML1791) en medi SC a 36°C, a partir de cultius en fase exponencial de creixement a 25°C. Els cultius es van tractar durant un total de 15 hores amb doxiciclina (2 μg/ml) a 36°C.

Els resultats del següent experiment de pols i caça [**Figura 50**] confirmen els anteriors treballs amb el mutant termosensible *ero1-1* a 36°C (Fränd i Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998), de manera que quan la funció Ero1 està compromesa, com succeeix en condicions de disminució de l'expressió d'*ERO1* amb doxiciclina, hi ha un retard significatiu en la maduració de CPY comparat amb la de les soques control (sense doxiciclina). Això és especialment evident al final del període de pols radioactiu (temps 0), en el qual gairebé tota la proteïna CPY recent sintetitzada es troba en la forma precursora quan els nivells d'expressió d'*ERO1* són baixos, en contrast amb la situació quan *ERO1* s'expressa als nivells ectòpics normals sota el promotor *tetO₂*. No obstant,

la introducció addicional tant de la mutació $\Delta grx6$ com la mutació $\Delta grx7$ rescata els anteriors defectes de processament de CPY en les condicions de baixos nivells d'Ero1 [Figura 50]. En tots els casos, els defectes de maduració/secreció de CPY es reverteixen quan s'afegeix diamida al medi de cultiu [Figura 50].

Aquests resultats, considerant paral·lelament els obtinguts en l'anàlisi del creixement cel·lular [Figura 43], suggereixen altra vegada que l'absència de Grx6 o Grx7 crea unes condicions oxidants que recuperen parcialment la funcionalitat prèviament compromesa (per la disminució dels nivells d'Ero1) de la maquinària de plegament i secreció proteica.

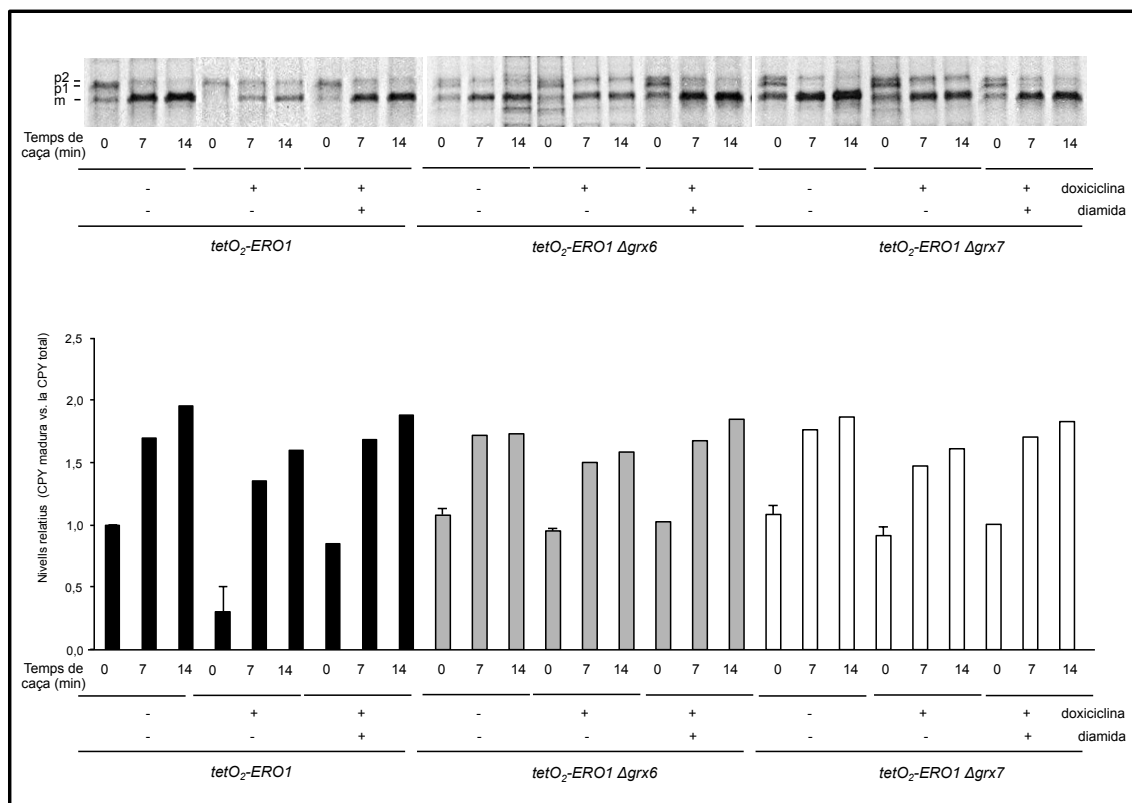


Figura 50. Anàlisi per pols i caça de la secreció de CPY a 36°C, a partir dels cultius de les soques *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789) i *tetO₂-ERO1Δgrx7* (MML1791) creixent prèviament en medi SC a 25°C. Després de transferir-los a 36°C, els cultius es van tractar durant 10 hores amb doxiciclina (2 μg/ml) i/o diamida (0,3 mM) en els casos indicats. A continuació, es van sotmetre a un pols de 5 minuts amb precursors radioactius seguit de la caça durant els temps indicats. "p1" i "p2" indiquen les posicions de les formes precursors del RE i aparell de Golgi, respectivament; "m" indica la posició de la forma madura de CPY (vacuola). Els valors del rati entre els nivells de forma CPY madura vs. la forma CPY total per cadascun dels punts es van relativitzar respecte la soca *tetO₂-ERO1* sense tractament a temps de caça 0 min, a la qual se li va donar el valor unitat.

12. LA MANCA DE GRX6 o GRX7 CREA CONDICIONS OXIDANTS AL LUMEN DEL RE

Donat que existeix una estreta relació entre el plegament proteic i el potencial redox al RE (Sevier i Kaiser, 2002; Tu i Weissman, 2004), es va mesurar l'estat redox en temps real al lumen del RE de la soca *tetO₂-ERO1* i les respectives soques que a més a més no expressen *GRX6* o *GRX7*, en presència o no de doxiciclina, ja que aquestes presenten diferent grau d'afectació del plegament i de la secreció proteica [Figura 50]. Amb aquest objectiu, es va transformar aquestes soques amb el plàsmid pPM28, que expressa una variant de GFP (GFP*) que es localitza al lumen del RE i conté dos residus de cisteïna que la fan sensible a les condicions redox de l'entorn. En condicions oxidants es forma un pont disulfur entre aquestes cisteïnes que canvia les propietats fluorescents de la molècula, quan s'excita a 405 i 488 nm. Així, quan està en estat oxidat incrementa la fluorescència emesa a 405 nm i disminueix la emesa a 488 nm, i viceversa quan està en estat reduït. Es va determinar la fluorescència emesa a aquestes longituds d'ona per les diferents soques, corresponent als nivells basals, i també es va fer un seguiment durant 3 hores de la fluorescència emesa per aquestes després d'un tractament amb DTT, fent una lectura cada 3 min d'un total de 10⁴ cèl·lules cada vegada. Finalment, s'obtenia la mitjana del rati de la fluorescència emesa a 488 nm vs. 405 nm, indicatiu de l'estat redox al lumen del RE.

Els resultats mostren que no hi ha diferències significatives entre els nivells constitutius del rati GFP* entre la soca *tetO₂-ERO1* i aquelles que a més a més no expressen *GRX6* o *GRX7*. No obstant, quan aquestes soques es tracten amb doxiciclina, l'absència addicional de *GRX6* o *GRX7* en una soca amb baixos nivells d'Ero1 resulta en un rati GFP* constitutivament més baix (indicatiu de major oxidació) que la soca amb baixos nivells d'Ero1 que presenta activitat Grx6 o Grx7 [Figura 51A i B].

El tractament amb DTT provoca un ràpid increment del valors del rati GFP*, seguit d'una resposta adaptativa de la cèl·lula per reduir aquest estrès. La presència de les mutacions $\Delta grx6$ o $\Delta grx7$ en la soca *tetO₂-ERO1* permet un increment més accentuat del rati GFP* (cap a un estat més reduït) que en la soca *tetO₂-ERO1*, indicant que en absència d'una d'aquestes GRXs la resposta reductiva del DTT dins el lumen del RE d'aquestes soques és més intensa. Ara bé, tant la soca *tetO₂-ERO1* com els respectius derivats sense *GRX6* o *GRX7* s'adapten ràpidament a l'estrès per DTT, arribant als valors del rati GFP* previs al tractament, similars en les tres soques [Figura 51A]. El

tractament amb DTT de la soca amb baixos nivells d'Ero1 (tractada amb doxiciclina) també provoca un ràpid increment del rati GFP*, però aquesta no aconsegueix arribar als valors de partida dins del període d'adaptació analitzat. No obstant, l'absència addicional de *GRX6* o *GRX7* en aquestes condicions millora la resposta adaptativa de la soca amb baixos nivells d'Ero1 a l'estrès per DTT, de manera que les cèl·lules retornen ràpidament als nivells clarament oxidants de partida [Figura 51B].

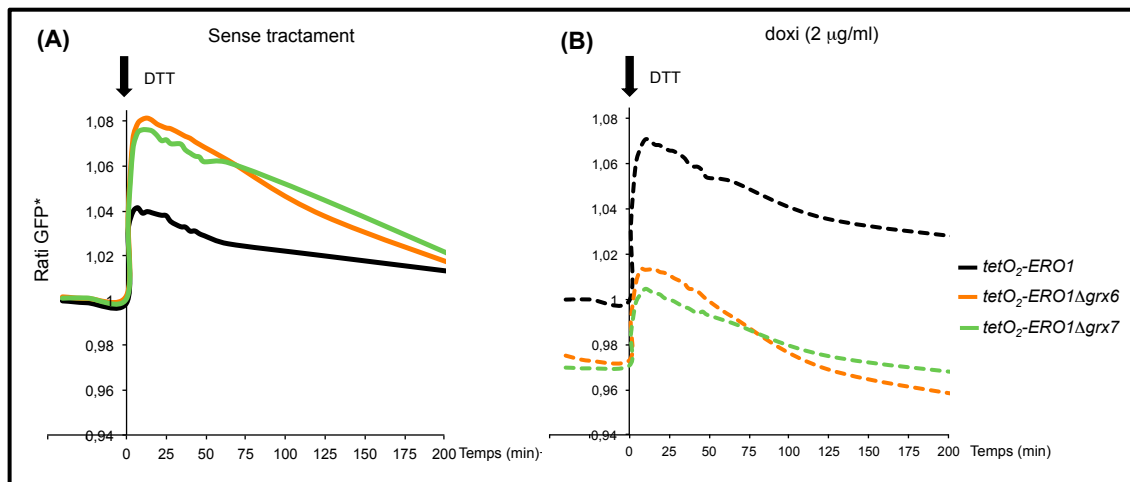


Figura 51. Mesura en temps real del potencial redox al RE de la soca *tetO₂-ERO1* i els respectius mutants que no expressen *GRX6* o *GRX7*, **A)** en absència o **B)** en presència de doxiciclina (10 hores), a 36°C. Els respectius cultius dels transformants amb el plàsmid pPM28 en fase exponencial de creixement en medi SC eren tractats a temps 0 amb DTT (2 mM), mesurant a continuació la fluorescència emesa cada 3 min, fins a un total de 3 hores aproximadament. El rati de fluorescència emesa pel reporter GFP* (excitació a 488 nm vs. 405 nm) està expressat en \log_2 i normalitzat respecte a les cèl·lules *tetO₂-ERO1* (amb/sense doxiciclina) abans del tractament amb DTT, a la qual se li va donar el valor unitat.

En resum, aquests resultats recolzen aquells obtinguts en els experiments de pols i caça i confirmen que la manca de Grx6 o Grx7 quan els nivells d'Ero1 estan per sota dels fisiològics resulta en un ambient més oxidant al lumen del RE.

13. L'ACUMULACIÓ DE Ca²⁺ EN EL MUTANT Δ grx6 ÉS INDEPENDENT DE LA MAQUINÀRIA DE PLEGAMENT/SECRECIÓ PROTEICA

El canvi en l'ambient redox, el qual és necessari per la funcionalitat de la maquinària de maduració/secreció proteica, podria ser la causa de l'alteració de l'homeòstasi del

RESULTATS

Ca^{2+} en les cèl·lules Δgrx6 , afectant potser la compartimentalització de transportadors d'aquest ió i/o la regulació d'aquests transportadors. Alternativament, l'alteració de l'homeòstasi del Ca^{2+} en el mutant podria ser la causa primària del canvi en la funcionalitat de la maquinària de maduració/secrèció proteica, donada la necessitat d'uns nivells de Ca^{2+} adequats pel bon funcionament d'aquesta maquinària. D'altra banda, ambdós alteracions podrien ser independents una de l'altra. El següent objectiu era determinar quina de les tres hipòtesis era la correcta.

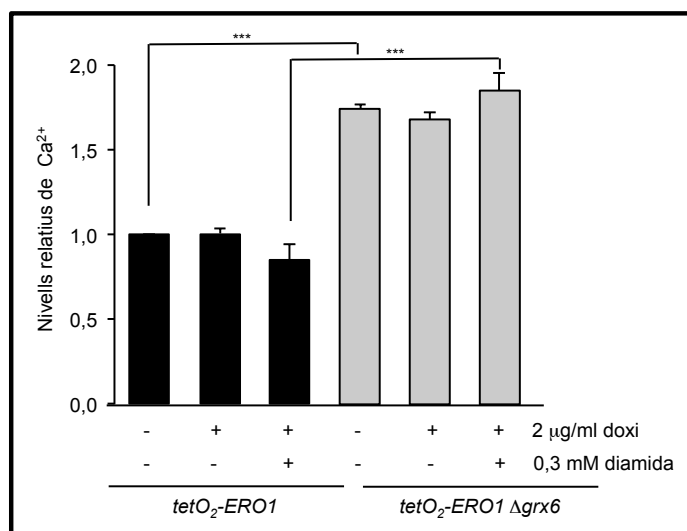


Figura 52. Anàlisi dels nivells relatius de Ca^{2+} citosòlic, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques *tetO₂-ERO1* (MML1221) i *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789), tractades amb doxiciclina (2 μg/ml) i diamida (0,3 mM) durant 10 hores en els casos indicats, en medi YPD a 36°C. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (\pm s.d), i estan relativitzats respecte a la soca *tetO₂-ERO1*, a la qual se li va donar el valor unitat.

En primer lloc, es van mesurar els nivells de Ca^{2+} en la soca *tetO₂-ERO1* i el corresponent derivat Δgrx6 , en les mateixes condicions utilitzades durant l'anàlisi de la secreció de CPY [Figura 50], és a dir, a 36°C i en presència i absència de doxiciclina i/o diamida. Els resultats mostren que l'absència de *GRX6* incrementa els nivells de calci de la soca *tetO₂-ERO1* al doble, independentment de la presència de doxiciclina, com també de diamida [Figura 52], i en concordança amb els resultats presentats anteriorment de la soca Δgrx6 [Figura 22]. Aquestes observacions recolzen que l'increment en els nivells de Ca^{2+} citosòlic és una conseqüència específica i directa de la falta de *GRX6*, ja que es produeix també en presència addicional de diamida, quan la secreció de CPY no sembla estar afectada [Figura 50]. Això confirma que

l'acumulació de Ca^{2+} en absència de *GRX6* succeeix independent de la funcionalitat de la maquinària de plegament proteic en condicions d'expressió ectòpica d'*ERO1*.

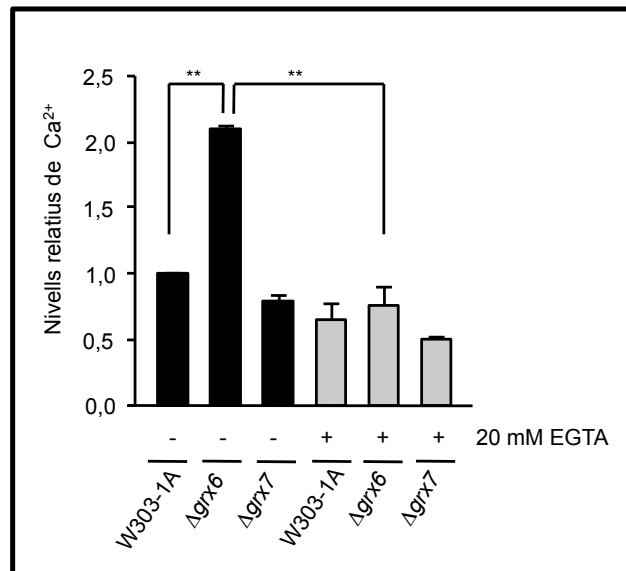


Figura 53. Anàlisi dels nivells relatius de Ca^{2+} citosòlic, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques salvatge (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML1680) i $\Delta grx7$ (MML887) tractades amb EGTA (20 mM) durant 10 hores, en medi YPD a 36°C. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (\pm s.d), i estan relativitzats respecte a la soca salvatge, a la qual se li va donar el valor unitat.

En segon lloc, ens vam preguntar si la reducció dels nivells de Ca^{2+} en el mutant $\Delta grx6$ provocaria algun canvi en el processament de CPY. Per respondre aquesta pregunta, inicialment vam tractar tant la soca salvatge com els dos mutants $\Delta grx6$ i $\Delta grx7$ amb EGTA per tal de determinar si aquest tractament igualava els nivells intracel·lulars del catió entre les soques. El tractament es va realitzar a 36°C, donat que aquest quelant provocava unes diferències més acusades sobre el creixement dels cultius en aquestes condicions [Figura 31]. Es va comprovar que el tractament amb EGTA igualava els nivells de Ca^{2+} citosòlics del mutant $\Delta grx6$ als nivells de la soca salvatge, i que en el cas del mutant $\Delta grx7$ tractat amb EGTA aquests nivells resultaven ser encara més baixos [Figura 53]. Els posteriors experiments de pols i caça mostren que tampoc hi ha diferències en el processament de CPY entre el mutant $\Delta grx6$, el mutant $\Delta grx7$, i la soca salvatge quan els cultius es tracten amb EGTA [Figura 54], indicant que la reducció dels nivells intracel·lulars de Ca^{2+} en cèl·lules deficientes en Grx6 fins als nivells de la soca salvatge no té efectes en la maduració/secrèció de CPY. Cal

RESULTATS

remarcar també que la lleugera reducció del Ca^{2+} citosòlic en el mutant Δgrx7 tractat tampoc afecta la cinètica de maduració de CPY.

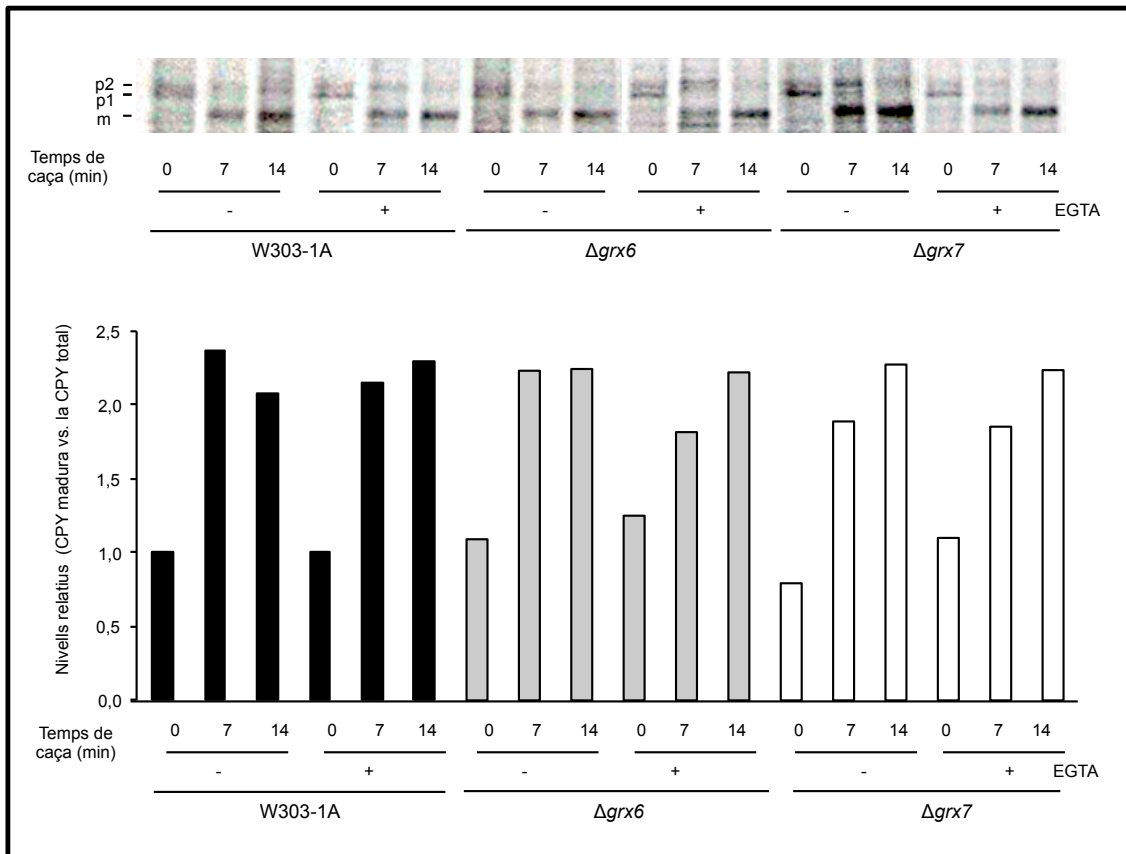


Figura 54. Anàlisi per pols i caça de la secreció de CPY a 36°C, a partir dels cultius de les soques salvatge (W303-1A), Δgrx6 (MML1680) i Δgrx7 (MML887) creixent prèviament en medi SC a 25°C. Després de transferir-los a 36°C, els cultius es van tractar durant 10 hores amb EGTA (20 mM) en els casos indicats. A continuació, es van sotmetre a un pols de 5 minuts amb precursors radioactius seguit de la caça durant els temps indicats. “p1” i “p2” indiquen les posicions de les formes precursors del RE i aparell de Golgi, respectivament; “m” indica la posició de la forma madura de CPY (vacuola). Els valors del rati entre els nivells de forma CPY madura vs. la forma CPY total per cadascun dels punts es van relativitzar respecte la soca salvatge sense tractament a temps de caça 0 min, a la qual se li va donar el valor unitat.

Havent confirmat l’absència de diferències en la cinètica de maduració de CPY entre els mutants simples Δgrx6 , Δgrx7 i la soca salvatge tractats amb EGTA, es va estudiar també aquesta cinètica en els mutants Δgrx6 i Δgrx7 portadors de la construcció $\text{tetO}_2\text{-ERO1}$ en condicions de tractament amb EGTA. Abans, no obstant, es va comprovar si aquest tractament amb EGTA disminueix els nivells de Ca^{2+} de la soca $\text{tetO}_2\text{-ERO1}\Delta\text{grx6}$ fins a nivells de la soca $\text{tetO}_2\text{-ERO1}$, i efectivament aquest és el cas tant

en presència com en absència de doxiciclina [Figura 55]. Pel que fa a la soca *tetO₂-ERO1Δgrx7* els nivells de Ca²⁺ es mantenen semblants als de la soca salvatge en totes les condicions analitzades. Cal remarcar les diferències existents entre els nivells de Ca²⁺ de les soques *Δgrx6* i *Δgrx7* amb baixos nivells d'Ero1 (cultius tractats amb doxiciclina) [Figura 55], quan en ambdós casos la secreció de CPY és normal [Figura 50]. Aquest resultat confirma que és possible separar experimentalment els defectes de l'acumulació de Ca²⁺ de les alteracions en la secreció de CPY, el què apunta a que en el cas de la mutació *Δgrx6* els dos fenotips poden ser independents.

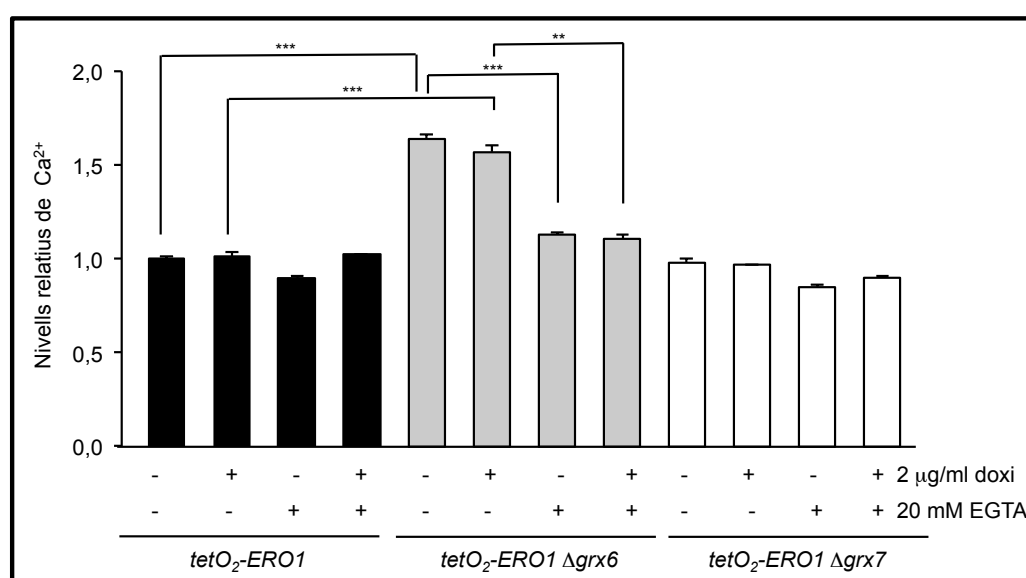


Figura 55. Anàlisi dels nivells relatius de Ca²⁺ citosòlic, a partir de cultius en fase exponencial de creixement de les soques *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789) i *tetO₂-ERO1Δgrx7* (MML1791), tractades o no amb EGTA (20 mM), en presència o absència de doxiciclina (2 μg/ml), durant 10 hores, en medi YPD a 36°C. Els valors corresponen a la mitjana d'un mínim de tres experiments independents (± s.d), i estan relativitzats respecte a la soca *tetO₂-ERO1*, a la qual se li va donar el valor unitat.

Quan es van fer els corresponents experiments de pols i caça amb les mateixes soques [Figura 56], es va observar que l'addició d'EGTA en el mutant condicional *tetO₂-ERO1* en condicions en què expressa baixos nivells d'*ERO1* (presència de doxiciclina) no provoca cap alteració addicional en la secreció de CPY, mantenint-se la mateixa afectació de la secreció per dèficit d'Ero1 observada ja en els cultius no tractats amb el quelant. No obstant, en el mutant condicional *tetO₂-ERO1* portador a més a més de la mutació *Δgrx6*, l'EGTA evita la capacitat de rescat dels defectes en el processament de CPY que es dona quan falta Grx6 en absència d'aquest quelant.

RESULTATS

Això mateix succeeix en la soca *tetO₂-ERO1Δgrx7* tractada amb EGTA [Figura 56]. En altres paraules, el rescat dels defectes en el processament de CPY per manca d'Ero1 que s'observa quan falta Grx6 o Grx7 [Figura 50 i 56] desapareix en presència d'EGTA. Aquesta inhibició per l'EGTA de la capacitat de rescatar el fenotip de la manca d'Ero1 per part de les mutacions *Δgrx6* i *Δgrx7* podria ser deguda a la inducció de la resposta UPR en aquestes condicions en ambdós mutants, provocant un augment de l'expressió de Pdi1 en condicions de gairebé absència d'Ero1 i els conseqüents efectes deleteris sobre la secreció, i no a una conseqüència directa de la disminució dels nivells de Ca²⁺ citosòlic, doncs s'observa tant quan falta *GRX6* com *GRX7*, tot i presentar diferents nivells de Ca²⁺ al citosol prèviament al tractament.

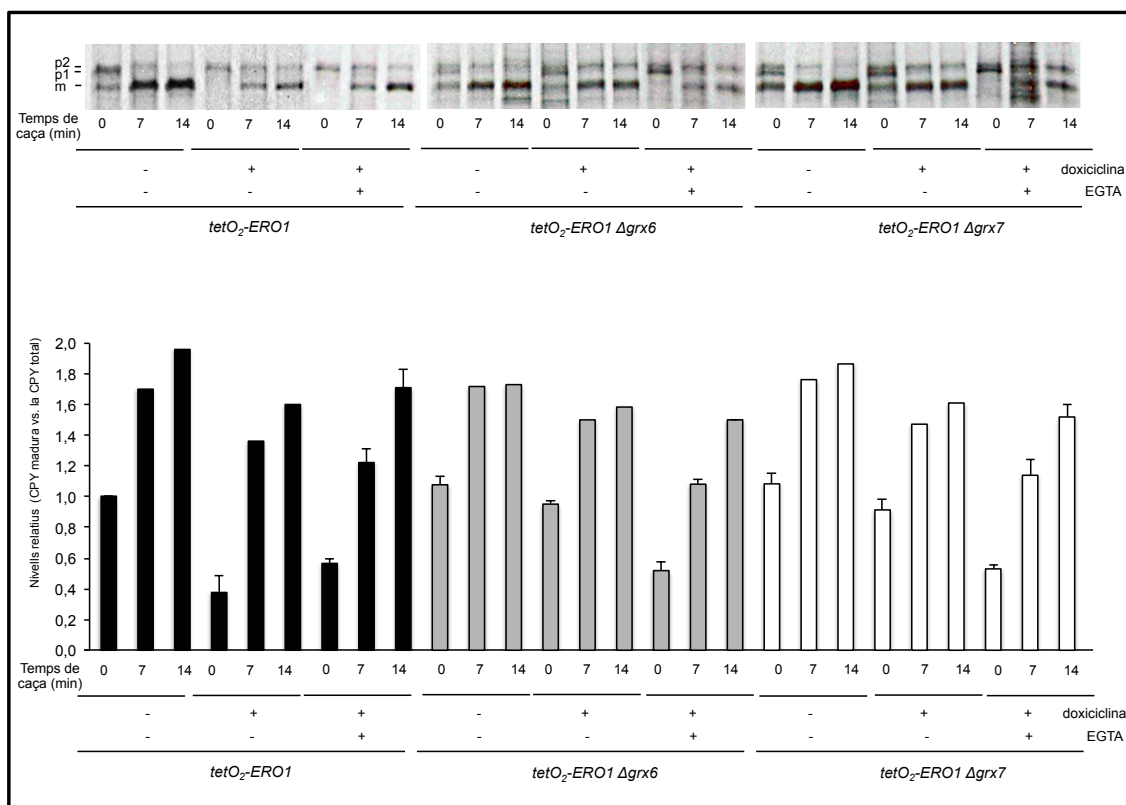


Figura 56. Anàlisi per pols i caça de la secreció de CPY a 36°C, a partir dels cultius de les soques *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789) i *tetO₂-ERO1Δgrx7* (MML1791) creixent prèviament en medi SC a 25°C. Després de transferir-los a 36°C, els cultius es van tractar durant 10 hores amb doxiciclina (2 μg/ml) i/o EGTA (20 mM) en els casos indicats. A continuació, es van sotmetre a un pols de 5 minuts amb precursors radioactius seguit de la caça durant els temps indicats. “p1” i “p2” indiquen les posicions de les formes precursors del RE i aparell de Golgi, respectivament; “m” indica la posició de la forma madura de CPY (vacuola). Els valors del rati entre els nivells de forma CPY madura vs. la forma CPY total per cadascun dels punts es van relativitzar respecte la soca *tetO₂-ERO1* sense tractament a temps de caça 0 min, a la qual se li va donar el valor unitat.

