



Universitat de Lleida

# Mecanismes implicats en la senyalització i la defensa front l'estrès per selenit en *Saccharomyces cerevisiae*

Maria Pérez Sampietro

Dipòsit Legal: L.1718-2013

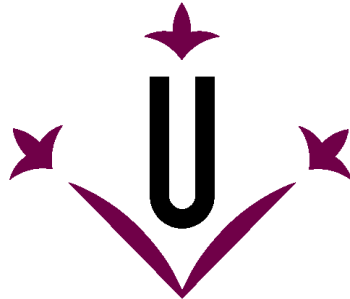
<http://hdl.handle.net/10803/129646>

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

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

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

**UNIVERSITAT DE LLEIDA**  
**FACULTAT DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES**



**Universitat de Lleida**

**MECANISMES IMPLICATS EN LA SENYALITZACIÓ I  
LA DEFENSA FRONT L'ESTRÈS PER SELENIT EN  
*Saccharomyces cerevisiae***

Memòria per a optar al Grau de Doctor  
per la Universitat de Lleida presentada  
per MARIA PÉREZ SAMPIETRO

El director de la Tesi

Dr. Enrique Herrero Perpiñan



## AGRAÏMENTS

Els meus agraïments van dirigits, en primer lloc, al meu director de tesi. Li agraeixo a l'Enric tot el temps i esforç que ha dedicat en mi, així com per guiar-me al llarg de tot el meu doctorat i ensenyar-me com treballar. Referent a aquest tasca també m'agradaria agrair-li a la Celia l'interès que ha tingut pel meu treball i el temps que ha dedicat en explicar-me com treballar i com manejar-me en un laboratori. Des de que vaig arribar al laboratori, he anat coneixent a gent diferent, i tots ells m'han ajudat i m'han aportat alguna cosa durant el temps que hem passat junts. Al principi, em vaig trobar unes companyes molt agradables, la Gemma, la Mireia, la Laia i l'Alicia, que van fer que em sentís molt còmoda només arribar. Li volia agrair especialment a l'Alicia tot el que em va ensenyar referent al laboratori, i també tota la paciència que va tenir amb mi i totes les preguntes potser inútils que va haver de respondre'm, però que a mi em va servir de molt. Després, vaig conèixer a la Judit, l'Esther, el Carlos i el Jordi, i ells, més que uns companys de feina, han sigut i són un grans amics que han estat al meu costat en els bons i mals moments, que hem compartit riures i plors dins i fora del laboratori, i de ben segur que em costarà trobar gent així en el meu futur, així que us vull agrair la manera de ser que heu tingut amb mi i tot el que m'heu ajudat, sense vosaltres i sense la pinya que hem fet sabeu que res hagués sigut el mateix. A més, no vull ni puc oblidar-me de l'Andrés, el David, la Sílvia i la Meri, que tot i anomenar-los més tard no per mi menys importants, han fet que els dies de laboratori que semblaven interminables no fossin realment tan durs i han estat també al meu costat en els bons moments de xerrades, riures, bromes, confessions... Us trobaré a faltar a tots.

Fora del laboratori, m'agradaria agrair als meus pares i a la meva germana el suport incondicional que m'han donat sempre, els bons consells, tots els moments que m'han escoltat i recolzat, per saber sempre què dir-me i com ajudar-me per fer que pogués tirar endavant, no només durant els meus anys de doctorat, sinó en la vida en general.

I finalment, no puc acabar aquesta part sense agrair-li al Victor tot el que ha fet per mi. El seu suport, la seva paciència, totes les històries del laboratori que ha hagut d'escoltar potser sense acabar d'entendre-ho del tot, però igualment intentant aconsellar-me, animar-me, treure'm un somriure o fent el que fos per ajudar-me, i sempre de la millor manera. Mai podré acabar d'agrair-te del tot el que hagis estat sempre al meu costat.



## RESUM

El seleni (Se) és un microelement essencial en la dieta humana que està present en forma de selenocisteïna en diverses selenoproteïnes. Contràriament als microorganismes multicel·lulars, el Se no és essencial pel creixement de *Saccharomyces cerevisiae*, el qual manca de selenoproteïnes. El Se a concentracions baixes té propietats anticancerígenes, mentre que a dosis elevades provoca efectes tòxics degut a la generació d'estrès oxidatiu i dany al DNA.

La proteïna quinasa Snf1/AMPK juga un paper central en la regulació de l'homeòstasi del metabolisme del carboni en *S. cerevisiae*. En aquest treball s'ha demostrat que l'activitat d'aquesta quinasa és necessària per protegir les cèl·lules front la toxicitat provocada pel Se en forma de selenit. Aquesta protecció involucra la quinasa Elm1, la qual activa Snf1. L'activitat basal de Snf1 és suficient per la defensa front al selenit, tot i que els nivells de fosforilació del residu Thr210 i conseqüent activació de Snf1 augmenten a temps llargs de tractament amb l'agent, probablement degut a la inhibició de la funció de la fosfatasa Reg1. Contràriament a una situació de dèficit de glucosa, on Snf1 es localitza al nucli, aquesta roman al citoplasma durant el tractament amb selenit, i la funció protectora de la quinasa no requereix dels seus factors nuclears coneguts. En condicions d'estrès per selenit, un mutant *snf1* presenta nivells més elevats de glutatió oxidat respecte els de glutatió reduït, comparant-los amb els de cèl·lules salvatges, i la hipersensibilitat de la soca  $\Delta snf1$  a l'agent és rescatada per la sobreexpressió del gen *GLR1*, el qual codifica per una glutatió reductasa. D'altra banda, en presència d'agents com el dietil maleat o la diamida, els quals provoquen alteracions en l'homeòstasi redox del glutatió incrementant els nivells de glutatió oxidat, les cèl·lules de llevat també necessiten Snf1 de forma dependent d'Elm1 per poder créixer. Aquests resultats demostren que, en cèl·lules de llevat, Snf1 juga un paper protector en situacions on l'homeòstasi redox del metabolisme del glutatió es troba alterada cap a un ambient intracel·lular més oxidant.

D'altra banda, anàlisis transcriptòmics de cèl·lules de *S. cerevisiae* tractades amb selenit han revelat la inducció de gens del sistema de captació de ferro d'alta afinitat, entre altres categories funcionals. L'expressió dels gens relacionats amb l'homeòstasi del ferro en condicions de dèficit del metall ve regulada pel factor transcripcional Aft1, o pel seu paràleg Aft2. En aquest treball s'ha demostrat que el selenit provoca la inducció del reguló Aft1 de forma específica i diferent del que s'observa en condicions de dèficit de ferro o en resposta a

determinats tipus d'estrès oxidatiu. Mentre que Aft1 protegeix les cèl·lules front la toxicitat provocada pel selenit depenent dels nivells de ferro intracel·lulars, Aft2 juga una funció independent front aquesta protecció i ho fa sense relacionar-ho amb el contingut del metall. Addicionalment, el paper protector d'Aft2 front al selenit tampoc està relacionat amb funcions prèviament conegudes regulades pel mateix factor de transcripció. A més, Rim101 (qui regula la via de resposta a pH alcalí) també protegeix front al selenit, tot i que el seu rol protector no està relacionat ni amb Aft1 com tampoc amb Aft2. Rim101 regula la resposta a condicions de pH alcalí actuant com a repressor de l'expressió de *NRG1*, de forma similar que durant l'estrès provocat per selenit, on la manca simultània de Rim101 i Nrg1 fa que les cèl·lules puguin créixer igual que les cèl·lules salvatges. Addicionalment, Rim101 regula l'expressió de gens d'algunes subunitats de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> de la vacuola durant l'estrès per pH alcalí, l'expressió dels quals també està alterada al llarg d'un tractament amb selenit. Aquesta observació confirma que la vacuola forma part del sistema de detoxificació de l'agent.

## RESUMEN

El selenio (Se) es un microelemento esencial en la dieta humana que está presente en forma de selenocisteína en diversas selenoproteínas. Contrariamente a los microorganismos multicelulares, el Se no es esencial para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual carece de selenoproteínas. El Se a concentraciones bajas tiene propiedades anticancerígenas, mientras que a dosis elevadas provoca efectos tóxicos debido a la generación de estrés oxidativo y daño al DNA.

La proteína quinasa Snf1/AMPK juega un papel central en la regulación de la homeostasis del metabolismo del carbono en *S. cerevisiae*. En este trabajo se ha demostrado que la actividad de esta quinasa es necesaria para proteger las células frente a la toxicidad provocada por el Se en forma de selenito. Esta protección involucra la quinasa Elm1, la cual activa Snf1. La actividad basal de Snf1 es suficiente para la defensa frente al selenito, aunque los niveles de fosforilación del residuo Thr210 y consecuente activación de Snf1 aumentan a tiempos largos de tratamiento con el agente, probablemente debido a la inhibición de la función de la fosfatasa Reg1. Contrariamente a una situación de déficit de glucosa, donde Snf1 se localiza en el núcleo, ésta permanece en el citoplasma durante el tratamiento con selenito, y la función protectora de la quinasa no requiere de sus factores nucleares conocidos. En condiciones de estrés por selenito, el mutante *snf1* presenta niveles más elevados de glutatión oxidado respecto a los de glutatión reducido, comparándolos con los de células salvajes, y la hipersensibilidad de la cepa  $\Delta snf1$  al agente es rescatada por la sobreexpresión del gen *GLR1*, el cual codifica por una glutatión reductasa. Por otra parte, en presencia de agentes como el dietil maleato o la diamida, los cuales provocan alteraciones en la homeostasis redox del glutatión incrementando los niveles de glutatión oxidado, las células de levadura también necesitan Snf1 de forma dependiente a Elm1 para poder crecer. Estos resultados demuestran que, en células de levadura, Snf1 juega un papel protector en situaciones donde la homeostasis redox del metabolismo del glutatión se encuentra alterada hacia un ambiente intracelular más oxidante.

Por otra parte, análisis transcriptómicos de células de *S. cerevisiae* tratadas con selenito han revelado la inducción de genes del sistema de captación de hierro de alta afinidad, entre otras categorías funcionales. La expresión de los genes relacionados con la homeostasis del hierro en condiciones de déficit del metal viene regulada por el factor transcripcional Aft1, o por su



parólogo Aft2. En este trabajo se ha demostrado que el selenito provoca la inducción del regulón Aft1 de forma específica y diferente de lo que se observa en condiciones de déficit de hierro o en respuesta a determinados tipos de estrés oxidativo. Mientras que Aft1 protege las células frente a la toxicidad provocada por el selenito dependiendo de los niveles de hierro intracelulares, Aft2 juega una función independiente frente a esta protección y lo hace sin relacionarlo con el contenido del metal. Adicionalmente, el papel protector de Aft2 frente al selenito tampoco está relacionado con funciones previamente conocidas reguladas por el mismo factor de transcripción. Además, Rim101 (quien regula la vía de respuesta a pH alcalino) también protege frente al selenito, aunque su rol protector no está relacionado ni con Aft1 ni tampoco con Aft2. Rim101 regula la respuesta en condiciones de pH alcalino actuando como represor de la expresión de *NRG1*, de forma similar que durante el estrés provocado por el selenito, donde la falta simultánea de Rim101 y Nrg1 hace que las células puedan crecer igual que las células salvajes. Adicionalmente, Rim101 regula la expresión de genes de algunas subunidades de la ATPasa V-H<sup>+</sup> de la vacuola durante el estrés por pH alcalino, la expresión de los cuales también está alterada a lo largo de un tratamiento con selenito. Esta observación confirma que la vacuola forma parte del sistema de detoxificación del agente.

## SUMMARY

Selenium (Se) is an essential microelement in human diet which is present as selenocysteine in a number of selenoproteins. In contrast to multicellular organisms, Se is not essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae*, which lacks selenoproteins. At low concentrations, Se has anticarcinogenic properties, but it is toxic at high doses due to generation of oxidative stress and DNA damage.

The AMPK/Snf1 protein kinase has a central role in carbon metabolism in *S. cerevisiae*. In this study it has been demonstrated that Snf1 activity is needed for protection against Se toxicity in the form of selenite. Such protection involves the Elm1 kinase, which activates Snf1. Basal Snf1 activity is sufficient for the defense against selenite, although Snf1 Thr210 phosphorylation levels and consequent Snf1 activation become increased at advanced treatment times, probably by inhibition of the Reg1 phosphatase function. Contrary to glucose deprivation, where Snf1 is localized in the nucleus, it remains cytosolic during selenite treatment, and the protective function of the kinase does not require its known nuclear effectors. Upon selenite treatment, a null *snf1* mutant displays higher levels of oxidized versus reduced glutathione compared to wild type cells, and its hypersensitivity to the agent is rescued by overexpression of the glutathione reductase gene *GLR1*. On the other hand, in the presence of agents such as diethyl maleate or diamide, which cause alterations in glutathione redox homeostasis by increasing the levels of oxidized glutathione, yeast cells also require Snf1 in an Elm1-dependent manner for growth. These results demonstrate a role of Snf1 in protecting yeast cells in situations where glutathione-dependent redox homeostasis is altered to a more oxidant intracellular environment.

On the other hand, transcriptomic analysis of the response of selenite-treated *S. cerevisiae* cells have revealed upregulation of genes involved in high affinity iron uptake, among other functional categories. Upregulation of iron metabolism genes in iron deprivation conditions is under the control of the Aft1 transcription factor or its paralog Aft2. In this study it has been demonstrated that selenite provokes the induction of the Aft1 regulon in a specific manner, and different from that observed in iron limitation conditions or in response to oxidative stress. While Aft1 protects cells against selenite in an iron-dependent manner, Aft2 has independent roles in such protection. Additionally, the protective role of Aft2 against selenite is not related to any of previous known functions mediated by this transcription factor.