En conjunt, els resultats anteriors suggereixen que hi ha dos defectes resultants de la falta de *GRX6*: per una banda, una alteració de l'homeòstasi del Ca^{2+} , provocada probablement per la desregulació d'un transportador de Ca^{2+} de la via secretora, i per altra banda, un canvi en l'ambient redox del RE (que és extensible a la manca de *GRX7*) que, en derivar cap a condicions més oxidants, permetria compensar en part els defectes de la disminució dels nivells de l'oxidasa Ero1 pel que fa a la funcionalitat de la maquinària secretora.

V. DISCUSSIÓ

Les GRXs participen en mecanismes de defensa antioxidant i de regulació redox a la cèl·lula. En aquest treball ens hem centrat en l'estudi de dues GRXs de *S. cerevisiae*, Grx6 i Grx7. Aquestes comparteixen una sèrie de semblances, doncs ambdues són GRXs monotioliques, es troben a les membranes d'òrgans de la via secretora, encarades al lumen d'aquests, i tenen una identitat de seqüència de gairebé el 50% (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008b). A més a més, estudis bioinformàtics realitzats en paral·lel al nostre laboratori indiquen la seva presència (o almenys la d'una d'elles) en pràcticament totes les espècies de fongs. Tot i les semblances estructurals, Grx6 i Grx7 presenten certes diferències que fan que puguin tenir funcions específiques i diferents en la via secretora. Primer, mentre que Grx6 es distribueix entre el RE i l'aparell de Golgi, Grx7 està majoritàriament sinó totalment localitzada al Golgi, resultant així en diferències en el patró d'O-glicosilació, el qual és més extens en Grx6. Segon, mentre l'expressió de *GRX6* s'indueix en resposta a estrès oxidatiu, per sodi i per calci, de manera dependent de la via de la calcineurina, l'expressió de *GRX7* s'indueix en resposta a estrès oxidatiu i sobretot per sodi, de manera dependent de Msn2/4. Tercer, mentre Grx6 té el motiu CSYS al centre actiu, Grx7 conté el motiu CPYS. Quart, mentre Grx6 pot formar dímers i inclús tetràmers, Grx7 només pot formar dímers de manera no-covalent. I cinquè, mentre Grx6 pot unir centres Fe/S al seu centre actiu (per formar els tetràmers), Grx7 no els uneix (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008a; Mesecke et al., 2008b).

En aquest estudi, l'anàlisi transcriptòmic inicial de la soca doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ mitjançant microordenaments de DNA permetia conèixer quins gens estan induïts en aquesta soca, obtenint així una informació més precisa sobre les dianes d'acció d'ambdues GRXs. El conseqüent anàlisi va agrupar els gens induïts en el doble mutant en les corresponents famílies proteiques, destacant un grup involucrat en l'homeòstasi del fosfat, i un altre involucrat en la secreció i transport/compartimentalització de proteïnes. D'aquí van sorgir els dos objectius principals d'aquesta memòria, determinar la relació d'aquestes GRXs amb l'homeòstasi iònica, sobretot del calci i del fosfat, i també determinar la seva relació amb la via secretora de proteïnes, en especial amb la maquinària de plegament proteic Ero1/Pdi1. La discussió que segueix es centra en aquests dos aspectes.

HOMEÒSTASI DEL Ca^{2+} I ALTRES IONS

L'anàlisi bioinformàtic dels gens induïts en el doble mutant $\Delta\text{grx6}\Delta\text{grx7}$ mostra una elevada representació de gens que depenen de la via de la calcineurina, a través del factor de transcripció Crz1 [Figura 57]. En el cas d'alguns gens, ja s'ha demostrat experimentalment la seva dependència de la via, mentre que en el cas d'altres gens, aquests són encara dianes potencials de la via segons el programa "Yeasttract", ja que contenen seqüències CDRE als seus promotors probablement reconegudes pel factor Crz1.

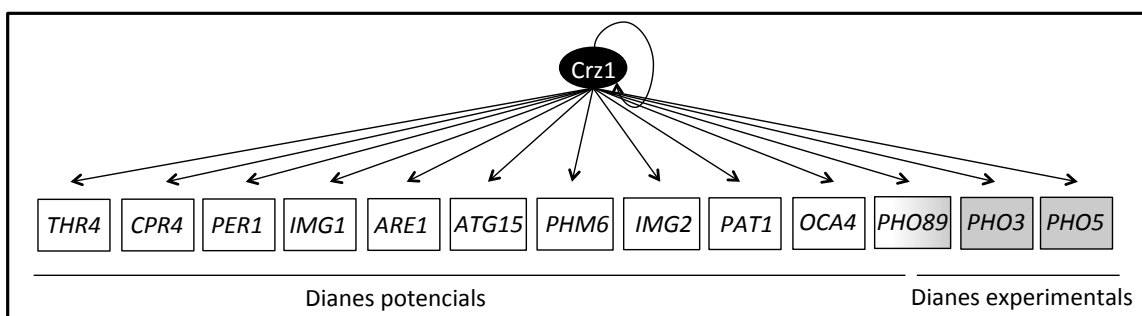


Figura 57. Gens induïts en el doble mutant $\Delta\text{grx6}\Delta\text{grx7}$ (MML892) [Taula 4] que són dianes potencials (quadre blanc) o experimentals (quadre gris) del factor de transcripció Crz1, determinat a través del programa bioinformàtic "Yeasttract". Veure el text per més detalls.

A partir d'aquí, varem confirmar experimentalment que el mutant Δgrx6 presenta una inducció constitutiva de la via Crz1-calcineurina, en comparació amb la soca salvatge i el mutant Δgrx7 . Per una banda, es va determinar l'expressió del gen reporter *lacZ* regulat per un promotor sintètic dependent de Crz1 [Figura 19], i per l'altra, es va analitzar per Northern blot la inducció d'alguns gens regulats per aquesta via [Figura 20], com ho són *PMC1*, *GYP7* i *CMK2*, que codifiquen per proteïnes implicades en l'homeòstasi del Ca^{2+} , transport vesicular i supervivència cel·lular en resposta a estrès, respectivament (Cyert, 2001; Kim et al., 2012b; Miyakawa i Mizunuma, 2007; Yoshimoto et al., 2002).

Entre els gens induïts degut a la mutació Δgrx6 destaquen *PHO89* i *PHO5* (Cyert, 2001; Miyakawa i Mizunuma, 2007; Yoshimoto et al., 2002), com també *PHM6* [Figura 16 i 18], implicats en el metabolisme del fòsfor i regulats de manera dependent de la via Crz1-calcineurina. No obstant, la inducció d'alguns dels gens de la Taula 4, i que són possibles dianes de la via de la calcineurina, com *OCA4*, *ATG15*, *ARE1* i *CPR4*, depèn

de la mutació $\Delta grx7$ [Figura 16]. Això es podria explicar pel fet que un mateix gen pot estar regulat per diferents vies de senyalització, i una via pot predominar per sobre de l'altra en determinades condicions. Per exemple, el mateix gen *ARE1* s'indueix també per la resposta UPR (Travers et al., 2000). A més a més, depenent de les condicions que activen la via de la calcineurina, aquesta resulta en diferents respostes transcripcionals (Yoshimoto et al., 2002). Per tant, en les nostres condicions, aquests gens podrien no estar induïts per la via de la calcineurina en el mutant $\Delta grx7$, sinó en resposta a altres vies, en les quals no s'ha aprofundit.

Per un altre costat, si ens centrem en els gens que es mostren reprimits en el doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ [Taula 5], destaca la presència de *SLM1*, al tractar-se d'un gen que codifica per un factor de transcripció regulat per la via de la calcineurina, tal com succeeix amb *Hph1/Hph2* o *Crz1* (Bultynck et al., 2006; Heath et al., 2004). El fet que *SLM1* estigui entre els gens reprimits en el doble mutant podria reflectir un efecte indirecte de la inducció de la via de la calcineurina i que aquesta, a més a més de la regulació post-traduccionals sobre *Slm1*, també duria a terme una regulació transcripcional. Cal, però, tenir en compte que la transcripció de *SLM1* també està controlada per altres vies, com la via TORC2, la via fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfat de la membrana plasmàtica o la via dels esfingolípid (Bultynck et al., 2006).

La via *Crz1*-calcineurina, evolutivament conservada, pot esdevenir essencial en determinades condicions d'estrès (Crabtree, 2001; Cyert, 2003). D'acord amb això, en aquesta memòria es mostra que la inhibició de la calcineurina amb l'immunosupressor FK506 provoca un defecte de creixement en el mutant $\Delta grx6$, el que indica que la inducció de la via contribueix a la proliferació i supervivència de les cèl·lules que no expressen *GRX6* [Figura 21].

La via *Crz1*-calcineurina s'activa en resposta a determinats estressos, tant extracel·lulars com intracel·lulars, per permetre a la cèl·lula superar i tolerar millor les condicions d'estrès (Stefan et al., 2013). Per exemple, un estrès de RE, provocat per una disminució dels nivells de Ca^{2+} al lumen o un canvi en l'estat redox que perjudiqui el plegament proteic adequat, promou l'entrada de Ca^{2+} al citosol a través del sistema HACS i conseqüentment l'activació de la via (Bonilla et al., 2002). Els mecanismes que uneixen l'estrès de RE amb l'activació d'HACS s'expliquen en detall a l'apartat 4.1.1.4 de la **Introducció**. De totes maneres, un factor directe de la inducció de la via és l'augment dels nivells de Ca^{2+} citosòlic, independentment de les causes que el produeixen (Cyert, 2003; Locke et al., 2000; Serrano et al., 2002). Per tant, la via de la

calcineurina podria estar induïda per un excés de Ca^{2+} al citosol del mutant Δgrx6 . Cal tenir en compte també que el gen *PMC1*, el qual està lleugerament induït en el mutant Δgrx6 [Figura 20 i 26], només s'indueix quan la via de la calcineurina està activada per Ca^{2+} (Stathopoulos i Cyert, 1997), emfatitzant així que l'activació de la via en el mutant podria ser degut a un excés de Ca^{2+} citosòlic.

En conseqüència, es van determinar els nivells de Ca^{2+} intracel·lular mitjançant l'indicador fluorescent químic indo-1, el qual s'acumula principalment al citosol, no es modifica pel metabolisme cel·lular, té una elevada selectivitat pel Ca^{2+} , i és adequat sobretot per mesurar els nivells de Ca^{2+} en condicions d'equilibri cel·lular (Halachmi i Eilam, 1989, 1993). Els resultats demostren que l'absència de *GRX6* incrementa els nivells de Ca^{2+} citosòlic fins a uns nivells de gairebé el doble respecte la soca salvatge [Figura 22]. No s'ha determinat encara la concentració de Ca^{2+} al lumen del RE, tot i que està previst fer-ho utilitzant un sistema basat en la proteïna aequorina com a indicador biofluorescent, dirigida i encarada al lumen d'aquest compartiment, i per tant adient per mesurar els nivells de Ca^{2+} en aquest entorn (Strayle et al., 1999).

Com altres mutants que presenten alteracions en l'homeòstasi del Ca^{2+} (Cunningham, 2011), el mutant Δgrx6 és sensible a les altes concentracions de Ca^{2+} extracel·lular en comparació amb la soca salvatge, probablement degut a que una major acumulació de Ca^{2+} en el mutant provoca una situació d'estrès cel·lular [Figura 35]. El mutant Δgrx6 també presenta una major sensibilitat a BAPTA-AM (quelant de Ca^{2+} intracel·lular) que la soca salvatge, indicant que aquest augment dels nivells de Ca^{2+} citosòlic li és útil i necessari per promoure la proliferació i supervivència cel·lular. En canvi, el mutant Δgrx6 mostra una menor susceptibilitat a EGTA (quelant de Ca^{2+} extracel·lular) que la soca salvatge, suggerint que aquest increment dels nivells de Ca^{2+} citosòlic en el mutant li permet superar millor unes condicions de dèficit de Ca^{2+} extracel·lular [Figura 28 i 33].

Seguidament, ens vam plantejar conèixer la procedència dels ions Ca^{2+} que provocaven l'increment dels nivells d'aquest al citosol del mutant Δgrx6 , els quals podien provenir de l'ambient extracel·lular i/o bé d'algun dels compartiments interns de la cèl·lula, i tenint en compte la localització de *Grx6*, del mateix RE. La vacuola és el principal magatzem de Ca^{2+} en les cèl·lules de llevat (Cunningham, 2011; Pittman, 2011), però el RE i el Golgi també tenen un paper important en el seu emmagatzematge, ja que el Ca^{2+} és necessari per l'activitat de nombrosos enzims que participen en el plegament, glicosilació i tràfic de proteïnes, entre els quals destaquen

les xaperones Kar2 i Pdi1 de RE, entre altres (Cunningham, 2011; Lissandron et al., 2010; Locke et al., 2000). En aquesta memòria es demostra que l'origen d'aquest Ca^{2+} prové, almenys en una part important, de l'exterior cel·lular, a través d'HACS. D'una banda, l'excés de Ca^{2+} citosòlic del mutant Δgrx6 disminueix gairebé als nivells de la soca salvatge en absència de Cch1 [Figura 27]. D'altra banda, l'absència del gen *CCH1* en un mutant Δgrx6 resulta en una major susceptibilitat d'aquest a l'agent EGTA. Per tant, la presència del sistema HACS funcional confereix certa tolerància al mutant Δgrx6 a unes condicions de dèficit de Ca^{2+} extracel·lular [Figura 30].

En conjunt, aquestes dades suggereixen que Grx6 pot tenir un paper en la regulació de l'homeòstasi del Ca^{2+} dins la cèl·lula. Per aquest motiu, es van comparar els fenotips obtinguts per l'absència de *GRX6* amb els fenotips d'altres mutants en els transportadors de Ca^{2+} . Concretament, s'observa que el mutant Δgrx6 acumula Ca^{2+} al citosol de manera similar al mutant Δpmr1 , a uns nivells de gairebé el doble que la soca salvatge, i que aquests són additius en el doble mutant [Figura 22]. No obstant, Halachmi i Eilam (1996) mostren que el mutant Δpmr1 acumula uns nivells de Ca^{2+} citosòlic més elevats que els obtinguts en aquesta memòria (de l'ordre de 3 o 4 vegades més que la soca salvatge). Com que en ambdós treballs els nivells de Ca^{2+} es van mesurar mitjançant l'indo-1, es pot considerar que les diferències observades són degudes al fons genètic utilitzat, o bé al contingut de Ca^{2+} present en el medi de creixement. Ambdós mutants tenen induïda constitutivament la via de la calcineurina, unes tres o quatre vegades més que la soca salvatge en el cas del mutant Δgrx6 [Figura 19], i de l'ordre de cinc vegades més que la soca salvatge en el mutant Δpmr1 (Locke et al., 2000). En conseqüència, ambdues soques presenten un augment de l'expressió de *PMC1*, el transportador de Ca^{2+} vacuolar induït per la via de la calcineurina, sent aquesta inducció molt més pronunciada en absència de *PMR1* que en absència de *GRX6* [Figura 26]. De fet, una de les principals diferències entre aquestes dues soques és que mentre el mutant Δgrx6 acumula Ca^{2+} principalment al citosol, que a la vegada pot ser internalitzat tant als compartiments de la via secretora, via el transportador Pmr1, com a la vacuola, el mutant Δpmr1 acumula Ca^{2+} al citosol i de manera majoritària a la vacuola, per l'elevada inducció de *PMC1*, mentre que disminueix a la meitat els nivells de Ca^{2+} del RE (Cunningham, 2011; Locke et al., 2000; Strayle et al., 1999) [Figura 25]. Una altra diferència entre aquestes dues soques és que mentre el mutant Δpmr1 és susceptible a la presència d'EGTA (Lee et al., 2007b; Rudolph et al., 1989), el mutant Δgrx6 no ho és, suggerint que el mutant Δpmr1 depèn més àmpliament de la disponibilitat de Ca^{2+} extracel·lular, perquè

donada la seva incapacitat de mobilitzar Ca^{2+} al RE, necessita una major inducció de la via i especialment una major inducció de *PMC1* per sobreviure que el mutant Δgrx6 (Cunningham i Fink, 1994; Miseta et al., 1999b). En resum, el mutant Δgrx6 té uns fenotips menys forts que el mutant Δpmr1 pel que fa a les alteracions (constitutives o provocades experimentalment) en l'homeòstasi del Ca^{2+} .

A diferència del que succeeix en absència de *GRX6*, la deleció dels gens dels altres dos transportadors de Ca^{2+} de la via secretora, *SPF1* i *GDT1*, no es reflecteix en un clar increment dels nivells de Ca^{2+} citosòlics o totals (Demaegd et al., 2013; Yu et al., 2012). És més, els dobles mutants $\Delta\text{spf1}\Delta\text{grx6}$ i $\Delta\text{gdt1}\Delta\text{grx6}$ acumulen nivells de Ca^{2+} similars als del mutant simple en *GRX6* [Figura 22 i 23]. El mutant Δspf1 presenta certa sensibilitat a EGTA, encara que de manera menys pronunciada que en absència de *PMR1* (Cronin et al., 2002; Yu et al., 2012), i el mutant Δgdt1 també mostra una lleugera sensibilitat a EGTA (Demaegd et al., 2013), però encara menor que en absència de *SPF1*, contràriament al que succeeix en el mutant Δgrx6 . En aquesta memòria es mostra que l'elevada sensibilitat del doble mutant $\Delta\text{pmr1}\Delta\text{spf1}$ a BAPTA-AM es recupera sorprenentment amb l'absència addicional de *GRX6* [Figura 34], indicant la importància dels nivells de Ca^{2+} citosòlic per aquests mutants. Tenint en compte que la mutació en *SPF1* no provoca canvis en la concentració de Ca^{2+} citosòlic, el doble mutant $\Delta\text{pmr1}\Delta\text{spf1}$ presentaria uns nivells de Ca^{2+} dependents gairebé totalment de la mutació en *PMR1*, els quals no serien suficients per contrarestar els defectes del BAPTA-AM. En canvi, la mutació addicional de *GRX6* en aquest doble mutant podria incrementar encara més els nivells de Ca^{2+} citosòlic fins a uns nivells suficients per contrarestar i tolerar la presència de BAPTA-AM i poder així sobreviure. En aquest sentit, cal destacar que el doble mutant $\Delta\text{grx6}\Delta\text{pmr1}$ té uns nivells de Ca^{2+} citosòlic d'unes tres vegades superiors que la soca salvatge [Figura 22].

La falta del canal *Csg2* no incrementa els nivells de Ca^{2+} citosòlic, sinó que augmenta els nivells de Ca^{2+} al lumen del RE (Beeler et al., 1994; Tanida et al., 1996). Finalment, amb uns fenotips totalment contraris a l'absència de *GRX6*, els mutants que tenen compromesa la capacitat d'emmagatzemar Ca^{2+} a l'interior de la vacuola, com ho són els mutants Δpmc1 , Δvcx1 i el doble mutant $\Delta\text{pmc1}\Delta\text{vcx1}$, presenten una disminució dels nivells de Ca^{2+} cel·lular total en comparació amb la soca salvatge, que es veu reflectit en una clara disminució dels nivells de Ca^{2+} vacuolar (Cunningham i Fink, 1996; Halachmi i Eilam, 1993; Miseta et al., 1999a; Pozos et al., 1996).

Els fenotips provocats per l'absència de *GRX6*, tant l'increment dels nivells de Ca^{2+} citosòlic com la menor susceptibilitat a EGTA, s'accentuen a alta temperatura (36°C) [Figura 31 i 32], suggerint que en aquestes condicions subòptimes la presència de Grx6 té un paper més important en la regulació de l'homeòstasi del Ca^{2+} . També en aquesta temperatura de 36°C, l'absència de *GRX7* mostra un fenotip diferent a la soca salvatge, concretament hipersensibilitat a EGTA [Figura 31 i 32], suggerint que Grx7 realitza una activitat oposada a Grx6 en aquestes condicions.

És important considerar que un augment dels nivells de Ca^{2+} cel·lulars correlaciona amb un increment del fòsfat cel·lular, i a l'inrevés (Clapham, 2007; Cunningham, 2011; Eide et al., 2005). D'acord amb això, el doble mutant $\Delta pmc1\Delta vcx1$, que presenta una disminució dels nivells de Ca^{2+} cel·lular respecte a la soca salvatge, mostra una disminució del 22% dels nivells de fòsfat inorgànic cel·lular total (Miseta et al., 1999a). No és d'estranyar, doncs, que el mutant $\Delta grx6$, que mostra un increment de gairebé el doble dels nivells de Ca^{2+} citosòlic, també presenti un augment del mateix ordre dels nivells de fòsfat citosòlic total (majoritàriament ortofòsfat) [Figura 36 i 37]. Així mateix, les cèl·lules que creixen en un medi amb una concentració baixa de fòsfat i que, per tant, disminueixen la seva concentració de fòsfat intracel·lular (Kulaev i Kulakovskaya, 2000), també podrien disminuir la seva concentració intracel·lular de Ca^{2+} . D'aquesta manera, quan el mutant $\Delta grx6$ es troba en un medi amb una baixa concentració de fòsfat té una menor inducció de la via de la calcineurina (de l'ordre de dos vegades) que quan es troba en un medi amb una concentració normal de fòsfat (de fins a quatre vegades), suggerint que una disminució dels nivells de Ca^{2+} en aquestes condicions alleugereix la inducció de la via de la calcineurina [Figura 19A].

L'augment dels nivells de fòsfat en el mutant $\Delta grx6$ és degut probablement a l'elevada inducció transcripcional del transportador de fòsfat d'alta afinitat Pho89 per la via de la calcineurina. La via *PHO* s'indueix en condicions de baix fòsfat, condicions gairebé contràries a les del mutant $\Delta grx6$, i provoca la inducció transcripcional dels dos transportadors de fòsfat d'alta afinitat, Pho84 i Pho89, sent Pho84 el principal responsable de l'obtenció del fòsfat lliure de l'exterior cel·lular i el que té màxima activitat al pH àcid en què la cèl·lula creix normalment (Lee et al., 2007a; Persson et al., 2003; Zvyagilskaya et al., 2008). Referent a l'anterior, la via *PHO* no està induïda en el mutant $\Delta grx6$, doncs no es detecta cap canvi aparent en els nivells d'expressió de *PHO84* en aquest mutant, a diferència de *PHO89* [Figura 16]. En canvi, el gen *PHO89* conté l'element CDRE al seu promotor i mostra una forta inducció transcripcional (independentment dels nivells de fòsfat) dependent de la via de la

DISCUSSIÓ

calcineurina (Wiesenberger et al., 2007; Yoshimoto et al., 2002) en el mutant $\Delta grx6$, que s'aboleix completament amb la mutació en *CRZ1* (Serrano et al., 2002). D'acord amb això, el mutant $\Delta pho84$ té uns baixos nivells de fosfat intracel·lular (Mouillon i Persson, 2006), en concordança amb el seu important paper en l'obtenció de fosfat cel·lular, mentre que l'absència addicional de la mutació en *GRX6*, que provoca la inducció de l'expressió de *PHO89*, li incrementa els nivells de fosfat (transportat via Pho89) fins a nivells pròxims als de la soca salvatge. El mutant $\Delta pho89$, en canvi, presenta uns nivells de fosfat similars a la soca salvatge, i l'absència addicional de *GRX6* no li provoca cap efecte significatiu en els nivells de fosfat intracel·lular [Figura 36].

Les cèl·lules amb alts nivells de fosfat, a pesar de tenir nivells normals de ferro intracel·lular, tenen augmentada l'expressió de gens típicament induïts per falta de ferro a través del factor de transcripció Aft1, com *FIT2* o *FRE4* (Rosenfeld et al., 2010). El doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ mostra una lleugera inducció d'aquests dos gens en els resultats de l'anàlisi transcriptòmic, just per sota del llindar que es decideix mostrar a la Taula 4, potser reflectint els majors nivells de fosfat en el mutant.

La via de la calcineurina també regula positivament altres transportadors iònics, a més a més de Pmc1, Pmr1 i Pho89, entre els quals destaquen Ena1 i Trk1, implicats respectivament en l'homeòstasi de Na^+ i K^+ (Ariño et al., 2010; Ke et al., 2013). Convé destacar que aquests ions alcalins, a més a més del Ca^{2+} , també formen complexos amb el fosfat, contrarestant així les seves càrregues (Rosenfeld et al., 2010). El mutant $\Delta grx6$ mostra un fort increment dels nivells de K^+ , tant en el citosol com sobretot a la vacuola, de dos i quatre vegades més que la soca salvatge, respectivament [Figura 38]. La concentració de K^+ en *S. cerevisiae* depèn àmpliament dels transportadors d'alta afinitat Trk1 i Trk2 (Ke et al., 2013), com també dels de baixa afinitat Kch1 i Kch2 (Stefan et al., 2013). Stefan i Cunningham (2013) van demostrar que l'estrès de RE indueix l'entrada de K^+ a la cèl·lula, la qual, a través de la despolarització parcial de la membrana plasmàtica, regula el sistema HACS. Els nostres resultats suggereixen que el mutant $\Delta grx6$, que mostra, sobretot en determinades condicions, un anormal estrès de RE, també indueix l'entrada de K^+ amb la conseqüent activació d'HACS. El mutant $\Delta grx6$ també mostra un fort increment dels nivells de Na^+ , majoritàriament citosòlics, i lleugerament en la vacuola, de gairebé més de quatre vegades respecte a la soca salvatge [Figura 38]. Per una banda, degut a la similitud amb el K^+ i la seva abundància extracel·lular, el Na^+ pot entrar a la cèl·lula a través de diferents transportadors de K^+ , com el mateix Trk1 (Ke et al., 2013; Stefan i Cunningham, 2013).

Per una altra banda, l'ATPasa tipus P Ena1, que bombeja Na^+ i K^+ fora de la cèl·lula generant una força motriu de Na^+ a través de la membrana plasmàtica, afavoreix l'activitat del transportador de fosfat Pho89, fortament induït per la via de la calcineurina en el mutant Δgrx6 (Serrano et al., 2002). Pho89, llavors, internalitza Pi gràcies a l'entrada de dos ions Na^+ (Martinez i Persson, 1998; Pattison-Granberg i Persson, 2000), influïnt també així en els nivells de Na^+ citosòlics del mutant.

HOMEÒSTASI REDOX I SECRECIÓ PROTEICA

Grx6 i Grx7 es localitzen al lumen de les vesícules secretores, on té lloc el plegament oxidatiu de proteïnes. El rati GSH:GSSG (3:1) oxidant de la via secretora permet mantenir l'equilibri entre el procés d'oxidació i formació de ponts disulfur proteics, realitzat per Ero1 i Pdi1, i el procés de reducció i isomerització, on intervé el GSH, de manera directa, o bé indirecta afavorint que les oxidoreductases del RE es mantinguin en un estat reduït (Molteni et al., 2004; Sevier i Kaiser, 2008; Tu i Weissman, 2004). A més a més, d'una banda, l'entrada a la via tant de proteïnes amb els grups tiols reduïts com de GSH constitueix una important font de poder reductor, mentre que per altra banda, la via Ero1/Pdi1 incrementa la producció de H_2O_2 , el qual pot oxidar proteïnes o augmentar els nivells de GSSG (Chakravarthi et al., 2006; Gross et al., 2006; Sevier i Kaiser, 2008). Per tant, l'estat redox del RE està estretament relacionat amb el rati GSH:GSSG i un desequilibri d'aquest pot afectar el plegament proteic i provocar estrès de RE (Appenzeller-Herzog, 2011; Margittai i Sitia, 2011). En conjunt, es necessita una bona regulació redox de la via secretora per afavorir una adequada maduració i secreció de les proteïnes.

D'acord amb els resultats de l'anàlisi transcriptòmic d'aquesta memòria [Taula 4] i tenint en compte els treballs anteriors que relacionaven aquestes dues GRXs amb la via secretora (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008b), es va estudiar el possible paper de Grx6 i Grx7 en la maduració/secreció proteica, explorant les relacions genètiques i funcionals amb les principals proteïnes implicades en el plegament oxidatiu, com és el cas d'Ero1.

D'entrada, es va estudiar la via UPR (apartat 3.3.1 de la **Introducció**), que s'indueix en resposta a l'estrès de RE, de manera paral·lela però independent a l'entrada de Ca^{2+} a través del sistema HACS, i permet l'expressió de proteïnes que ajuden a reparar el dany causat per l'estrès i a l'adaptació i recuperació de la cèl·lula (Cao i Kaufman,

2012; Ron i Walter, 2007). Entre les dianes de la UPR, cal destacar el gen *ARE1*, fortament induït en el doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ [Taula 4], que codifica per un enzim implicat en el metabolisme d'esterols i encarregat d'augmentar la capacitat dels compartiments on té lloc aquest estrès (Travers et al., 2000), així com els gens *PD11* i *ERO1* (apartat 3.2 de la **Introducció**), que tot i no estar fortament induïts en el doble mutant, s'han utilitzat al llarg d'aquesta memòria com a gens reporters. No obstant, ni *GRX6* ni *GRX7* s'han descrit com a dianes de la UPR (Kimata et al., 2006; Ng et al., 2000; Travers et al., 2000).

Atès que els mutants $\Delta grx6$ i $\Delta grx7$ no tenen la UPR induïda constitutivament (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008b), per tal d'estudiar la presència o no d'estrès de RE en aquests mutants es van extreure les condicions tractant les cèl·lules amb agents que incrementen aquest estrès, com són la tunicamicina i el DTT, i es va determinar si existia alguna diferència en la inducció de la UPR en aquestes condicions. Estudis previs demostren que el tractament amb DTT bloqueja la formació de ponts disulfur i induïx ràpida i transitòriament la UPR, provocant un increment de l'expressió dels gens *ERO1* i *PD11*, entre altres (Fränd i Kaiser, 1998; Gasch et al., 2000; Pollard et al., 1998). El tractament del mutant $\Delta grx6$ amb DTT augmenta l'expressió tant d'*ERO1* com de *PD11* de l'ordre de dues vegades més que en la soca salvatge, mentre que el mutant $\Delta grx7$ induïx la resposta UPR de manera inclús més moderada que la soca salvatge [Figura 39]. El mutant $\Delta pmr1$ tampoc activa constitutivament la UPR, però el tractament d'aquest mutant amb DTT augmenta moderadament, respecte a la soca salvatge, l'expressió del gen *KAR2*, una xaperona de RE induïda per la UPR (Dürr et al., 1998; Vashist et al., 2002). De manera similar, tant el mutant $\Delta pmr1$ com el mutant $\Delta grx6$ també augmenten lleugerament més la inducció de la UPR respecte a la soca salvatge quan es tracten amb EGTA, i aquest increment és encara més gran en el cas del doble mutant $\Delta grx6\Delta pmr1$ [Figura 40]. Aquests resultats indiquen que existeix una interacció funcional entre Grx6 i la maquinària de plegament proteic, potser degut a una afectació en l'homeòstasi iònica al RE, inicialment suggerint que el mutant $\Delta grx6$ podria presentar un dèficit de Ca^{2+} en el RE. És important destacar que, a diferència dels mutants $\Delta grx6$ i $\Delta pmr1$, el mutant $\Delta spf1$ presenta una resposta UPR activada de manera constitutiva, fet que indica que la pèrdua de l'activitat Spf1 causa un desequilibri homeostàtic més important al RE (Cronin et al., 2002; Vashist et al., 2002) que quan falten Pmr1 o Grx6, per tant, suggerint que aquestes proteïnes utilitzen diferents mecanismes per mantenir l'homeòstasi iònica.