Moreover, Rim101 (which mediates the alkaline pH response pathway) also protects against selenite, although its role is not related neither to Aft1 nor to Aft2. Rim101 regulates the response to alkaline pH acting as a repressor of *NRG1* expression, as occurs in the case of selenite stress, where the simultaneous absence of Rim101 and Nrg1 allows cells to grow similarly to wild type cells. Additionally, Rim101 regulates the expression of some genes encoding ATPase V-H<sup>+</sup> vacuolar subunits during the response in alkaline pH stress, whose expression is also affected during selenite treatment. This observation confirms that the vacuole is part of the detoxification system of the agent.

## LLISTA D'ABREVIATURES

<b>AIS</b>	Seqüència autoinhibitòria de Snf1
<b>AMPK</b>	Proteïna quinasa activada per l'AMP
<b>BER</b>	Reparació per escissió de bases
<b>BPS</b>	Àcid sulfònic de batofenantrolina
<b>CBS</b>	Repetició cistationina-beta-sintasa
<b>CDK</b>	Quinasa dependent de ciclina
<b>CKI</b>	Inhibidor de quinases dependents de ciclins
<b>CSRE</b>	Element de resposta a la font de carboni
<b>DAPI</b>	4,8-diamino-2-fenilindol
<b>DEM</b>	Dietil maleat
<b>DSB</b>	Trencament de doble cadena de DNA
<b>DTNB</b>	Àcid 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoic
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ESCRT</b>	Complex endosomal organitzador del transport de complexes
<b>GBD</b>	Domini d'unió a glicogen
<b>GFP</b>	Proteïna verd fluorescent
<b>GPX</b>	Glutatió peroxidasa
<b>GRX</b>	Glutaredoxina
<b>GSH</b>	Glutatió reduït
<b>GSSeSG</b>	Selenodiglutatió
<b>GSSG</b>	Glutatió oxidat
<b>HR</b>	Recombinació homòloga
<b>HSE</b>	Element de xoc per calor
<b>HU</b>	Hidroxiurea
<b>ISC</b>	Centre ferro-sofre
<b>KD</b>	Domini quinasa
<b>KIS</b>	Seqüència d'interacció quinasa
<b>LH</b>	Àcid gras poliinsaturat
<b>LOOH</b>	Hidroperòxid lipídic
<b>MDH</b>	Malat deshidrogenasa
<b>MMR</b>	Via de reparació de desaparellaments
<b>MMS</b>	Metil metanosulfonat
<b>NER</b>	Reparació per excisió de nucleòtids
<b>NES</b>	Senyal d'exportació nuclear
<b>NHEJ</b>	Unió d'extremes no homòlegs
<b>N-myr</b>	Seqüència consens de N-miristilació
<b>ORF</b>	Marc obert de lectura
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí
<b>PKA</b>	Proteïna quinasa A
<b>PMSF</b>	Fluorur de fenilmetilsulfonil
<b>PP1</b>	Proteïna fosfatasa del tipus 1

<b>PP2</b>	Proteïna fosfatasa del tipus 2
<b>PRR</b>	Via de reparació post-replicativa
<b>RNR</b>	Ribonucleòtid reductasa
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen
<b>SDS</b>	Dodecilsulfat sòdic
<b>Se</b>	Seleni
<b>SeC</b>	Selenocisteïna
<b>SeIP</b>	Selenoproteïna-P
<b>SeM</b>	Selenometionina
<b>SSB</b>	Trencament de la cadena simple de DNA
<b>t-BOOH</b>	Hidroperòxid de <i>tert</i> -butil
<b>TR</b>	Tioredoxina reductasa
<b>TRX</b>	Tioredoxina
<b>UTR</b>	Regió no traduïble del mRNA
<b>UV</b>	Radiació ultraviolada

## ÍNDIX

<b>I. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EL SELENI .....</b>	<b>3</b>
1.1 Aspectes biològics del seleni .....	3
1.1.1 Selenoproteïnes .....	3
1.1.2 Formes inorgàniques del seleni .....	4
1.2 El paper protector del seleni .....	4
1.3 Efectes perjudicials del seleni .....	5
1.3.1 Acció prooxidant del seleni .....	5
1.3.2 Seleni i dany al DNA .....	6
1.4 El llevat <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com a organisme model d'estudi de la toxicitat per seleni .....	7
1.4.1 Dany al DNA en cèl·lules de <i>S. cerevisiae</i> exposades a selenit .....	8
1.4.2 Seleni i estrès oxidatiu .....	10
1.4.3 Detoxificació del seleni en <i>S. cerevisiae</i> .....	12
1.4.4 Mecanismes de transport del seleni .....	13
1.4.5 Anàlisi transcriptòmic de l'efecte del selenit en <i>S. cerevisiae</i> .....	15
<b>2 EL REGULÓ AFT1 I EL TRANSPORT DE FERRO EN EL LLEVAT .....</b>	<b>15</b>
2.1 La importància i el paper del ferro a la cèl·lula .....	15
2.2 Mecanismes de transport i senyalització del ferro en <i>S. cerevisiae</i> .....	17
2.2.1 Captació de ferro extracel·lular .....	17
2.2.1.1 La via reductiva .....	17
2.2.1.2 La via no reductiva .....	19
2.2.2 Mobilització de les reserves del ferro intracel·lular .....	19
2.2.3 Remodelació metabòlica en resposta a la manca de ferro .....	21
2.3 Regulació transcripcional de la resposta a la manca de ferro .....	21
2.4 Papers dels factors Aft1 i Aft2 en funcions independents del ferro .....	24
2.4.1 Altres funcions d'Aft1 i la seva relació amb altres reguladors transcripcionals ...	24
2.4.2 Altres funcions d'Aft2 .....	27
2.5 Inducció del reguló Aft1 per altres estressos .....	28
<b>3 REGULACIÓ METABÒLICA PER SNF1 .....</b>	<b>30</b>
3.1 El complex Snf1 .....	30
3.2 Subunitats estructurals del complex Snf1 .....	31

3.2.1 La subunitat catalítica Snf1 .....	32
3.2.2 Les subunitats $\beta$ .....	33
3.2.3 La subunitat Snf4 .....	34
3.3 Regulació de l'activitat del complex Snf1 .....	35
3.3.1 Les quinases Sak1, Elm1 i Tos3 .....	37
3.3.2 La proteïna fosfatasa de tipus 1 .....	38
3.4 Regulació de la localització subcel·lular del complex Snf1 .....	39
3.5 Funció del complex Snf1 .....	40
3.5.1 Resposta transcripcional a l'estrès causat per la font de carboni .....	40
3.5.2 Control d'enzims i transportadors metabòlics en resposta a estrès per la font de carboni .....	42
3.5.3 Funcions del complex Snf1 en resposta a altres estressos mediambientals .....	42
3.5.4 Papers reguladors del complex Snf1 en altres processos cel·lulars .....	46
<b>II. OBJECTIUS .....</b>	<b>47</b>
<b>III. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>51</b>
<b>1 MICROORGANISMES UTILITZATS .....</b>	<b>53</b>
1.1 Soques de <i>S. cerevisiae</i> .....	53
1.2 Soques d' <i>Escherichia coli</i> .....	57
<b>2 PLÀSMIDS .....</b>	<b>57</b>
<b>3 MEDIS DE CULTIU .....</b>	<b>59</b>
<b>4 CULTIU DE MICROORGANISMES .....</b>	<b>59</b>
<b>5 TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR .....</b>	<b>60</b>
5.1 Extracció de DNA genòmic de <i>S. cerevisiae</i> .....	60
5.2 Tècniques de DNA recombinant .....	61
5.2.1 Amplificació i clonació de gens .....	61
5.2.2 Purificació de plàsmids a partir de cultius d' <i>E. coli</i> .....	62
5.2.3 Mètodes de transformació per <i>E. coli</i> i <i>S. cerevisiae</i> .....	62
5.3 Construcció de mutants nuls simples i múltiples de <i>S. cerevisiae</i> .....	62
5.4 Anàlisi de l'expressió gènica per Northern blot .....	63
5.5 Anàlisi de l'expressió gènica utilitzant microordenaments de DNA .....	67
5.6 Anàlisi de proteïnes per Western blot .....	69
<b>6 DETECCIÓ DE LA PROTEÏNA FOSFORILADA I TOTAL DE SNF1 .....</b>	<b>69</b>
<b>7 ESTUDIS FENOTÍPICS DEL CREIXEMENT .....</b>	<b>72</b>
7.1 Anàlisi del creixement microbià en medi sòlid .....	72

7.2 Anàlisi del creixement microbià en medi líquid .....	72
<b>8 ANÀLISIS METABOLÒMICS DE <i>S. cerevisiae</i> PER ESPECTOMETRIA DE MASSES .....</b>	<b>72</b>
<b>9 DETECCIÓ DELS NIVELLS DE FERRO INTRACEL·LULAR .....</b>	<b>76</b>
<b>10 ASSAIG DE L'ACTIVITAT DE PROMOTORS BASAT EN EL REPORTER GFP .....</b>	<b>77</b>
<b>11 DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES .....</b>	<b>78</b>
11.1 Determinació de les activitats aconitasa i malat deshidrogenasa .....	78
11.2 Determinació de l'activitat isopropilmalat isomerasa (Leu1) .....	80
<b>12 DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE GLUTATIÓ REDUÏT I OXIDAT .....</b>	<b>82</b>
<b>13 TÈCNiques DE MICROSCOPIA .....</b>	<b>85</b>
13.1 Detecció de proteïnes marcades amb GFP .....	85
13.2 Immunolocalització de Mig1-HA .....	85
<b>14 AÏLLAMENT DE CLONS ESPECÍFICS A PARTIR D'UNA GENOTECA DE DNA DE</b>	
<b><i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>87</b>
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>89</b>
<b>1 PAPER DE SNF1 EN LA DEFENSA FRONT A LA TOXICITAT PER SELENIT .....</b>	<b>91</b>
1.1 L'activitat de la quinasa Snf1 protegeix front la toxicitat per selenit .....	91
1.2 La quinasa Elm1 juga un paper principal en la resposta front la toxicitat per selenit ....	93
1.3 El paper protector de Snf1 front la toxicitat causada pel selenit no requereix de	
l'activitat dels seus efectors nuclears coneguts .....	94
1.3.1 Snf1 es localitza al citosol durant un tractament amb selenit .....	94
1.3.2 La cascada de senyals induïda pel selenit no està relacionada amb el rol	
funcional de Snf1 en el nucli .....	96
1.4 La fosforilació de Snf1 no es correlaciona amb la seva protecció front la toxicitat	
causada pel selenit .....	98
1.5 Els efectes tòxics del selenit no són provocats per una situació de dèficit	
de glucosa .....	101
1.5.1 El selenit no causa efectes nocius a nivell de membrana plasmàtica .....	101
1.5.2 Els nivells intracel·lulars de glucosa no es veuen afectats pel selenit .....	102
1.6 La toxicitat provocada pel selenit requereix l'entrada de l'agent a les cèl·lules .....	104
1.7 La sensibilitat del mutant <i>snf1</i> als efectes del selenit està relacionada amb	
alteracions en el metabolisme del glutatió .....	107
1.8 L'activitat quinasa de Snf1 protegeix front agents causants de l'oxidació del GSH .....	110
1.9 Anàlisi transcriptòmic de les soques salvatge i mutant <i>snf1</i> tractades amb selenit ....	112
1.10 Anàlisi metabòlic de les soques salvatge i mutant <i>snf1</i> tractades amb selenit ....	116



<b>2 PAPER DELS REGULADORS DEL SISTEMA D'ALTA AFINITAT DEL FERRO EN LA PROTECCIÓ FRONT LA TOXICITAT CAUSADA PEL SELENIT .....</b>	<b>118</b>
2.1 El selenit provoca la inducció del reguló Aft1 fins a temps llargs de tractament en <i>S. cerevisiae</i> .....	118
2.1.1 Els gens del reguló Aft1 s'indueixen pel selenit de forma dependent i independent a aquest factor transcripcional .....	118
2.1.2 El patró d'inducció de l'expressió del reguló Aft1 causat pel selenit és específic de l'agent .....	121
2.2 El selenit no interfereix en els centres ferro-sofre en <i>S. cerevisiae</i> .....	122
2.3 El factor transcripcional Aft2 té un rol funcional en la protecció de la cèl·lula front la toxicitat per selenit .....	124
2.3.1 L'activitat protectora d'Aft2 front al selenit és independent de la seva funció en l'homeòstasi del ferro .....	124
2.3.2 El paper protector d'Aft2 front al selenit no està relacionat amb funcions conegudes regulades per aquest factor de transcripció .....	126
2.3.3 Aïllament i identificació de supressors de la sensibilitat del mutant <i>aft2</i> al selenit .....	128
2.4 La proteïna Rim101 confereix protecció front la toxicitat causada pel selenit .....	132
2.4.1 El rol protector de Rim101 front el selenit no està relacionat amb les funcions d'Aft1 i Aft2 en aquest estrès .....	132
2.4.2 La inducció dels gens del reguló Aft1 no depèn de Rim101 en cèl·lules tractades amb selenit, però sí de Snf1 en alguns casos .....	134
2.4.3 Efectes del selenit en gens diana coneguts del factor transcripcional Rim101 .....	136
<b>V. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>141</b>
<b>VI. CONCLUSIONS .....</b>	<b>159</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>165</b>
<b>VIII. ARTICLE .....</b>	<b>189</b>

# **I. INTRODUCCIÓ**



## 1 EL SELENI

### 1.1 Aspectes biològics del seleni

El seleni (Se) és considerat un metal·loide i també un element traça essencial pels mamífers ja que intervé en diversos processos cel·lulars. Dins d'aquests processos, el Se actua com a microelement fonamental en la dieta humana degut a la seva presència com a selenocisteïna en diverses selenoproteïnes (Brozmanová et al., 2010; Letavayová et al., 2006; Lu i Holmgren, 2009). El Se s'incorpora específicament a les proteïnes en forma de selenocisteïna (SeC) i, d'altra banda, de manera inespecífica com a selenometionina (SeM) enlloc de metionina, essent aquest últim aminoàcid la forma predominant en la majoria de dietes riques en Se (Letavayová et al., 2006). Les cèl·lules no distingeixen entre metionina o SeM durant la síntesi proteica, així doncs aquest selenoaminoàcid s'incorpora a les cadenes polipeptídiques enlloc de la metionina ja sigui aquesta un factor limitant o no (Shiobara et al., 1998). Tant la SeM com la SeC representen les formes orgàniques del Se en la natura i en els microorganismes en particular.

#### 1.1.1 Selenoproteïnes

Les selenoproteïnes juguen un paper important en diverses funcions biològiques, com la defensa antioxidant, la formació d'hormones tiroïdals, la síntesi del DNA, la fertilitat i la reproducció (Mehdi et al., 2013). Una trentena de selenoproteïnes han estat identificades recentment en mamífers, i aquestes es poden classificar en 5 grups o famílies. En primer lloc, les glutatió peroxidases (GPx) conformen una família d'enzims antioxidants, i la seva funció principal és la neutralització del peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i d'hidroperòxids orgànics en els compartiments intra i extracel·lulars. Existeixen vuit formes de GPxs, les quals tenen modes i llocs d'acció diferents, a més de l'estructura química. Tot i així, la seva activitat enzimàtica és directament proporcional a l'entrada de Se (Brigelius-Flohé i Maiorino, 2012). Les deionidases són el segon tipus de selenoproteïnes caracteritzades. N'hi ha de tres tipus, totes elles amb funcions relacionades amb el metabolisme de les hormones tiroïdals, tot i que es localitzen en compartiments diferents (Fairweather-tait et al., 2010). Un tercer tipus és la selenoproteïna-P (SeIP). Aquesta glicoproteïna extracel·lular (la més abundant en plasma) juga un paper en l'homeòstasi i el transport de Se als teixits (Fairweather-tait et al., 2010) i també actua com antioxidant extracel·lular. D'altra banda, s'han descrit tres tioredoxina reductases (TR1, TR2 i TR3), les quals tenen funcions antioxidants i de control del potencial redox intracel·lular. A part

de reduir la concentració de tioredoxina (TRX), actuen com a factors de creixement cel·lular en la síntesi de DNA i inhibició d'apoptosi, i es troben en compartiments cel·lulars diferents (Fairweather-tait et al., 2010). Finalment, existeixen altres selenoproteïnes en humans no classificades en cap dels grups anteriors que tenen funcions i localitzacions diverses.

### **1.1.2 Formes inorgàniques del seleni**

Les formes inorgàniques del Se són el selenit ( $\text{SeO}_3^{-2}$ ), el selenur ( $\text{Se}^{-2}$ ), el selenat ( $\text{SeO}_4^{-2}$ ) i el seleni elemental ( $\text{Se}^0$ ). El selenit i el selenat són reduïts per una molècula de glutatió (abreviat en la seva forma reduïda com GSH), generant selenur d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{Se}$ ), a través d'una cadena de reaccions que s'explicarà més endavant. El  $\text{H}_2\text{Se}$  actua com a precursor de la síntesi de selenoproteïnes, tot i que aquestes formes inorgàniques són molt menys freqüents en la dieta humana i es troben en dosis molt baixes (Letavayová et al., 2006).

## **1.2 El paper protector del seleni**

Les respostes cel·lulars al Se depenen tant de la dosi com de la forma química en la que s'administra el compost (Ip, 1998). S'ha demostrat també que el Se a concentracions baixes té propietats anticancerígenes (Brozmanová et al., 2010; Letavayová et al., 2006), mentre que a dosis elevades pot arribar a ser tòxic degut a la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i dany al DNA (Brozmanová et al., 2010; Letavayová et al., 2006; Spallholz, 1997), entre altres.

Diversos estudis han demostrat la capacitat dels compostos de Se per inhibir el creixement cel·lular i induir l'apoptosi de les cèl·lules tumorals, de manera que aquest fenomen es presentaria com un mecanisme important de quimioprevenió cancerígena (Sinha i El-Bayoumy, 2004; Stewart et al., 1997; Wang et al., 2003). A més, està demostrat que el Se té un paper protector en la fase d'iniciació de la carcinogènesi disminuint la formació de carcinògens reactius (El-bayoumy et al., 1992; Sohn et al., 1999). D'altra banda, s'ha descrit també que el Se inhibeix l'activitat de diverses quinases que juguen un paper central en la regulació del creixement cel·lular, promoció i diferenciació tumoral (Gopalakrishna et al., 1997; Sinha et al., 1999).

Tots els organismes aeròbics han desenvolupat mecanismes de defensa front el dany oxidatiu causat per les ROS. El Se és important per aquests mecanismes de defensa antioxidant ja sigui

com a agent segrestador de radicals lliures o bé com a component de les GPx. Els membres de la família de les GPx catalitzen la reducció del  $H_2O_2$  i dels peròxids lipídics. A més, com ja s'ha dit (apartat 1.1), el Se també forma part d'altres selenoproteïnes que tenen funcions relacionades amb la defensa antioxidant, com són les TR o les iodotironina deidonasas, entre altres. Tan les selenoproteïnes de la família de les GPx, concretament la selenoproteïna de 15kDa (Sep15), com la selenoproteïna P i les TR semblen tenir un paper rellevant en la prevenció del càncer, tot i que en aquestes últimes podria ser dubtós (Rayman, 2007). El lligam establert entre les selenoproteïnes i el risc cancerigen està, doncs, basat en l'activitat antioxidant d'algunes d'elles, les quals tenen funcions protectores front les ROS que promouen l'inici de la malaltia. L'estrès oxidatiu mutagènic es creu que és, generalment, un dels principals factors iniciadors del càncer en humans. La gran generació de ROS indueix un estrès oxidatiu persistent, de manera que contribueix a l'expressió d'un fenotip maligne en cèl·lules cancerígenes degut a canvis genètics en els oncògens i gens supressors tumorals (Brozmanová et al., 2010; Valko et al., 2007).

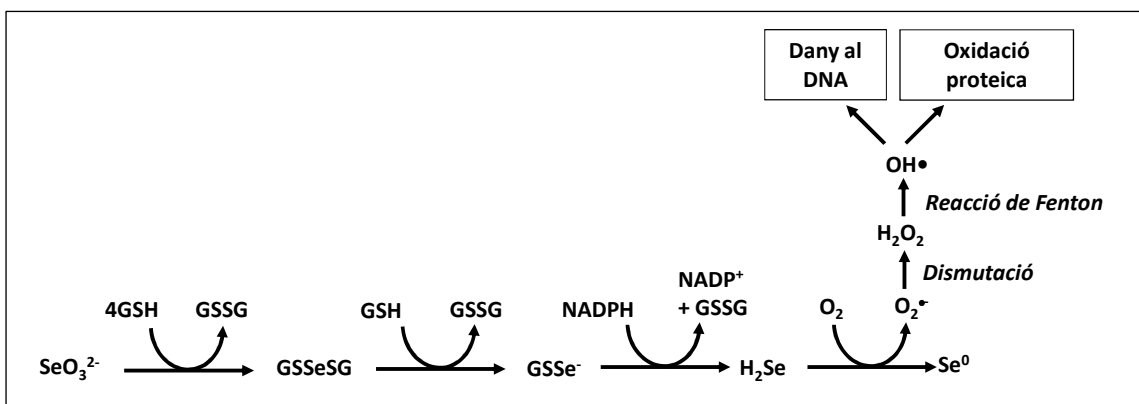
### 1.3 Efectes perjudicials del seleni

Tal i com s'ha citat (apartat 1.1), l'efecte del Se a les cèl·lules depèn de la forma química d'aquest i també de la seva dosi. A altes concentracions, el Se esdevé un compost mutagènic, tòxic i cancerigen (Letavayová et al., 2008; Letavayová et al., 2006), i dins dels efectes perjudicials del Se s'inclou la inducció d'estrès oxidatiu i el dany al DNA.

#### 1.3.1 Acció prooxidant del seleni

L'estrès oxidatiu és el principal mecanisme de citotoxicitat induït pel Se, el qual també inclou l'habilitat dels compostos del Se d'induir l'apoptosi (Drake, 2006). Més concretament, la toxicitat del Se es deu a la seva capacitat per generar espècies de radicals lliures, ja que en la seva forma inorgànica de selenit, causa la conversió del GSH en la seva forma oxidada de diglutatió (GSSG) i la subsegüent producció de l'anió superòxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) i del Se elemental ( $Se^0$ ), amb la formació de compostos intermedis com el selenodiglutatió (GSSeSG) (**Figura 1**). Tot que el radical  $O_2^{\bullet-}$  té una reactivitat i toxicitat relativament baixes, dóna lloc a productes oxidants secundaris. El procés de dismutació del  $O_2^{\bullet-}$  produeix  $H_2O_2$ , el qual pròpiament no és tòxic, però té una reactivitat alta *in vivo* deguda a les reaccions de Fenton, on el  $H_2O_2$  reacciona amb ions parcialment reduïts com el fèrric ( $Fe^{2+}$ ) o el cúpric ( $Cu^+$ ) per formar el radical hidroxil

(OH•). El OH• pot causar directament dany al DNA i està considerat el radical més important entre les ROS relacionades amb dany al DNA (Letavayová et al., 2006).



**Figura 1.** Esquema de la via reductiva del selenit i generació del radical superòxid [adaptat de (Letavayová et al., 2006)]. Veure el text pels detalls.

Tal i com mostra la **Figura 1**, el selenit (i també el selenat) és reduït pel GSH. Aquest tripèptid ( $\gamma$ -glutamil-cisteïnil-glicina) es troba present al llarg de tota l'escala evolutiva, en animals, plantes i microorganismes. És el pèptid de baix pes molecular més abundant, i en moltes cèl·lules representa el 90% del sofre no proteic (Meister, 1988). El GSH és un dels components del sistema de defensa no enzimàtic front estrès oxidatiu, el qual consisteix en molècules petites, solubles en medi aquós o lipídic que són oxidades per les ROS i d'aquesta manera eliminen els oxidants del medi. Els enzims encarregats de la síntesi del GSH són la  $\gamma$ -glutamilcisteinsintetasa, la qual uneix el glutàmic amb la cisteïna, i la glutatió sintetasa, que incorpora una glicina al dipèptid anterior (Meister, 1994). Les dos característiques estructurals del GSH, l'enllaç  $\gamma$ -glutamil i el grup  $-\text{SH}$ , li donen estabilitat intracel·lular i també li permeten dur a terme la seva funció de protegir les cèl·lules de la toxicitat de les ROS mitjançant processos de catàlisi, metabolisme, transport i S-tiolació, a més de constituir el principal regulador de l'estat redox de les proteïnes en els diversos compartiments cel·lulars (Meister, 1988).

### 1.3.2 Seleni i dany al DNA

Con ja s'ha dit, els compostos del Se tenen el potencial d'induir dany al DNA. També està establert que la toxicitat de la forma inorgànica del Se, el selenit sòdic, està influenciada pel seu metabolisme i la producció de ROS (Letavayová et al., 2006). Dit d'una altra manera, la genotoxicitat del selenit està relacionada amb la seva activitat prooxidant en la generació de ROS. A més, la inducció de la ruptura de les cadenes de DNA està associada amb la pèrdua de

viabilitat cel·lular (Lu et al., 1995). La producció del compost tòxic  $H_2Se$  suggereix que tan les formes inorgàniques com algunes formes orgàniques del Se poden ser efectives en la inducció del dany al DNA, tot i que no necessàriament a les mateixes dosis. A més, està demostrat també que el selenit indueix mort apoptòtica degut a la fragmentació de les cadenes de DNA. Per tant, aquest dany sembla tenir un paper regulador important en l'apoptosi induïda pel selenit (Zhou et al., 2003).

Tot i que el mecanisme exacte de les modificacions al DNA induïdes pel selenit encara roman desconegut, el trencament de la cadena simple i doble del DNA (Lu et al., 1995; Zhou et al., 2003) i les lesions en les bases nitrogenades (Wycherly et al., 2004) semblen les conseqüències més probables d'aquesta toxicitat. Per tal d'eliminar aquest dany, la cèl·lula ha desenvolupat diversos mecanismes de reparació. La via més important de reparació de dany en bases de DNA, "forats" buits i trencaments de cadena simple és la reparació per excisió de nucleòtids (NER). D'altra banda, els errors de replicació són reparats per la via de reparació de desaparellaments ("mismatch repair", MMR), i els trencaments de doble cadena de DNA per processos de recombinació homòloga (HR) o unió d'extrems no homòlegs ("non-homologous end-joining", NHEJ). Tot i així, existeixen alguns agents que poden interferir amb la reparació del DNA, incrementant d'aquesta manera les conseqüències adverses de les lesions d'aquest. Dins d'aquest grup es troben alguns compostos metàl·lics cancerígens com el níquel, el cobalt, el cadmi o l'arsènic. Aquests ions metàl·lics tenen com a diana les estructures "dits de zinc" de les proteïnes reparadores del DNA (Hartwig i Schwerdtle, 2002). A més, també s'ha demostrat que els compostos del Se que són reduïts a selenur podrien inactivar els processos de reparació de DNA a través de l'oxidació dels "dits de zinc" de les proteïnes reparadores (Ho, 2004). Aquest fenomen es deu a la reactivitat que té el Se amb els grups tiol, ja sigui interferint amb la integritat de les proteïnes reparadores del DNA o amb la seva funció, accentuant d'aquesta manera les conseqüències adverses que comporten les lesions al DNA (Hartwig et al., 2003; Blessing et al., 2004).