Cal destacar que el DTT és un agent reductor de grups tiol, i que la seva addició a un mutant en *GRX6* o *GRX7*, als quals els hi falta probablement una activitat reductora, podria estar contrarestant en part l'estat redox possiblement alterat del RE/Golgi dels mutants. Això afectaria la possibilitat de veure diferències (reduint aquestes diferències) en la inducció de la UPR entre els mutants i la soca salvatge degut a un desequilibri de l'homeòstasi redox en aquests mutants.

En la línia anterior, també seria interessant estudiar l'afectació de la resposta ERAD en els mutants en *GRX6* o *GRX7* per comprovar si, tal com passa en els mutants $\Delta pmr1$ o $\Delta spf1$, es detecta un retard en l'exportació i degradació de la proteïna mal plegada CPY*, probablement degut a que es necessita un nivell de Ca^{2+} adequat pel funcionament de certes proteïnes, com Kar2, implicades en aquesta resposta (Dürr et al., 1998; Vashist et al., 2002).

Seguidament, per tal d'indagar en la possible relació funcional entre Grx6/Grx7 i la maquinària de plegament proteic, i en concret, amb les principals proteïnes encarregades d'aquest plegament, Ero1 i Pdi1, es va determinar si l'estat redox d'aquestes dues proteïnes estava modificat en absència de *GRX6* o *GRX7*. La modificació del seu estat redox podria resultar en una alteració parcial d'aquestes funcions essencials, però es descartava l'afectació total, ja que això representaria defectes considerables, sinó letals, en el creixement dels mutants en *GRX6* o *GRX7*. Per una banda, la proteïna Ero1 de llevat conté un total de 14 residus cisteïna, 4 de les quals són cisteïnes catalítiques essencials per oxidar Pdi1, dos del centre actiu i dos anomenades "shuttle", i la resta són cisteïnes reguladores no essencials (Heldman et al., 2010). La regulació d'aquestes cisteïnes no essencials permet modificar post-traduccionament l'activitat d'Ero1 i regular així les condicions redox perquè siguin adequades pel plegament proteic (Heldman et al., 2010). No obstant, la **Figura 41** mostra que l'absència tant de *GRX6* com de *GRX7* no varia l'estat redox d'Ero1, descartant així el paper d'aquestes GRXs com a reguladores de l'activitat d'Ero1. Recentment, Kim et al. (2012a) han demostrat que una de les principals proteïnes implicades en la regulació de l'activitat d'Ero1 és el seu substrat, Pdi1, que a la vegada respon al rati GSH:GSSG del RE (apartat 3.2.2 de la **Introducció**). Per una altra banda, la proteïna Pdi1 de llevat té un total de 6 cisteïnes (Xiao et al., 2004), distribuïdes en dos dominis catalítics i dos dominis no-catalítics. Els resultats mostren que aquestes GRXs tampoc regulen l'estat redox de Pdi1, que de fet està regulat principalment per Ero1 (Sevier i Kaiser, 2008). Així doncs, es descarta la regulació redox tant d'Ero1 com de Pdi1 per Grx6 i/o Grx7 [**Figura 41**]. Cal destacar que tant

DISCUSSIÓ

Ero1 com Pdi1 es troben a la cèl·lula majoritàriament en la forma oxidada, amb un desplaçament similar a les formes proteiques completament oxidades, d'acord amb la seva funció principal a les cèl·lules, la d'oxidar les proteïnes que s'estan plegant [Figura 41].

Abans d'avançar en la discussió de la possible relació funcional entre aquestes GRXs i la maquinària de plegament proteic Ero1/Pdi1, val la pena recordar els estudis previs en aquest mateix sentit. Així, Mesecke et al. (2008b) van observar que Grx7 no és capaç de dur a terme el plegament proteic en assajos *in vitro*, i Izquierdo et al. (2008) van mostrar que la sobreexpressió d'aquestes GRXs no recupera el fenotip de letalitat d'un mutant condicional pel gen *PDI1*. La hipòtesi de partida del present estudi és que Grx6/Grx7 i la proteïna oxidasa Ero1 tenen funcions redox antagòniques en la via secretora, plantejant un possible paper reductor d'aquestes GRXs. Servint com a precedent, Frand i Kaiser (1998) van mostrar que el mutant condicional *ero1-1*, sensible a temperatura, no aporta els equivalents oxidants necessaris per la formació dels ponts disulfur al RE, provocant l'acumulació de proteïnes mal plegades. A la temperatura permissiva de creixement, el mutant *ero1-1* és hipersensible a DTT respecte a la soca salvatge, suggerint que només la pèrdua parcial d'Ero1 ja disminueix notablement la capacitat d'oxidar les proteïnes al RE. En canvi, la diamida suprimeix la sensibilitat a temperatura del mutant *ero1-1*, aportant la capacitat oxidativa necessària pel plegament proteic i compensant així la pèrdua de funció Ero1. *A posteriori*, es va demostrar també que un mutant en *GSH1*, que té afectada la biosíntesi de glutatió, suprimeix el fenotip del mutant *ero1-1*, afavorint el seu creixement, i per tant suggerint que el GSH actua com a reductor contrarestant l'activitat oxidativa d'Ero1 (Cuozzo i Kaiser, 1999; López-Mirabal i Winther, 2008; Molteni et al., 2004). La **Figura 43** indica que l'absència tant de *GRX6* com de *GRX7* rescata la letalitat d'un mutant amb baixos nivells d'Ero1, a nivells similars a com ho fa la diamida. Per tant, l'absència de *GRX6* o *GRX7*, similar a la presència de diamida o absència de *GSH1*, crea unes condicions més oxidants al RE que compensen la pèrdua de la funció Ero1. Tenint en compte que els oxidants externs disminueixen el GSH disponible (López-Mirabal i Winther, 2008), l'absència d'aquestes GRXs, amb activitat reductora de ponts disulfur mixtes entre el GSH i les proteïnes, també provoca probablement una disminució dels nivells de GSH al lumen de les vesícules de RE/Golgi. Cal destacar que aquest rescat de la letalitat d'un mutant amb baixos nivells d'Ero1 degut a l'absència de *GRX6* o *GRX7* es posa de manifest sobretot quan les cèl·lules es creixen a 36°C, segurament perquè aquestes condicions relativament extremes de temperatura magnifiquen l'estat oxidant del lumen de les vesícules. Amb

aquests antecedents experimentals, es va mesurar el rati GSH:GSSG al RE en temps real de les cèl·lules amb baixos nivells d'Ero1 i les respectives cèl·lules que a més a més no expressen *GRX6* o *GRX7* a 36°C. Els resultats confirmen que el parell GSH:GSSG està més oxidat de manera constitutiva en absència d'una de les dues GRXs que en la seva presència quan els nivells d'Ero1 estan per sota dels fisiològics, permetent això una adaptació més ràpida d'aquestes cèl·lules absents de *GRX6* o *GRX7* a un estrès extracel·lular per DTT [Figura 51].

Paral·lelament, es va estudiar també l'efecte que tenia l'absència addicional de *GRX6* o *GRX7* en un mutant amb baixos nivells d'Ero1 sobre la secreció proteica. Per tal de relacionar els canvis en l'estat redox del RE amb la secreció proteica, i tenint en compte que el tractament d'una soca salvatge amb DTT afecta el plegament de proteïnes que contenen ponts disulfur (Fränd i Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998), es va utilitzar CPY com proteïna reportera del procés de secreció. En aquest sentit, el mutant *ero1-1* és incapaç de plegar correctament la proteïna CPY a la temperatura no permissiva de 36°C, similarmet al que succeeix amb el tractament amb DTT, degut a un defecte en la formació dels ponts disulfur, el que es manifesta en una retenció de la maduració/secreció en la forma p1-CPY de RE (Fränd i Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998). La diamida també restaura el plegament proteic de CPY en el mutant *ero1-1* a 36°C. D'acord amb això, d'entrada, en el present treball de tesi es va estudiar l'estat de CPY mitjançant l'anàlisi per Western blot [Figura 44], en les mateixes condicions que l'estudi de creixement anterior [Figura 43]. La Figura 44 mostra diferències en la quantitat relativa de CPY acumulada en les soques utilitzades i en les diferents condicions. En el mutant amb baixos nivells d'Ero1, que ja no creix en aquestes condicions, ni probablement secreta proteïnes, es detecta la proteïna CPY madura possiblement acumulada abans d'aturar el creixement, mentre que l'absència addicional de *GRX6* o *GRX7* en un mutant amb baixos nivells d'Ero1, que en millora el creixement, i per tant la secreció de CPY, mostra tant la forma precursora recent sintetitzada com la forma madura de la CPY ja processada. Alternativament, l'absència de *GRX6* o *GRX7* en un mutant amb baixos nivells d'Ero1, combinat amb la presència de diamida, provoca un efecte additiu que recupera el creixement de les soques a nivells pràcticament normals, i per tant la secreció proteica, acumulant-se la majoria de molècules de CPY en la forma madura. Aquests resultats preliminars suggerien que l'absència de *GRX6* o *GRX7* millora notablement la secreció de CPY d'un mutant amb baixos nivells d'Ero1, i que l'addició a més a més de l'agent diamida la recupera fins a nivells aparentment normals. Convé recalcar que, en aquestes condicions, el mutant amb baixos nivells d'Ero1 i aquells que a més a més no expressen *GRX6* o *GRX7* es

DISCUSSIÓ

troben en diferents estadis del creixement, o bé fins i tot en algun cas en estadi de no creixement, i per tant, es requerien experiments de pols i caça complementaris per realitzar una interpretació més fisiològica dels resultats.

Considerant l'alteració en l'homeòstasi del Ca^{2+} que provoca l'absència de *GRX6*, es va comparar per Western blot la proteïna CPY acumulada en un mutant amb baixos nivells d'Ero1 que no expressa *GRX6*, amb un que no expressa *PMR1*. En un mutant $\Delta pmr1$ s'han descrit nombrosos fenotips atribuïts a la disminució dels nivells de Ca^{2+} al lumen del RE, entre ells, defectes en la secreció de CPY, que es reverteixen amb l'addició de Ca^{2+} al medi extracel·lular (Antebi i Fink, 1992; Vashist et al., 2002). En un mutant $\Delta grx6$, en canvi, i tal com ja hem discutit, de moment només es coneix que hi ha un increment dels nivells de Ca^{2+} citosòlics que provenen majoritàriament de l'exterior cel·lular [Figura 27 i 30]. La Figura 46 mostra que el patró de formes de la proteïna CPY acumulada en un mutant amb baixos nivells d'Ero1 és diferent segons manqui addicionalment *GRX6* o *PMR1*, suggerint que la manca d'un o altre gen afecta de manera diferent el procés de secreció proteica. Aquesta observació ens porta a pensar que l'alteració de la secreció de CPY que provoca la falta de *GRX6* no està directament relacionada amb una desregulació de l'homeòstasi del Ca^{2+} al lumen del RE d'aquest mutant, com succeeix en el cas de l'absència de *PMR1*, sinó amb un canvi de l'homeòstasi redox.

Adicionalment, les Figures 44, 45 i 46 mostren petits canvis de mobilitat en gel de la proteïna CPY en les diferents soques que deuen reflectir canvis en el procés de maduració proteica. La soca que expressa *ERO1* sota el promotor *tetO₂* presenta una menor mobilitat de la proteïna CPY que la soca salvatge, i això independentment de si es tanca o no l'expressió d'*ERO1* amb doxiciclina, el que indica que la soca *tetO₂-ERO1* no es comporta com una soca salvatge almenys pel que fa al processament de CPY. Això pot ser degut a que els nivells de proteïna Ero1 en aquestes condicions en què el gen *ERO1* està regulat pel promotor *tetO₂* no són els mateixos que els d'una soca salvatge on *ERO1* s'expressa sota el seu propi promotor. En aquest sentit però, cal destacar que l'absència addicional de *GRX6* o de *GRX7* en una soca *tetO₂-ERO1* fa que la CPY recuperi la mobilitat de la soca salvatge, rescatant així les deficiències de maduració. Per un altre costat, també convé destacar que l'absència de *PMR1* en les soques *tetO₂-ERO1* confereix una major mobilitat de la CPY en gel, probablement degut a defectes en el procés de maduració proteica per la manca de Ca^{2+} , o bé especialment Mn^{2+} , al lumen del RE/Golgi.

Tenint en compte que la N-glicosilació proteica actua també com un control de qualitat del plegament proteic al RE (Delic et al., 2013; Roth et al., 2010), es va mirar si la proteïna CPY està N-glicosilada correctament en aquestes cèl·lules. Cal recordar que la glicosilació de CPY comença al RE (p1-CPY), continua al Golgi, on s'estenen les cadenes de carbohidrats (p2-CPY), i arriba a la vacuola, amb un total de 4 N-oligosacàrids (m-CPY) (Hasilik i Tanner, 1978). En *S. cerevisiae*, aquesta glicofoma madura de CPY de 61 kDa, com a resultat de la digestió amb EndoH, dona lloc a una forma desglucosilada de 51 kDa (Van Berkel et al., 1999). La **Figura 47** mostra com el tractament amb EndoH dels extrems proteics procedents de la soca *tetO₂-ERO1* i les soques mancades addicionalment de *GRX6* o *GRX7* iguala la mobilitat de les respectives proteïnes CPY, indicant que els canvis anteriors de mobilitat són deguts a deficiències en el procés de N-glicosilació de la soca *tetO₂-ERO1*, que millora en absència addicional de *GRX6* o *GRX7*, probablement en relació amb la desregulació de l'homeòstasi redox. Val la pena destacar que en absència de *GRX6*, tot i tenir alterada l'homeòstasi cel·lular del Ca²⁺, això no sembla afectar l'activitat de les manosiltransferases responsables de l'elongació dels N-carbohidrats en l'aparell de Golgi, les quals necessiten sobretot la presència de Mn²⁺ (Dürr et al., 1998; Sharma et al., 1974).

En aquest punt, per estudiar amb més exactitud la síntesi i velocitat de maduració/secreció de CPY en les diferents soques es van realitzar experiments de pols i caça. En primer lloc, es va demostrar que la falta únicament de *GRX6* i/o *GRX7* no afecta la secreció de CPY [**Figura 48**], a diferència del que succeeix en el mutant *Δpmr1* (Vashist et al., 2002). En relació amb aquests resultats, cal esmentar que el mutant *GSH1* també presenta un plegament oxidatiu normal de la CPY (Frand i Kaiser, 1998; Tu i Weissman, 2004), el que suggereix que la presència d'un ambient lleugerament més oxidant (com seria el cas dels nostres mutants) a la via secretora no es reflexa en forma de defectes en la secreció de CPY. Ara bé, donat que el mutant *Δgrx6* mostra una inducció constitutiva de la via de la calcineurina, i que la inhibició d'aquesta resulta en un petit defecte en el creixement, es va estudiar si la inactivació de la calcineurina amb FK506 provocaria algun defecte visible en la secreció, però aquest no va ser el cas. Això indica que la inducció de la via de la calcineurina en el mutant *Δgrx6* no sembla estar relacionada amb un rescat de possibles defectes en la secreció de CPY [**Figura 48**].

En segon lloc, l'anàlisi de la cinètica de maduració/secreció de CPY en un mutant amb baixos nivells d'Ero1 i dels derivats d'aquest que a més a més no expressen *GRX6* o

DISCUSSIÓ

GRX7 demostra que, en unes condicions encara metabòlicament actives pels mutants [Figura 49], el mutant amb baixos nivells d'Ero1 presenta un retard significatiu en la maduració de CPY, especialment just després del pols radioactiu (temps 0), mostrant gairebé tota la CPY recent sintetitzada en la forma precursora, mentre que els mutants que a més a més dels baixos nivells d'Ero1 no expressen *GRX6* o *GRX7* rescaten notablement els defectes de processament de CPY, mostrant ja en temps 0 tant la forma precursora com la forma madura de la proteïna [Figura 50]. Com era d'esperar, la diamida restaura en bona part la secreció en els mutants amb baixos nivells d'Ero1, i aquesta recuperació és pràcticament total en els mutants que a més a més dels baixos nivells d'Ero1 no expressen *GRX6* o *GRX7*. Aquests resultats concorden clarament amb els estudis de creixement [Figura 43], confirmant que l'absència de *GRX6* o *GRX7* recupera parcialment la funcionalitat de la maquinària de plegament/secreció proteica compromesa pels baixos nivells d'Ero1, ja que la manca de qualsevol de les dues GRXs provoca un canvi de l'estat redox del RE cap a un estat més oxidant que compensa l'absència de l'oxidasa Ero1 [Figura 51].

En tercer lloc, els experiments de pols i caça [Figura 50 i 56] també demostren que l'absència addicional de *GRX6* o *GRX7* en una soca *tetO₂-ERO1* recupera els defectes d'aquesta última en la N-glicosilació proteica, ja que permet la reaparició de la forma p1-CPY de RE absent en la soca *tetO₂-ERO1*.

En conjunt, l'absència de *GRX6* provoca un defecte en l'homeòstasi del Ca²⁺ i una alteració en l'homeòstasi redox al RE, aquesta última compartida amb l'absència de *GRX7*. Per tal de conèixer si aquests dos fenotips estan o no relacionats en absència de *GRX6*, es van mesurar, d'una banda, els nivells de Ca²⁺ en el mutant condicional *tetO₂-ERO1* i el respectiu mutant en *GRX6* en condicions en què la secreció estava més o menys afectada, en presència/absència de doxiciclina/diamida, a 36°C. La Figura 52 demostra que els nivells de Ca²⁺ depenen específicament de la mutació en *GRX6*, independentment de la funcionalitat de la maquinària de plegament/secreció proteica. D'altra banda, es van reduir els nivells de Ca²⁺ del mutant $\Delta grx6$ als nivells de la soca salvatge amb un tractament amb EGTA [Figura 53] i es van analitzar els possibles defectes en la secreció de CPY. Els resultats indiquen que els nivells més alts de Ca²⁺ citosòlic no tenen cap implicació en el correcte processament de la CPY [Figura 54]. De manera similar, es van reduir els nivells de Ca²⁺ de la soca *tetO₂-ERO1* $\Delta grx6$ als nivells de la soca *tetO₂-ERO1* [Figura 55]. En aquest cas, però, la presència d'EGTA evita el rescat de la secreció observat quan la soca amb baixos nivells d'Ero1 no expressa *GRX6*, i el mateix succeeix quan la soca amb baixos nivells

d'Ero1 no expressa *GRX7*, tot i que aquesta darrera soca no acumula Ca^{2+} al citosol. Per tant, aquesta absència de rescat en presència d'EGTA és probablement conseqüència d'un efecte indirecte de l'EGTA i no de la disminució dels nivells de Ca^{2+} , com podria ser la inducció de la UPR, que comportaria un excés de proteïna Pdi1 reduïda en unes condicions de baixos nivells d'Ero1, i per tant un desequilibri redox al RE [Figura 56]. Com a alternativa a l'estratègia anterior, i per evitar la inducció de la UPR que comporta l'EGTA, es podria utilitzar una soca *tetO₂-ERO1Δgrx6* mancada de *CCH1* per evitar l'entrada de Ca^{2+} per HACS i confirmar llavors aquesta independència entre el Ca^{2+} citosòlic i els defectes en secreció.

En definitiva, tots aquests resultats apunten a la independència d'ambdós fenotips (afectació de l'homeòstasi del Ca^{2+} i creació d'un ambient oxidant favorable pel plegament proteic), o dit d'una altra manera, la manca d'una relació causal directa entre l'un i l'altre, en el mutant *Δgrx6*.

HIPÒTESI

El RE constitueix un entorn on una bona part del GSH es troba formant part de ponts disulfur mixtes amb proteïnes (Bass et al., 2004). Aquests ponts disulfur poden influenciar la funcionalitat de les proteïnes, ja sigui alterant la seva estructura activa o bé l'estat redox dels grups tiols implicats en la seva activitat (Herrero i De La Torre-Ruiz, 2007). Per tal de controlar la funcionalitat d'aquestes proteïnes, un conjunt de components cel·lulars es dediquen a la regulació redox dels seus grups tiols. En aquest sentit, Grx6 i Grx7, amb activitat tiol oxidoreductasa consistent en la reducció dels ponts disulfur mixtes (Deponete, 2013; Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008b), podrien regular l'estat redox de residus cisteïna necessaris per l'activitat de proteïnes específiques de RE i/o Golgi o que segueixen la via secretora.

Donat que el mutant *Δgrx6* té alterada l'homeòstasi del Ca^{2+} i tenint en compte treballs realitzats en cèl·lules superiors que fan referència a la regulació redox a la què estan sotmeses algunes proteïnes transportadores de Ca^{2+} , tant bombes com canals, presents en les membranes del RE i del Golgi (veure apartat 4.1.1.6 de la **Introducció**), es suggereix llavors que Grx6 podria regular, entre altres possibles dianes, un transportador de Ca^{2+} , explicant així l'increment dels nivells de Ca^{2+} al citosol del mutant. En absència de *GRX6*, un transportador de Ca^{2+} del RE/Golgi es mantindria en estat oxidat, provocant l'obertura permanent d'un canal de sortida de

DISCUSSIÓ

Ca^{2+} del RE al citosol (com seria Csg2), o bé la inactivació d'una bomba/intercanviador d'entrada de Ca^{2+} del citosol al RE (com seria Pmr1, Spf1 i Gdt1), o bé un efecte conjunt d'obertura d'un canal i inactivació parcial d'una bomba/intercanviador [Figura 58]. En aquest moment, no hi ha evidències experimentals suficients que indiquin que Grx6 reguli algun dels transportadors esmentats, tot i que els resultats obtinguts són compatibles amb la regulació a més d'un nivell. No es descarta, però, la presència d'altres transportadors de Ca^{2+} en *S. cerevisiae*. En concret, Rigamonti et al. (resultats presentats al "26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology", Frankfurt, 2013) suggereixen que els gens *YOR365C* i *YALO53W* de *S. cerevisiae*, tot i no estar caracteritzats funcionalment en detall, codifiquen per canals de Ca^{2+} tipus TRPC.

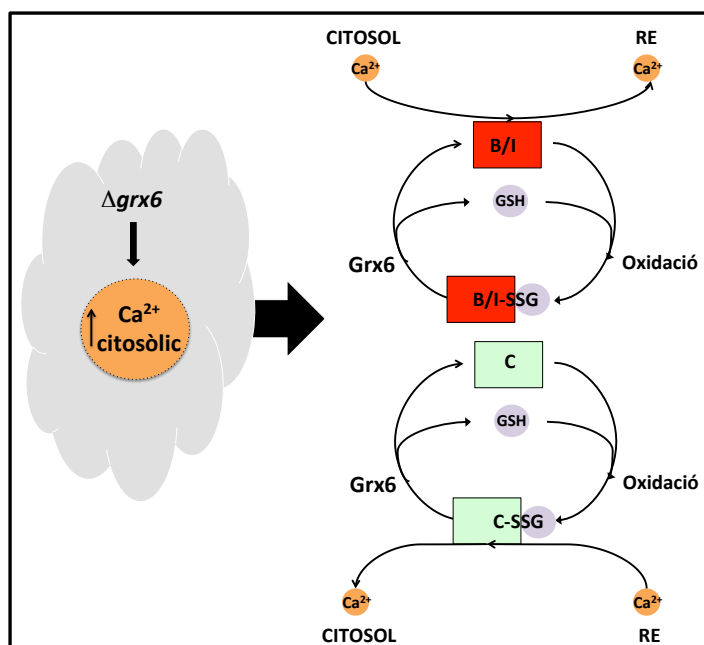


Figura 58. Esquema del possible paper de Grx6 en l'homeòstasi del Ca^{2+} . Grx6 podria regular una bomba (B) o intercanviador (I) de Ca^{2+} , un canal (C) de Ca^{2+} , o ambdós a la vegada, de manera que la seva absència comporta l'acumulació de Ca^{2+} al citosol (veure el text per més detalls).

Convé destacar que a pesar de la importància dels canals de Ca^{2+} $\text{IP}_3\text{R1}$ i RyR1 i la bomba de Ca^{2+} SERCA 2b en cèl·lules superiors, no es coneixen homòlegs d'aquests en les cèl·lules fúngiques. Ara bé, el canal IP_3R té el nombre i posicions d'alguns residus cisteïna altament conservats (Higo et al., 2005) i el gen que codifica per aquest receptor és una diana potencial de la via NFAT-calcineurina (Naranjo i Mellström, 2012). En *S. cerevisiae*, la majoria dels transportadors de Ca^{2+} del RE/Golgi, també estan majoritàriament induïts per la via Crz1-calcineurina. Estudis paral·lels realitzats en el nostre laboratori mostren que els transportadors de RE/Golgi de *S. cerevisiae*

també tenen residus cisteïna conservats i, per tant, potencialment susceptibles a regulació redox.

A més a més, algunes de les tioredoxines implicades en la regulació d'IP₃R i SERCA 2b, ERp44 i ERp57 respectivament, estan induïdes per l'estrès cel·lular, suggerint que es necessiten unes condicions redox i uns nivells de Ca²⁺ adequats pel manteniment de les funcions de RE (Higo et al., 2005). En aquest sentit, Izquierdo et al. (2008) van demostrar que l'expressió de *GRX6* també està induïda en resposta a un estrès de RE per tunicamicina.

En conseqüència d'aquesta desregulació homeostàtica en el mutant $\Delta grx6$ es podria induir el sistema HACS, que a la vegada contribuiria a augmentar la concentració de Ca²⁺ al citosol. De fet, encara no es coneix el mecanisme molecular pel qual s'activa aquest sistema en resposta a un estrès de RE en llevats. En concret, en el mutant $\Delta grx6$, una possibilitat seria que aquesta sortida o no entrada de Ca²⁺ al RE/Golgi produís una necessitat de Ca²⁺ als compartiments de la via secretora, que a través d'una proteïna sensora, permetés l'activació del sistema HACS, tal i com succeeix en eucariotes superiors amb les proteïnes STIM i el canal Orai en les zones de contacte RE-MP (Park et al., 2009; Putney, 2009), de les quals tampoc es coneixen ortòlegs en els genomes fúngics (Cunningham, 2011; Manfred et al., 2012). Una altra possibilitat seria que l'estrès de RE induís l'activació de transportadors de K⁺ (com el transportador Trk1), els quals a través de l'entrada de K⁺ extracel·lular i la conseqüent despolarització transitòria de la membrana plasmàtica promoguessin l'activació d'HACS (Stefan i Cunningham, 2013). No es descarta tampoc la combinació d'aquestes dues possibilitats. Posteriorment, aquest increment dels nivells de Ca²⁺ al citosol activaria la calmodulina, i així una sèrie de proteïnes quinases i fosfatases, que retransmetrien la senyal fins a la inducció específica d'una sèrie de transportadors, com Pmc1 o Pho89, induïts en el mutant $\Delta grx6$ a través de la via Crz1-calcineurina.

Ara bé, Grx6, a més a més de participar en la regulació de l'homeòstasi del Ca²⁺, també té un paper en l'homeòstasi redox de la via secretora, aquest segon fenotip compartit amb Grx7. En aquest cas, en absència de l'activitat oxidoreductasa de Grx6 o Grx7 hi hauria un increment de proteïnes que es troben formant part de ponts disulfur mixtes amb el GSH, un fet que es tradueix probablement en menys GSH disponible, i per tant una disminució del rati GSH:GSSG de la via. D'acord amb això, l'ambient moderadament més oxidat resultant de la falta de *GRX6* o *GRX7* permetria restaurar en part els defectes, tant de creixement com de plegament/secreció,

DISCUSSIÓ

provocats per la disminució de l'activitat oxidasa d'Ero1 [Figura 59]. Aquests resultats mostren un clar antagonisme d'ambdues GRXs en la via secretora. En aquest punt val la pena ressaltar que Mesecke et al. (2008b) van veure que en altres fons genètics el mutant $\Delta grx6$ és hipersensible a oxidants com la diamida i l' H_2O_2 respecte al mutant $\Delta grx7$ i la soca salvatge. Aquests autors van atribuir la major sensibilitat als oxidants per la falta de Grx6 al fet que Grx6 és molt més abundant (40 $\mu g/100$ mg de proteïna cel·lular) que Grx7 (3 $\mu g/100$ mg de proteïna cel·lular) en les cèl·lules de llevat i per tant, la seva absència és més notable i resulta en una major afectació de les cèl·lules.

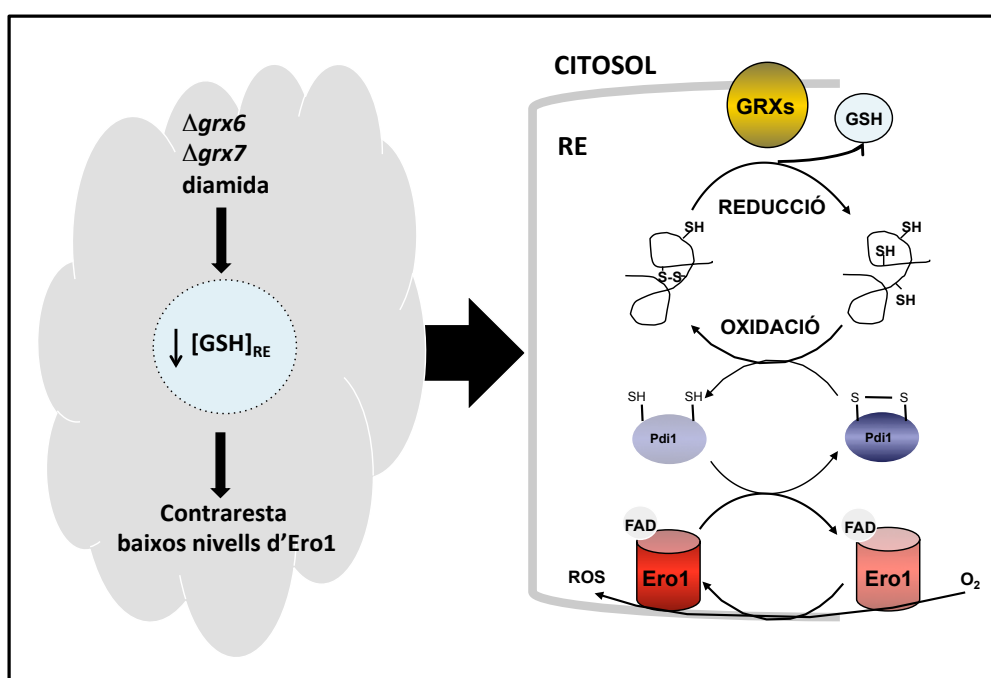


Figura 59. Esquema del possible paper de Grx6/Grx7 en l'homeòstasi redox de la via secretora, de manera que la seva absència contraresta els baixos nivells d'Ero1.