#### **1.4 El llevat *Saccharomyces cerevisiae* com a organisme model d'estudi de la toxicitat per seleni**

Tot i que *S. cerevisiae* és un organisme unicel·lular, representa un model adequat per estudiar les bases moleculars de la toxicitat generada pel Se per diversos motius. Primer, l'ús d'aquest



microorganisme és avantatjós ja que manca de selenoproteïnes, és a dir, no incorpora Se a les proteïnes via selenocisteïna, permetent d'aquesta manera separar els efectes metabòlics del Se dels efectes funcionals. Un segon motiu és que *S. cerevisiae* serveix com a model d'estudi directe mitjançant aproximacions genètiques, també aplicable per resoldre els components i mecanismes involucrats en la toxicitat per Se. Dins d'aquestes aproximacions genètiques, els anàlisis amb microordenaments i l'ús de genoteques de mutants es poden adaptar fàcilment a aquest model, ja que ambdues tècniques representen eines molt potents per trobar respostes genètiques relacionades amb el Se i determinar com els nivells transcripcionals de determinats gens varien front l'exposició d'aquest agent.

En *S. cerevisiae*, la forma més tòxica del Se és el selenur, el qual es forma a partir d'altres formes del Se com per exemple el selenit (veure **Figura 1**). L'entrada del Se al llevat té lloc en presència de grups tiols externs, i preferentment ho fa en forma de  $H_2Se$  (Tarze et al., 2007). Aquest compost no només entra a dins de la cèl·lula amb major eficiència que el selenit, sinó que a més és susceptible de ser l'espècie responsable de la toxicitat. Possiblement, el  $H_2Se$  promou un canvi en el rati entre el GSH i el GSSG. Per tant, la presència de  $H_2Se$  a la cèl·lula causa l'oxidació del GSH (Tarze et al., 2007). A més, les ROS generades a partir de la reacció del  $H_2Se$  amb l'oxigen molecular dins la cèl·lula (Seko i Imura, 1997) també contribueixen en l'oxidació del GSH. Eventualment, la disminució dels nivells intracel·lulars de GSH podria generar estrès oxidatiu, explicant d'aquesta manera els efectes genotòxics del selenit observats en *S. cerevisiae* (Anjaria i Madhvanath, 1988; Pinson et al., 2000).

### 1.4.1 Dany al DNA en cèl·lules de *S. cerevisiae* exposades a selenit

Un cop dins de la cèl·lula del llevat, el selenit (o derivats) causa trencament de la doble cadena de DNA i aturada del cicle cel·lular (Letavayová et al., 2008; Pinson et al., 2000). Recentment s'ha demostrat que, en cèl·lules de llevat, el  $H_2Se$  indueix aquestes lesions del DNA a través d'un mecanisme dependent estrictament de la presència d' $O_2$  (Peyroche et al., 2012). El selenit afecta al creixement cel·lular degut al retard de la mitosi i la reducció de la viabilitat. Aquest retard mitòtic depèn del gen *RAD9*, que codifica per una proteïna requerida per l'aturada del cicle cel·lular en fase G1/S, intra-S i G2/M. Aquest fenotip suggereix que el "checkpoint" en mitosi dependent de *RAD9* és crític per la reparació del dany al DNA induït per selenit. Aquest dany específic no és reparat per la via NER, per la via de reparació per escissió de bases o "base excision repair" (BER), ni per les de recombinació, però per contra es converteix en mutacions

per la via de reparació dependent de *REV3*, permetent d'aquesta manera la progressió del cicle cel·lular (Pinson et al., 2000).

D'altra banda, el selenit indueix el trencament de doble cadena de DNA (DSB) de forma dosi-dependent. Aquest tipus de dany no es produeix directament, però sí a través del trencament generat en la cadena simple de DNA. Aquesta conversió succeeix freqüentment en cèl·lules que s'estan replicant, on els trencaments no reparats de les cadenes simples de DNA (SSB) o altres tipus de danys al DNA processats via intermediaris de SSB donen lloc a DSB. Per tant, la inducció de DSB generada pel selenit és més elevada en cèl·lules de llevat creixent exponencialment que en aquelles que es troben en fase estacionària. Tanmateix, el selenit també pot induir DSB directament de forma independent de la replicació del DNA (Letavayová et al., 2008).

Aquests efectes genotòxics del selenit provoquen que mutants en diverses vies de reparació del DNA manifestin una sensibilitat elevada front aquest agent. Dins d'aquestes vies de reparació, es va estudiar el rols de les vies NHEJ i BER en la contribució a la supervivència, inducció de DSB, freqüència mutagènica i tipus de mutacions davant l'exposició a selenit en *S. cerevisiae* (Mániková et al., 2010). En primer lloc, es va veure que la via NHEJ no jugava cap paper en la reparació de les lesions del DNA, contràriament a la via BER. Dins d'aquesta via, les activitats responsables del bloqueig de l'extrem 3' terminal semblaven les més crucials en la manifestació dels efectes tòxics del selenit en el llevat. Segon, ni la via NHEJ com tampoc la BER estaven relacionades amb la inducció de DSB per selenit. A més, la deficiència d'ambdues vies no alterava la freqüència de mutació de forma significativa.

D'altra banda, s'han realitzat experiments de sensibilitat a selenit emprant una col·lecció de soques de *S. cerevisiae* mutants en diferents gens que representen tres processos relacionats amb l'estrès per selenit: la via de reparació de DNA dependent de *RAD9*, la via de tolerància al dany de DNA dependent de *RAD6/RAD18* i finalment els mecanismes de defensa front dany oxidatiu (Seitomer et al., 2008). Com a resultat, es va observar que entre el 64 i 72% de les soques mancades de gens de les vies de reparació *RAD9* o de tolerància *RAD6/RAD18* mostraven sensibilitat al selenit. A més, aquest agent també interferia en el creixement d'un 21 a 25% de les soques deficientes en gens relacionats amb l'estrès oxidatiu. Per tant, es va poder demostrar com aquestes vies són importants en el llevat per protegir-lo front el dany genotòxic i el dany oxidatiu causats pel selenit.

Un treball més recent i més extensiu (Mániková et al., 2012) ha emprat la combinació d'anàlisis transcriptòmics i genètics sistemàtics per intentar aclarir els mecanismes relacionats amb la toxicitat induïda pel selenit en *S. cerevisiae*. A partir dels mutants de la genoteca que presentaven inhibició del creixement en presència de l'agent, s'han identificat i agrupat diversos gens en diferents subgrups. La majoria d'aquests codifiquen principalment per proteïnes involucrades en la resposta i reparació del dany a DNA, funcions vacuolars, metabolisme del GSH, transcripció i metabolisme de la cromatina. Dins del primer subgrup, s'han fet estudis més detallats on s'ha observat una interacció sinèrgica entre les vies de reparació post-replicativa (PRR) i HR, i una altra entre aquesta última ruta i el metabolisme del GSH. Finalment, anàlisis genètics per microordenaments han revelat dos categories de gens que responen a la toxicitat induïda pel selenit, concretament els del metabolisme dels aminoàcids i els implicats en la generació de precursors metabòlics i energia, els quals estan induïts i reprimits, respectivament (Mániková et al., 2012).

### **1.4.2 Seleni i estrès oxidatiu**

Addicionalment als efectes nocius al DNA, el selenit esdevé un compost prooxidant en *S. cerevisiae* ja que es redueix a  $H_2Se$  (**Figura 1**) amb la subsegüent formació de radicals superòxid, els quals poden generar altres ROS i causar, per tant, estrès oxidatiu. Aquesta reacció provoca també l'oxidació del GSH i, eventualment, aquesta davallada de la forma reduïda pot desencadenar també estrès oxidatiu i dany a altres macromolècules (Tarze et al., 2007).

En *S. cerevisiae* la resposta a estrès oxidatiu implica diversos sistemes enzimàtics de defensa, tant per eliminar les ROS com per reparar els danys produïts per aquestes (Herrero et al. 2008). Entre aquests sistemes estan les glutaredoxines (GRXs). Les GRXs són oxidoreductases tiòliques que regulen l'estat redox de les cisteïnes dels grups tiol (una diana principal dels oxidants de proteïnes) emprant el GSH com agent reductor (Lillig et al., 2008). *S. cerevisiae* conté 8 GRXs (de Grx1 a Grx8), les quals es divideixen en dos subfamílies i es troben en compartiments cel·lulars diferents. Les GRXs ditiòliques Grx1 i Grx2, que contenen el motiu CPYC en el seu centre actiu, es localitzen principalment al citoplasma, tot i que una petita porció de Grx2 es troba al mitocondri (Luikenhuis et al., 1998; Porras et al., 2006). Grx3, Grx4 i Grx5 formen la família de GRXs monotíliques (amb el domini CGFS en el centre actiu) i tenen funcions relacionades amb l'homeòstasi del ferro i la síntesi de centres ferro-sofre al mitocondri (Herrero i de La Torre-Ruiz, 2007; Pujol-Carrion et al., 2006; Rodríguez-

Manzanaque et al., 1999). Grx6 i Grx7 són GRXs associades a les membranes de la ruta secretora primerenca, tot i que la seva funció roman desconeguda (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008). Aquestes GRXs tenen una única cisteïna al seu centre actiu, però la seva seqüència d'aminoàcids és més similar a la de les ditiòliques. Finalment, Grx8 es troba al citoplasma i conté el motiu CPDC al seu centre actiu, amb poca activitat en assaigs *in vitro* (Eckers et al., 2009).

Pel que fa a les GRXs ditiòliques, Grx1 confereix protecció davant de l'anió superòxid i dels hidroperòxids, mentre que Grx2 està especialitzada en la protecció front hidroperòxids (Luikenhuis et al., 1998). Aquest fenotip es pot explicar basant-se en l'activitat d'aquestes GRXs com a glutatió peroxidases en assaigs *in vitro* (Collinson et al., 2002). Altres autors van descriure la major supervivència d'un mutant *grx2* comparada amb la d'una soca salvatge en presència de cadmi, el qual indirectament causa estrès oxidatiu a través de la disminució de GSH (Gomes et al., 2008). A més, també es va posar de manifest la hipersensibilitat del doble mutant en Grx1 i Grx2 al selenit, tenint ambdues GRXs un paper redundat en la protecció front aquest agent (Lewinska i Bartosz, 2008). Aquest fenotip va ser observat també en *Caenorhabditis elegans*, on la mutació en el gen *GLRX-21*, el qual codifica per una GRX homòloga a Grx1/2, fa que l'animal sigui hipersensible en l'impediment de motilitat induït pel seleni, però no arriba a provocar letalitat (Morgan et al., 2010).

D'altra banda, el selenit també provoca carbonilació proteica en *S. cerevisiae*, que és un altre marcador d'estrès oxidatiu intracel·lular (Izquierdo et al., 2010). Aquest estudi també va demostrar que els efectes tòxics del selenit en llevat causen la pèrdua de la integritat de la membrana cel·lular i genotoxicitat a temps inicials de tractament, i que ambdós efectes es veuen incrementats en absència de Grx1 i Grx2. Després de temps llargs d'incubació amb l'agent, aquest provoca una morfologia nuclear anormal i l'aparició de cèl·lules TUNEL positives, propietat que és considerada com a marcador apoptòtic en cèl·lules de llevat, essent aquest segon efecte independent de les proteïnes Grx1 i Grx2. Per tant, el paper protector d'ambdues GRXs queda restringit a fases inicials de tractament amb selenit (Izquierdo et al., 2010). L'estrès oxidatiu es troba entre els inductors d'apoptosi en llevat (Perrone et al., 2008). Diversos metalls i metal·loids també causen apoptosi, i aquest efecte probablement està relacionat amb el seu paper en la generació de ROS.

### 1.4.3 Detoxificació del seleni en *S. cerevisiae*

Per poder entendre millor els efectes tòxics del seleni, s'han estudiat els processos cel·lulars relacionats amb la seva detoxificació. Aquest procés implica tres gens: *SSU1*, *GLR1* i *RPS6A*, que codifiquen per una bomba de detoxificació de sulfits de la membrana plasmàtica, una glutatió reductasa que converteix el GSSG a GSH i una proteïna de la subunitat petita ribosomal (40S), respectivament (Brozmanová et al., 2010). La sobreexpressió d'aquests gens fa incrementar la resistència de *S. cerevisiae* al selenit. El mecanisme d'acció de la proteïna Ssu1 no està del tot clar, però possiblement permet la sortida del selenit de les cèl·lules disminuint per tant la seva concentració intracel·lular. D'altra banda, la sobreexpressió de la proteïna Glr1 promou la reducció del selenit a  $\text{Se}^0$ , el qual és menys tòxic. Els compostos derivats del selenit probablement són transportats cap a la vacuola com a conjugats del glutatió per la proteïna Ycf1, una bomba vacuolar que també està involucrada en la detoxificació del cadmi i altres metalls (Pinson et al., 2000). El segrest del selenit a la vacuola depèn de la reducció enzimàtica d'aquest agent a  $\text{Se}^0$  en el citoplasma, la qual està relacionada amb l'activitat de l'ATPasa V-H<sup>+</sup>. La reducció del selenit també està influenciada per les condicions mediambientals, com per exemple la seva concentració, temperatura, pH i temps d'incubació (Falcone i Nickerson, 1963). A més, aquesta reacció enzimàtica és més eficient en cèl·lules que han aturat el seu procés de divisió que en aquelles que s'estan replicant (Brozmanová et al., 2010).