Tal com ja s'ha comentat, els dos fenotips descrits provocats per l'absència de Grx6 – alteracions en la compartimentalització del Ca^{2+} intracel·lular i restauració de la capacitat de maduració/secrèció de proteïnes quan la funció Ero1 és defectiva- són separables entre ells. Això no obsta que es pugui proposar un esquema unificat de la funció de Grx6 en condicions fisiològiques per a les cèl·lules, segons el qual un dels blacs sotmesos (via glutatiloniació vs. desglutatiloniació) a regulació redox per aquesta GRX seria una proteïna de RE/Golgi involucrada de manera més o menys directa en l'homeòstasi del Ca^{2+} .

Com apunt final, convé remarcar que tot i que *GRX6* i *GRX7* només es troben en fongs, plantes i cucs (Izquierdo et al., 2008), les seves funcions poden estar conservades en cèl·lules eucariotes superiors, on per exemple la funció reguladora de l'estat redox de les proteïnes es podria du a terme probablement per algunes espècies de la família de les tioredoxines o de la mateixa família de les PDI. Per això el present treball contribueix a l'avenç de la investigació sobre la regulació redox de processos associats a la maquinària secretora de proteïnes en les cèl·lules eucariotes en general.

VI. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. El doble mutant $\Delta grx6\Delta grx7$ mostra una inducció constitutiva de gens involucrats en l'homeòstasi del fosfat i en la secreció i compartimentalització de proteïnes, essent la inducció de la majoria dels gens involucrats en l'homeòstasi del fosfat conseqüència de la manca de *GRX6*.
2. El mutant $\Delta grx6$ mostra una inducció constitutiva de la via Crz1-calcineurina a diferència de la soca salvatge i el mutant $\Delta grx7$. La inducció de la via Crz1-calcineurina per un estrès per Ca^{2+} encara provoca una inducció lleugerament superior de la via en el mutant.
3. El mutant $\Delta grx6$ mostra un creixement defectiu quan es tracta amb l'inhibidor de la calcineurina FK506, en comparació amb la soca salvatge i el mutant $\Delta grx7$, essent l'activitat tiol oxidoreductasa de Grx6 necessària per protegir les cèl·lules de llevat quan la via Crz1-calcineurina està inhibida.
4. El mutant $\Delta grx6$ conté uns nivells de Ca^{2+} intracel·lular d'aproximadament el doble que la soca salvatge o el mutant $\Delta grx7$, fet que es correlaciona amb una menor susceptibilitat del mutant al quelant extracel·lular EGTA i una major sensibilitat d'aquest al quelant intracel·lular BAPTA-AM i a les elevades concentracions de Ca^{2+} extracel·lular, degut a l'absència de l'activitat tiol oxidoreductasa de Grx6.
5. L'acumulació de Ca^{2+} en el mutant $\Delta grx6$ és similar a la provocada per l'absència de la bomba de Ca^{2+} del Golgi Pmr1, mentre que el doble mutant $\Delta grx6\Delta pmr1$ mostra un efecte additiu, suggerint que el paper de Grx6 en la regulació de l'homeòstasi del Ca^{2+} és paral·lel al de Pmr1.
6. L'acumulació de Ca^{2+} intracel·lular en el mutant $\Delta pmr1$ es dona sobretot en la vacuola, mentre que en el mutant $\Delta grx6$ es dona majoritàriament en el citosol.
7. L'origen directe i majoritari de l'excés de Ca^{2+} en el mutant $\Delta grx6$ és extracel·lular i requereix la funcionalitat del canal HACS de la membrana plasmàtica.
8. A la temperatura subòptima de 36°C, el mutant $\Delta grx6$ segueix essent menys susceptible a l'EGTA que la soca salvatge, mentre que el mutant $\Delta grx7$ mostra

CONCLUSIONS

- una major sensibilitat a aquest, en concordança amb uns nivells de Ca^{2+} inferiors respecte a la soca salvatge.
9. El mutant Δgrx6 hiperacumula ortofosfat en comparació amb la soca salvatge, principalment al citosol o als compartiments extravacuolars de la cèl·lula, sent probablement el principal responsable de l'acumulació el transportador d'alta afinitat de fosfat Pho89.
 10. El mutant Δgrx6 també hiperacumula K^+ i Na^+ , tant en els compartiments vacuolars com extravacuolars/citosòlics, mentre que hiperacumula moderadament Mg^{2+} només en els compartiments extravacuolars/citosòlics, en comparació amb la soca salvatge i el mutant Δgrx7 .
 11. En condicions d'estrès de RE degut al tractament amb el reductor de proteïnes DTT o el quelant de Ca^{2+} EGTA, l'absència de *GRX6* provoca una activació més intensa de la UPR en comparació amb la soca salvatge. En canvi, l'absència de *GRX7* resulta en una activació inclús més moderada d'aquesta resposta al tractament amb DTT que la soca salvatge.
 12. Ni *Grx6* ni *Grx7* participen en la regulació de l'estat redox de les proteïnes Ero1 i Pdi1 essencials pel plegament proteic a nivell de RE.
 13. L'absència de *GRX6* o *GRX7* contraresta la letalitat d'un mutant condicional que té reprimida l'expressió del gen essencial *ERO1* amb doxiciclina, de manera similar a l'oxidant diamida, suggerint que l'absència d'una d'aquestes GRXs crea unes condicions oxidants al RE que compensen en part els baixos nivells de l'oxidasa Ero1.
 14. Els mutants Δgrx6 , Δgrx7 i la soca salvatge segueixen la mateixa cinètica de maduració/secreció de CPY. La inhibició de la via de la calcineurina tampoc provoca defectes aparents en el maduració de CPY en el mutant Δgrx6 en comparació amb la soca salvatge, indicant que l'activació de la via de la calcineurina en el mutant Δgrx6 no està lligada amb el rescat de possibles defectes en la maduració/secreció de proteïnes.
 15. L'absència de *GRX6* o *GRX7* en un mutant que expressa baixos nivells d'*ERO1* reverteix els defectes de maduració/secreció de CPY d'aquest mutant, de manera similar a la diamida, creant unes condicions oxidants que recuperen

parcialment la funcionalitat de la maquinària de plegament proteic prèviament compromesa pels defectes en la funció Ero1.

16. L'increment dels nivells de Ca^{2+} citosòlic és una conseqüència primària de la falta de *GRX6*, ja que es produeix independentment de que estigui o no afectada la maduració/secreció de CPY.
17. Els fenotips dels mutants Δgrx6 i Δgrx7 en relació a la maduració/secreció de CPY són independents als fenotips de la desregulació de l'homeòstasi del Ca^{2+} , doncs els primers es produeixen en condicions de depleció d'Ero1 tant si els nivells de Ca^{2+} citosòlics són alts (mutant sense Grx6) com si no (mutant sense Grx7).

VII. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L., i Goldstein, S. A. (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell*, 99:283–291.
- Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., i Herrero, E. (2009). Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins. *BMC Evol Biol*, 9:66.
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221:1256–1264.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., i Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90:7915–7922.
- Antebi, A., i Fink, G. R. (1992). The yeast Ca^{2+} -ATPase homologue, *PMR1*, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell*, 3:633–654.
- Appenzeller-Herzog, C. (2011). Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 124:847–855.
- Aramburu, J., Rao, A., i Klee, C. B. (2000). Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul*, 36:237–295.
- Ariño, J., Ramos, J., i Sychrová, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74:95–120.
- Armstrong, J. (2010). Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends Cell Biol*, 20:580–585.
- Asnis, R. E. (1995). A glutathione reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 270:77–85.
- Auesukaree, C., Homma, T., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y., i Harashima, S. (2004). Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the *PHO* pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279:17289–17294.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., i Struhl, K. (1994). In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Avery, A. M., i Avery, S. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem*, 276:33730–33735.
- Azzolin, L., von Stockum, S., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M. A., i Bernardi, P. (2010). The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett*, 584:2504–2509.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W., i Tabor, H. (1991). Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:5872–5876.
- Ballou, L., Hernandez, L. M., Alvarado, E., i Ballou, C. E. (1990). Revision of the oligosaccharide structures of yeast carboxypeptidase Y. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:3368–3372.
- Bañuelos, M. A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L., i Potier, S. (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology*, 144:2749–2758.
- Barford, D. (2004). The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol*, 14:679–686.
- Bass, R., Ruddock, L. W., Klappa, P., i Freedman, R. B. (2004). A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem*, 279:5257–5262.

BIBLIOGRAFIA

- Beeler, T., Gable, K., Zhao, C., i Dunn, T. (1994). A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269:7279–7284.
- 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*, 14:1127–1138.
- 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 Res*, 26:942–947.
- Bellí, G., Molina, M. M., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, 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. *J Biol Chem*, 279:12386–12395.
- Benham, A. M., Cabibbo, A., Fassio, A., Bulleid, N., Sitia, R., i Braakman, I. (2000). The CXXCXXC motif determines the folding, structure and stability of human Ero1-L α . *EMBO J*, 19:4493–4502.
- Bernales, S., Papa, F. R., i Walter, P. (2006). Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22:487–508.
- Berndt, C., Hudemann, C., Hanschmann, E. M., Axelsson, R., Holmgren, A., i Lillig, C. H. (2007). How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid Redox Signal*, 9:151–157.
- Biswas, S., Chida, A. S., i Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol*, 71:551–564.
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrnyk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Geoghegan, K. F., i Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem*, 275:24798–24806.
- Bolotina, V. M., i Csutora, P. (2005). CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends Biochem Sci*, 30:378–387.
- Bonilla, M., i Cunningham, K. W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell*, 14:4296–4305.
- Bonilla, M., Nastase, K. K., i Cunningham, K. W. (2002). Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J*, 21:2343–2353.
- Borst-Pauwels, G. W. (1993). Mutual interaction of ion uptake and membrane potential. *Biochim Biophys Acta*, 1145:15–24.
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S., i Bachhawat, A. K. (2000). Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275:13259–13265.
- Boustany, L. M., i Cyert, M. S. (2002). Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev*, 16:608–619.
- Bowers, K., i Stevens, T. H. (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1744:438–454.
- Bradshaw, P. C., Jung, D. W., i Pfeiffer, D. R. (2001). Free fatty acids activate a vigorous Ca²⁺:2H⁺ antiport activity in yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 276:40502–40509.

- Bradshaw, P. C., i Pfeiffer, D. R. (2006). Release of Ca^{2+} and Mg^{2+} from yeast mitochondria is stimulated by increased ionic strength. *BMC Biochem*, 7:4.
- Bradshaw, P. C., i Pfeiffer, D. R. (2013). Characterization of the respiration-induced yeast mitochondrial permeability transition pore. *Yeast*, 30:471-483.
- Brennan, R. J., i Schiestl, R. H. (1996). Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat Res*, 356:171-178.
- Brigelius-Flohé, R. (2006). Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem*, 387:1329-1335.
- Bultynck, G., Heath, V. L., Majeed, A. P., Galan, J. M., Haguenaer-Tsapis, R., i Cyert, M. S. (2006). Slm1 and Slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis and the yeast uracil permease. *Mol Cell Biol*, 26:4729-4745.
- 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*, 31:9288-9293.
- Bushweller, J. H., Billeter, M., Holmgren, A., i Wüthrich, K. (1994). The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between *Escherichia coli* glutaredoxin(C14S) and glutathione. *J Mol Biol*, 235:1585-1597.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., i Ravanat, J. L. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res*, 531:5-23.
- Cao, S. S., i Kaufman, R. J. (2012). Unfolded protein response. *Curr Biol*, 22:622-626.
- Casagrande, R., Stern, P., Diehn, M., Shamu, C., Osario, M., Zúñiga, M., Brown, P. O., i Ploegh, H. (2000). Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell*, 5:729-735.
- Castro, C. D., Meehan, A. J., Koretsky, A. P., i Domach, M. M. (1995). In situ ^{31}P nuclear magnetic resonance for observation of polyphosphate and catabolite responses of chemostat-cultivated *Saccharomyces cerevisiae* after alkalization. *Appl Environ Microbiol*, 61:4448-4453.
- Chakravarthi, S., Jessop, C. E., i Bulleid, N. J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep*, 7:271-275.
- Chapman, R., Sidrauski, C., i Walter, P. (1998). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14:459-485.
- Choi, J. H., Lou, W., i Vancura, A. (1998). A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 273:29915-29922.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131:1047-1058.
- Coblentz, A., i Wolf, K. (1994). The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Rev*, 14:303-308.
- Collinson, E. J., i Grant, C. M. (2003). Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J Biol Chem*, 278:22492-22497.
- Collinson, E. J., Wheeler, G. L., Garrido, E. O., Avery, A. M., Avery, S. V., i Grant, C. M. (2002). The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem*, 277:16712-16717.

BIBLIOGRAFIA

- Conradt, B., Shaw, J., Vida, T., Emr, S., i Wickner, W. (1992). *In vitro* reactions of vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 119:1469–1479.
- Couturier, J., Jacquot, J. P., i Rouhier, N. (2009a). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell Mol Life Sci*, 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. *J Biol Chem*, 284:9299–9310.
- Cox, J. S., Shamu, C. E., i Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 73:1197–1206.
- Crabtree, G. R. (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem*, 276:2313–2316.
- Cronin, S. R., Khoury, A., Ferry, D. K., i Hampton, R. Y. (2000). Regulation of Hmg-CoA reductase degradation requires the P-Type ATPase Cod1p/Spf1p. *J Cell Biol*, 148:915–924.
- Cronin, S. R., Rao, R., i Hampton, R. Y. (2002). Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *J Cell Biol*, 157:1017–1028.
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T. G., Balla, T., i Hajnóczky, G. (2010). Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell*, 39:121–132.
- Csutora, P., Peter, K., Kilic, H., Park, K. M., Zarayskiy, V., Gwozdz, T., i Bolotina, V. M. (2008). Novel role for STIM1 as a trigger for calcium influx factor production. *J Biol Chem*, 283:14524–14531.
- Cui, J., Kaandorp, J. A., Ositelu, O. O., Beaudry, V., Knight, A., Nanfack, Y. F., i Cunningham, K. W. (2009a). Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast. *Cell Calcium*, 45:123–132.
- Cui, J., Kaandorp, J. A., Sloot, P. M., Lloyd, C. M., i Filatov, M. V. (2009b). Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res*, 9:1137–1147.
- Culotta, V. C., Howard, W. R., i Liu, X. F. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269:25295–25302.
- Culotta, V. C., Yang, M., i O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta*, 1763:747–758.
- Cunningham, K. W. (2011). Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Calcium*, 50:129–138.
- Cunningham, K. W., i Fink, G. R. (1994). Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMC1*, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J Cell Biol*, 124:351–363.
- Cunningham, K. W., i Fink, G. R. (1996). Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 16:2226–2237.
- Cuozzo, J. W., i Kaiser, C. A. (1999). Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat Cell Biol*, 1:130–135.

- Cyert, M. S. (2001). Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 35:647–672.
- Cyert, M. S. (2003). Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 311:1143–1150.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., i Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*, 10:389–406.
- Davis, T. N., Urdea, M. S., Masiarz, F. R., i Thorner, J. (1986). Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell*, 47:423–431.
- Dawes, E. A., i Senior, P. J. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv Microb Physiol*, 10:135–266.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., i Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476:336–340.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., i Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111:471–481.
- Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., i Gasser, B. (2013). The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev*, 37:872-914.
- Demaegd, D., Foulquier, F., Colinet, A. S., Gremillon, L., Legrand, D., Mariot, P., Peiter, E., Van Schaffingen, E., Matthijs, G., i Morsomme, P. (2013). Newly characterized Golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110:6859–6864.
- Denis, V., i Cyert, M. S. (2002). Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol*, 156:29–34.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1830:3217–3266.
- Deponte, M., Becker, K., i Rahlfs, S. (2005). Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins. *Biol Chem*, 386:33–40.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., i Moreno, S. N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*, 3:251–261.
- Dormer, U. H., Westwater, J., Stephen, D. W., i Jamieson, D. J. (2002). Oxidant regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *GSH1* gene. *Biochim Biophys Acta*, 1576:23–29.
- Dudley, A. M., Janse, D. M., Tanay, A., Shamir, R., i Church, G. M. (2005). A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol Syst Biol*, 1:2005.0001.
- Dunn, T., Gable, K., i Beeler, T. (1994). Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. *J Biol Chem*, 269:7273–7278.
- Dürr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H., i Rudolph, H. K. (1998). The *medial*-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell*, 9:1149–1162.
- 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.
- Eide, D. J., Clark, S., Nair, T. M., Gehl, M., Gribskov, M., Guerinot, M. L., i Harper, J. F. (2005). Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol*, 6:R77.

BIBLIOGRAFIA

- Eilam, Y., Lavi, H., i Grossowicz, N. (1985). Cytoplasmic Ca²⁺ homeostasis maintained by a vacuolar Ca²⁺ transport system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, 131:623–29.
- Ellgaard, L. (2004). Catalysis of disulphide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Biochem Soc Trans*, 32:663–667.
- Ellgaard, L., i Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:181–191.
- Ellgaard, L., i Ruddock, L. W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep*, 6:28–32.
- Enns, G. M. (2003). The contribution of mitochondria to common disorders. *Mol Genet Metab*, 80:11–26.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*, 24:469–486.
- Fagioli, C., Mezghrani, A., i Sitia, R. (2001). Reduction of interchain disulfide bonds precedes the dislocation of Ig- μ chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol for proteasomal degradation. *J Biol Chem*, 276:40962–40967.
- Fernandes, A. P., i Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal*, 6:63–74.
- Ferrezuelo, F., Aldea, M., i Futcher, B. (2009). Bck2 is a phase-independent activator of cell cycle-regulated genes in yeast. *Cell Cycle*, 15:239–252.
- Fischer, M., Schnell, N., Chattaway, J., Davies, P., Dixon, G., i Sanders, D. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett*, 419:259–262.
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., i Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe/S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem*, 268:22369–22376.
- Forsburg, S. L. (2001). The art and design of genetic screens: yeast. *Nat Rev Genet*, 2:659–668.
- Foulquier, F., Amyere, M., Jeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V., Bammens, R., Morelle, W., Rosnoble, C., Legrand, D., Demaegd, D., Buist, N., Cheillan, D., Guffon, N., Morsomme, P., Annaert, W., Freeze, H. H., Van Schaffingen, E., Vikkula, M., i Matthijs, G. (2012). TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet*, 91:15–26.
- Foury, F., i Talibi, D. (2001). Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem*, 276:7762–7768.
- Frand, A. R., i Kaiser, C. A. (1998). The *ERO1* gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*, 1:161–170.
- Frand, A. R., i Kaiser, C. A. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*, 4:469–477.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 64:97–112.
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., i Sommer, T. (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2:379–384.

- Gaber, R. F., Styles, C. A., i Fink, G. R. (1988). *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 8:2848–2859.
- Gan, Z. R. (1991). Yeast thioredoxin genes. *J Biol Chem*, 266:1692–1696.
- Garcerá, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J., i Herrero, E. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem J*, 398:187–196.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J. M., Francois, J., Nombela, C., i Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem*, 279:15183–15195.
- Gardner, B. M., i Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*, 333:1891–1894.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., i Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 11:4241–4257.
- Ghezzi, P. (2005). Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochem Soc Trans*, 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*, 74:527–534.
- Goldstein, A. L., i McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15:1541–1553.
- Goto, M. (2007). Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71:1415–1427.
- Grant, C. M., MacIver, F. H., i Dawes, I. W. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 29:511–515.
- Grant, C. M., Quinn, K. A., i Dawes, I. W. (1999). Differential protein S-thionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 19:2650–2656.
- Gross, E., Sevier, C. S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C. A., Thorpe, C., i Fass, D. (2006). Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:299–304.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., i Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260:3440–3450.
- Guarente, L. (1983). Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol*, 101:181–191.
- Halachmi, D., i Eilam, Y. (1989). Cytosolic and vacuolar Ca²⁺ concentrations in yeast cells measured with the Ca²⁺-sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS Lett*, 256:55–61.
- Halachmi, D., i Eilam, Y. (1993). Calcium homeostasis in yeast cells exposed to high concentrations calcium. Roles of vacuolar H⁺-ATPase and cellular ATP. *FEBS Lett*, 316:73–78.
- Halachmi, D., i Eilam, Y. (1996). Elevated cytosolic free Ca²⁺ concentrations and massive Ca²⁺ accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking *PMR1*, a homolog of Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett*, 392:194–200.

BIBLIOGRAFIA

- Halliwell, B., i Gutteridge, J. M. C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radic Biol Med*, 10:449–450.
- Hampton, R. Y., i Sommer, T. (2012). Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation. *Curr Opin Cell Biol*, 24:460-466.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166:557–580.
- Hansen, R. E., i Winther, J. R. (2009). An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. *Anal Biochem*, 394:147–158.
- Haro, R., Garcíadeblas, B., i Rodríguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett*, 291:189–191.
- Hasilik, A., i Tanner, W. (1978). Carbohydrate moiety of carboxypeptidase Y and perturbation of its biosynthesis. *Eur J Biochem*, 91:567–575.
- Hatahet, F., i Ruddock, L. W. (2009). Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*, 11:2807–2850.
- Hausmann, A., Samans, B., Lill, R., i Mühlhoff, U. (2008). Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem*, 283:8318–8330.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., i Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:51–88.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., i Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 10:3787–3799.
- Heath, V. L., Shaw, S. L., Roy, S., i Cyert, M. S. (2004). Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurin-mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 3:695–704.
- Heldman, N., Vonshak, O., Sevier, C. S., Vitu, E., Mehlman, T., i Fass, D. (2010). Steps in reductive activation of the disulfide-generating enzyme Ero1p. *Protein Sci*, 19:1863–1876.
- Herrero, E., Bellí, G., i Casas, C. (2010). Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Curr Protein Pept Sci*, 11:659-668
- Herrero, E., i De La Torre-Ruiz, M. A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci*, 64:1518–1530.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., i Cabiscol, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780:1217–1235.
- Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., i Mikoshiba, K. (2005). Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell*, 120:85–98.
- Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73:2275–2279.
- Holmgren, A. (1979). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 254:3664–3671.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, 254:13963–13966.
- Holmgren, A., i Aslund, F. (1995). Glutaredoxin. *Methods Enzymol*, 252:282-292.

- Hong, E., Davidson, A. R., i Kaiser, C. A. (1996). A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol*, 135:623–633.
- Hong, S., Cong, X., Jing, H., Xia, Z., Huang, X., Hu, X., i Jiang, X. (2013). Characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, 537:125–132.
- Hoseki, J., Ushioda, R., i Nagata, K. (2010). Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem*, 147:19–25.
- Huang, K., Ferrin-O'Connell, I., Zhang, W., Leonard, G. A., O'Shea, E. K., i Quioco, F. A. (2007). Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. *Mol Cell*, 28:614–623.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., i O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425:686–691.
- Huh, W. K., Lee, B. H., Kim, S. T., Kim, Y. R., Rhie, G. E., Baek, Y. W., Hwang, C. S., Le, J. S., i Kang, S. O. (1998). D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 30:895–903.
- Hürlimann, H. C., Stadler-Waibel, M., Werner, T. P., i Freimoser, F. M. (2007). Pho91 Is a vacuolar phosphate transporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 18:4438–4445.
- Hurtley, S. M., i Helenius, A. (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*, 5:277–307.
- Iida, K., Tada, T., i Iida, H. (2004). Molecular cloning in yeast by *in vivo* homologous recombination of the yeast putative $\alpha 1$ subunit of the voltage-gated calcium channel. *FEBS Lett*, 576:291–296.
- Ikner, A., i Shiozaki, K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res*, 569:13–27.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, 57:395–418.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*, 77:755–776.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., i Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274:27002–27009.
- Ishiwata-Kimata, Y., Promlek, T., Kohno, K., i Kimata, Y. (2013). BiP-bound and nonclustered mode of Ire1 evokes a weak but sustained unfolded protein response. *Genes Cells*, 18:288–301.
- Izawa, S., Inoue, Y., i Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 230:61–67.
- 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. *Eukaryot Cell*, 7:1415–1426.
- Jämsä, E., Simonen, M., i Makarow, M. (1994). Selective retention of secretory proteins in the yeast endoplasmic reticulum by treatment of cells with a reducing agent. *Yeast*, 10:355–370.

BIBLIOGRAFIA

- Johansson, C., Lillig, C. H., i Holmgren, A. (2004). Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *J Biol Chem*, 279:7537–7543.
- Joly, J. C., i Swartz, J. R. (1997). *In vitro* and *in vivo* redox states of the *Escherichia coli* periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC. *Biochemistry*, 36:10067–10072.
- Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A., i Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:13807–13812.
- Jung, G., Ueno, H., i Hayashi, R. (1999). Carboxypeptidase Y: structural basis for protein sorting and catalytic triad. *J Biochem*, 126:1–6.
- Kaffman, A., Herskowitz, I., Tjian, R., i O’Shea, E. K. (1994). Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science*, 263:1153–1156.
- Kaffman, A., Rank, N. M., O’Neill, E. M., Huang, L. S., i O’Shea, E. K. (1998). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature*, 396:482–486.
- Karala, A. R., Lappi, A. K., i Ruddock, L. W. (2010). Modulation of an active-site cysteine pKa allows PDI to act as a catalyst of both disulfide bond formation and isomerization. *J Mol Biol*, 396:883–892.
- Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., i Mori, K. (1997). Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Mol Biol Cell*, 8:1845–1862.
- Ke, R., Ingram, P. J., i Haynes, K. (2013). An integrative model of ion regulation in yeast. *PLoS Comput Biol*, 9:e1002879
- Kim, H., Kim, A., i Cunningham, K. W. (2012b). Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) promotes vacuolar membrane permeabilization and nonapoptotic death in stressed yeast. *J Biol Chem*, 287:19029–29039.
- Kim, S., Sideris, D. P., Sevier, C. S., i Kaiser, C. A. (2012a). Balanced Ero1 activation and inactivation establishes ER redox homeostasis. *J Cell Biol*, 196:713–725.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Yamada, S., i Kohno, K. (2006). Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells*, 11:59–69.
- Kimata, Y., Kimata, Y. I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I. C., Takeuchi, M., Rose, M. D., i Kohno, K. (2003). Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell*, 14:2559–2569.
- Kingsbury, T. J., i Cunningham, K. W. (2000). A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev*, 14:1595–1604.
- Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., Nishiyama, M., Yajima, T., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., i Aoki, H. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. *J Antibiot*, 40:1256–1265.
- Klee, C. B., Ren, H., i Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem*, 273:13367–13370.
- Klionsky, D. J., Cuervo, A. M., Dunn, W. A. J., Levine, B., van der Klei, I., i Seglen, P. O. (2007). How shall I eat thee? *Autophagy*, 3:413–416.

- Ko, C. H., Buckley, A. M., i Gaber, R. F. (1990). *TRK2* is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 125:305–312.
- Ko, C. H., i Gaber, R. F. (1991). *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 11:4266–4273.
- Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J Bacteriol*, 177:491–496.
- Kosower, N. S., i Kosower, E. M. (1995). Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol*, 251:123–133.
- Kretsinger, R. H. (1980). Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit Rev Biochem*, 8:119–174.
- Kulaev, I., i Kulakovskaya, T. (2000). Polyphosphate and phosphate pump. *Annu Rev Microbiol*, 54:709–734.
- Kumar, C., Igbaria, A., D'Autreaux, B., Planson, A. G., Junot, C., Godat, E., Bachhawat, A. K., Delaunay-Mosian, A., i Toledano, M. B. (2011). Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J*, 30:2044–2056.
- Kumble, K. D., i Kornberg, A. (1996). Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. *J Biol Chem*, 271:27146–27151.
- Lagerstedt, J. O., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., i Persson, B. L. (2000). The yeast phosphate transporting system: regulated trafficking of the Pho84 phosphate transporter. In: *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*, Kluwer/Plenum, New York, pp. 405–414.
- Lagerstedt, J. O., Zvyagilskaya, R., Pratt, J. R., Pattison-Granberg, J., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., i Persson, B. L. (2002). Mutagenic and functional analysis of the C-terminus of *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 phosphate transporter. *FEBS Lett*, 526:31–37.
- LaMantia, M. L., i Lennarz, W. J. (1993). The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell*, 74:899–908.
- Lau, W. T., Howson, R. W., Malkus, P., Schekman, R., i O'Shea, E. K. (2000). Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:1107–1112.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., i Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem*, 274:16040–16046.
- Lee, S. M., Kim, H. S., Han, H. J., Moon, B. C., Kim, C. Y., Harper, J. F., i Chung, W. S. (2007b). Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited Ca²⁺-ATPase (*ACA11*) that is localized to vacuole membranes in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 581:3943–3949.
- Lee, Y. S., Mulugu, S., York, J. D., i O'Shea, E. K. (2007a). Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science*, 316:109–112.
- Li, F., Yu, T., i Yu, S. (2013). Structural dynamic and thermodynamic analysis of calcineurin B subunit induced by calcium/magnesium binding. *Int J Biol Macromol*, 60:122–127.
- Li, L., Chen, O. S., Ward, D. M., i Kaplan, J. (2001). CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem*, 276:29515–29519.
- 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. *Biochim Biophys Acta*, 1804:1542–1547.

BIBLIOGRAFIA

- Li, X., Qian, J., Wang, C., Zheng, K., Ye, L., Fu, Y., Han, N., Bian, H., Pan, J., Wang, J., i Zhu, M. (2011). Regulating cytoplasmic calcium homeostasis can reduce aluminum toxicity in yeast. *PLoS One*, 6:e21148.
- Li, Y., i Camacho, P. (2004). Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol*, 164:35–46.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460:831–838.
- Lill, R., i Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22:457–486.
- Lillig, C. H., Berndt, C., i Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta*, 1780:1304–1317.
- Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M. E., Hudemann, C., Bill, E., i Holmgren, A. (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:8168–8173.
- Lissandron, V., Podini, P., Pizzo, P., i Pozzan, T. (2010). Unique characteristics of Ca²⁺ homeostasis of the trans-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:9198-9203.
- Liu, C., Yang, Z., Yang, J., Xia, Z., i Ao, S. (2000). Regulation of the yeast transcriptional factor PHO2 activity by phosphorylation. *J Biol Chem*, 275:31972-31978.
- Locke, E. G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y., i Cunningham, K. W. (2000). A homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in yeast. *Mol Cell Biol*, 20:6686–6694.
- Loew, L. M., Carrington, W., Tuft, R. A., i Fay, F. S. (1994). Physiological cytosolic Ca²⁺ transients evoke concurrent mitochondrial depolarizations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:12579–12583.
- Lönn, M. E., Hudemann, C., Berndt, C., Cherkasov, V., Capani, F., Holmgren, A., i Lillig, C. H. (2008). Expression pattern of human glutaredoxin 2 isoforms: identification and characterization of two testis/cancer cell-specific isoforms. *Antioxid Redox Signal*, 10:547–557.
- López-Mirabal, H. R., i Winther, J. R. (2008). Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochim Biophys Acta*, 1783:629–640.
- 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. *Biochem J*, 377:395–405.
- Loukin, S., i Kung, C. (1995). Manganese effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium. *J Cell Biol*, 131:1025–1037.
- Luan, Y., Matsuura, I., Yazawa, M., Nakamura, T., i Yagi, K. (1987). Yeast calmodulin: structural and functional differences compared with vertebrate calmodulin. *J Biochem*, 102:1531–1537.
- 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. *Mol Biol Cell*, 9:1081–1091.
- Luo, M., Jiang, Y. L., Ma, X. X., Tang, Y. J., He, Y. X., Yu, J., Zhang, R. G., Chen, Y., i Zhou, C. Z. (2010). Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6. *J Mol Biol*, 398: 614–622.

- MacMillan, D. (2013). FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular Ca^{2+} signalling. *Eur J Pharmacol*, 700:181–193.
- MacMillan, D., Currie, S., Bradley, K. N., Muir, T. C., i McCarron, J. G. (2005). In smooth muscle, FK506-binding protein modulates IP_3 receptor-evoked Ca^{2+} release by mTOR and calcineurin. *J Cell Sci*, 118:5443–5451.
- Manford, A. G., Stefan, C. J., Yuan, H. L., Macgurn, J. A., i Emr, S. D. (2012). ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev Cell*, 23:1129–1140.
- Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I., i Feldmann, H. (1999). Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett*, 450:27–34.
- Marchi, V., Sorin, A., Wei, Y., i Rao, R. (1999). Induction of vacuolar Ca^{2+} -ATPase and $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity in yeast mutants lacking Pmr1, the Golgi Ca^{2+} -ATPase. *FEBS Lett*, 454:181–186.
- Margittai, E., i Sitia, R. (2011). Oxidative protein folding in the secretory pathway and redox signaling across compartments and cells. *Traffic*, 12:1–8.
- Marquardt, T., Hebert, D. N., i Helenius, A. (1993). Post-translational folding of influenza hemagglutinin in isolated endoplasmic reticulum-derived microsomes. *J Biol Chem*, 268:19618–19625.
- Martin, D. C., Kim, H., Mackin, N. A., Maldonado-Báez, L., Evangelista, C. C. Jr., Beaudry, V. G., Dudgeon, D. D., Naiman, D. Q., Erdman, S. E., i Cunningham, K. W. (2011). New regulators of a high affinity Ca^{2+} influx system revealed through a genome-wide screen in yeast. *J Biol Chem*, 286:10744–10754.
- Martin, J. L. (1995). Thioredoxin—a fold for all reasons. *Structure*, 3:245–250.
- Martinez, P., i Persson, B. L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na^+ -coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 258:628–638.
- Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S., i Cunningham, K. W. (1997). Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 11:3445–3458.
- Matsumoto, T. K., Ellsmore, A. J., Cessna, S. G., Low, P. S., Pardo, J. M., Bressan, R. A., i Hasegawa, P. M. (2002). An osmotically induced cytosolic Ca^{2+} transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 277:33075–33080.
- Matsuura, I., Ishihara, K., Nakai, Y., Yazawa, M., Toda, H., i Yagi, K. (1991). A site-directed mutagenesis study of yeast calmodulin. *J Biochem*, 109:190–197.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 263:17205–17208.
- Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem*, 269:9397–9400.
- Mendoza, I., Quintero, F. J., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., i Pardo, J. M. (1996). Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *J Biol Chem*, 271:23061–23067.

BIBLIOGRAFIA

- Mendoza, I., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A., i Pardo, J. M. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269:8792–8796.
- Merksamer, P. I., Trusina, A., i Papa, F. R. (2008). Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions. *Cell*, 135:933–947.
- 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*, 47:1452–1463.
- 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. *Mol Biol Cell*, 19:2673–2680.
- Mezghrani, A., Fassio, A., Benham, A., Simmen, T., Braakman, I., i Sitia, R. (2001). Manipulation of oxidative protein folding and PDI redox state in mammalian cells. *EMBO J*, 20:6288–6296.
- Michalak, M., Robert Parker, J. M., i Opas, M. (2002). Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 32:269–278.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., i Lemaire, S. D. (2006). Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynth Res*, 89:225–245.
- Mikoshiba, K. (2007). IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem*, 102:1426–1446.
- Miseta, A., Fu, L., Kellermayer, R., Buckley, J., i Bedwell, D. M. (1999b). The Golgi apparatus plays a significant role in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the *vps33Δ* vacuolar biogenesis mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274:5939–5947.
- Miseta, A., Kellermayer, R., Aiello, D. P., Fu, L., i Bedwell, D. M. (1999a). The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett*, 451:132–136.
- Mitchell, P., i Moyle, J. (1967). Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem J*, 105:1147–1162.
- Miyakawa, T., i Mizunuma, M. (2007). Physiological roles of calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with special emphasis on its roles in G2/M cell-cycle regulation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71:633–645.
- Molina, M. M., Bellí, G., De La Torre, M. A., Rodríguez-Manzanaque, M. T., i Herrero, E. (2004). Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem*, 279:51923–51939.
- Molina-Navarro, M. M., Castells-Roca, L., Bellí, G., García-Martínez, J., Marín-Navarro, J., Moreno, J., Pérez-Ortín, J. E., i Herrero, E. (2008). Comprehensive transcriptional analysis of the oxidative response in yeast. *J Biol Chem*, 283:17908–17918.
- Molteni, S. N., Fassio, A., Ciriolo, M. R., Filomeni, G., Pasqualetto, E., Fagioli, C., i Sitia, R. (2004). Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279:32667–32673.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., i Mager, W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol*, 19:651–658.

- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374:131–134.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., i Yura, T. (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells*, 1:803-817.
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M. J., i Sambrook, J. F. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast *KAR2* (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J*, 11:2583–2593.
- Mori, Y., Wakamori, M., Miyakawa, T., Hermosura, M., Hara, Y., Nishida, M., Hirose, K., Mizushima, A., Kurosaki, M., Mori, E., Gotoh, K., Okada, T., Fleig, A., Penner, R., Iino, M., i Kurosaki, T. (2002). Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J Exp Med*, 195:673–681.
- Moskovitz, J. (2005). Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1703:213–219.
- Mouillon, J. M., i Persson, B. L. (2006). New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 6:171–176.
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C. H., i Lill, R. (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab*, 12:373–385.
- Mukai, K., Kohno, Y., i Ishizu, K. (1988). Kinetic study of the reaction between vitamin E radical and alkyl hydroperoxides in solution. *Biochem Biophys Res Commun*, 155:1046–1050.
- Myers, M. D., i Payne, G. S. (2013). Clathrin, adaptors and disease: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Biosci*, 18:862–891.
- Nakajima-Shimada, J., Iida, H., Tsuji, F. I., i Anraku, Y. (1991). Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:6878–6882.
- Naranjo, J. R., i Mellström, B. (2012). Ca^{2+} -dependent transcriptional control of Ca^{2+} homeostasis. *J Biol Chem*, 287:31674-31680.
- Ng, D. T., Spear, E. D., i Walter, P. (2000). The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol*, 150:77–88.
- Nohl, H., Kozlov, A. V., Gille, L., i Staniek, K. (2003). Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem Soc Trans*, 31:1308–1311.
- Nørgaard, P., Tachibana, C., Bruun, A. W., i Winther, J. R. (2003). Gene regulation in response to protein disulphide isomerase deficiency. *Yeast*, 20:645–652.
- Nørgaard, P., Westphal, V., Tachibana, C., Alsøe, L., Holst, B., i Winther, J. R. (2001). Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *J Cell Biol*, 152:553–562.
- Ogawa, N., DeRisi, J., i Brown, P. O. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell*, 11:4309–4321.
- Ohsumi, Y., i Anraku, Y. (1981). Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 256:2079-2082.

BIBLIOGRAFIA

- 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*. *J Biol Chem*, 281:17661–17669.
- Oka, O. B., i Bulleid, N. J. (2013). Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1833:2425–2429.
- Olafsdottir, K., i Reed, D. J. (1988). Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment. *Biochim Biophys Acta*, 964:377–382.
- Oshima, Y., Ogawa, N., i Harashima, S. (1996). Regulation of phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 179:171–177.
- Østergaard, H., Tachibana, C., i Winther, J. R. (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol*, 166:337–345.
- Outten, C. E., i Culotta, V. C. (2004). Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* *GLR1* gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase. *J Biol Chem*, 279:7785–7791.
- Pagani, M., Fabbri, M., Benedetti, C., Fassio, A., Pilati, S., Bulleid, N. J., Cabibbo, A., i Sitia, R. (2000). *Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-L β* (*ERO1-L β*), a human gene induced in the course of the unfolded protein response. *J Biol Chem*, 275:23685–23692.
- Paget, M. S., i Buttner, M. J. (2003). Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet*, 37:91–121.
- Paidhungat, M., i Garrett, S. (1997). A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the *cdc1(Ts)* growth defect. *Mol Cell Biol*, 17:6339–6347.
- Palmer, C. P., Zhou, X. L., Lin, J., Loukin, S. H., Kung, C., i Saimi, Y. (2001). A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:7801–7805.
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E., i Lewis, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136:876–890.
- Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W., i Kim, I. H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275:5723–5732.
- Park, S. Y., Seo, S. B., Lee, S. J., Na, J. G., i Kim, Y. J. (2001). Mutation in *PMR1*, a Ca²⁺-ATPase in Golgi, confers salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by inducing expression of *PMR2*, an Na⁺-ATPase in plasma membrane. *J Biol Chem*, 276:28694–28699.
- Patil, C., i Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*, 13:349–355.
- Pattison-Granberg, J., i Persson, B. L. (2000). Regulation of cation-coupled high-affinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 182:5017–5019.
- Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. A., Wright, A. P., i Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274:6366–6373.
- Pedrajas, J. R., Porras, P., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Miranda-Vizuete, A., i Bárcena, J. A. (2002). Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed *in vivo* and localize to different subcellular compartments. *Biochem J*, 364:617–623.

- Persson, B. L., Lagerstedt, J. O., Pratt, J. R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., i Lundh, F. (2003). Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 43:225–244.
- Persson, B. L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A., i Pattison, J. (1999). Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1422:255–272.
- Pick, U., Bental, M., Chitlaru, E., i Weiss, M. (1990). Polyphosphate-hydrolysis--a protective mechanism against alkaline stress? *FEBS Lett*, 274:15–18.
- Pinson, B., Merle, M., Franconi, J. M., i Daignan-Fornier, B. (2004). Low affinity orthophosphate carriers regulate *PHO* gene expression independently of internal orthophosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279:35273–35280.
- Pinton, P., Pozzan, T., i Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 17:5298–5308.
- Pittman, J. K. (2011). Vacuolar Ca^{2+} uptake. *Cell Calcium*, 50:139–146.
- Polizotto, R. S., i Cyert, M. S. (2001). Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J Cell Biol*, 154:951–960.
- Pollard, M. G., Travers, K. J., i Weissman, J. S. (1998). Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*, 1:171–182.
- Porras, P., Padilla, C. A., Krayl, M., Voos, W., i Bárcena, J. A. (2006). One single *in-frame* AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 281:16551–16562.
- Poynton, R. A., i Hampton, M. B. (2013). Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 1840:906–912.
- Pozos, T. C., Sekler, I., i Cyert, M. S. (1996). The product of *HUM1*, a novel yeast gene, is required for vacuolar Ca^{2+}/H^{+} exchange and is related to mammalian Na^{+}/Ca^{2+} exchangers. *Mol Cell Biol*, 16:3730–3741.
- Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S. B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Bennink, J. R., i Yewdell, J. W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, 18:343–354.
- Prole, D. L., i Taylor, C. W. (2012). Identification and analysis of cation channel homologues in human pathogenic fungi. *PLoS One*, 7:e42404.
- 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*. *J Cell Sci*, 119:4554–4564.
- Purdue, P. E., i Lazarow, P. B. (2001). Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:701–752.
- Putney, J. W. (2009). Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev*, 231:10–22.
- Rai, P., Cole, T. D., Wemmer, D. E., i Linn, S. (2001). Localization of Fe^{2+} at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe^{2+} and H_2O_2 . *J Mol Biol*, 312:1089–1101.
- Rao, A., Luo, C., i Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15:707–747.

BIBLIOGRAFIA

- Rao, N. N., Liu, S., i Kornberg, A. (1998). Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J Bacteriol*, 180:2186–2193.
- Rasmussen, C. D., Means, R. L., Lu, K. P., May, G. S., i Means, A. R. (1990). Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 265:13767-13775.
- Reddi, A. R., Jensen, L. T., Naranuntarat, A., Rosenfeld, L., Leung, E., Shah, R., i Culotta, V. C. (2009). The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection. *Free Radic Biol Med*, 46:154-162.
- Reusch, R. N., i Sadoff, H. L. (1988). Putative structure and functions of a poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85:4176–4180.
- Rhee, S. G., Chae, H. Z., i Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*, 38:1543–1552.
- Rietsch, A., i Beckwith, J. (1998). The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu Rev Genet*, 32:163–184.
- Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M., i Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358:325–327.
- Roderick, H. L., i Bootman, M. D. (2005). Redoxing calcium from the ER. *Cell*, 120:4–5.
- Rodríguez, A., Roy, J., Martínez-Martínez, S., López-Maderuelo, M. D., Niño-Moreno, P., Ortí, L., Pantoja-Uceda, D., Pineda-Lucena, A., Cyert, M. S., i Redondo, J. M. (2009). A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Mol Cell*, 33:616–626.
- Rodríguez-Manzanegue, 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*. *Mol Cell Biol*, 19:8180–8190.
- Rodríguez-Manzanegue, 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. *Mol Biol Cell*, 13:1109–1121.
- Ron, D., i Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:519–529.
- Rosenfeld, L., Reddi, A. R., Leung, E., Aranda, K., Jensen, L. T., i Culotta, V. C. (2010). The effect of phosphate accumulation on metal ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Inorg Chem*, 15:1051–1062.
- Roth, J., Zuber, C., Park, S., Jang, I., Lee, Y., Kysela, K. G., Le Fourn, V., Santimaria, R., Guhl, B., i Cho, J. W. (2010). Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol Cells*, 30:497–506.
- Rouhier, N., Lemaire, S. D., i Jacquot, J. P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol*, 59:143–166.
- Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S. K., Hirasawa, M., Gualberto, J. M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D. B., Georgiou, G., Hase, T., Johnson, M. K., i Jacquot, J. P. (2007). Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe–2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:7379–7384.

- Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J. I., i Moir, D. T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a Ca^{2+} ATPase family. *Cell*, 58:133–145.
- Ruiz, A., Serrano, R., i Ariño, J. (2008). Direct regulation of genes involved in glucose utilization by the calcium/calcineurin pathway. *J Biol Chem*, 283:13923–13933.
- Ruoppolo, M., Lundström-Ljung, J., Talamo, F., Pucci, P., i Marino, G. (1997). Effect of glutaredoxin and protein disulfide isomerase on the glutathione-dependent folding of ribonuclease A. *Biochemistry*, 36:12259–12267.
- Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Mühlenhoff, U., Lill, R., i Winge, D. R. (2005). Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem*, 280:10135–10140.
- Rutter, G. A., i Rizzuto, R. (2000). Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca^{2+} release: an intimate connection. *Trends Biochem Sci*, 25:215–221.
- Saier, M. H. Jr. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:354–411.
- Samyn, D. R., Ruiz-Pávon, L., Andersson, M. R., Popova, Y., Thevelein, J. M., i Persson, B. L. (2012). Mutational analysis of putative phosphate- and proton-binding sites in the *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 phosphate: H^+ transceptor and its effect on signalling to the PKA and *PHO* pathways. *Biochem J*, 445:413–422.
- Santo-Domingo, J., i Demaurex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1797:907–912.
- Schekman, R. (1985). Protein localization and membrane traffic in yeast. *Annu Rev Cell Biol*, 1:115–143.
- Schneider, K. R., Smith, R. L., i O’Shea, E. K. (1994). Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science*, 266:122–126.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R., i Ariño, J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol*, 46:1319–1333.
- Sevier, C. S., i Kaiser, C. A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3:836–847.
- Sevier, C. S., i Kaiser, C. A. (2006). Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol Biol Cell*, 17:2256–2266.
- Sevier, C. S., i Kaiser, C. A. (2008). Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1783:549–556.
- Sevier, C. S., Qu, H., Heldman, N., Gross, E., Fass, D., i Kaiser, C. A. (2007). Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell*, 129:333–344.
- Sharma, C. B., Babczinski, P., Lehle, L., i Tanner, W. (1974). The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 46:35–41.
- Shelton, M. D., Chock, P. B., i Mieyal, J. J. (2005). Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxid Redox Signal*, 7:348–366.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, 350:3-41.

BIBLIOGRAFIA

- Shi, Y., Vattem, K. M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., i Wek, R. C. (1998). Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 α -subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*, 18, 7499–7509.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 215:213–219.
- Smith, M. H., Ploegh, H. L., i Weissman, J. S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 334:1086-1090.
- Sørensen, S. O., Van Den Hazel, H. B., Kielland-Brandt, M. C., i Winther, J. R. (1994). pH-dependent processing of yeast procarboxypeptidase Y by proteinase A *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Biochem*, 220:19–27.
- Stadtman, E. R., i Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25:207–218.
- Starovasnik, M. A., Davis, T. N., i Klevit, R. E. (1993). Similarities and differences between yeast and vertebrate calmodulin: an examination of the calcium-binding and structural properties of calmodulin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 32:3261–3270.
- Stathopoulos, A. M., i Cyert, M. S. (1997). Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev*, 11:3432–3444.
- Stathopoulos-Gerontides, A., Guo, J. J., i Cyert, M. S. (1999). Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev*, 13:798–803.
- Stathopoulos, P. B., i Ikura, M. (2013). Structure and function of endoplasmic reticulum STIM calcium sensors. *Curr Top Membr*, 71:59–93.
- Stefan, C. P., i Cunningham, K. W. (2013). Kch1-family proteins mediate essential responses to endoplasmic reticulum stresses in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 288:34861–34870.
- Stefan, C. P., Zhang, N., Sokabe, T., Rivetta, A., Slayman, C. L., Montell, C., i Cunningham, K. W. (2013). Activation of an essential calcium signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by Kch1 and Kch2, putative low-affinity potassium transporters. *Eukaryot Cell*, 12:204–214.
- Stehling, O., i Lill, R. (2013). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3:1–17.
- Stevens, T., Esmon, B., i Schekman, R. (1982). Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell*, 30:439–448.
- Strayle, J., Pozzan, T., i Rudolph, H. K. (1999). Steady-state free Ca^{2+} in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 μM and is mainly controlled by the secretory pathway pump Pmr1. *EMBO J*, 18:4733–4743.
- Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., i Culotta, V. C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. *J Biol Chem*, 276:38084–38089.
- Su, D., Novoselov, S. V., Sun, Q. A., Moustafa, M. E., Zhou, Y., Oko, R., Hatfield, D. L., i Gladyshev, V. N. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. *J Biol Chem*, 280:26491–26498.

- Sun, J., Xu, L., Eu, J. P., Stamler, J. S., i Meissner, G. (2001). Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* 276:15625–15630.
- Tabas, I., i Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, 13:184–190.
- Takeda, T., i Yamamoto, M. (1987). Analysis and *in vivo* disruption of the gene coding for calmodulin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84:3580–3584.
- Takita, Y., Engstrom, L., Ungermann, C., i Cunningham, K. W. (2001). Inhibition of the Ca²⁺-ATPase Pmc1p by the v-SNARE protein Nyv1p. *J Biol Chem*, 276:6200–6206.
- Takita, Y., Ohya, Y., i Anraku, Y. (1995). The *CLS2* gene encodes a protein with multiple membrane-spanning domains that is important Ca²⁺ tolerance in yeast. *Mol Gen Genet*, 246:269–281.
- Tamai, Y., Toh-e, A., i Oshima, Y. (1985). Regulation of inorganic phosphate transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 164:964–968.
- Tamarit, J., Belli, G., Cabisco, E., Herrero, E., i Ros, J. (2003). Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J Biol Chem*, 278:25745–25751.
- Tanida, I., Takita, Y., Hasegawa, A., Ohya, Y., i Anraku, Y. (1996). Yeast Cls2p/Csg2p localized on the endoplasmic reticulum membrane regulates a non-exchangeable intracellular Ca²⁺ pool cooperatively with calcineurin. *FEBS Lett*, 379:38–42.
- Tirasophon, W., Welihinda, A. A., i Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*, 12:1812–1824.
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., Azevedo, D. A., Hohmann, S., i Mager, P. W. H. (2003). Oxidative stress responses. In: *Yeast Stress Responses*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 241–303.
- Ton, V. K., i Rao, R. (2004). Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287:C580–C589.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., i Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101:249–258.
- Tu, B. P., Ho-Schleyer, S. C., Travers, K. J., i Weissman, J. S. (2000). Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, 290:1571–1574.
- Tu, B. P., i Weissman, J. S. (2002). The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*, 10:983–994.
- Tu, B. P., i Weissman, J. S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*, 164:341–346.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552:335–344.
- 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. *Mol Biol Cell*, 24:1830–1841.
- Valls, L. A., Winther, J. R., i Stevens, T. H. (1990). Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four propeptide amino acids. *J Cell Biol*, 111:361–368.

BIBLIOGRAFIA

- Van Berkel, M. A., Rieger, M., Te Heesen, S., Ram, A. F., Van Den Ende, H., Aebi, M., i Klis, F. M. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* *CWH8* gene is required for full levels of dolichol-linked oligosaccharides in the endoplasmic reticulum and for efficient N-glycosylation. *Glycobiology*, 9:243–253.
- Vashist, S., Frank, C. G., Jakob, C. A., i Ng, D. T. (2002). Two distinctly localized P-Type ATPases collaborate to maintain organelle homeostasis required for glycoprotein processing and quality control. *Mol Biol Cell*, 13:3955–3966.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A., i Ariño, J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279:43614–43624.
- Vlamiš-Gardikas, A., i Holmgren, A. (2002). Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzymol*, 347:286–296.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., i Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10:1793–1808.
- Walter, P., i Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334:1081–1086.
- Weiner, M. P., i Costa, G. L. (1994). Rapid PCR site-directed mutagenesis. *PCR Methods Appl*, 4:S131-S136
- Westwater, J., McLaren, N. F., Dormer, U. H., i Jamieson, D. J. (2002). The adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to mercury exposure. *Yeast*, 19:233–239.
- Whitbread, A. K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M., i Board, P. G. (2005). Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol*, 401:78–99.
- Wiesenberger, G., Steinleitner, K., Malli, R., Graier, W. F., Vormann, J., Schweyen, R. J., i Stadler, J. A. (2007). Mg²⁺ deprivation elicits rapid Ca²⁺ uptake and activates Ca²⁺/calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 6:592–599.
- Wilkinson, B., i Gilbert, H. F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*, 1699:35–44.
- Withee, J. L., Mulholland, J., Jeng, R., i Cyert, M. S. (1997). An essential role of the yeast pheromone-induced Ca²⁺ signal is to activate calcineurin. *Mol Biol Cell*, 8:263–277.
- 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-κB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J Biol Chem*, 275:1902-1909.
- Wittke, S., Dünwald, M., Albertsen, M., i Johnsson, N. (2002). Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 13:2223–2232.
- Wood, Z. A., Schröder, E., i Robin Harris, J., i Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 28:32–40.
- Wurst, H., Shiba, T., i Kornberg, A. (1995). The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 177:898-906.
- Wykoff, D. D., i O'Shea, E. K. (2001). Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 159:1491–1499.

- Xia, R., Stangler, T., i Abramson, J. J. (2000). Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *J Biol Chem*, 275:36556–36561.
- Xiao, R., Wilkinson, B., Solovyov, A., Winther, J. R., Holmgren, A., Lundström-Ljung, J., i Gilbert, H. F. (2004). The contributions of protein disulfide isomerase and its homologues to oxidative protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279:49780–49786.
- Yamada, A., Yamamoto, T., Yoshimura, Y., Gouda, S., Kawashima, S., Yamazaki, N., Yamashita, K., Kataoka, M., Nagata, T., Terada, H., Pfeiffer, D. R., i Shinohara, Y. (2009). Ca²⁺-induced permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions. *Biochim Biophys Acta*, 1787:1486–1491.
- Yang, Y., Jao, S. C., Nanduri, S., Starke, D. W., Mieyal, J. J., i Qin, J. (1998). Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. *Biochemistry*, 37:17145–17156.
- Yap, K. L., Ames, J. B., Swindells, M. B., i Ikura, M. (1999). Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins*, 37:499–507.
- Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A. P., Li, H. X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P. O., i Cyert, M. S. (2002). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 277:31079–31088.
- Yoshitake, S., Nanri, H., Fernando, M. R., i Minakami, S. (1994). Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *J Biochem*, 116:42–46.
- Yu, J., Zhang, N. N., Yin, P. D., Cui, P. X., i Zhou, C. Z. (2008). Glutathionylation-triggered conformational changes of glutaredoxin Grx1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins*, 72:1077-1083.
- Yu, Q., Wang, H., Xu, N., Cheng, X., Wang, Y., Zhang, B., Xing, L., i Li, M. (2012). Spf1 strongly influences calcium homeostasis, hyphal development, biofilm formation and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology*, 158:2272-2282.
- Zarayskiy, V., Monje, F., Peter, K., Csutora, P., Khodorov, B., i Bolotina, V. (2007). Store-operated Orai1 and IP₃ receptor-operated TRPC1 channel. *Channels*, 1:246–252.
- Zhang, Y. Z., Naleway, J. J., Larison, K. D., Huang, Z. J., i Haugland, R. P. (1991). Detecting *lacZ* gene expression in living cells with new lipophilic, fluorogenic β-galactosidase substrates. *FASEB J*, 5:3108–3113.
- Zhao, X. J., Raitt, D., V Burke, P., Clewell, A. S., Kwast, K. E., i Poyton, R. O. (1996). Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271:25131–25138.
- Zima, A. V., i Blatter, L. A. (2006). Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res*, 71:310–321.
- Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M., i Helms, V. (2011). Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1808:912–924.
- Zvyagil'skaya, R. A., Lundh, F., Samyn, D., Pattison-Granberg, J., Mouillon, J. M., Popova, Y., Thevelein, J. M., i Persson, B. L. (2008). Characterization of the Pho89 phosphate transporter by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 8:685–696.

VIII. ANNEX

Altered intracellular calcium homeostasis and endoplasmic reticulum redox state in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Grx6 glutaredoxin

Judit Puigpinós, Celia Casas and Enrique Herrero*

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Edifici Biomedicina I, Rovira Roure 80, 25198-Lleida, Spain

Running title: Calcium homeostasis and ER redox state in yeast Grx6-minus cells

*Corresponding author (enric.herrero@cmb.udl.cat)

Summary

Glutaredoxin 6 (Grx6) of *Saccharomyces cerevisiae* is an integral thiol oxidoreductase protein of the endoplasmic reticulum (ER)/Golgi membranes. Its absence alters the redox equilibrium of the ER lumen towards a more oxidized state that can compensate the defects in protein folding/secretion and cell growth caused by depleted levels of the ER oxidase Ero1. In addition, null mutants in *GRX6* display a more intense unfolded protein response (UPR) compared to wild type cells upon treatment with UPR inducers. These observations support a role of Grx6 in regulating the glutathionylation of thiols of ER/Golgi target proteins, and consequently the equilibrium between reduced and oxidized glutathione in the vesicles lumen. Among the functions influenced by Grx6 activity is the homeostasis of intracellular calcium. In the absence of Grx6, accumulation of calcium occurs at the cytosol from an extracellular source of the cation, consequently causing activation of the calcineurin-dependent pathway. Inhibition of this responses has negative effects on the Grx6-minus cells, which otherwise are moderately resistant to chelators of extracellular calcium. Some but not all the phenotypes of the mutant are coincident with those of mutants lacking other intracellular calcium transporters such as the Golgi Pmr1 protein. Overall, the results presented in this study provide evidence for redox regulation of calcium homeostasis in yeast cells.

Introduction

Ion homeostasis is essential for the physiology of cells. While cations such as K^+ , Na^+ or Ca^{2+} are required for a large diversity of cellular processes, their excess may be toxic and lead to stress conditions that induce protective responses by the cell. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been employed as a model to study the plasma membrane and intracellular transport mechanisms contributing to maintain cation homeostasis, as well as the responses to restore such homeostasis when this is disturbed (Ariño *et al.*, 2010; Cunningham, 2011; Cyert and Philpott, 2013).

Cytosolic Ca^{2+} concentration is important in signalling and regulation of many essential responses in practically all cell types (Clapham, 2007). To make this signalling possible, cells maintain cytosolic calcium at low levels and have different transporters that regulate the concentration of this cation in the different intracellular compartments and make possible the oscillations required for cell signalling. In yeast cells, the vacuole is the major Ca^{2+} store. Entry or exit of the cation from this organelle is mediated by transporters located in its membrane [reviewed by Cunningham (2011)]. Pmc1 is a vacuolar Ca^{2+} pump related to the PMCA-family of plasma membrane Ca^{2+} ATPases from mammals and plants, and is the main contributor to vacuolar Ca^{2+} levels. These also become determined by the activities of the Ca^{2+}/H^+ exchanger Vcx1 and the Ca^{2+} channel Yvc1, which respectively import or release Ca^{2+} into or from the vacuole. As in mammalian cells, in yeast cells Ca^{2+} is required at the endoplasmic reticulum (ER) for the correct function of the protein folding and secretory machinery (Bonilla *et al.*, 2002). Adequate Ca^{2+} levels at the ER/early Golgi organelles mainly result from the activity of Pmr1, a P-type Ca^{2+}/Mn^{2+} pump of the SPCA family that imports those cations into the organelle lumen (Dürr *et al.*, 1998). Spf1/Cod1 is another P-type ATPase that acts synergistically with Pmr1 in transporting Ca^{2+} into the ER lumen (Cronin *et al.*, 2002), and also influences entrance of Mn^{2+} inside ER vesicles (Cohen *et al.*, 2013). Recently, Gdt1/Grc1 has been characterized as a Golgi-localized transmembrane member of the cation/ Ca^{2+} exchanger superfamily that would contribute together with Pmr1 for Ca^{2+} supply to the Golgi apparatus in yeast (Demaegd *et al.* 2013). On the other hand, it has been proposed that Csg2 acts as a channel that releases Ca^{2+} from ER to cytosol to keep with luminal ER homeostasis (Beeler *et al.*, 1994; Tanida *et al.*, 1996). At the *S. cerevisiae* plasma membrane two mechanisms operate for Ca^{2+} influx, the low-affinity system (that only acts in Ca^{2+} -rich conditions) and the high-affinity system (HACS, acting in both Ca^{2+} -rich and -poor conditions). HACS is composed of three interacting proteins (Cch1, Mid1 and Ecm7) with homology to the voltage-gated Ca^{2+} channels in animals (Cunningham, 2011).

The above Ca^{2+} transport systems are interrelated. Thus, the absence of *Pmr1* upregulates HACS, and the consequent entry of Ca^{2+} to the cytosol induces the calcineurin-dependent pathway (Locke *et al.*, 2000; Bonilla and Cunningham, 2003). In yeast, this pathway responds to alterations in intracellular Ca^{2+} homeostasis and also to high environmental concentrations of cations such as Ca^{2+} or Na^+ and to sexual pheromones (Cyert, 2001; Yoshimoto *et al.*, 2002). Central in this pathway is the calmodulin/ Ca^{2+} complex, which activates the Ser/Thr phosphatase calcineurin that in turn dephosphorylates the Crz1 transcription factor causing its import to the nucleus. Crz1 targets promoter elements with the CDRE motif. In this way, calcium and sodium stresses share common Crz1-dependent gene targets (Yoshimoto *et al.*, 2002). *PMC1* is one of the genes upregulated upon alteration of Ca^{2+} homeostasis (Yoshimoto *et al.*, 2002). Thus, a $\Delta pmr1$ mutant accumulates large amount of Ca^{2+} at the vacuole (Halachmi and Eilam, 1996) as a compensatory mechanism, and a double $\Delta pmr1\Delta pmc1$ mutant is non-viable (Cunningham and Fink, 1996). One of the two genes responsible for the high-affinity phosphate transport system at the plasma membrane (*PHO89*) is also upregulated by high-calcium stress in a Crz1-dependent manner (Yoshimoto *et al.*, 2002), which may reflect a relationship between Ca^{2+} and phosphate influx consistent with the fact that most of vacuolar Ca^{2+} is complexed with inorganic polyphosphate (Dunn *et al.*, 1994).