La proteïna Ycf1 no participa en la detoxificació del selenit ja que mutants *ycf1* són més resistents a selenit que la soca salvatge (Pinson et al., 2000). Una possible explicació per aquest fet és que en presència de Ycf1, el selenit és transportat a la vacuola com a conjugat del glutatió resultant així en la reducció del GSH i del selenit al citoplasma. Tot i que pot entrar selenit addicional dins la cèl·lula provinent del medi, el glutatió segrestat a la vacuola no es regenera, per tant una soca mutant en *YCF1* té tot el glutatió disponible en el citoplasma per reduir el selenit ja que aquest no serà mai retingut a la vacuola. A més, els efectes de la sobreexpressió de *GLR1* i la mutació en *YCF1* no són additius, el qual significa que aquests efectes es troben involucrats en el mateix mecanisme (Pinson et al., 2000). Tanmateix, cadascun d'aquests efectes és additiu amb la sobreexpressió de *SSU1*. D'altra banda, la sobreexpressió de *YCF1* provoca major sensibilitat a selenit en *S. cerevisiae* (Lazard et al., 2011). Un cop el selenit s'incorpora a la cèl·lula, ràpidament es converteix a GSSeSG degut a la concentració intracel·lular elevada del GSH (més de 10mM). A més, aquest conjugat és un substrat d'alta afinitat pel transportador Ycf1, igual que el GSSG. Quan el GSSeSG està dins de

la vacuola es converteix ràpidament a  $H_2Se$ , amb la producció simultània de GSSG. El  $H_2Se$  pot difondre passivament a través de la membrana vacuolar cap al citosol, de manera que el resultat net d'aquest cicle és l'acumulació de GSSG a la vacuola sense el benefici del segrest del seleni en aquest orgànu. Aquest fenomen fa disminuir els nivells de GSH en cèl·lules sobreexpressores de Ycf1, i el rati GSH/GSSG és sis cops més baix que en soques salvatges. Aquesta davallada provocaria per tant el dany cel·lular induït pel selenit en soques sobreexpressores de YCF1 (Lazard et al., 2011).

#### 1.4.4 Mecanismes de transport del seleni

Diversos organismes han d'assegurar-se l'entrada del Se a les cèl·lules per mantenir el seu metabolisme, tot i que no en el cas de *S. cerevisiae*. El Se i el sofre són elements que tenen algunes propietats químiques en comú, per tant, ambdós comparteixen vies metabòliques. Conseqüentment, es va demostrar que el selenat entra en les cèl·lules de *S. cerevisiae* a través de les sulfat permeases (Cherest et al., 1997). De la mateixa manera, en plantes el selenat entra per les arrels a través de la via d'alta afinitat de transportadors de sulfats (Sors et al., 2005).

La caracterització de les cinètiques de l'absorció del selenit van suggerir l'existència de dos sistemes de transport: el sistema d'alta afinitat a baixes concentracions de seleni i el sistema de baixa afinitat a concentracions elevades (Gharieb i Gadd, 2004). Addicionalment, existeix una correlació entre la resistència a la toxicitat per selenit i l'expressió d'un transportador de fosfat d'alta afinitat en el llevat (Pinson et al., 2004). El fosfat és un nutrient essencial requerit per nombrosos processos biològics com la biosíntesi dels àcids nucleics i dels fosfolípids. En *S. cerevisiae*, el fosfat inorgànic entra a la cèl·lula a través de cinc transportadors (Wykoff i O'Shea, 2001). Tres d'ells, Pho87, Pho90 i Pho91, són expressats constitutivament i incorporen fosfat amb baixa afinitat (Auesukaree et al., 2003). El sistema de transport d'alta afinitat està format per les proteïnes Pho84 i Pho89, i la seva transcripció està regulada per una via de transducció de senyal en resposta a la privació de fosfat (Martinez et al., 1998; Zvyagilskaya et al., 2008). Amb aquestes dades anteriors, altres autors van demostrar que el transportador de fosfat d'alta afinitat Pho84, igual que els de baixa afinitat, són capaços d'incorporar el selenit en *S. cerevisiae* (Lazard et al., 2010). El mecanisme d'aquest sistema de transport emprat oportunísticament pel selenit depèn de la concentració de fosfat al medi. A baixes concentracions (fins a 0,4 mM), el selenit entra a la cèl·lula principalment pel transportador d'alta afinitat Pho84. Quan el fosfat és abundant, el paper de Pho84 esdevé negligible, i el

selenit s'internalitza a través d'un o de tots els transportadors de baixa afinitat de fosfat (Lazard et al., 2010). Existeixen altres metal·loides tòxics que entren també a través d'aquest sistema de transport, com per exemple, l'arsenat, tant en organismes procariotes com en eucariotes (Rosen i Liu, 2009). Pho84 és lleugerament més eficient en el transport de selenit que els transportadors de baixa afinitat. Tot i així, Pho84 té molta més afinitat pel fosfat que pel Se. Per tant, el transportador d'alta afinitat és molt selectiu pel fosfat mentre que el sistema de baixa afinitat és molt menys discriminatori (Lazard et al., 2010). La inhibició competitiva de l'entrada del selenit pel fosfat ha estat documentada també en diverses espècies de plantes (Li et al., 2008), a l'alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Riedel i Sanders, 1996) i en el fong dimòrfic *Candida albicans* (Falcone i Nickerson, 1963). Per tant, l'entrada del selenit per la via de transport del fosfat és un mecanisme bastant general, almenys en plantes, algues i fongs.

D'altra banda, en presència de fonts de carboni alternatives a la glucosa, el selenit és incorporat a *S. cerevisiae* a través de la proteïna Jen1. Jen1 és un transportador que catalitza la internalització de metabòlits cel·lulars monocarboxilats com el piruvat i el lactat i permet l'entrada del selenit amb elevada afinitat, essent el responsable de la major part d'acumulació d'aquest agent en el llevat creixent en medi no fermentatiu (Mcdermott et al., 2010). L'expressió de *JEN1* ve regulada per les condicions del cultiu i per les fonts de carboni com la glucosa (Chambers et al., 2004). Aquesta regulació és lògica ja que els compostos monocarboxilats són emprats com a combustible quan altres fonts de carboni fermentatives preferibles són absents (Casal et al., 2008). Tal i com era d'esperar, el transport del selenit està també regulat per les condicions del cultiu i per la glucosa. A més, aquest transport es veu incrementat en condicions anaeròbiques amb fonts de carboni no fermentatives, on l'expressió de *JEN1* augmenta considerablement (Lewinska i Bartosz, 2008). El motiu pel qual el selenit és internalitzat a través d'un transportador de nutrients és perquè aquest comparteix una similitud estructural significativa amb altres substrats de Jen1 com el format, l'acetat, el piruvat i el lactat. A més, el selenit i el lactat s'inhibeixen de forma recíproca la seva entrada a la cèl·lula de manera competitiva. Jen1 transporta múltiples àcids carboxílics com el piruvat i el lactat amb la mateixa inhibició competitiva entre ambdós metabòlits (Cássio et al., 1987; Casal et al., 1996). Per tant, es pot entendre que el selenit i els substrats monocarboxilats siguin translocats via Jen1 emprant un mecanisme similar.

#### 1.4.5 Anàlisi transcriptòmic de l'efecte del selenit en *S. cerevisiae*

Estudis transcriptòmics en cèl·lules de *S. cerevisiae* tractades amb selenit en medi ric mostren la inducció de diverses categories funcionals de gens (Salin et al., 2008). Aquests estudis van suggerir que un dels efectes primerencs del selenit sobre l'expressió gènica és la inducció d'una resposta a la manca de ferro, la qual està regulada pels factors de transcripció Aft1 i Aft2 (Courel et al., 2005; Shakoury-Elizeh et al., 2004; veure apartat **2.3**). El selenit afectaria a l'homeòstasi del ferro a dos nivells, no exclusius entre ells. Primer, podria interaccionar amb el ferro del medi amb alta afinitat (Su i Suarez, 2000) fent que aquest metall quedés inaccessible per la cèl·lula. En segon lloc, podria interferir en l'homeòstasi del ferro reemplaçant el sofre dels centres ferro-sofre de les proteïnes mitocondrials o d'altres compartiments cel·lulars (Rutherford et al., 2005).

D'altra banda, els anàlisis transcriptòmics esmentats mostraven la inducció de gens relacionats amb la resposta a estrès general i amb la degradació proteica (Salin et al., 2008). Tal i com ja s'ha explicat, el selenit indueix una resposta forta a estrès oxidatiu. Aquest podria afectar a l'homeòstasi redox de diverses formes. En primer lloc, cada molècula de selenit conté tres àtoms d'oxigen, el qual podria generar les ROS durant la seva reducció. A més, el selenit és metabolitzat mitjançant la interacció amb derivats tiòlics, incloent el glutatió (**Figura 1**), conduint probablement a un desequilibri en l'homeòstasi redox. Finalment, com s'ha mencionat abans, el selenit podria interferir amb l'homeòstasi del ferro i la biosíntesi i estructura dels centres ferro-sofre, afectant en un grau elevat l'activitat mitocondrial i l'homeòstasi redox (Toledano et al., 2007).

## **2 EL REGULÓ AFT1 I EL TRANSPORT DE FERRO EN EL LLEVAT**

### **2.1 La importància i el paper del ferro a la cèl·lula**

El ferro (Fe) és un element essencial per tots els organismes eucariotes. La facilitat d'aquest element en perdre i guanyar electrons li permet participar en una àmplia varietat de reaccions d'oxidació-reducció. A més, els cofactors de Fe, com els centres ferro-sofre (ISC) i els grups hemo, són requerits per l'activitat de nombrosos enzims que estan involucrats en un rang molt extens de processos cel·lulars. El Fe es troba com a grup prostètic de les proteïnes en formes



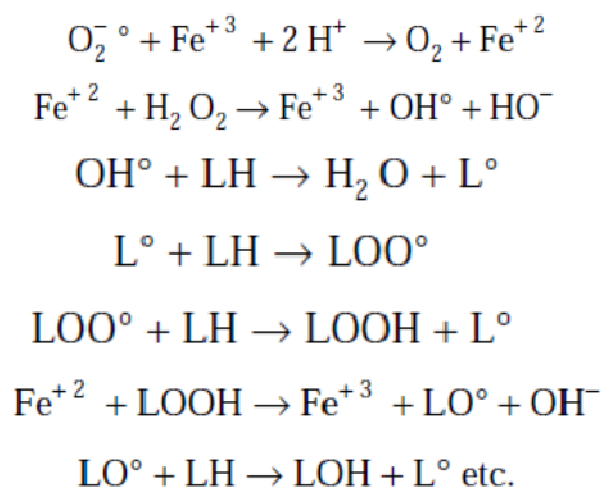
diverses: ferro elemental, oxoferro o oxoferro-zinc, hemo i centres ferro-sofre (Kaplan i Kaplan, 2009).

Tot i que, com ja s'ha esmentat, s'evidencia la utilitat del Fe en moltes reaccions bioquímiques degut al gran nombre de proteïnes on es troba, aquest element també és problemàtic per dos motius. En primer lloc, la mateixa facilitat en el guany i en la pèrdua d'electrons permet que el ferro doni electrons a l'oxigen o al  $H_2O_2$  generant radicals de l'oxigen tòxics,  $O_2^{\bullet -}$  i  $OH^{\bullet}$ . Aquestes ROS poden danyar les membranes cel·lulars, les proteïnes i el DNA (Gutteridge et al., 1982). Existeixen proteïnes que segresten el Fe per tal de reduir aquest fenomen. Els ions de Fe circulen pel plasma units a la transferrina, i s'acumulen a la cèl·lula en forma de ferritina. Sota condicions normals, mai s'aprecia una concentració elevada de Fe lliure (o Fe quelat per compostos de baix pes molecular). Qualsevol alliberament de Fe (II) és immediatament quelat en les cèl·lules per compostos com el citrat o l'adenosina difosfat. D'aquesta manera s'evita l'alta toxicitat del Fe lliure, ja que aquest pot catalitzar la formació del  $OH^{\bullet}$  (Emerit et al., 2001) a través de la reacció de Haber–Weiss. El radical  $OH^{\bullet}$  és capaç de segrestar un àtom d'hidrogen provinent dels àcids grassos poliinsaturats (LH) per tal d'iniciar la peroxidació lipídica. Un cop acumulats els hidroperòxids lipídics (LOOH), el Fe lliure inicia directament una peroxidació lipídica addicional (**Figura 2**). Finalment, l'acumulació resultant dels hidroperòxids

lipídics destrueix l'estructura de les membranes cel·lulars i la seva funció.

El radical  $OH^{\bullet}$  és altament reactiu, de forma que pot danyar lípids, proteïnes, DNA, sucres i, en general, totes les molècules orgàniques. Aquest fet explica l'amenaça del Fe lliure o Fe quelat, ja que pot produir estrès oxidatiu, involucrat en diverses manifestacions patològiques

(arteriosclerosi, diabetis, vellesa, etc) (Emerit et al., 2001).



**Figura 2.** Seqüència de reaccions per la formació d'hidroperòxids lipídics, entre elles la reacció de Haber - Weiss [adaptat de (Emerit et al., 2001)]. Veure el text pels detalls.

D'altra banda, el motiu pel qual el Fe és problemàtic es deu a que la seva biodisponibilitat és escassa. Tot i que el Fe és un metall abundant en l'escorça terrestre, es troba en una forma

biològica inaccessible, és a dir, en forma fèrrica. La propensió del Fe a reaccionar amb l'oxigen fa que l'hidròxid fèrric sigui la forma més abundant del Fe, la qual és poc soluble a pH neutre. Per tant, el Fe pot ser un factor limitant pel creixement, de manera que organismes unicel·lulars i plantes han desenvolupat estratègies sofisticades per adquirir Fe de l'ambient.

## 2.2 Mecanismes de transport i senyalització del ferro en *S. cerevisiae*

### 2.2.1 Captació de ferro extracel·lular

*S. cerevisiae* expressa dos sistemes separats per la captació de Fe en condicions de dèficit d'aquest metall, anomenats via reductiva i via no reductiva (Philpott i Protchenko, 2008). Les sals i els quelats fèrrics són incorporats per la via reductiva, mentre que la via no reductiva reconeix exclusivament sideròfors. Els sideròfors són molècules orgàniques que tenen alta afinitat pel Fe (Haas et al., 2008). Aquests són secretats fora de la cèl·lula cap al medi i seguidament tornen a entrar conjugats amb  $\text{Fe}^{3+}$ . La captació dels complexos sideròfor-Fe es dona a través dels transportadors de la superfície cel·lular, els quals són específics per cada sideròfor diferent. La síntesi i transport dels sideròfors ve regulada per la demanda de Fe i es veu incrementada sota condicions de falta d'aquest element. *S. cerevisiae* no es genera els seus propis sideròfors tot i que sí expressa els seus transportadors de Fe, de manera que es beneficia dels sideròfors produïts per altres organismes.

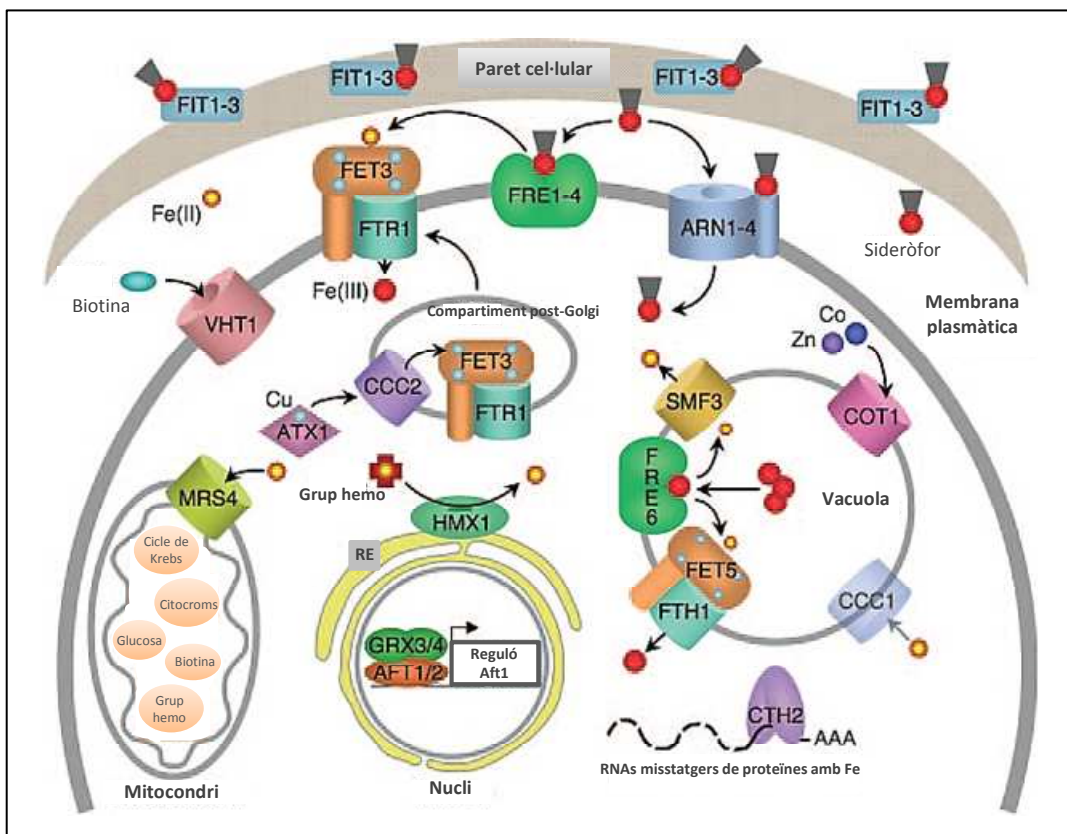
#### 2.2.1.1 La via reductiva

La via reductiva de captació de Fe és un procés diferenciat en dos passos (**Figura 3**), on el Fe fèrric és reduït en primer lloc a l'estat ferrós i, en aquesta forma, és transportat al citosol a través d'un complex d'alta afinitat específic del Fe ferrós. El pas de reducció del Fe fèrric a ferrós és catalitzat per productes de la família gènica *FRE*. Aquests gens codifiquen per flavocitocroms que duen a terme la major part d'activitat ferroreductasa de la superfície cel·lular, i també desestabilitzen una gran quantitat de sideròfors en ambients pobres en Fe. El Fe reduït té baixa afinitat pels lligands sideròfors, de manera que la reducció dels complexos Fe-sideròfor resulta en l'alliberació del Fe ferrós i la subsegüent captació pels transportadors específics d'aquest metall. Els productes dels gens *FRE1-4* es troben a la membrana plasmàtica, mentre que el de *FRE6* es localitza a la vacuola, on s'encarrega de transportar el Fe i el coure des de la vacuola al citosol (Rees i Thiele, 2007; Singh et al., 2007). *FRE3* codifica per una reductasa que catalitza la reducció del Fe unit a sideròfors d'hidroxiamat, mentre que *FRE4* ho fa d'aquell unit a dihidroxiamat d'àcid rodotorulic. Totes aquestes reductases són induïdes

## Introducció

en condicions d'esgotament de Fe sota control del factor transcripcional Aft1, tot i que Fre1 també és induïda via Mac1 en condicions de disminució de coure, igual que el setè membre de la família, Fre7 (**Figura 3**).

Adicionalment, el coure juga un paper important en la captació del Fe a través de la via reductiva, ja que Aft1 indueix la transcripció de 4 gens lligats a aquest metall. El Fe reduït és captat a través d'un complex transportador d'alta afinitat que consisteix en una ferroxidasa multicoure anomenada Fet3 i una permeasa Ftr1. L'activitat oxidasa de Fet3 és requerida per la captació de Fe, i el coure és necessari per aquesta funció. Aquest metall s'incorpora post-traduccionalment a Fet3 en un compartiment post-Golgi de la via secretora, i aquesta inserció la duen a terme la xaperona de coure Atx1 i el transportador de coure Ccc2, ambdós regulats pel Fe (**Figura 3**). L'oxigen molecular és necessari també per l'activitat de Fet3 i, sota condicions d'hipòxia, les cèl·lules del llevat expressen un transportador de baixa afinitat pel Fe ferrós anomenat Fet4, que s'empra com a sistema de captació de Fe independent de l'oxigen (Hassett et al., 1998; Jensen i Culotta, 2002).



**Figura 3.** Mecanismes de transport i senyalització de *S. cerevisiae* en condicions d'esgotament de Fe [adaptat de (Philpott i Protchenko, 2008)]. Veure el text pels detalls.

### 2.2.1.2 La via no reductiva

Per aquesta via, *S. cerevisiae* pot incorporar diversos quelats de Fe i sideròfors a través d'un grup de transportadors homòlegs que componen la subfamília *ARN/SIT* dins de la gran família d'aquest tipus de molècules (Philpott, 2006). Cadascun d'aquests transportadors disposa de 14 dominis transmembrana per incorporar els quelats de Fe i sideròfors de forma intacta, i és específic per un grup de sideròfors bacterià o fúngic en concret. El Fe unit als sideròfors ha de ser dissociat abans que la cèl·lula el pugui utilitzar. Prèviament, els productes dels gens *FIT1-3*, localitzats a la paret cel·lular, han permès que els sideròfors units a Fe travessin aquesta (Philpott i Protchenko, 2008) (**Figura 3**). Aquests gens codifiquen per tres manoproteïnes de la paret cel·lular que es transcriuen a nivells molt elevats en condicions de falta de Fe, contribueixen a la retenció del sideròfor ferricrom a la paret cel·lular i promouen l'entrada del Fe unit a la ferroxamina B i al ferricrom mateix (Protchenko et al., 2001).

Arn1 i Arn3 són redirigits de la vacuola a la membrana plasmàtica només en presència dels seus sideròfors específics per tal de prevenir l'entrada de substrats inespecífics tòxics que s'assemblin estructural i químicament als ferricroms i a la ferrioxamina B, els quals són els seus sideròfors específics. A més, en el cas d'Arn1, la mobilització cap a la membrana involucra la unió del ferricrom a un domini receptor del mateix transportador (Froissard et al., 2007; Kim et al., 2005). Contràriament, Arn4/Enb1 es dirigeix directament a la superfície cel·lular tot i en absència del seu substrat específic, l'enterobactina (**Figura 3**).

Els sideròfors són incorporats a la cèl·lula pels transportadors Arn de forma intacta, però un cop dins, el Fe s'ha de dissociar del sideròfor per poder ser utilitzat. Tan la ferrioxamina B com el ferricrom s'acumulen com a quelats de Fe al citosol després de la seva absorció, indicant que ambdós sideròfors poden servir com a molècules d'emmagatzematge de Fe (Moore et al., 2003). Un cop al citosol, el Fe es pot alliberar del ferricrom a través de la degradació del sideròfor, tot i que els mecanismes reductius per l'alliberació de Fe encara no han sigut identificats a *S. cerevisiae*.

### 2.2.2 Mobilització de les reserves del ferro intracel·lular

Les cèl·lules del llevat poden créixer en medis mancats de Fe durant varies generacions, el que indica que expressen sistemes eficients d'emmagatzematge i mobilització de Fe. Estudis previs en llevat van descriure la vacuola com el principal compartiment de provisions de Fe, tot i que

també està present al citosol, al mitocondri, i a altres orgànuls (Raguzzi et al., 1988). Quan el Fe és abundant en el medi, les vacuoles l'acumulen mitjançant l'activitat del transportador de Fe i manganès Ccc1 (Chen i Kaplan, 2000; Lapinskas et al., 1996). El segrest del Fe a la vacuola protegeix les cèl·lules dels efectes tòxics d'aquest metall i permet el seu ús quan aquest és escàs en el medi extracel·lular (Li et al., 2001). Es desconeix la forma molecular en què es troba el Fe dins de la vacuola, tot i que es creu que podria estar formant complexos amb polifosfats o àcid orgànics presents allí.

Quan els nivells de Fe extracel·lular disminueixen, la funció de Ccc1 desapareix i s'expressen proteïnes vacuolars regulades per Aft1 que permeten el flux del Fe des de la vacuola al citosol per tal de pal·liar aquesta deficiència. Aquestes proteïnes fan duplicar els sistemes de transport de Fe que es troben presents a la membrana plasmàtica de diverses formes. Addicionalment, proteïnes de la superfície cel·lular paràlogues als complexos de transport de Fe d'alta afinitat es troben també a la membrana vacuolar i s'expressen sota condicions de manca de Fe. Fet5 i Fth1 formen part d'un complex que es creu que funciona de forma similar al complex Fet3-Ftr1 (Urbanowski i Piper, 1999) (**Figura 3**). Smf3 és un altre transportador que participa amb Fre6 en l'alliberació del Fe de la vacuola (Singh et al., 2007), i és l'únic membre de la família de transportadors metàl·lics divalents en el llevat que està regulat pel Fe. La seva expressió depèn principalment del factor transcripcional Aft2, més que d'Aft1 (Courel et al., 2005; Rutherford et al., 2003; veure apartat **2.4.2**). Aquest transportador s'indueix també sota condicions de deficiència d'oxigen i proporciona a la cèl·lula un altre mecanisme de mobilització del Fe de la vacuola que és independent de l'oxigen.

En condicions de manca de Fe les cèl·lules de llevat són sensibles també als efectes tòxics d'altres metalls com el cobalt, el coure, el zinc i el manganès. La disminució dels nivells de Fe promou l'expressió de Cot1 (de manera dependent a Aft1) (Shakoury-Elizeh et al., 2004), un transportador de la membrana vacuolar que té especificitat per metalls com el zinc i el cobalt, i per tant promou la seva acumulació a la vacuola (MacDiarmid et al., 2000).

A part de la vacuola, el Fe cel·lular també es troba al mitocondri, l'orgànul on s'incorpora als grups hemo i als ISC. Per tant, ambdues formes constitueixen una reserva important de Fe que pot ésser mobilitzada pel seu ús durant la deficiència d'aquest metall. *HMX1* codifica per una oxigenasa del grup hemo i és activament transcrit en condicions de manca de Fe (Kim et al., 2006; Protchenko i Philpott, 2003). Hmx1 es localitza a la cara citosòlica del reticle

endoplasmàtic i s'encarrega de la degradació dels grups hemo. Aquesta degradació fa que no s'activin els factors transcripcionals Hap1/2/3/4 i 5. Aquestes proteïnes regulen l'expressió de gens que codifiquen per components dels citocroms de la cadena respiratòria, els quals contenen Fe. Per tant, en condicions de manca de Fe, Hmx1 serveix tant per alliberar el Fe dels grups hemo com per la disminució del seu flux als complexos respiratoris.