The unfolded protein response (UPR) is induced in situations causing ER stress that lead to incorrect protein folding or to protein traffic overloading at the lumen of this compartment (Walter and Ron, 2011). The response involves the induction of ER/Golgi-associated chaperones and the ERAD machinery for degradation of missfolded proteins. The UPR mediators are evolutionary conserved, and in yeast cells they include the signalling protein kinase Ire1 and the effector transcription factor Hac1. Among the genes induced by the UPR in *S. cerevisiae* (Travers *et al.*, 2000) are *PDI1* (for protein disulphide isomerase) and *ERO1* (for ER oxidase). These two proteins are necessary for oxidative protein folding in the ER. Partial loss-of-function *ero1* mutants are hypersensitive to the reducing agent dithiothreitol (DTT) while the thiol oxidant diamide rescues partially the mutated phenotype (Frand and Kaiser, 1998; Pollard *et al.*, 1998). Ca^{2+} deprivation at the ER also activates the UPR in *S. cerevisiae* (Bonilla *et al.*, 2002), supporting the important role of Ca^{2+} for correct function of the protein secretory machinery. On the other hand, tunicamycin (an inhibitor of protein N-glycosylation that interferes with protein folding and consequently induces the UPR) provokes Ca^{2+} influx through a mechanism that is Ire1- and Hac1-independent, a phenomenon extensible to other conditions causing ER stress (Bonilla *et al.*, 2002). This together with the fact that the calcineurin-dependent pathway is required for long-

term survival to tunicamycin treatment indicates that the calcineurin pathway and the UPR operate in parallel for cell protection against ER stress.

Glutaredoxins (GRXs) are glutathione-dependent thiol oxidoreductases that regulate cellular redox processes involving protein sulfhydryl groups (Lillig *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2010). *S. cerevisiae* contains two glutaredoxins, Grx6 and Grx7, which are integral components of ER/Golgi membranes (Izquierdo *et al.*, 2008; Mesecke *et al.*, 2008b). They share extensive sequence homology between them and with the dithiol GRXs. However, Grx6 and Grx7 contain a single Cys residue at the active site. Considering the 1-Cys mechanism of action of GRXs (Lillig *et al.*, 2008), this supports the idea that Grx6/Grx7 have a deglutathionylation function on uncharacterized targets at ER/Golgi organelles. In spite of their sequence similarities and the fact that both of them become upregulated upon ER stress by tunicamycin (Izquierdo *et al.*, 2008), Grx6 and Grx7 have certain specificities. Thus, Grx6 is enriched at the ER, while Grx7 localizes preferentially at Golgi (Izquierdo *et al.*, 2008). Also, expression of the *GRX6* gene is induced by high-calcium and sodium stresses and by oxidative stress in a Crz1-dependent manner, in contrast to *GRX7* expression (Izquierdo *et al.*, 2008). Finally, Grx6, but not Grx7, contains an iron-sulfur cluster ligand that may be important for its enzymatic activity (Mesecke *et al.*, 2008a). These differences point to specialized roles of both GRXs at the membranes of the compartments of the secretory pathway. In the present work, we show that the absence of Grx6 affects redox homeostasis at the ER luminal space and also that Ca^{2+} homeostasis in these cells is altered. Overall, our study reveals the importance of GRXs to carry out redox functions at the lumen of early secretory membrane vesicles in fungal cells.

Materials and Methods

Strains and plasmids. Strains employed in this study derive from *S. cerevisiae* wild type W303 and are listed in Supplementary Table S1.

Plasmids pAMS366 and pAMS364 drive expression of the *lacZ* reporter gene respectively from four wild type copies in tandem of CDRE or from mutated CDRE forms unable to bind Crz1 (Stathopoulos and Cyert, 1997). Plasmid pMM1071 derives from pMM822 (Izquierdo *et al.*, 2008) by mutagenizing the active site Cys codon of the *GRX6* ORF into a Ser codon using the ExSite method (Weiner and Costa, 1995), followed by subcloning a *Bam*HI-*Pst*I fragment containing the mutagenized *GRX6* ORF plus promoter and downstream regions into the polylinker of the *LEU2* vector YIplac128 (Gietz and Sugino, 1988). Mutation was confirmed by DNA sequencing. In

parallel, pMM1073 was obtained by direct subcloning of the *Bam*HI-*Pst*II fragment of pMM822 containing wild type *GRX6* plus adjacent sequences into YIplac128. Plasmids were integrated at the *LEU2* locus of the transformed strain after linearization by *EcoRV* digestion.

Growth media and culture conditions. YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or synthetic SC medium (Sherman, 2002) were usually employed for *S. cerevisiae* cell growth at a temperature of 30°C unless otherwise indicated. Media were solidified with 2% agar. Plate assays of growth sensitivity were done by spotting serial 1:10 dilutions of exponential cultures onto medium plates containing the corresponding agent and recording growth after 2 or 3 days of incubation at 30°C. For sensitivity to CaCl₂ stress, a modified synthetic SD medium was employed (Demaegd *et al.* 2013).

Growth in liquid medium of several strains under parallel separate treatments (in 0.5 ml cultures initially inoculated with 2x10⁵ cells) was automatically recorded (optical density at 600 nm) at one-hour intervals, using shaken microtiter plates sealed with oxygen-permeable plastic sheets, in a PowerWave XS (Biotek) apparatus at controlled temperature. Treatments were applied to cells that had been growing previously during at least ten generations in exponential conditions. The ratio of the automatically recorded optical density values between treated and untreated cultures after different time periods for the tested strains was made relative to the ratio in the wild type strain (unit value).

Genetic methods. Standard protocols were used for DNA manipulations and transformation of yeast cells. Single null mutants were generated in the present study using the short-flanking homology approach after PCR amplification of the *natMX4* or *kanMX4* cassettes and selection for resistance to nourseothricin (Goldstein and McCusker, 1999) or geneticin (Wach *et al.*, 1994) respectively. Disruptions were confirmed by PCR analysis. The endogenous *ERO1* promoter was substituted by the *tetO₂* promoter using the *kanX4*-based cassette from plasmid pCM224 as described by Bellí *et al.* (1998a). Multiple mutants were obtained by crossing the parental mutant strains, followed by diploid sporulation, tetrad analysis, and selection of the mutant combinations.

Microarray analyses. RNA purification, microarray characteristics and other experimental steps, as well as data analyses, have been described previously (Ferrezuelo *et al.*, 2009).

Isolation of vacuolar fraction. Isolation of vacuoles was based on the method described by Li *et al.* (2001) with modifications. About 10^{10} cells from an exponentially growing culture were centrifuged, resuspended in 30 ml of 0.1 M Tris- H_2SO_4 buffer pH 9.3 with 10 mM dithiothreitol and incubated at 30°C for 30 min. After two washings with 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 with 1.2 M sorbitol, cells were resuspended in 4 ml of this buffer containing Zymolyase 20T (3 mg per g of cells). Spheroplast formation was followed microscopically and once formed, spheroplasts were recovered by low speed centrifugation (1,800 g, 5 min), and resuspended in 3.5 ml of a solution of 15% Ficoll in 10 mM PIPES-KOH pH 6.8 plus 0.2 M sorbitol. After addition of DEAE-dextran (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, final concentration), the spheroplast lysate was kept for 2 min at 0°C and then for 5 min at 30°C with mild shaking. Magnesium chloride was added at a final concentration of 1.5 mM, the lysate was transferred to a centrifuge tube and then overlaid with 3 ml of the above PIPES/sorbitol buffer with 8% Ficoll, 4 ml of buffer with 4% Ficoll and 1 ml of buffer alone. Samples were centrifuged at 110,000 g for 90 min with a Beckman SW55Ti rotor. Fractions of 0.4 ml were taken, an aliquote of each was separated for acetone precipitation of proteins followed by western analysis of compartment reporters [carboxypeptidase Y (CPY) for vacuole, porin for mitochondria and hexokinase 1 for cytosol], and the remaining of each fraction was kept for determination of ion concentration. Vacuolar fraction was collected at the 0%/4% Ficoll interphase.

Determination of intracellular ion levels. Cytosolic Ca^{2+} concentration was determined using the pentapotassium salt of indo-1 as described in Halachmi and Eilam (1989), after determining the fluorescence ratio at 410/480 nm according to Grynkiewicz *et al.* (1985). In this method, indo-1 is loaded in the cytosolic compartment by incubating the yeast cells at an acidic pH. In order to determine intracellular total Ca^{2+} levels (including membranous vesicles stores), cellular membranes were permeabilized with DEAE-dextran (2 mg/ml) as described in Halachmi and Eilam (1989).

Orthophosphate was measured by molybdate reactivity (Reddi *et al.*, 2009). For determination of total intracellular phosphate, samples were treated with 1 N sulphuric acid for 10 min at 100°C prior to analysis. Polyphosphate levels were calculated as the difference between total inorganic phosphate and orthophosphate levels.

Northern blot analyses. RNA isolation and electrophoresis, probe labelling with digoxigenin, hybridization, and signal detection were done as described previously (Bellí *et al.*, 1998a). Gene probes were generated by PCR from genomic DNA, using

oligonucleotides designed to amplify internal open reading frame sequences. *SNR19* mRNA was employed as loading control. Signals were quantified using the ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) software. Background values were determined for a region lacking visible signal, of the same size as the measured band and adjacent to it, and such background was subtracted for the respective band signal value.

Pulse-chase labelling and immunoprecipitation of CPY. Samples (about 6×10^8 cells) from cultures in SC medium were resuspended in 10 ml of the same medium lacking methionine and cysteine, and incubated for 30 min at the appropriate temperature before adding 500 μ Ci of a [35 S]methionine/[35 S]cysteine cocktail (Perkin-Elmer). After a 5 or 6 min pulse, cold methionine and cysteine were added at 2 mM final concentration each. At successive 7 min intervals samples of 1.5 ml were taken and 20 mM (final concentration) sodium azide was added. Cells were pelleted, resuspended in 100 μ l of lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% SDS, 6 M urea, and 1x protease inhibitor complete (Roche)] and lysed with glass beads by shaking and treatment at 100°C. The supernatant was carefully taken and IP buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Tween-20, and 1x protease inhibitor complete (Roche)] was added to 1 ml final volume. The suspension was mixed with 50 μ l of Sheep anti-Mouse Ig Dynabeads (Invitrogen) coupled to 3 μ g of mouse monoclonal anti-CPY antibodies. After mixing for 2 hours at 4°C, the supernatant was eliminated, the beads were washed three times with 350 μ l of IP buffer and then eluted with 20 μ l of 1x Laemmli buffer, boiled and separated by SDS-PAGE. Gels were autoradiographed, and X-ray film signals were quantified with the ImageJ software.

Measurement of ER redox state. Real-time ER redox measurements were done as described in Merksamer *et al.* (2008), in cultures of transformants with plasmid pPM28, which expresses a redox-sensitive eroGFP form.

Western blot analyses. Western blot analyses were done as described in Bellí *et al.* (1998b). The following primary antibodies were employed: mouse monoclonal anti-CPY (1:500; Molecular Probes), rabbit polyclonal anti-Hxk1 (1:5,000; USBiological), or mouse monoclonal anti-porin (1:1,000; Molecular Probes).

Determination of β -galactosidase activity. Enzyme activity (Miller units) was determined in permeabilized cells as described in Ausubel *et al.* (1987).

Results

The calcineurin pathway is constitutively induced in $\Delta grx6$ cells

In order to advance in the functional characterization of Grx6/Grx7 we made a transcriptomic analysis of a double $\Delta grx6\Delta grx7$ mutant. In our study, 26 genes were constitutively induced at least two-fold in the mutant compared to wild type cells, while 11 became repressed (Supplementary Table S2). Among the upregulated genes those involved in phosphate metabolism (*PHO89*, *PHO5*, *PHM6*, *PHO11*, *PHO3*, *PHO12*) or in protein secretion and compartmentalisation (*ATG15*, *ARE1*, *CPR4*, *PER1*) were predominant. We confirmed the transcriptomic results by Northern analysis of some selected genes, using in addition the single $\Delta grx6$ and $\Delta grx7$ mutants (Figure 1). Our results indicate that upregulation of two genes involved in phosphate homeostasis (*PHO89* and *PHM6*) is due to the $\Delta grx6$ mutation, while upregulation of the other six genes tested depends on the $\Delta grx7$ mutation. *PHO89* and *PHO84* code for the two high-affinity phosphate transporters in yeast (Persson *et al.*, 2003; Mouillon and Persson, 2006). Therefore, we also tested whether *PHO84* expression was also affected in the absence of Grx6 and/or Grx7. However, this was not the case (Figure 1).

Expression of *PHO89*, but not that of *PHO84*, is induced by calcium stress in a Crz1-dependent manner (Ruiz *et al.*, 2008; Yoshimoto *et al.* 2002). Other two genes induced in the $\Delta grx6\Delta grx7$ mutant (*THR4* and *CPR4*) contain CDRE consensus motifs in their promoters. These observations point to alterations in the homeostasis of some ions in the absence of Grx6 and/or Grx7. In consequence, we determined whether expression from a Crz1-dependent promoter was constitutively upregulated in the absence of the two GRXs, by using the pAMS366 (wild type CDRE promoter) and pAMS364 (mutated CDRE promoter) *lacZ* reporter plasmids. In the absence of Grx6, albeit not of Grx7, the CDRE-containing promoter was upregulated and this was dependent on the ability to bind the Crz1 factor (Figure 2A). High Ca^{2+} stress was able to induce expression from the intact CDRE promoter in wild type and $\Delta grx7$ mutant cells but did not cause significant additional induction over high basal constitutive levels in the $\Delta grx6$ mutant (Figure 2A). By Northern analysis we confirmed that *CMK2* and *GYP7*, two genes that are upregulated upon Ca^{2+} stress in a Crz1-dependent manner (Yoshimoto *et al.* 2002), are also constitutively induced in $\Delta grx6$ cells and that this induction is abrogated by the $\Delta crz1$ mutation (Figure 2B).

To confirm that the constitutive induction of the calcineurin pathway in $\Delta grx6$ cells is of biological significance, we determined the sensitivity of wild type and mutant cells to the calcineurin inhibitor FK506. The $\Delta grx6$ and $\Delta grx6\Delta grx7$ mutants displayed defective growth in cultures treated with FK506 compared to wild type and $\Delta grx7$ cells (Figure 2C). Although the differences were moderate, they were statistically significant. To confirm that the growth defects were due to the absence of the enzymatic activity of Grx6 and not to indirect effects caused by the absence of the protein in the null mutant, we measured growth in FK506-treated cells that expressed a Grx6 active site mutant with a Cys136 to Ser substitution instead of the wild type form of the protein. Compared to cells expressing wild type Grx6, cells expressing the mutated form of Grx6 had the same growth defects as the mutant lacking any form of Grx6 (Figure 2D). Therefore, enzymatically active Grx6 is required for protecting yeast cells in conditions where the calcineurin pathway is inhibited.

Yeast cells lacking Grx6 have elevated intracellular levels of Ca²⁺

Altogether, the above observations suggest that the absence of Grx6 cause constitutive calcium stress in the cell and subsequent induction of the calcineurin-dependent pathway, possibly by intracellular accumulation of Ca²⁺. Therefore, we measured cytosolic Ca²⁺ concentration using indo-1 as fluorescent reporter. Ca²⁺ levels were about twice in the $\Delta grx6$ mutant compared to wild type cells, while the $\Delta grx7$ mutant did not show abnormal accumulation (Figure 3A). The double $\Delta grx6\Delta grx7$ mutant behaves as the $\Delta grx6$ mutant, confirming that the absence of Grx7 does not influence intracellular calcium homeostasis. Accumulation of calcium in Grx6-minus cells was comparable to the accumulation in $\Delta pmr1$ cells lacking the ER/Golgi SPCA-type pump, and the absence of both Pmr1 and Grx6 has an additive effect in alteration of cytosolic calcium homeostasis (Figure 3A). As reported in earlier studies, in the absence of the P-type pump Spf1 alone no alteration of Ca²⁺ levels occurs (Cronin *et al.*, 2002), and elimination of Spf1 in a $\Delta grx6$ mutant did not cause additive effects. Similarly, elimination of the Ca²⁺ exchanger Gdt1 in $\Delta grx6$ cells had not any additional effect on Ca²⁺ accumulation (Figure 3A). In summary, the absence of Grx6 causes accumulation of Ca²⁺ at the cytosol similarly (but independently of) to the absence of the Pmr1 pump. In order to confirm that the redoxin activity of Grx6 is responsible for the above phenotype related to Ca²⁺ homeostasis, we determined Ca²⁺ levels in cells that expressed the Grx6 C136S active site mutant instead of the Grx6 wild type form. This mutant accumulated Ca²⁺ at similar levels as the $\Delta grx6$ null mutant (Figure 3B), confirming that full activity of Grx6 is required for the homeostasis of this ion.

In order to discriminate between the cytosolic Ca^{2+} pool and that localized in other organelles, we also made determinations after disrupting membranes with DEAE-dextran, which therefore would correspond to total intracellular Ca^{2+} (see Materials and Methods). The DEAE-dextran treatment increased the differences in Ca^{2+} levels between the Δpmr1 mutant and wild type cells (Figure 3C), compared with the results with non-permeabilized samples (Figure 3A). This observation is in accordance with the reported Ca^{2+} hyperaccumulation in the vacuoles of Δpmr1 cells (Halachmi and Eilam, 1996). On the contrary, membrane permeabilization did not further increase the differences between the Δgrx6 mutant and wild type cells (Figure 3C), denoting that Ca^{2+} accumulation in this mutant occurs mainly at the cytosol. As expected, the double $\Delta\text{grx6}\Delta\text{pmr1}$ mutant displayed additive accumulation of total intracellular Ca^{2+} . In summary, our results indicate that intracellular Ca^{2+} pools are differentially affected in the absence of Grx6 or Pmr1.

PMC1 expression is also a marker of Ca^{2+} accumulation, and this upregulation contributes to increase vacuolar Ca^{2+} stores (Cunningham, 2011). In accordance with the above results on Ca^{2+} levels in the mutants, Δgrx6 and Δpmr1 cells expressed higher *PMC1* mRNA levels than wild type cells, and this increase was additive in the double mutant (Figure 3D).

Next, we determined the origin of the excess of Ca^{2+} in Δgrx6 cells. With this objective, we obtained mutants that in addition to Grx6 lacked Cch1 (subunit of the plasma membrane HACS machinery for Ca^{2+} influx), Yvc1 (vacuolar membrane channel for Ca^{2+} release to the cytosol) or Csg2 (ER membrane Ca^{2+} channel). Only the Δcch1 mutation suppressed the accumulation of Ca^{2+} in Δgrx6 cells (Figure 3E), indicating that the excess of this cation results from influx of external sources through HACS, rather than from net mobilization through these transporters from the internal organelle stores.

Absence of Grx6 causes altered sensitivity to depletion or excess of Ca^{2+}

Other *S. cerevisiae* mutants defective in regulation of intracellular calcium homeostasis display alterations in the sensitivity to Ca^{2+} chelators [reviewed in Cunningham (2011)]. Consequently, we tested the sensitivity of Δgrx6 cells to EGTA, which chelates extracellular Ca^{2+} ions. In solid medium, the mutant was moderately more resistant to EGTA than wild type cells (Figure 4A). We also quantified the effect of the chelator by automatically measuring growth in liquid medium (Figure 4B). The results confirmed that the Δgrx6 and the $\Delta\text{grx6}\Delta\text{grx7}$ mutants grow better than wild type cells in EGTA-treated cultures. This is in contrast to Δgrx7 cells, which do not display

statistically significant differences with wild type cells. The moderate resistance of the mutant is abrogated by introduction of a $\Delta cch1$ mutation. These results suggest that previous hyperaccumulation of intracellular calcium from extracellular sources protects the mutant cells against the calcium starvation effects caused by EGTA. The Grx6 C136S mutant has the same sensitivity phenotype to EGTA as the null $\Delta grx6$ mutant (Figure 4C), again confirming that these effects are caused by the lack of thiol oxidoreductase activity in the mutated Grx6 molecule.

While EGTA chelates extracellular calcium, BAPTA-AM is membrane-permeable and is therefore able to chelate intracellular Ca^{2+} stores in yeast cells (Li *et al.*, 2011). Contrary to EGTA, the $\Delta grx6$ mutant was moderately (although significantly) more sensitive to BAPTA-AM than wild type cells (Figure 4D). The ER membrane Ca^{2+} transporter mutants $\Delta pmr1$ and $\Delta spf1$ also displayed increased sensitivity to BAPTA-AM, and this was specially manifested in the double $\Delta pmr1\Delta spf1$ mutant, consistent with the overlapping role of both transporters in regulating Ca^{2+} content in the ER lumen (Cronin *et al.*, 2002). However, knocking out *GRX6* in cells lacking Pmr1 and Spf1 rescued the hypersensitivity to BAPTA-AM (Figure 4D), confirming that Grx6 may have independent functions with Pmr1 and Spf1 in regulating calcium homeostasis in intracellular membranous compartments.

Other yeast mutants in intracellular Ca^{2+} compartmentalization, in addition to being hypersensitive to chelators of the cation also display high sensitivity to calcium excess. In accordance with the observed alterations in Ca^{2+} accumulation, the $\Delta grx6$ mutation provoked moderate hypersensitivity to extracellular high Ca^{2+} concentration, in contrast to the $\Delta grx7$ mutation (Figure 4E).

The $\Delta grx6$ mutant also overaccumulates intracellular phosphate

Given the existing relationship between calcium and phosphate homeostasis in yeast cells, we measured intracellular orthophosphate levels in the $\Delta grx6$ and $\Delta grx7$ mutants. The $\Delta grx6$ cells accumulated twice more intracellular orthophosphate than wild type cells, in contrast to $\Delta grx7$ mutant cells, which did not hyperaccumulate orthophosphate (Figure 5A). The abnormal accumulation of orthophosphate in $\Delta grx6$ cells is totally rescued by deletion of the *PHO89* gene, while introduction of the $\Delta grx6$ mutation in cells lacking the other high-affinity phosphate transporter Pho84 still causes higher orthophosphate levels compared to those in the single $\Delta pho84$ mutant (Figure 5A), pointing to Pho89 as the main responsible for the accumulation of orthophosphate in the absence of Grx6. We next determined where phosphate became accumulated in the $\Delta grx6$ cells. Vacuoles were isolated from cytosolic and other membranous

compartments by centrifugation in a Ficoll gradient, and a vacuolar fraction was isolated which was not detectably contaminated by cytosolic or mitochondrial proteins (Figure 5B). A fraction enriched in cytosolic proteins but which was contaminated by vacuolar proteins was considered as cytosolic fraction. Orthophosphate and polyphosphate levels were measured separately in both fractions, and the results showed that both forms of phosphate became accumulated in the cytosolic fraction of the *Δgrx6* cells compared to the wild type, while the vacuolar fraction of the mutant cells exhibited reduced levels of both orthophosphate and polyphosphate (Figure 5C). Therefore, compartmentalization of phosphate is altered in the absence of Grx6 with the result of a significant accumulation at the cytosol.

The absence of Grx6 counteracts defects in the ER protein folding machinery

The UPR is not constitutively induced in the *Δgrx6* mutant (Izquierdo *et al.*, 2008). However, we hypothesized that the lack of Grx6 could exacerbate the UPR in the presence of agents which by themselves interfere with the protein folding machinery. To analyze it we employed *ERO1* and *PDI1* expression as reporter of activation of the UPR (Yoshimoto *et al.*, 2002). As expected, the protein reductant DTT activated the UPR in wild type cells in a transient way, but this activation was more intense in *Δgrx6* cells (Figure 6A). This is in contrast with *Δgrx7* cells, which displayed even a milder response than wild type cells. Increased induction of the UPR upon interference with the protein folding machinery in the absence of Grx6 could point to a relationship of the latter with other components of the protein folding machinery.

The UPR target Ero1 is an essential ER oxidase required for appropriate protein folding (Frand and Kaiser, 1998; Pollard *et al.*, 1998). To determine the possible genetic interactions between *ERO1* and *GRX6*, we constructed a mutant in which the endogenous *ERO1* promoter was substituted by the doxycycline-regulatable *tetO₂* promoter (Bellí *et al.*, 1998a), and the *Δgrx6* mutation was introduced in that strain. As expected, the wild type strain for *GRX6* that expressed *ERO1* under the *tetO₂* promoter did not grow when this promoter was switched-off by doxycycline. However, introduction of the *Δgrx6* mutation rescued partially although significantly the lethality due to the depletion of *ERO1* expression (Figure 6B). As occurs with the conditional *ero1-1* mutation (Frand and Kaiser, 1998), the thiol oxidant diamide abolished the growth defects caused by downregulation of *ERO1* expression in the conditional *tetO₂-ERO1* strain. These results therefore support that the absence of Grx6 creates oxidant conditions at the ER that compensate for the depletion of the Ero1 oxidase, and therefore implicate that GRX in the protein folding machinery.

We have shown (Izquierdo *et al.*, 2008) that the lack of Grx6 and/or Grx7 in an otherwise genetic background does not affect the pool of mature CPY, a vacuolar protein that is processed during secretion along ER/Golgi compartments and is employed as a reporter for the functionality of the secretory machinery. In accordance with those results, in pulse and chase experiments conversion of the precursor to the mature form of CPY followed the same kinetics in $\Delta grx6$ and $\Delta grx7$ cells as in the wild type cells (Figure 7A). Given the above shown interaction of Grx6 with Ero1 and the UPR, we analysed CPY maturation kinetics in the $\Delta grx6$ mutant under doxycycline-regulated conditional expression of *ERO1*. As expected from other works (Frandsen and Kaiser, 1998; Pollard *et al.*, 1998), a significant delay in CPY maturation was observed when Ero1 function was compromised compared to the control conditions without doxycycline (Figure 7B). This was especially evident just after the pulse period (0 min), in which almost all newly synthesized CPY remained in the precursor form when Ero1 levels were depleted. However, introduction of the $\Delta grx6$ mutation rescued the defects in CPY processing in these same Ero1-deficient conditions, as it happens after diamide addition (Figure 7B). These results paralleled those on cell growth (Figure 6B) and supported the notion that the oxidant conditions created in the absence of Grx6 partially restore the previously compromised functionality of the machinery for protein folding and secretion. To confirm it, we made real-time measurements of the redox state of the ER lumen in the above strains and conditions, using a redox-sensitive ero-GFP form oriented to the ER lumen (Merksamer *et al.*, 2008). Constitutive oxidizing conditions at the ER lumen and the subsequent reductive response upon DTT application were similar in *GRX6* and $\Delta grx6$ cells expressing Ero1, with a slow recovery to basal conditions after application of the reductive stress (Figure 7C). In contrast, Ero1-deficient conditions constitutively created a moderate hyperoxidized state at ER that was much exacerbated in cells lacking Grx6. Besides, these latter cells rapidly returned to the hyperoxidized conditions upon DTT treatment (Figure 7C). We can conclude that the absence of Grx6 causes overoxidation of the pool of cysteine sulfhydryls at the ER lumen, as becomes clearly manifested in Ero1-deficient cells.

Phenotypic alterations in Ca^{2+} homeostasis and in protein secretion in Grx6-minus cells can be rescued independently

The Ca^{2+} homeostasis defects in $\Delta grx6$ cells could be due to alterations in the protein secretion machinery. However, these alterations were not observed (at least for CPY) in the $\Delta grx6$ background when physiological levels of Ero1 are expressed (Figure 7A) and Ca^{2+} levels double those of wild type cells. However, we wanted to confirm

such lack of causal dependence in Ero1-deficient cells treated with diamide, which display wild type-like CPY processing. In these conditions, the $\Delta grx6$ mutation still provoked increased accumulation of intracellular Ca^{2+} (Figure 8A), confirming that this accumulation occurs independently of the functional state of the ER protein folding machinery. We also studied whether reducing cytosolic Ca^{2+} levels (by introducing a $\Delta cch1$ mutation) in Grx6-minus Ero1-deficient cells interfered with the ability to rescue CPY processing. In fact, the $tetO_2-ERO1\Delta grx6\Delta cch1$ mutant accumulated calcium levels similar to control *GRX6* cells (Figure 8A) but CPY still occurred efficiently in doxycycline-treated cells in spite of the low Ero1 levels (Figure 8B). In summary, phenotypes related to CPY processing and calcium accumulation in $\Delta grx6$ cells can be rescued independently each other.

The previous results supported the participation of the redox activity of Grx6 in regulation of protein thiols at the ER/Golgi lumen. In this context, accumulation of cytosolic Ca^{2+} would be one of the consequences of disrupting such regulatory role of Grx6. Is this were the case, reductive stress could compensate for the absence of Grx6 and return cytosolic Ca^{2+} to wild type levels. Our results with DTT-treated cells (Figure 8C) confirm this hypothesis, allowing us to propose a thiol regulatory role in Ca^{2+} homeostasis for Grx6.

Discussion

Yeast Grx6 and Grx7 are the first described enzymes associated to the protein secretory machinery primarily acting as glutathione-dependent thiol oxidoreductases and lacking disulfide isomerase activity. Based on our initial transcriptome results with the respective mutants, we focused this study on the functional characterization of Grx6. One-Cys GRXs such as Grx6 or Grx7 do not have the capacity to reduce protein disulfides. Their enzyme activity consists of deglutathionylating mixed disulfides formed between glutathione and protein thiols, with the consequent release of reduced glutathione (GSH) (Lillig et al., 2008; Herrero et al., 2010; Deponte, 2013). Protein glutathionylation is a reversible mechanism for protecting protein thiols against irreversible oxidative modifications, in addition to having signalling functions (Gallogly and Mieyal, 2007). Such protective role may be of great importance in the oxidant environment of the early secretory machinery vesicles. In addition, the equilibrium between the glutathionylated and deglutathionylated protein forms at the ER may be a mechanism to regulate the redox ratio between free GSH and oxidized glutathione. This latter form may exist as molecule dimmers (GSSG) or forming mixed disulfides

with proteins. Since GSH is important for the activity of the Ero1/PDI machinery (Cuozzo and Kaiser, 1999; Chakravarthi et al., 2006; Sevier and Kaiser, 2008), ER/Golgi GRXs could act as general regulators of protein folding through their oxidoreductase activity on glutathione-protein mixed disulfides. The role of GRXs as facilitators of protein folding has been proposed earlier (Berndt et al., 2008).

In this study we have observed using the *eroGFP* reporter that a Δ *grx6* mutant does not display altered redox homeostasis at the ER, provided that *ERO1* is expressed. However, downregulation of *ERO1* expression causes a moderate redox shift towards a higher oxidant state which is much more intense in the absence of Grx6. That is, the absence of this GRX results in a significant oxidation of the ER lumen over basal conditions, provided that Ero1 levels are under normality. In wild type conditions for *ERO1* the redox equilibrium due to balanced Ero1/Pdi1 activities (Kim et al., 2012) could compensate for the absence of Grx6 with no significant affectation of the GSH/oxidized glutathione ratio. This would not occur in Ero1-depletion conditions, and in this situation the deglutathionylating activity of Grx6 could restore, at least partially, the mentioned redox equilibrium by releasing GSH from the mixed disulfides. The overoxidation state created by the absence of Grx6 in Ero1-depletion conditions would be comparable to the conditions created by the oxidant diamide in a termosensitive *ero1-1* mutant (Fränd and Kaiser, 1998), with similar implications concerning rescue of Ero1 function defects in relation to CPY secretion/maturation and general cell growth. These results support a role for the disulfide reductant activity of Grx6 (and probably also of Grx7) in modulating the glutathionylation state of target proteins at the ER/Golgi lumen and consequent regulation of the glutathione redox balance. GRXs may act as thiol reductant or oxidant depending of the redox state of the enzyme environment (Lillig et al., 2008). The above observations on Grx6-minus cells provide evidence that this GRX has a reductant activity in spite of the highly oxidant environment of the ER lumen.

Under normal Ero1 levels, secretion of the CPY reporter is not altered in a Δ *grx6* mutant. However, that some effects on the protein folding machinery still occur in these conditions is supported by the more intense upregulation of the UPR in the mutant under treatment with agents that induce this pathway upon alteration of protein folding. Perhaps, in the latter conditions, some depletion of GSH at the ER lumen due to the absence of the deglutathionylating activity of Grx6 would result in intrinsic defects in the folding machinery given the requirement of GSH for Ero1 activity (Cuozzo and Kaiser, 1999; Sevier and Kaiser, 2008). These defects would only become phenotypically manifested upon treatment with external agents further compromising protein folding. Remarkably, such UPR upregulation is not similarly

observed in a $\Delta grx7$ mutant, which might be due to a more secondary role of Grx7 in redox regulation of the vesicles lumen or alternatively to the fact that Grx7 seems to have an exclusive location at the Golgi vesicles (Izquierdo et al., 2008), while UPR signalling occurs at the ER.

Although not contradicting a possible general regulatory role of ER/Golgi GRXs on the GSH/oxidized glutathione ratio at the vesicles lumen, Grx6 may have specific protein targets as its absence results in specific phenotypes compared to a $\Delta grx7$ mutant. Based on the initial demonstration of the constitutive activation of the calcineurin-dependent pathway in the $\Delta grx6$ cells, we have confirmed that this mutant (but not $\Delta grx7$ cells) has higher than normal cytosolic Ca^{2+} levels, and that this originates from external sources of the cation. Ca^{2+} accumulation occurs in $\Delta grx6$ cells in conditions in which CPY maturation is not apparently affected, that is, in cells with normal Ero1/PDI functions, as well as in diamide-treated Ero1-depleted cells otherwise lacking Grx6 function. These results point to a specific redox function of Grx6 on some regulator of Ca^{2+} homeostasis inside the cell, a function that would not be shared with Grx7. We propose that this regulator would be a Ca^{2+} transporter whose activity would be modulated through the deglutathionylation activity of Grx6. In support of this hypothesis, treatment of $\Delta grx6$ cells with the thiol reductant DTT reduces Ca^{2+} levels in the mutant to wild type ones. The accompanying hyperaccumulation of phosphate that occurs inside $\Delta grx6$ cells would be a consequence of the activation of the calcineurin pathway in this mutant, one of which targets is *PHO89*, coding for one of the two high affinity phosphate transporters at the yeast plasma membrane. In fact, our results indicate that Pho89 is the main responsible for the observed phosphate accumulation. Phosphate acts as a buffer in yeast cells for regulating the excess of free calcium and other cations (Dunn et al., 1994; Eide et al., 2005).

In mammalian cells, functional redox regulation has been demonstrated for several ER Ca^{2+} transporters, among them the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPases (SERCAs) and the cardiac Ca^{2+} release channels (also known as ryanodine receptors) (Zima and Blatter, 2006; Raturi et al., 2014). In the case of SERCA 2b activity, it has been shown to be regulated by ERp57, a multifunctional ER thiol oxidoreductase member of the PDI family (Li and Camacho, 2004; Turano et al., 2011). About the redox-regulated target of Grx6, given the ER/Golgi location of the latter, attention should be initially focused on the Ca^{2+} transporters in these organelles, the Pmr1, Spf1 and Gdt1 pumps and the Csg2 channel. Pmr1 is the main controller of intra-ER/Golgi Ca^{2+} necessary among other functions for mannosylation of secretory proteins (Cunningham, 2011). In case that Grx6-mediated deglutathionylation of Pmr1

were required for activation of the pump, this would result in lack of Pmr1 function in $\Delta grx6$ cells. However, this is not compatible with some of the observed phenotypes in the respective single and the double mutant. Thus: (i) $\Delta pmr1$ cells accumulate Ca^{2+} preferentially at the vacuole (through activation of the calcineurin-dependent pathway and consequent upregulation of the *PMC1* gene), while in $\Delta grx6$ cells Ca^{2+} accumulation occurs at the cytosol; (ii) $\Delta pmr1$ cells are significantly sensitive to EGTA, while cells lacking Grx6 are moderately resistant to this extracellular chelator probably in accordance with the high cytosolic Ca^{2+} levels in the $\Delta grx6$ mutant, (iii) $\Delta pmr1$ cells display retarded kinetics of CPY maturation/secretion (Vashist et al., 2002), in contrast to the $\Delta grx6$ mutant, and (iv) intracellular accumulation of Ca^{2+} is additive between the $\Delta pmr1$ and $\Delta grx6$ mutations, definitively pointing to independent roles for both proteins. A scenario where Pmr1 deglutathionylation by Grx6 would result in its inhibition would also be incompatible with the above phenotypes.

The fact that the double $\Delta grx6\Delta spf1$ mutant accumulates intracellular Ca^{2+} to the same levels as the single $\Delta grx6$ mutant and in contrast to the single $\Delta spf1$ mutant (Cronin et al., 2002; and this work) argues against Grx6 as a direct regulator of Spf1, either as activator (in which case both single mutants would have similar phenotypes) or inactivator (which would result in similar phenotypes for $\Delta spf1$ and $\Delta grx6\Delta spf1$ cells). Similar arguments apply for Grx6 as potential regulator of the third ER/Golgi Ca^{2+} pump, Gdt1. In summary, neither Pmr1 nor Spf1 or Gdt1 appear to be direct redox targets of Grx6, as least when separately considered. A more complex interpretation of the results would result from considering compensatory effects of the absence of some of them on the activity of the remaining pumps, or alternatively considering the existence of an intermediate regulator between Grx6 and the ER Ca^{2+} pumps. The primary role of Csg2 as a channel exporting Ca^{2+} from the ER to the cytosol is more controversial, as it has also been characterized as a Ca^{2+} -binding protein involved in the synthesis of sphingolipids (Zhao et al., 1994). The absence of Csg2 does not provoke intracellular Ca^{2+} accumulation (Tanida et al., 1996; and this study) and does not suppress the accumulation of the cation in $\Delta grx6$ cells, discarding a direct positive regulatory function of Grx6 on Csg2. An alternative negative role of Grx6 on Csg2 also seems to be not plausible, as it would cause constitutive activation of Csg2 in the absence of Grx6, leading to Ca^{2+} depletion at the ER if a Ca^{2+} homeostatic function of Csg2 is postulated. The consequent phenotypic defects in CPY maturation/secretion resulting from this hypothesis were not observed in this study. The possibility is open that other still unknown proteins involved in Ca^{2+} movement to or from the cytosol exist which could be the direct targets of Grx6 redox activity.

GRXs of the Grx6/Grx7 subfamily are only present in fungi. In higher eukaryotes this function might be carried by members of the PDI family, as has been experimentally demonstrated for the SERCA 2b pump. In fact, this family displays larger diversification of functionally specialized members in mammals than in yeast and other fungi (Oka and Bulleid, 2013). In any case, the regulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis through thiol redox regulation of transporters may be evolutionary conserved in eukaryotes.

Acknowledgements

J.P. is the recipient of a predoctoral grant from the University of Lleida. This work was supported by grants BFU2010-17656 (from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain) and 2009/SGR/196 (from Generalitat de Catalunya). We acknowledge the support of Francisco Ferrezuelo in the transcriptome analyses and the technical help of Silvia Porras and Meritxell Martin.

References

- Ariño, J., Ramos, J., and Sychrová, H. (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *74*, 95-120.
- Beeler, T., Gable, K., Zhao, C., and Dunn, T. (1994) A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *269*, 7279-7284.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds) (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley Interscience.
- Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998a) Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* *14*, 1127-1138.
- Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998b). An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* *26*, 942-947.
- Berndt, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 641-650.
- Bonilla, M., Nastase, K.K., and Cunningham, K.W. (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* *21*, 2342-2353.
- Bonilla, M., and Cunningham, K.W. (2003) MAP kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4296-4305.
- Chakravarthi, S., Jessop, C.E., and Bulleid, N.J. (2006) The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* *7*, 271-275.
- Clapham, D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell* *131*, 1047-1058.
- Cohen Y., Megyeri, M., Chen, O.C.W., Condomitti, G., Riezman, I., Loizides-Mangold, U., Abdul-Sada, A., Rimón, N., Riezman, H., Platt, F.M., Futerman, A.H., and Schuldiner, M. (2013) The yeast P5 type ATPase, Spf1, regulates manganese transport into the endoplasmic reticulum. *PLoS One* *8*, e85519.
- Cronin, S.R., Rao, R., and Hampton, R.Y. (2002) Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *J. Cell Biol.* *157*, 1017-1028.
- Cunningham, K.W. (2011) Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Calcium* *50*, 128-139.
- Cunningham, K.W., and Fink, G.R. (1996) Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *16*, 2226-2237.
- Cuozzo, J.W., and Kaiser, C.A. (1999) Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat. Cell Biol.* *1*, 130-135.

Cyert, M.S. (2001) Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 35, 647-672.

Cyert, M.S., and Philpott, C.C. (2013) Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193, 677-713.

Demaegd, D., Foulquier, F., Colinet, A.s., Gremillon, L., Legrand, D., Mariot, P., Peiter, E., Van Schaffinger, E., Matthijs, G., and Morsomme, P. (2013) Newly characterized Golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 6859-6864.

Deponte, M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217-3266.

Dunn, T., Gable, K., and Beeler, T. (1994) Regulation of cellular Ca^{2+} by yeast vacuoles. *J. Biol. Chem.* 269, 7273-7278.

Eide, D. J., Clark, S., Nair, T. M., Gehl, M., Gribskov, M., Guerinot, M. L., and Harper, J. F. (2005). Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.* 6, R77.

Ferrezuelo, F., Aldea, M., and Futcher, B. (2009) Bck2 is a phase-independent activator of cell cycle-regulated genes in yeast. *Cell Cycle* 8, 239-252.

Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (1998) The *ERO1* gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 1, 161-170.

Galogly, M.M., and Mieval, J.J. (2007) Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 381-391.

Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast gens lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 3065-3073.

Goldstein, A.L., and McCusker, J.H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15,1541-1553.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.

Halachmi, D., and Eilam, Y. (1989) Cytosolic and vacuolar Ca^{2+} concentrations in yeast cells measured with the Ca^{2+} -sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS Lett.* 256, 55-61.

Halachmi, D., and Eilam, Y. (1996) Elevated cytosolic free Ca^{2+} concentrations and massive Ca^{2+} accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking *PMR1*, a homolog of Ca^{2+} -ATPase. *FEBS Lett.* 392, 194-200.

Herrero, E., Bellí, G., and Casas, C. (2010) Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 11, 659-668.

- Izquierdo, A., Casas, C., Mühlenhoff, U., Lillig, C.H., and Herrero, E. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryot. Cell* 7, 1415-1426.
- Kim, S., Sideris, D.P., Sevier, C.S., and Kaiser, C.A. (2012) Balanced Ero1 activation and inactivation establishes ER redox homeostasis. *J. Cell Biol.* 196, 713-725.
- Li, L., Chen, O.S., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 29515-29519.
- Li, X., Quian, J., Wang, C., Zheng, K., Ye, L., fu, Y., Han, N., Bian, H., Pan, J., Wang, J., and Zhu, M. (2011) Regulating cytoplasmic calcium homeostasis can reduce aluminium toxicity in yeast. *PLoS One* 6, e21148.
- Li, Y., and Camacho, P. (2004) Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J. Cell Biol.* 164, 35-46.
- Lillig, C. H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1304–1317.
- Locke, E.G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y., and Cunningham, K.W. (2000) A homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6686-6694.
- Merksamer, P.I., Trusina, A., and Papa, F.R. (2008) Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions. *Cell* 135, 933-947.
- Mesecke, N., Mittler, S., Ecker, E., Herrmann, J.M., and 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, 1452-1463.
- Mesecke, N., Spang, A., Deponte, M., and Herrmann, J.M. (2008b) A novel group of glutaredoxins in the *cis*-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol. Biol. Cell* 19, 2673-2680.
- Mouillon, J.M., and Persson, B.L. (2006) New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6, 171-176.
- Oka, O.B., and Bulleid, N.J. (2013). Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2425–2429.
- Persson, B.L., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., and Lundh, F. (2003) Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 72, 323-334.
- Pollard, M.G., Travers, K.J., and Weissman, J.S. (1998) Ero1p: a novel ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 1, 171-182.
- Raturi, A., Ortiz-Sandoval, C., and Simmen, T. Redox dependence of endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ signaling. *Histol. Histopathol.* 29, 543-552.

Reddi, A.R., Jensen, L.T., Naranuntarat, A., Rosenfeld, L., Leung, E., Shah, R., and Culotta, V.C. (2009) The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection. *Free Radic. Biol. Med.* *46*, 154-162.

Ruiz, A., Serrano, R., and Ariño, J. (2008) Direct regulation of genes involved in glucose utilization by the calcium/calcineurin pathway. *J. Biol. Chem.* *283*, 13923-13933.

Sevier, C.S., and Kaiser, C.A. (2008) Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 549-556.

Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* *350*, 3-41.

Stathopoulos, A.M., and Cyert, M.S. (1997) Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* *11*, 3432-3444.

Tanida, I., Takita, Y., Hasegawa, A., Ohya, Y., and Anraku, Y. (1996) Yeast *Cls2p/Csg2p* localized on the endoplasmic reticulum membrane regulates a non-exchangeable intracellular Ca^{2+} pool cooperatively with calcineurin. *FEBS Lett.* *379*, 38-42.

Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* *101*, 249-258.

Turano, C., Gaucci, E., Grillo, C., and Chichiarelli, S. (2011) ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell. Mol. Biol. Lett.* *16*, 539-563.

Vashist, S., Frank, C.G., Jakob, C.A., and Ng, D.T.W. (2002) Two distinctly localized P-type ATPases collaborate to maintain organelle homeostasis required for glycoprotein processing and quality control. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3955-3966.

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.

Walter, P., and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* *334*, 1081-1086.

Weiner, M.P., and Costa, G.L. (1995) Rapid PCR site-directed mutagenesis, p. 613-621. In C.W. Dieffenbach and G.S. Dveksler (ed.), *PCR primer: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.

Zima, A.V., and Blatter, L.A. (2006) Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc. Res.* *71*, 310-321.

Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A.P., Li, H.X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P.O., and Cyert, M.S. (2002). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *277*, 31079-31088.

Zhao, C., Beeler, T., and Dunn, T. (1994) Suppressors of the Ca^{2+} -sensitive yeast mutant (*csg2*) identify genes involved in sphingolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *269*, 21480-21488.

Figure legends

Figure 1. Northern blot gene expression analyses in Grx6- and Grx7-deficient strains. (A) Expression of the indicated genes in wild type (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML890), $\Delta grx7$ (MML887) and $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892) cells growing exponentially in YPD medium. *SNR19* was employed as loading control. (B) Quantification of gene expression from Northern blot images. Bars correspond to the mean of three independent experiments (\pm s.d.). Values are made relative to the wild type strain (unit value).

Figure 2. Calcineurin pathway-dependent gene expression in Grx6- and Grx7-deficient strains. (A) Wild type (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML842), $\Delta grx7$ (MML887) and $\Delta grx6\Delta crz1$ (MML1723) cells were transformed with the *lacZ* reporter plasmid pAMS366, which contains functional (+) CDRE motifs, or with plasmid pAMS364, which contains non-functional (-) CDRE motifs. Cultures of transformants were exponentially grown in SC medium without or with added (0.2 M, 60 min) $CaCl_2$. β -galactosidase activity was determined in three independent experiments. Bars indicate the mean (\pm s.d.), made relative to the unit value corresponding to pAMS366-transformed with type cells from SC medium without added $CaCl_2$. (B) Quantification of expression of the indicated genes from Northern blot analyses, from exponential cultures in YPD medium of the same non-transformed strains indicated in part (A). Expression of each gene was normalized by the loading control (*SNR19*), and then compared to the respective expression in wild type cells, which was given the unit value. Bars correspond to the mean of three independent experiments (\pm s.d.). (C) Effect of treatment with FK506 (2.5 μ g/ml) on the following strains in YPD medium: wild type (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML890), $\Delta grx7$ (MML887) and $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892). Bars correspond to the mean of five independent experiments (\pm s.d.). (D) As in (C), with the wild type strain or the $\Delta grx6$ mutant non-transformed or transformed with the integrative plasmids YIplac128 (vector), pMM1073 (*GRX6*) or pMM1071 (*GRX6**).

Figure 3. Ca^{2+} levels are increased in Grx6-deficient strains. Analyses were done in samples from exponential cultures in YPD medium. (A) Relative cytosolic Ca^{2+} levels in the following strains: wild type (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML890), $\Delta grx7$ (MML887), $\Delta grx6\Delta grx7$ (MML892), $\Delta pmr1$ (MML1530), $\Delta grx6\Delta pmr1$ (MML1535), $\Delta spf1$ (MML1716), $\Delta grx6\Delta spf1$ (MML1703), $\Delta gdt1$ (MML1884) and $\Delta grx6\Delta gdt1$ (MML1912). Values [mean of three independent experiments (\pm s.d.)] are normalized with respect to the wild type. (B) As in (A), with the wild type strain or the $\Delta grx6$ mutant non-

transformed or transformed with the integrative plasmids YIplac128 (vector), pMM1073 (*GRX6*) or pMM1071 (*GRX6**). (C) Relative Ca^{2+} levels in cytosolic (black bars) or total intracellular (grey bars) fractions in the indicated strains. (D) Northern blot analysis of *PMC1* mRNA levels in the indicated strains. *SNR19* mRNA is shown as loading control. The graphic shows the quantification of *PMC1* mRNA levels in samples from three independent experiments for each strain (bars correspond to the mean \pm s.d.), once normalized by *SNR19* mRNA levels and compared to expression in wild type cells (unit value). (E) As in (A), with the following strains: wild type, Δ *grx6*, Δ *cch1* (MML1527), Δ *grx6\Delta**cch1* (MML1548), Δ *yvc1* (MML1526), Δ *grx6\Delta**yvc1* (MML1531), Δ *csg2* (MML1529) and Δ *grx6\Delta**csg2* (MML1538).

Figure 4. Ca^{2+} chelating agents affect growth of Grx6-deficient strains. (A) Sensitivity of wild type (W303-1A) and Δ *grx6* (MML890) cells to EGTA. Serial dilutions (1:5) of the respective exponential cultures were spotted on YPD plates with the indicated concentrations of the agent. Growth was recorded after 2 days at 30°C. (B) Effect of treatment with EGTA on the following strains in YPD liquid medium: wild type (W303-1A), Δ *grx6* (MML890), Δ *grx7* (MML887), Δ *grx6\Delta**grx7* (MML892) and Δ *grx6\Delta**cch1* (MML1548). Bars correspond to the mean of five independent experiments (\pm s.d.). (C) As in (B), with the wild type strain or the Δ *grx6* mutant non-transformed or transformed with the integrative plasmids YIplac128 (vector), pMM1073 (*GRX6*) or pMM1071 (*GRX6**). (D) Effect of treatment with BAPTA-AM on the following strains in YPD liquid medium: wild type (W303-1A), Δ *grx6* (MML890), Δ *pmr1* (MML1530), Δ *grx6\Delta**pmr1* (MML1535), Δ *spf1* (MML1716), Δ *grx6\Delta**spf1* (MML1703), Δ *pmr1\Delta**spf1* (MML1710) and Δ *grx6\Delta**pmr1\Delta**spf1* (MML1721). Bars correspond to the mean of five independent experiments (\pm s.d.). (E) Sensitivity of wild type, Δ *grx6*, Δ *grx7* and Δ *grx6\Delta**grx7* cells to the indicated concentrations of CaCl_2 . Growth on modified SD solid medium was recorded after 4 days at 30°C.

Figure 5. Grx6-deficient cells accumulate phosphate intracellularly. (A) Orthophosphate levels in cells (growing exponentially in YPD medium) of the following strains: wild type (W303-1A), Δ *grx6* (MML890), Δ *grx7* (MML887), Δ *grx6\Delta**grx7* (MML892), Δ *pho84* (MML1304), Δ *grx6\Delta**pho84* (MML1337), Δ *pho89* (MML1306) and Δ *grx6\Delta**pho84* (MML1313). Values (mean of three independent experiments \pm s.d.) are normalized with respect to wild type cells. (B) Purity of vacuolar and cytosolic cell fractions from wild type cells growing exponentially in YPD medium, tested by Western blot with antibodies against CPY (vacuolar marker), Hxk1 (cytosolic marker) and porin

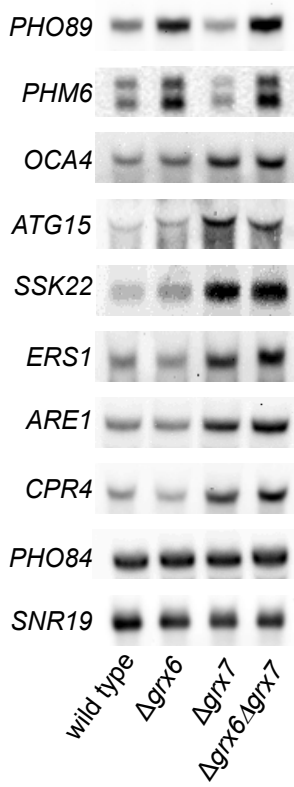
(mitochondrial marker). (C) Orthophosphate and polyphosphate content in purified vacuolar and cytosolic fractions from wild type and $\Delta grx6$ cells growing exponentially in YPD medium.

Figure 6. Grx6 interacts functionally with UPR components. (A) Quantification of expression of the indicated genes from Northern blot analyses. Samples were obtained from exponential cultures in YPD medium of wild type (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML890), $\Delta grx7$ (MML887) that were treated for the indicated times with DTT (2 mM). Expression of each gene was normalized by the loading control *SNR19* gene, and then compared to the respective expression in wild type cells, which was given the unit value. Bars correspond to the mean of three independent experiments (\pm s.d.). (B) Cultures of wild type (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML890), *tetO₂-ERO1* (MML1221) and *tetO₂-ERO1* $\Delta grx6$ (MML1789) cells in SC medium at 25°C were serially diluted (1:5) and spotted on SC medium plates without or with doxycycline (2 μ g/ml) and without or with diamide (0.3 mM). Growth was recorded after 3 days of incubation at 36°C.

Figure 7. Grx6 counteracts the defects of Ero1-depleted cells in CPY processing. (A) Exponential cultures in SC medium of wild type (W303-1A), $\Delta grx6$ (MML890), $\Delta grx7$ (MML887) cells were pulse-labelled with [³⁵S]methionine/[³⁵S]cysteine for 6 min and chased for the indicated times. Immunoprecipitated CPY was visualized by autoradiography after SDS-PAGE separation. The position of the ER (p1), Golgi (p2) and mature vacuolar (m) forms of CPY (Vashist *et al.*, 2002) is indicated. (B) Cells of the *tetO₂-ERO1* (MML1221) and *tetO₂-ERO1* $\Delta grx6$ (MML1789) strains were grown exponentially at 25°C and then shifted to 36°C. Doxycycline alone (2 μ g/ml) or plus diamide (0.3 mM) was added to part of these cultures at the time of the temperature shift, and after 9 hours they were pulse-labelled for 5 min, chased and processed as in (A). The graphic indicates the fraction of the mature form relative to total CPY, after autoradiography signal quantification. Values (mean of three independent experiments) were made relative to those of *tetO₂-ERO1* cells at time 0 (unit value). (C) Cultures of the indicated strains were grown in SC medium at 36°C with doxycycline (9 hours, 2 μ g/ml) or without the antibiotic. At time 0, DTT (2 mM) was added. The eroGFP ratio in samples taken at the indicated times was calculated as the ratio of emission at 488 nm vs. 405 nm (expressed as log₂) and then normalized relative to the value in the sample of *tetO₂-ERO1* without doxycycline at time 0.

Figure 8. Alteration of intracellular Ca^{2+} levels in the absence of Grx6 can be dissected experimentally from alterations in CPY processing. (A) Relative Ca^{2+} levels in *tetO₂-ERO1* (MML1221), *tetO₂-ERO1Δgrx6* (MML1789) and *tetO₂-ERO1Δgrx6Δcch1* (MML1965) cells. These were grown exponentially at 25°C in SC medium and then shifted to 36°C without or with doxycycline (2 μg/ml) and without or with diamide (0.3 mM). Samples were taken after 14 hours in these conditions for cytosolic Ca^{2+} determination. Bars correspond to the mean of three independent experiments (±s.d.), made relative to wild type cells without treatments (unit value). (B) The strains indicated in part (A) were subjected to pulse and chase experiments for quantification of precursor and mature CPY. See legend of Figure 7A and B for details. (C) Relative Ca^{2+} levels in wild type (W303-1A) and *Δgrx6* (MML890) cells growing exponentially in SC medium and then subjected to DTT treatment (mM, hours). Values [mean of three independent experiments (±s.d.)] are normalized with respect to the untreated wild type cells.

(A)



(B)