### 2.2.3 Remodelació metabòlica en resposta a la manca de ferro

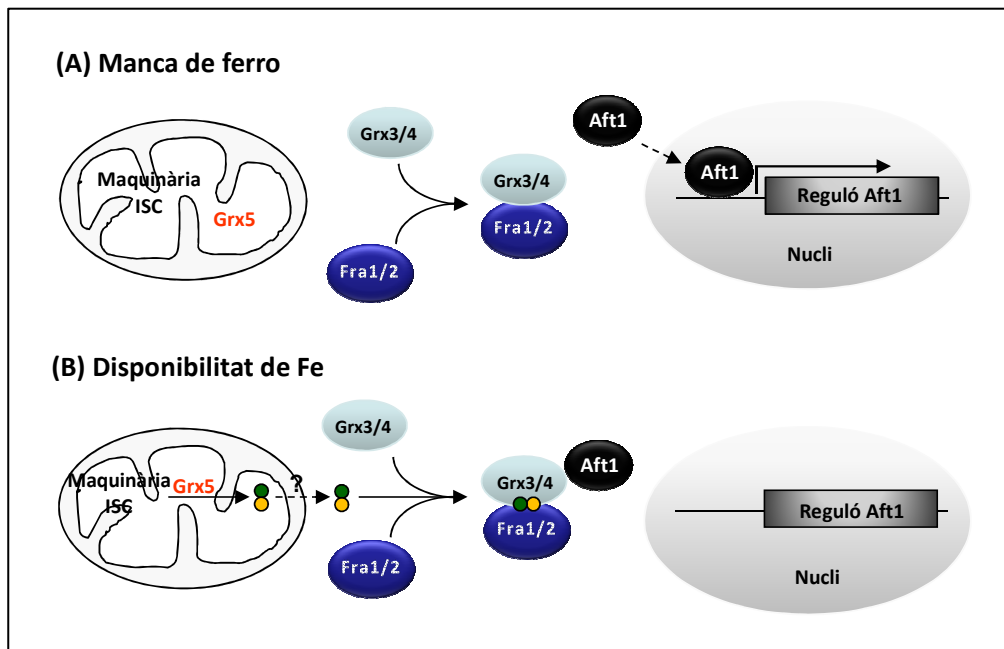
L'anàlisi transcripcional de la resposta a la manca de Fe suggereix que les cèl·lules de llevat responen a aquest dèficit alterant l'ús del seu Fe, retirant-lo de les rutes metabòliques no essencials i mantenint-lo en les que sí ho són. La proteïna Cth2 s'expressa de forma abundant en condicions d'esgotament de Fe i la seva inducció també està regulada per Aft1 (Puig et al., 2005). Cth2, i la seva proteïna paràloga Cth1, són membres d'una família de proteïnes d'unió al RNA i reconeixen elements rics en AU que es troben en regions no traduïdes 3' (3'-UTR) de mRNAs específics. La unió de Cth2 a aquests elements rics en AU porta a la desestabilització i degradació d'aquests transcrits (**Figura 3**). Entre d'altres, Cth2 s'uneix específicament a les 3'-UTRs dels mRNAs dels gens *SDH4* i *ACO1*, que codifiquen per una subunitat d'unió al grup hemo de la succinat deshidrogenasa i de l'enzim amb ISC aconitasa, respectivament (Puig et al., 2005). Per tant, el grup de gens induïts per Aft1 durant la manca de Fe inclou una proteïna que disminueix els transcrits relacionats amb l'ús de Fe de forma específica. Aquest fenomen permet a la cèl·lula dirigir el Fe que normalment s'incorporaria a la seva ruta metabòlica cap a una altra d'essencial (Philpott i Protchenko, 2008). Un altre exemple d'aquest tipus de remodelació metabòlica regulada per Cth2 és l'expressió del gen *VHT1*, el qual codifica per un transportador d'alta afinitat d'absorció de biotina a la superfície cel·lular (Stolz et al., 1999). El producte d'aquest gen permet a la cèl·lula obtenir biotina essencial de l'ambient enlloc d'emprar la seva ruta biosintètica dependent de Fe.

## 2.3 Regulació transcripcional de la resposta a la manca de ferro

La resposta principal a l'esgotament de Fe en el llevat és l'activació transcripcional d'un grup de gens que estan sota el control d'un factor transcripcional dependent de Fe, Aft1, i que es coneix globalment com reguló Aft1 (Yamaguchi-Iwai et al., 1995; Yamaguchi-Iwai et al., 1996). Aft1 s'expressa constitutivament i, quan el Fe intracel·lular és abundant, es localitza al citoplasma sense activar la transcripció (Yamaguchi-Iwai et al., 2002). D'altra banda, quan els nivells de Fe són baixos, Aft1 s'acumula al nucli, on s'uneix al DNA i activa la transcripció dels

gens del seu reguló. Més concretament, la importina nuclear Pse1 regula la translocació d'Aft1 cap al nucli a través de la interacció de Pse1 amb dos seqüències de localització nuclear d'Aft1 no clàssiques (Ueta et al., 2003). Un cop a dins, s'uneix al DNA i activa la transcripció (**Figura 4A**).

En l'exportació nuclear d'Aft1 i la inhibició de la transcripció del reguló hi intervenen varies proteïnes. La frataxina mitocondrial (Yfh1), Grx5 i el glutatió són requerits per la producció d'ISC i per la generació d'un compost desconegut que és substrat d'un transportador de la cara interior de la membrana mitocondrial anomenat Atm1. Aquest compost és exportat del mitocondri i possiblement és dirigit cap al nucli. Addicionalment, Grx3 i Grx4 són necessàries també per la inactivació d'Aft1 i la seva exportació del nucli al citosol (Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006) a través de l'exportina Msn5. Amb tota aquesta informació, es va postular un model hipotètic en què la producció del substrat resultant de la formació d'ISC és proporcional als nivells de Fe intracel·lulars, de manera que aquest compost desconegut podria acumular-se al nucli i conduir a la dimerització d'Aft1. Aquest dímers d'Aft1 formen un pont disulfur mixt, possiblement involucrant a Grx3, Grx4 i el producte de la maquinària d'ISC, i tot el complex és exportat del nucli a través de Msn5 (Philpott i Protchenko, 2008) (**Figura 4B**). Aquest complex no està regulat pels nivells de Fe cel·lulars, i no es sap si es forma exclusivament al nucli o també es pot generar al citosol. A més, el complex format entre Aft1 i Grx3/4 conté dos proteïnes addicionals anomenades Fra1 (una proteïna aminopeptidasa de tipus P) i Fra2 (una proteïna homòloga a BolA) (Kumánovics et al., 2008). En absència d'alguna d'aquestes dos proteïnes es continua activant constitutivament el reguló Aft1. Experiments *in vitro* han demostrat que Fra2 ajuda a estabilitzar el complex Aft1/Grx3-4 (Li et al., 2009). Concretament, Fra2 forma un complex heterodimèric amb ponts Fe-S amb lligands del Fe proporcionats per la cisteïna del centre actiu de Grx3/4, pel glutatió i per un residu d'histidina de Fra2. Aquesta interacció suggereix que el complex podria estar actuant com a senyal per controlar el reguló Aft1 en resposta al status del Fe cel·lular en el llevat (Li et al., 2009). Addicionalment, anàlisis genòmics comparatius han demostrat que existeix una forta concurrència en organismes entre les proteïnes de la família BolA i les GRXs que tenen el domini CGFS al centre actiu (Couturier et al., 2009; Huynen et al., 2005). Aquest fet juntament amb els estudis que demostren interaccions físiques entre els membres de les dos famílies suggereixen que les relacions funcionals entre Fra i homòlegs de Grx3/4 estan conservades evolutivament.



**Figura 4.** (A) Esquema de l'activació d'Aft1 en condicions de manca de Fe. (B) Representació de la regulació de l'activitat d'Aft1 en condicions d'abundància de Fe [adaptat de (Herrero et al., 2010)]. La interacció entre Aft1 i Grx3/4 es podria estendre també al nucli. Veure el text pels detalls.

Quan Aft1 es troba al nucli, reconeix i s'uneix a unes seqüències consens (PyPuCACCC) en la regió "up-stream" dels gens diana (Yamaguchi-Iwai et al., 1996). El seu paràleg, anomenat Aft2, mostra un 39% de similitud amb ell, reconeix les mateixes seqüències consens i pot activar també la transcripció d'alguns dels gens del reguló (Blaiseau et al., 2001; Courel et al., 2005; Rutherford et al., 2001; Rutherford et al., 2005). El paper que juga Aft2 en la resposta a la disminució dels nivells de Fe no és del tot clar, tot i que indueix la transcripció del gen *FET3* entre d'altres del reguló en un mutant *aft1*, i que a més el doble mutant *aft1 aft2* és incapaç de créixer en condicions d'esgotament de Fe (Blaiseau et al., 2001). Els dominis més semblants entre Aft1 i Aft2 es troben en la regió N-terminal de la proteïna. Aquesta regió conté quatre cisteïnes conservades incloent la seqüència CDC, la que es suposa que lliga Aft1 amb el Fe (Yamaguchi-Iwai et al., 1995). Addicionalment, Aft2 és reclutat per la mateixa seqüència nuclear de reconeixement a Aft1 o per una similar, la qual cosa indica que estaria participant en la transcripció dels mateixos gens diana que Aft1 (Blaiseau et al., 2001). D'altra banda, Aft2 també regula la transcripció d'altres gens com *SMF3* i *MRS4*, els quals no són gens diana d'Aft1 (Courel et al., 2005; Rutherford et al., 2005). Mentre que Aft1 reconeix la seqüència PyPuCACCC, Aft2 pot reconèixer seqüències alternatives presents en els promotors dels dos gens esmentats anteriorment. Aquests gens estan relacionats amb l'homeòstasi del Fe en la



vacuola i mitocondri, respectivament, per tant podria ser que Aft2 estigués preferentment relacionat amb la utilització del Fe intracel·lular (Courel et al., 2005).

### 2.4 Papers dels factors Aft1 i Aft2 en funcions independents del ferro

A banda de les funcions solapades d'Aft1 i Aft2 en la resposta als canvis en l'homeòstasi del Fe en les cèl·lules de llevat, ambdós factors també tenen papers divergents.

#### 2.4.1 Altres funcions d'Aft1 i la seva relació amb altres reguladors transcripcionals

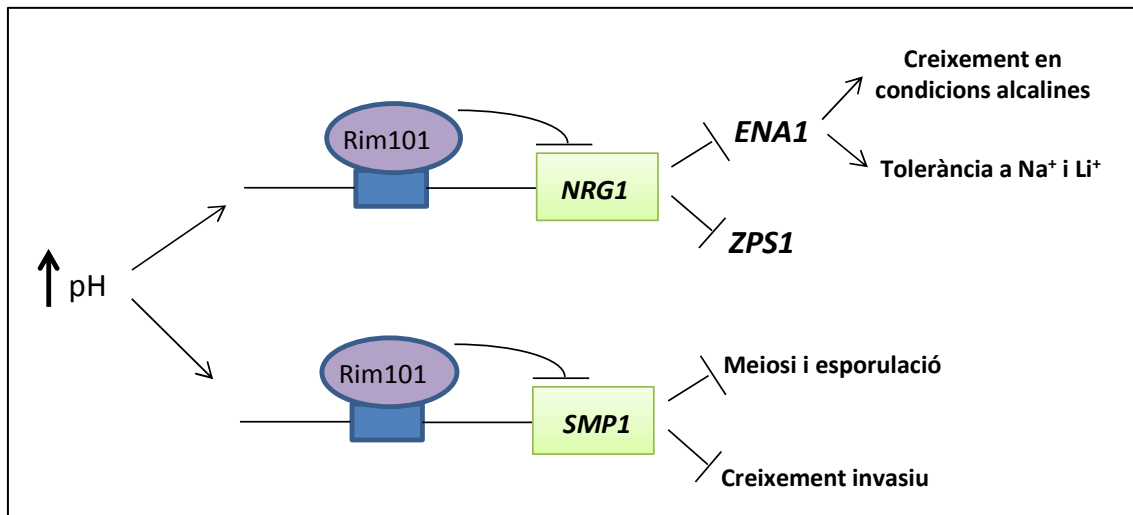
Els efectes transcripcionals d'Aft1 no es limiten a l'homeòstasi del Fe. Mutacions en *AFT1* que el fan localitzar constitutivament al nucli resulten en la modulació transcripcional de més de 200 gens implicats en una gran varietat de processos (Shakoury-Elizeh et al., 2004). Tot i que no es sap si aquests gens estan regulats directa o indirectament per Aft1, suggereix que la funció d'aquest factor transcripcional no estaria limitada a la inducció del reguló entès en sentit estRICTE.