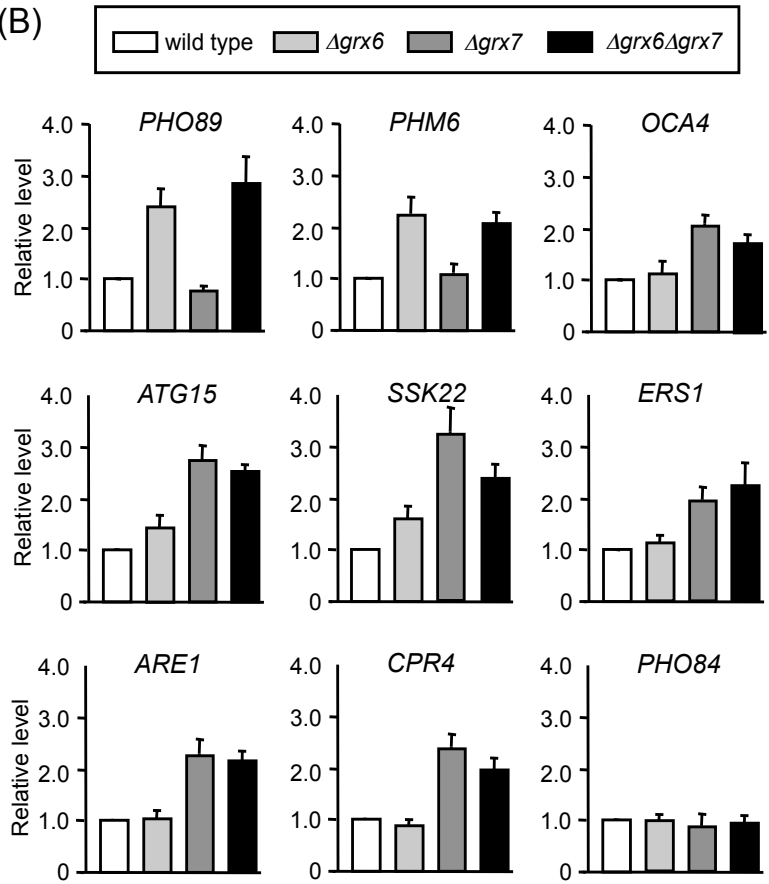


Figure 1

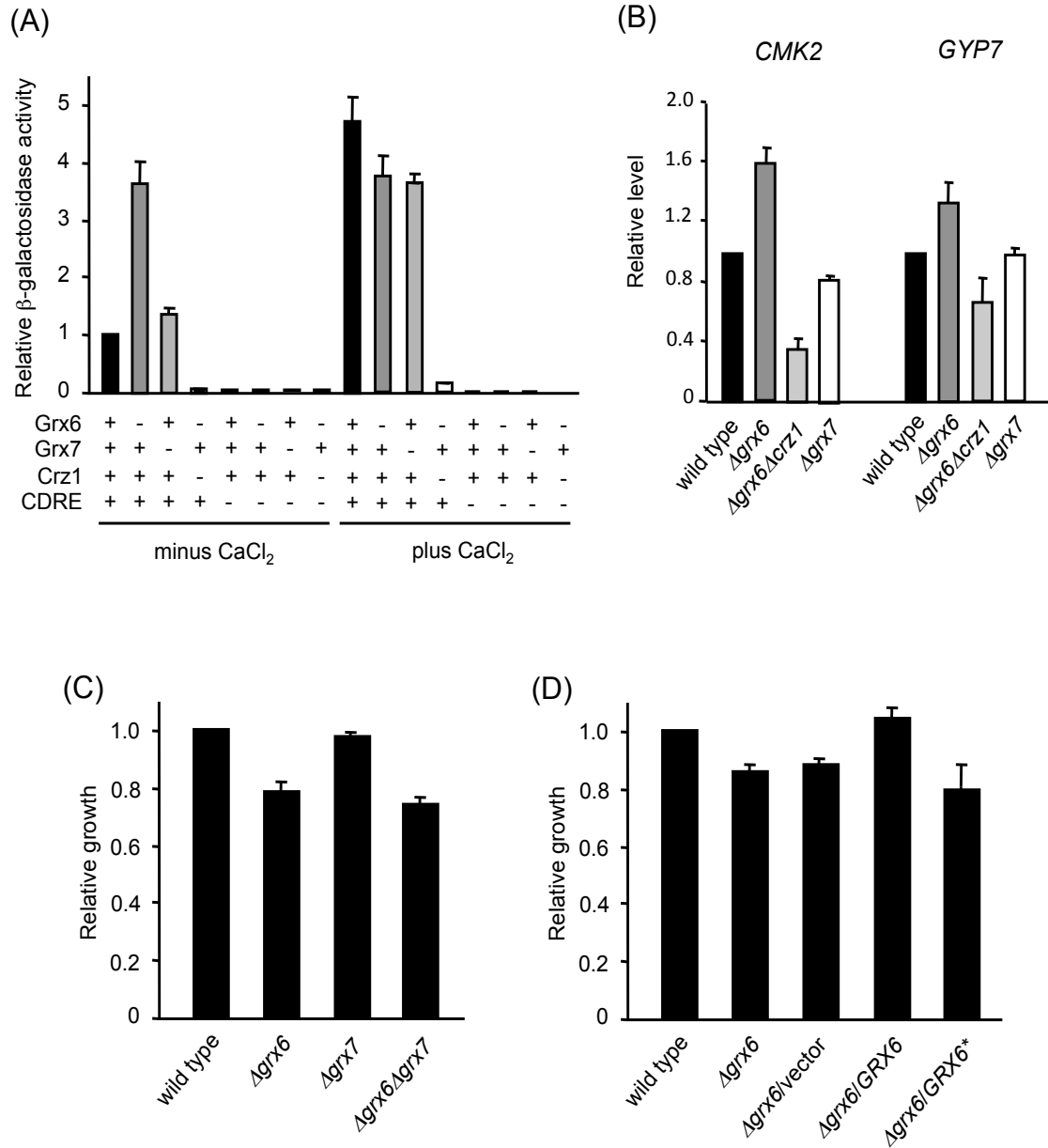


Figure 2

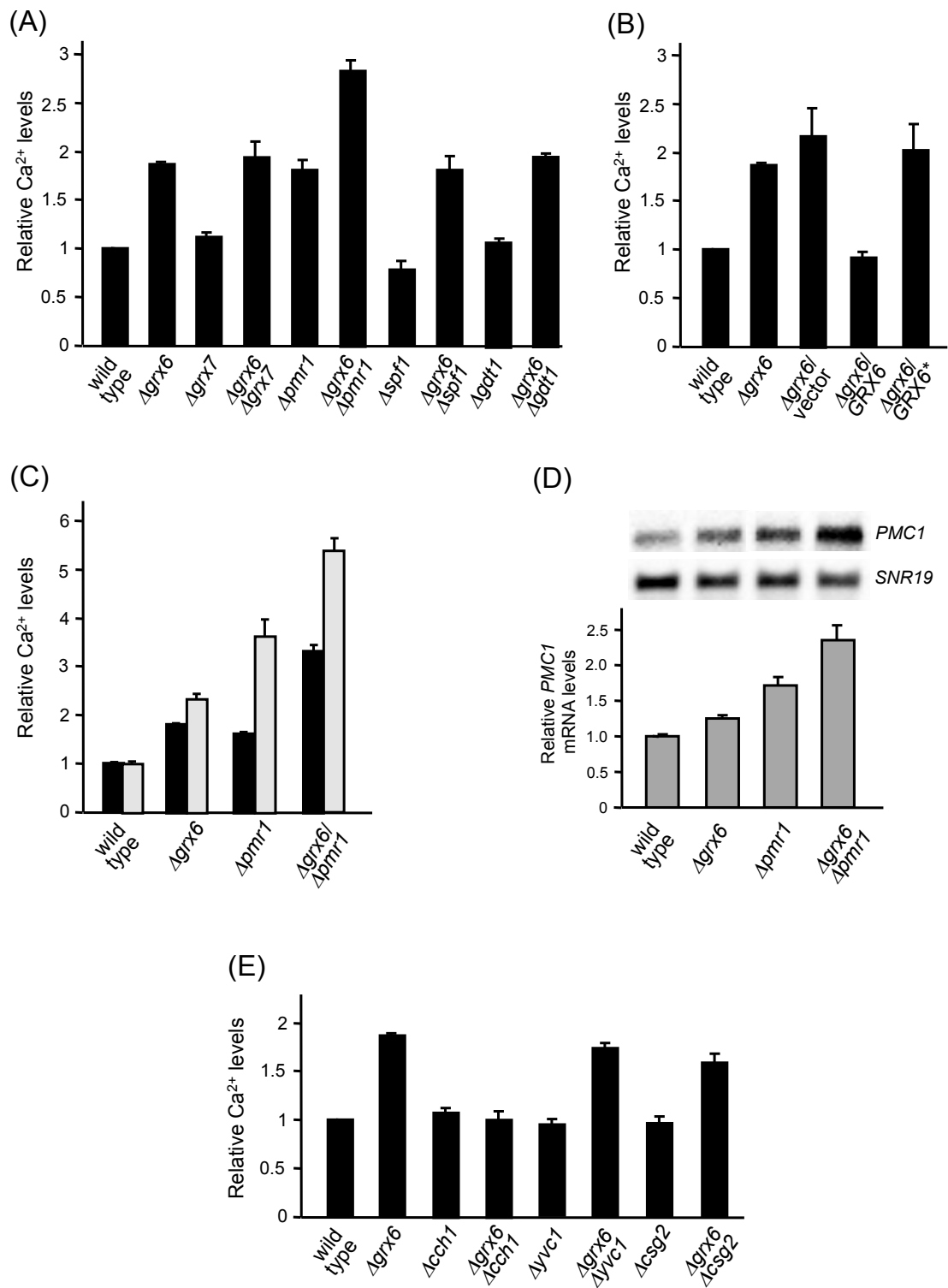


Figure 3

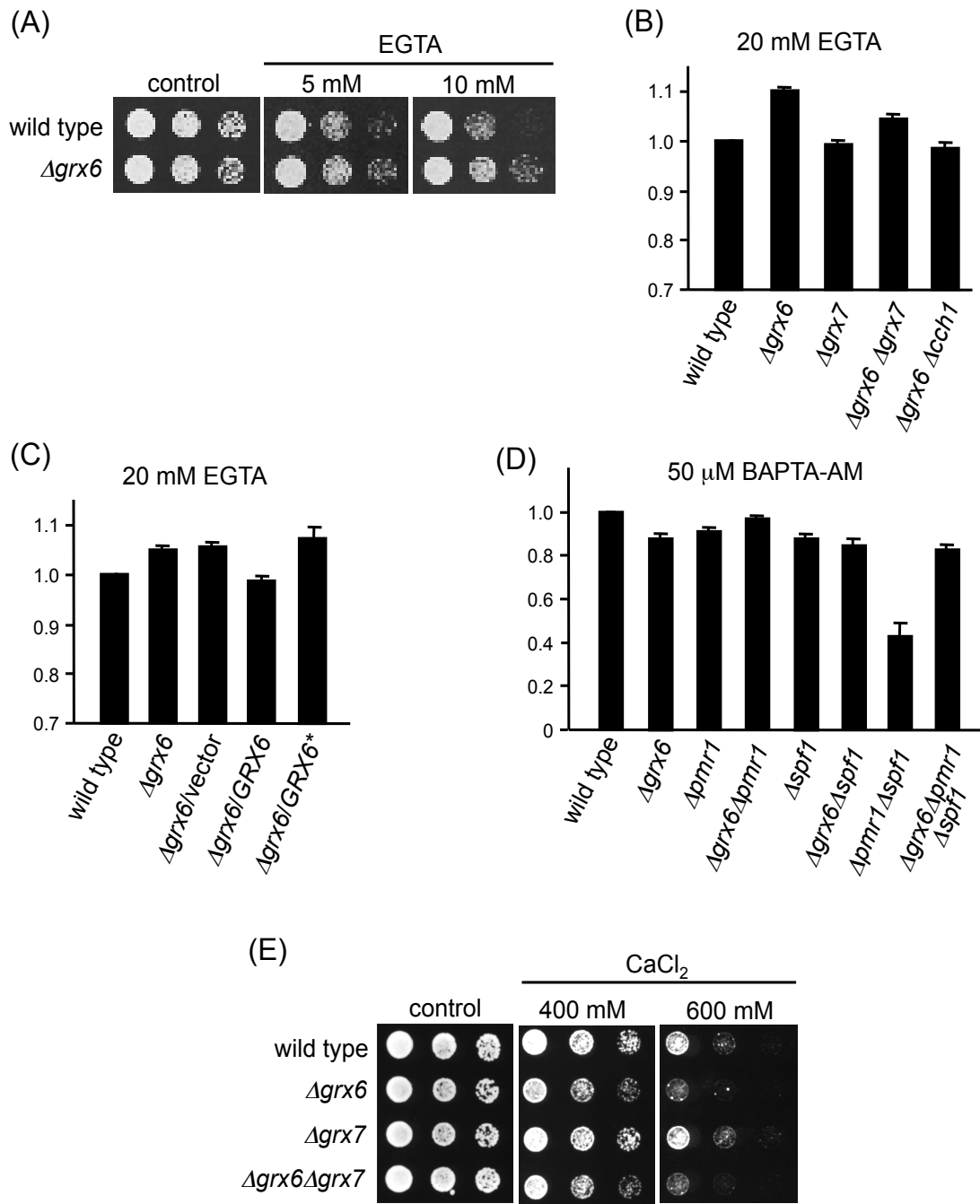


Figure 4

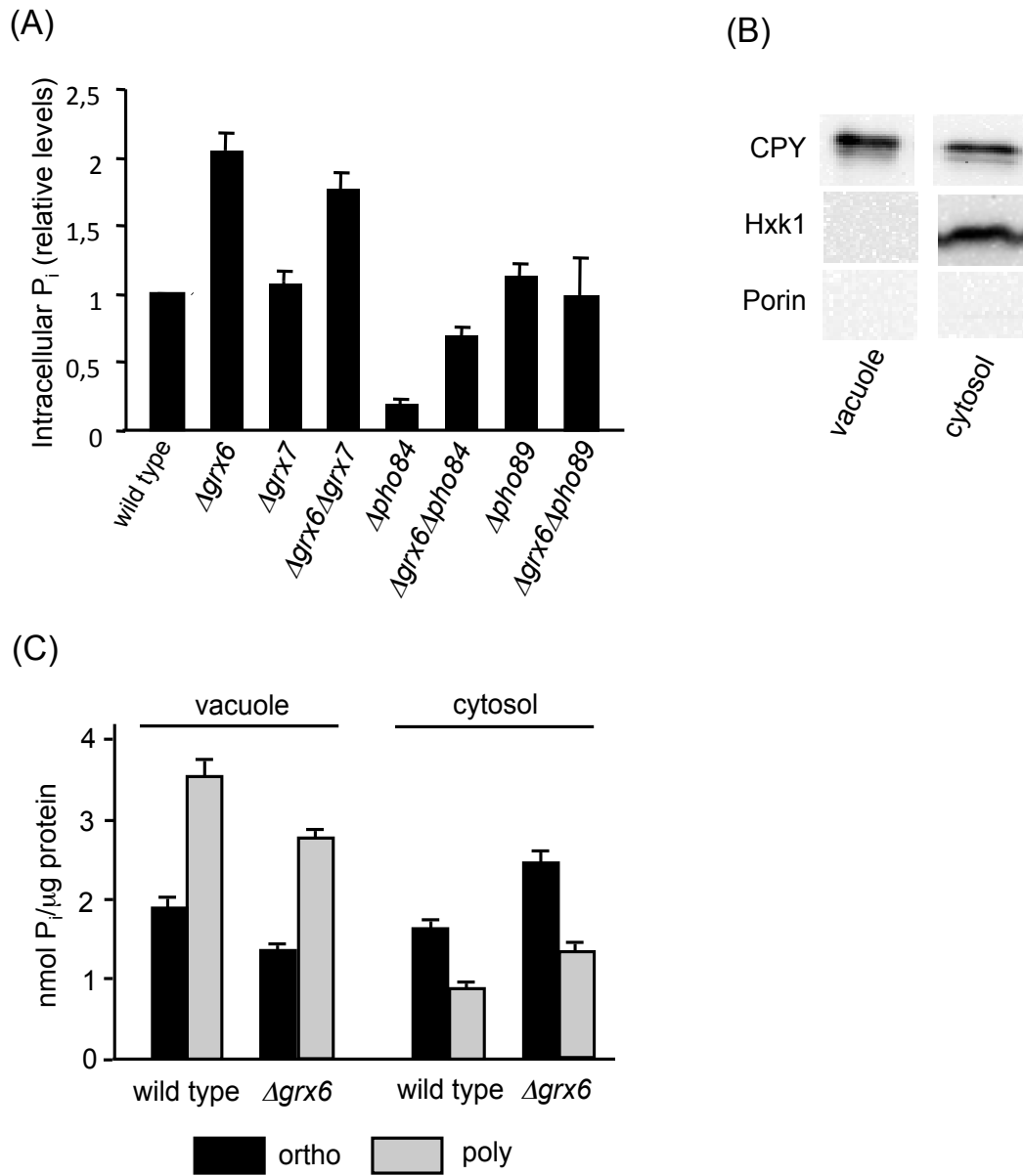


Figure 5

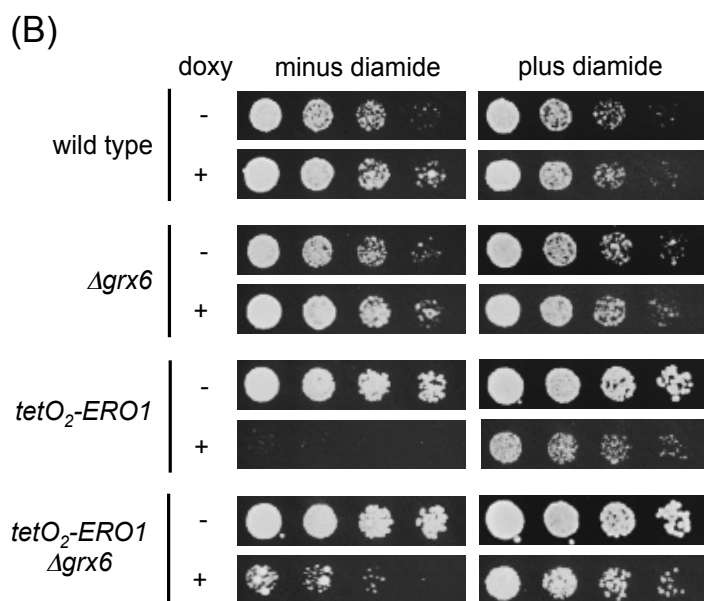
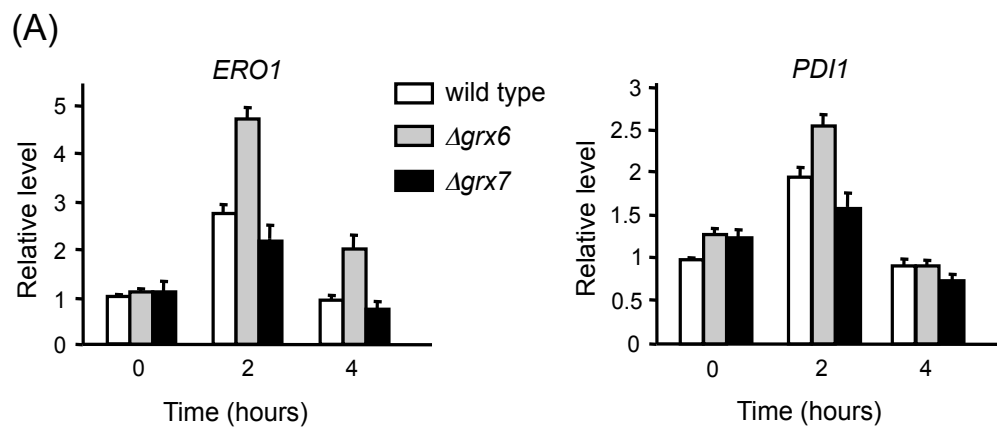


Figure 6

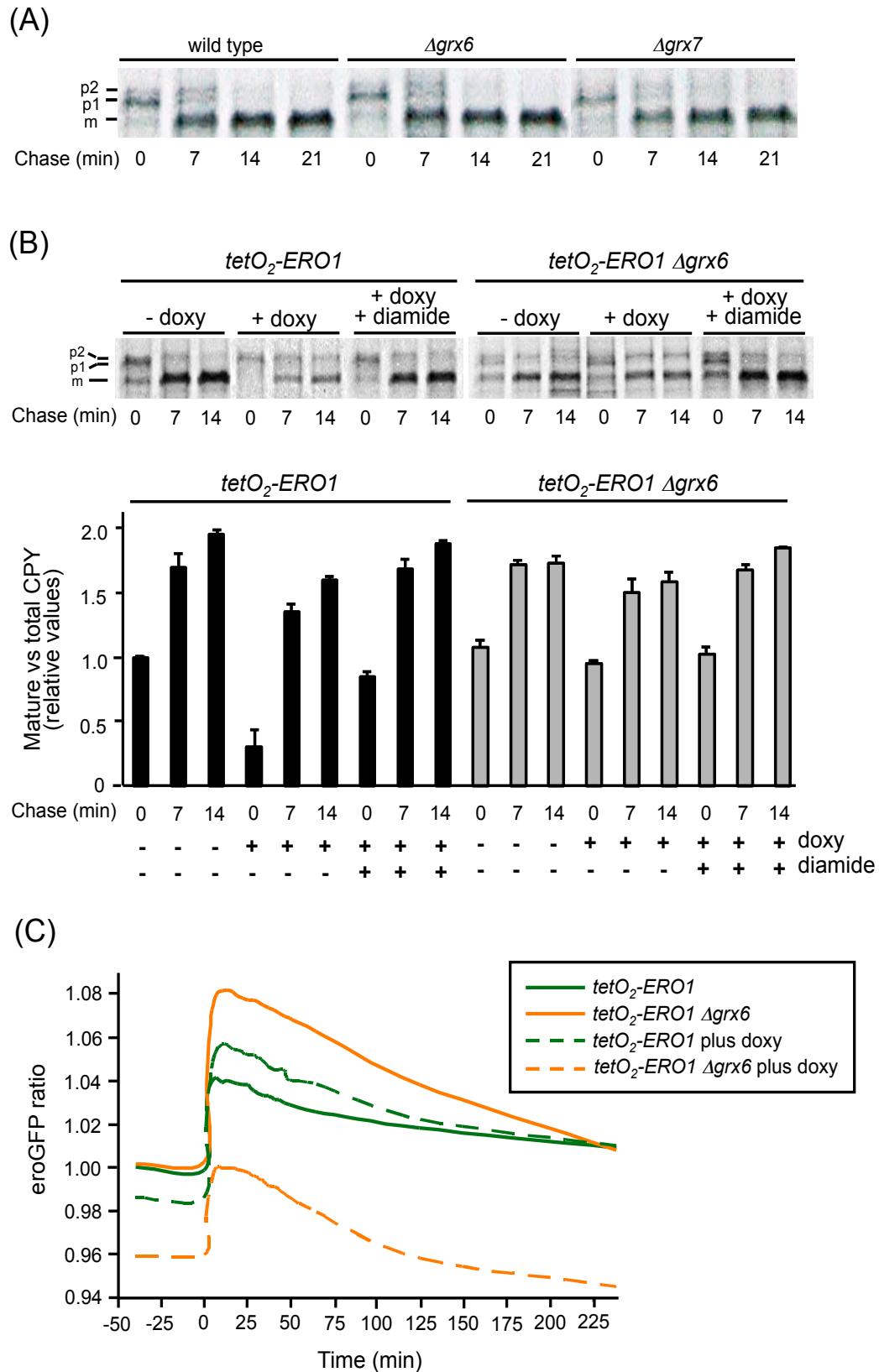


Figure 7

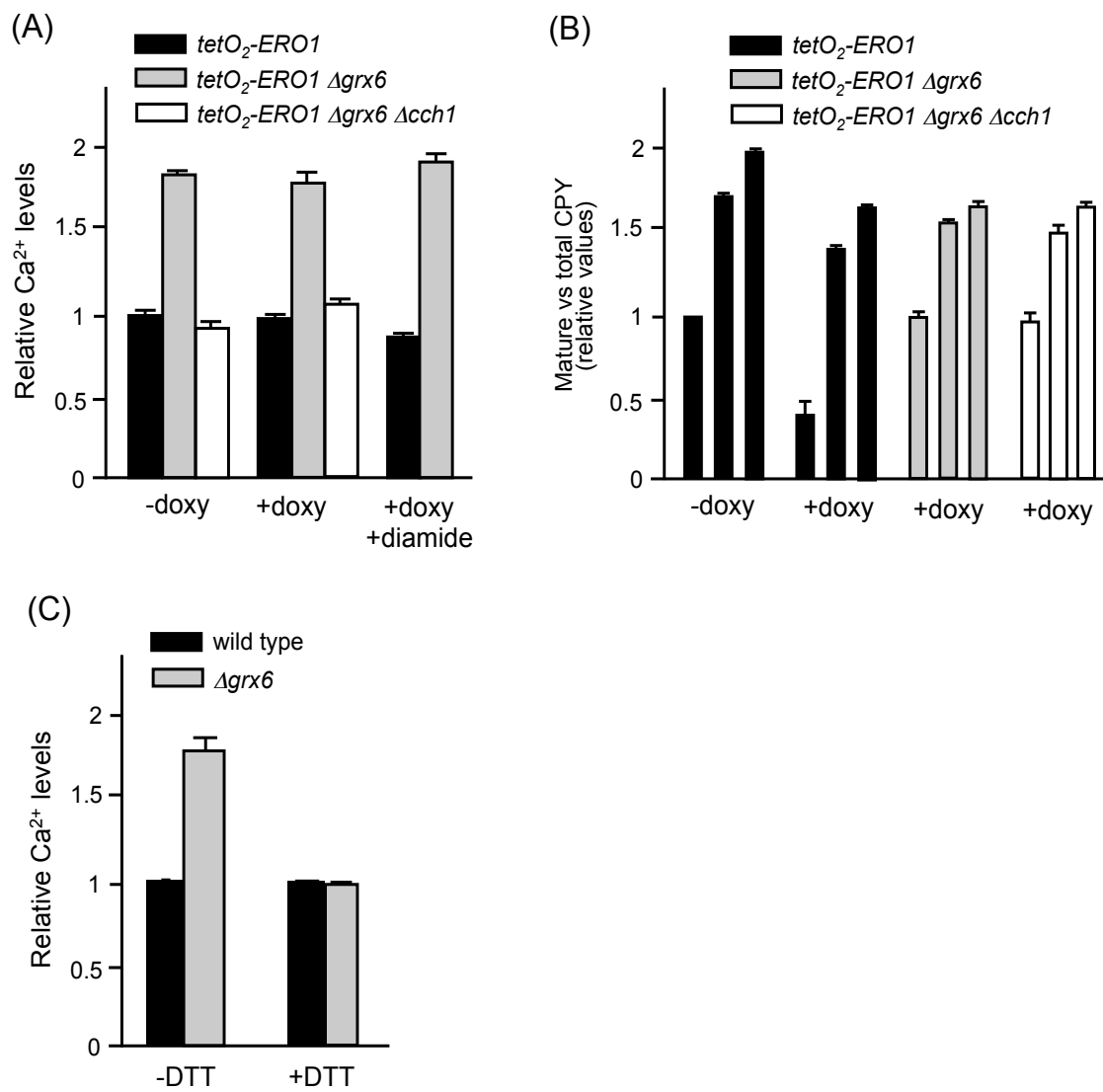


Figure 8

Supplementary Table S1. Strains employed in this study

Strain	Genotype	Source and comments
W303-1A	<i>MATa ura3-1ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 can1-1</i>	Wild type
W303-1B	<i>MATalpha ura3-1ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 can1-1</i>	Wild type
MML842	W303-1A <i>Δgrx6::natMX4</i>	This work
MML887	W303-1A <i>Δgrx7::kanMX4</i>	Izquierdo <i>et al.</i> (2008)
MML890	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3</i>	Izquierdo <i>et al.</i> (2008)
MML892	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δgrx7::kanMX4</i>	Izquierdo <i>et al.</i> (2008)
MML1221	W303-1A <i>tetO₂-ERO1::kanMX4 tetR⁻-SSN6::LEU2</i>	This work, <i>ERO1</i> promoter substitution
MML1304	W303-1A <i>Δpho84::natMX4</i>	This work
MML1306	W303-1A <i>Δpho89::natMX4</i>	This work
MML1313	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δpho89::natMX4</i>	This work
MML1337	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δpho84::natMX4</i>	This work
MML1526	W303-1A <i>Δyvc1::kanMX4</i>	This work
MML1527	W303-1A <i>Δcch1::kanMX4</i>	This work
MML1529	W303-1A <i>Δcsg2::kanMX4</i>	This work
MML1531	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δyvc1::kanMX4</i>	This work
MML1535	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δpmr1::kanMX4</i>	This work
MML1538	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δcsg2::kanMX4</i>	This work
MML1548	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δcch1::kanMX4</i>	This work
MML1703	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δspf1::natMX4</i>	This work
MML1710	W303-1A <i>Δpmr1::kanMX4 Δspf1::natMX4</i>	This work
MML1716	W303-1A <i>Δspf1::natMX4</i>	This work
MML1721	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δpmr1::kanMX4 Δspf1::natMX4</i>	This work
MML1723	W303-1A <i>Δgrx6::natMX4 Δcrz1::kanMX4</i>	This work
MML1743	MML890 [YIplac128]::LEU2	This work, integration of YIplac128 into MML890
MML1744	MML890 [pMM1071(GRX6 C136S)]::LEU2	This work, integration of pMM1071 into MML890
MML1745	MML890 [pMM1073 (GRX6)]::LEU2	This work, integration of pMM1073 into MML890
MML1789	W303-1B <i>tetO₂-ERO1::kanMX4 tetR⁻-SSN6::LEU2 Δgrx6::CaURA3</i>	This work
MML1884	W303-1A <i>Δgdt1::natMX4</i>	This work
MML1912	W303-1A <i>Δgrx6::CaURA3 Δgdt1::natMX4</i>	This work
MML1965	W303-1A <i>tetO₂-ERO1::kanMX4 tetR⁻-SSN6::LEU2 Δgrx6::CaURA3 Δcch1::kanMX4</i>	This work

Supplementary Table S2. Description of genes activated or repressed at least two-fold in *Δgrx6* cells vs wild type cells

Gene name	Induction fold mutant/wt (log2)	Description
PHO89	2,098	Na ⁺ /Pi cotransporter, active in early growth phase; similar to phosphate transporters of <i>Neurospora crassa</i> ; transcription regulated by inorganic phosphate concentrations and Pho4p
PHO5	1,639	Repressible acid phosphatase (1 of 3) that also mediates extracellular nucleotide-derived phosphate hydrolysis; secretory pathway derived cell surface glycoprotein; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
PHM6	1,456	Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels
CSM1	1,302	Nucleolar protein that forms a complex with Lrs4p and then Mam1p at kinetochores during meiosis I to mediate accurate homolog segregation; required for condensin recruitment to the replication fork barrier site and rDNA repeat segregation
OCA4	1,251	Cytoplasmic protein required for replication of Bromo mosaic virus in <i>S. cerevisiae</i> , which is a model system for studying replication of positive-strand RNA viruses in their natural hosts
ATG15	1,247	Lipase required for intravacuolar lysis of autophagic bodies and Cvt bodies; targeted to intravacuolar vesicles during autophagy via the multivesicular body (MVB) pathway
PHO11	1,229	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YCR087C-A	1,216	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleolus
SSK22	1,209	MAP kinase kinase kinase of the HOG1 mitogen-activated signaling pathway; functionally redundant with, and homologous to, Ssk2p; interacts with and is activated by Ssk1p; phosphorylates Pbs2p
THR4	1,143	Threonine synthase, conserved protein that catalyzes formation of threonine from 0-phosphohomoserine; expression is regulated by the GCN4-mediated general amino acid control pathway
PAT1	1,128	Topoisomerase II-associated deadenylation-dependent mRNA-decapping factor; also required for faithful chromosome transmission, maintenance of rDNA locus stability, and protection of mRNA 3'-UTRs from trimming; functionally linked to Pab1p
ERS1	1,092	Protein with similarity to human cystinosin, which is a H(+)-driven transporter involved in L-cystine export from lysosomes and implicated in the disease cystinosis; contains seven transmembrane domains
IMG1	1,083	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, required for respiration and for maintenance of the mitochondrial genome
SOL2	1,063	Protein with a possible role in tRNA export; shows similarity to 6-phosphogluconolactonase non-catalytic domains but does not exhibit this enzymatic activity; homologous to Sol1p, Sol3p, and Sol4p
ARE1	1,055	Acyl-CoA:sterol acyltransferase, isozyme of Are2p; endoplasmic reticulum enzyme that contributes the major sterol esterification activity in the absence of oxygen
PHO3	1,040	Constitutively expressed acid phosphatase similar to Pho5p; brought to the cell surface by transport vesicles; hydrolyzes thiamin phosphates in the periplasmic space, increasing cellular thiamin uptake; expression is repressed by thiamin
IMG2	1,036	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
HCM1	1,035	Forkhead transcription factor that drives S-phase specific expression of genes involved in chromosome segregation, spindle dynamics, and budding; suppressor of calmodulin mutants with specific SPB assembly defects; telomere maintenance role
IMG1	1,032	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, required for respiration and for maintenance of the mitochondrial genome
YIH1	1,028	Protein that inhibits activation of Gcn2p, an eIF2 alpha subunit protein kinase, by competing for Gcn1p binding, thus impacting gene expression in response to starvation; has sequence and functional similarity to the mouse IMPACT gene
CPR4	1,028	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin), catalyzes the cis-trans isomerization of peptide bonds N-terminal to proline residues; has a potential role in the secretory pathway
BUD23	1,027	Methyltransferase, methylates residue G1575 of 18S rRNA; required for rRNA processing and nuclear export of 40S ribosomal subunits independently of methylation activity; diploid mutant displays random budding pattern
PHO12	1,021	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho11p; upregulated by phosphate starvation
YCR061W	1,007	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern; induced by treatment with 8-methoxypsoralen and UVA irradiation
ARG1	1,001	Argininosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argininosuccinate from citrulline and L-aspartate in the arginine biosynthesis pathway; potential Cdc28p substrate
YCR045C	1,001	Probable subtilisin-family protease with a role in formation of the dihydroxy layer of spore walls; localizes to the spore wall and also the nuclear envelope and ER region in mature spores
PER1	1,000	Protein of the endoplasmic reticulum, required for GPI-phospholipase A2 activity that remodels the GPI anchor as a prerequisite for association of GPI-anchored proteins with lipid rafts; functionally complemented by human ortholog PERLD1
PUT1	-0.697	Proline oxidase, nuclear-encoded mitochondrial protein involved in utilization of proline as sole nitrogen source; PUT1 transcription is induced by Put3p in the presence of proline and the absence of a preferred nitrogen source
HSE1	-0.705	Subunit of the endosomal Vps27p-Hse1p complex required for sorting of ubiquitinated membrane proteins into intraluminal vesicles prior to vacuolar degradation, as well as for recycling of Golgi proteins and formation of luminal membranes
YKL061W	-0.723	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the endosome
YLR030W	-0.748	Putative protein of unknown function
MNN4	-0.765	Putative positive regulator of mannosylphosphate transferase (Mnn6p), involved in mannosylphosphorylation of N-linked oligosaccharides; expression increases in late-logarithmic and stationary growth phases
YJR028W	-0.821	Retrotransposon TYA Gag gene co-transcribed with TYB Pol; translated as TYA or TYA-TYB polyprotein; Gag is a nucleocapsid protein that is the structural constituent of virus-like particles (VLPs); similar to retroviral Gag
SLM1	-0.969	Phosphoinositide PI4,5P(2) binding protein, forms a complex with Slm2p; acts downstream of Mss4p in a pathway regulating actin cytoskeleton organization in response to stress; phosphorylated by the TORC2 complex
ADR1	-1.002	Carbon source-responsive zinc-finger transcription factor, required for transcription of the glucose-repressed gene ADH2, of peroxisomal protein genes, and of genes required for both ethanol, glycerol, and fatty acid utilization
YGR111W	-1.066	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to both the cytoplasm and the nucleus
YBT1	-1.105	Transporter of the ATP-binding cassette (ABC) family involved in bile acid transport; similar to mammalian bile transporters
FRE7	-1.611	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression induced by low copper levels