Entre aquestes funcions alternatives, Aft1 podria estar jugant un paper en la regulació del cicle cel·lular. Cèl·lules mutants en *AFT1* són significativament més grans (Jorgensen et al., 2002) i es troben frenades en la fase G1 del cicle (White et al., 2009). D'altra banda, la sobreexpressió d'Aft1 causa aturada en G1 degut a la inhibició de la traducció de les ciclines en aquesta fase (Casas et al., 1997). Aft1 també està relacionat amb l'estabilitat cromosòmica (Measday et al., 2005; Yuen et al., 2007). Estudis d'anàlisi genètics sintètics van demostrar que mutants en *AFT1* no poden tolerar ni la sobreexpressió ni la pèrdua de funció dels gens codificants de proteïnes dels cinetocors (Measday et al., 2005). A més, aquests mutants mostraven una pèrdua d'estabilitat cromosòmica més elevada que les soques salvatges (Measday et al., 2005). El fet que Aft2 no estigués relacionat amb aquest fenomen d'inestabilitat cromosòmica suggeria que el paper d'Aft1 en aquest procés és independent de la seva funció en l'homeòstasi del Fe. Una possible explicació de com Aft1 estaria regulant el procés d'estabilitat cromosòmica és a través de la transcripció de gens determinats que codifiquin per proteïnes requerides pel manteniment del genoma i per la resistència al benomil (Berthelet et al., 2010), un agent fungicida que s'uneix als microtúbuls interferint en processos com la meiosi o el transport intracel·lular. Tot i que aquests gens mencionats no han estat identificats, sí que s'ha vist que els pocs gens que depenen d'Aft1 sota el tractament amb benomil formen part del reguló Met4 (Lee et al., 2010). Met4 interacciona amb les proteïnes Met31 i Met32, les quals

tenen estructures de “dits de zinc”, i amb la proteïna Cbf1. Estudis de doble híbrid revelen la interacció d’Aft1 amb Cbf1 (Measday et al., 2005), la qual té un paper com part del complex cinetocor que s’uneix directament al DNA centromèric. A part, altres estudis han mostrat com Aft1 també interacciona amb altres proteïnes del cinetocor, per tant, la interacció entre Aft1 i Cbf1 podria reflectir el paper funcional d’Aft1 en el cinetocor. Excepte Cbf1, no s’ha identificat cap altre gen del reguló Met4 que estigui implicat en l’estabilitat cromosòmica o en la resistència a benomil. Per tant, Aft1 potser estaria intervenint en aquest procés a través de la interacció amb proteïnes del cinetocor, més que a nivell transcripcional del reguló Met4. En aquesta línia, estudis recents demostren que Aft1 s’associa al complex cinetocor a través d’Iml3 (Hamza i Baetz, 2012), un proteïna perifèrica del cinetocor que forma part del complex Ctf19, el qual és necessari per una major associació de la cohesina al pericentròmer i a regions centromèriques tan en la mitosi com en la meiosi. A més, Aft1 també és requerit per augmentar la unió de la cohesina amb la cromatina pericèntrica, la qual és essencial per resistir a la tensió dels microtúbuls. Així, mutants en *AFT1* mostren defectes en la segregació cromosòmica durant la meiosi (Hamza i Baetz, 2012).

D’altra banda, Aft1 també participa en la reparació del dany al DNA (Kimura et al., 2007; Lee et al., 2005) i possiblement tingui algun rol funcional relacionat amb l’assemblatge de la paret cel·lular, transport de proteïnes i el mitocondri, segons el seu mapa d’interaccions genètiques (Berthelet et al., 2010). Aquesta varietat de funcions suggereix que Aft1 no afecta directament a les vies en sí mateixes sinó que afecta a proteïnes que funcionen paral·lelament a aquestes rutes i que requereixen cofactors de Fe. Així doncs, diverses sensibilitats químiques de mutants *aft1*, tals com a la hidroxidrea (HU) (Dubacq et al., 2006), al dodecilsulfat sòdic (SDS), cafeïna, cisplatina i al metil metanosulfonat (MMS), poden ser revertides per l’addició de Fe exogen (Berthelet et al., 2010). Per tant, es proposa que alguns enzims importants en la replicació del DNA, resposta a dany al DNA i relacionats amb la paret cel·lular requereixen cofactors de Fe per dur a terme la seva funció i que els nivells baixos de Fe en mutants *aft1* comprometrien la funció d’aquestes vies. Per exemple, en el cas de la resposta a dany al DNA, diverses proteïnes com Rad3 (una helicasa involucrada en NER) (Rudolf et al., 2006) i Pri1 (una subunitat de la DNA primasa que participa en la replicació del DNA i en la reparació dels DSB) (Klinge et al., 2007) requereixen els ICS per dur a terme la seva funció. Contràriament, la sensibilitat de mutants *aft1* al NaCl o al calcoflour white no es reverteix afegint Fe suplementari a la cèl·lula, de manera que Aft1 esmorteix els efectes d’aquests compostos a través d’un mecanisme independent del Fe (Berthelet et al., 2010).

A part de totes les funcions esmentades, Aft1 treballa en paral·lel amb la via de resposta a pH alcalí regulada per *RIM101* en la regulació de processos biològics similars, i ambdues vies sí estan connectades amb els nivells de Fe (Berthelet et al., 2010). La interacció perjudicial per la cèl·lula entre les mutacions *aft1* i *rim101* es pot revertir amb la incorporació extra de Fe, per tant la ruta de *RIM101* regula fenòmens que podrien estar actuant paral·lelament amb vies dependents del Fe. *RIM101* està involucrat en diversos processos cel·lulars com la resposta a estrès per pH alcalí (Hayashi et al., 2005), l' esporulació (Li i Mitchell, 1997; Su i Mitchell, 1993), l'assemblatge de la paret cel·lular (Lamb et al., 2001) i l'homeòstasi de ions (Castrejon et al., 2006). Similarmet, Aft1 ha estat implicat en els mateixos fenòmens, incloent l' esporulació (Gil et al., 1991). Dins de la resposta transcripcional a estrès alcalí (Lamb et al., 2001; Serrano et al., 2002), s'han identificat gens relacionats amb bombes de ions (*ENA1* i *VMA4*), amb la limitació d'alguns ions (*CTR3*, *FRE1*, *PHO11/12* i *PHO84*), transportadors de sideròfors de Fe (*ARN4*), dos factors transcripcionals (*NRG2* i *TIS11*) i dos gens que codifiquen per proteïnes de membrana, tots ells dependents de *RIM101*. *VMA4* codifica per una subunitat de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> de la vacuola que és necessària pel creixement del llevat en condicions alcalines, il·lustrant com Rim101 pot controlar l'adaptació de les cèl·lules a aquestes condicions. A més, Rim101 també promou la resistència a concentracions elevades de cations degut a l'activació de bombes de ions (Lamb et al., 2001). Addicionalment, els nivells d'expressió dels gens *FRE2*, *FRE3*, *FRE4*, *ARN2* i *FIT1*, tots ells membres del reguló Aft1, disminueixen en un mutant *rim101* sota condicions alcalines (Barwell et al., 2005). Per tant, Rim101 funciona tant com a repressor de la transcripció mitjançant la unió a promotors (Peñalva et al., 2008) com indirectament d'activador de la transcripció a través de la repressió de dos gens repressors també, anomenats *SMP1* i *NRG1* (**Figura 5**) (Lamb i Mitchell, 2003). Amb la seva estructura completa, Rim101 és inactiu i requereix el tall proteolític en la regió C-terminal per esdevenir un repressor actiu (Peñalva et al., 2008).



**Figura 5.** Relació de Rim101 amb els repressors diana i la seva funció biològica. Rim101 s'associa al promotor de *NRG1*, regulant negativament els gens induïts en condicions de pH alcalí *ZPS1* i *ENA1*. *Ena1* és requerit pel creixement en medi alcalí i tolerància a  $\text{Na}^+$  i  $\text{Li}^+$ . La repressió del gen diana *SMP1* funciona com a regulador negatiu del creixement invasiu i l'esporulació, tot i que existeixen altres proteïnes diana de Rim101 que intervenen en l'esporulació (Lamb i Mitchell, 2003).

#### 2.4.2 Altres funcions d'Aft2

El factor transcripcional Aft2 intervé també en altres processos cel·lulars independents de l'homeòstasi del Fe, tot i que no són tant coneguts com en el cas d'Aft1. A més, Aft2 podria estar intervenint en un programa de regulació dels gens de l'homeòstasi del Fe diferent al d'Aft1. Anàlisis transcriptòmics de l'expressió gènica de *S. cerevisiae* en resposta a diferents condicions d'estrès van mostrar que l'expressió d'*AFT2* és més elevada durant la fase estacionària del creixement del llevat, en condicions de manca de nitrogen i després d'un tractament amb l'agent alquilant MMS (Gasch et al., 2000; Jelinsky et al., 2000). Altres anàlisis fenotípics van mostrar que la manca d'*AFT2* no confereix cap fenotip específic en relació amb el Fe, mentre que revelaven una desregulació en l'ús del Fe intracel·lular i efectes relacionats amb l'estrès quan falta també Aft1 (Blaiseau et al., 2001). L'activitat d'Aft2 es desencadena en condicions exacerbades de manca de Fe causades pels efectes acumulatius de la disminució d'aquest element i la pèrdua dels sistemes de captació de Fe dependents d'Aft1. Així, en resposta a condicions severes de falta de Fe, Aft2 activa la transcripció de gens involucrats en el transport de Fe vacuolar i mitocondrial per tal de reorganitzar la distribució del Fe dins de la cèl·lula. Aquests gens són *SMF3* i *MRS4*, que codifiquen pels transportadors mitocondrial i vacuolar, respectivament (Courel et al., 2005). Aquest fet es recolza amb estudis que indiquen

que el gen diana d'Aft2 *MRS4* està involucrat en la ruta senyalitzada pel Fe mitocondrial-vacuolar (Li i Kaplan, 2004).

Tot i així, aquests estudis han mostrat un rol d'Aft2 relacionat amb la transcripció gènica solament en absència d'*AFT1* o amb el guany de funció en la soca sobreexpressora d'Aft2, i en tot cas en processos relacionats amb el Fe (Courel et al., 2005; Rutherford et al., 2001). Recentment, s'ha descrit que Aft2 és el regulador principal de l'expressió de *GEX1*, essent aquest el primer dels gens regulats per Aft2 en un context genètic salvatge i de forma independent al Fe (Dhaoui et al., 2011). Gex1 i el seu paràleg Gex2 pertanyen a una família de transportadors involucrats en el transport de metalls diferents al Fe tot i que presenten homologia amb els sideròfors Arn del reguló Aft1. Gex1 es troba majoritàriament a la membrana vacuolar, encara que una fracció minoritària es localitza a la membrana plasmàtica i la seva expressió s'indueix en condicions de manca de Fe i estrès oxidatiu en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A més, Gex1 juga un paper com a intercanviador de GSH, ja que la sobreexpressió de la proteïna indueix l'acidificació del citosol, confirmant d'aquesta manera la seva participació en el transport de protons com un intercanviador GSH/protó en la membrana vacuolar i citoplasmàtica (Dhaoui et al., 2011). Tot i que s'ha descrit que l'expressió de *GEX1* depèn majoritàriament d'Aft2, també ho fa en menor extensió d'Aft1. El promotor de *GEX1* té dos llocs d'unió específics d'Aft2, en canvi el de *GEX2* només conté un d'ells (Dhaoui et al., 2011).

### 2.5 Inducció del reguló Aft1 per altres estressos

Tal i com els factors transcripcionals Aft1 i Aft2 tenen funcions independents a l'homeòstasi del Fe, també s'ha demostrat com el reguló pot ser activat per altres estressos diferents a les condicions de falta de Fe. Així, condicions ambientals diverses resulten en la inducció del reguló Aft1, com per exemple el tractament de les cèl·lules de *S. cerevisiae* amb altes concentracions de zinc (Pagani et al., 2007), HU (Dubacq et al., 2006) i cisplatina (Kimura et al., 2007), o també en situacions de pèrdua de DNA mitocondrial (Veatch et al., 2009). A més, com ja s'ha dit (veure apartat **2.4.1**), els gens del reguló Aft1 s'activen durant la resposta a estrès per pH alcalí (Lamb et al., 2001; Serrano et al., 2002) i en l'adaptació als àcids làctic i acètic (Kawahata et al., 2006), tot i que en aquests dos últims casos la dependència d'Aft1 no ha estat confirmada. Sota algunes d'aquestes condicions, Aft1 juga un paper crític ja que mutants en *AFT1* mostren hipersensibilitat a molts d'aquests agents (veure apartat **2.4.1**). Tot i que el rol d'Aft1 es desconeix en alguns dels casos, una possibilitat seria que el Fe és limitant sota

aquestes condicions o que potser es requereix Fe addicional per contrarestar aquests efectes. S'ha vist com el Fe o la seva incorporació disminueix en condicions de pH alcalí (Serrano et al., 2004), i com el tractament amb cisplatina (Kimura et al., 2007) i la pèrdua de DNA mitocondrial resulten en la disminució dels nivells d'ISC (Veatch et al., 2009), per exemple.

Altres estudis van demostrar que, en *S. cerevisiae*, l'estrès causat pel cobalt indueix selectivament diversos gens del reguló Aft1 (Stadler i Schweyen, 2002). Possiblement el cobalt estaria competint amb el Fe en la unió a llocs específics proteics compromentent d'aquesta manera la seva funció, doncs aquesta toxicitat es veu revertida per l'augment dels nivells de Fe intracel·lulars. D'altra banda, el reguló Aft1 també s'indueix en condicions d'estrès oxidatiu per tractament amb peròxid (Castells-Roca et al., 2011). Tot i així, els mecanismes moleculars involucrats en la resposta a aquestes estresses no han estat caracteritzats. En el cas del cobalt i l'estrès oxidatiu, la internalització nuclear d'Aft1 ha sigut demostrada experimentalment. A més, sota condicions d'estrès per peròxid, la hipersensibilitat de les cèl·lules de llevat a aquest fenomen requereix l'absència simultània d'ambdós Aft1 i Aft2 (Blaiseau et al., 2001; Castells-Roca et al., 2011). Addicionalment, la rellevància fisiològica dels gens del reguló Aft1 en aquesta diversitat de factors medi ambientals es demostra també en el cas de la hipersensibilitat del mutant *aft1* a l'estrès causat pel cadmi (Thorsen et al., 2009) i per l'arsenat (Batista-Nascimento et al., 2013). Altres autors van descriure la inducció dels gens *FET3* i *FTR1* del reguló Aft1 a causa de l'estrès generat per les elevades concentracions de coure (Gross et al., 2000). Tot i així, aquesta inducció podria ser un efecte secundari degut a la interferència del coure en els nivells de Fe intracel·lulars.

D'altra banda, els membres del reguló Aft1 són induïts també quan les cèl·lules de llevat passen d'un medi fermentatiu a un medi respiratori, procés anomenat canvi diàuxic, el qual es dona en condicions de limitació de glucosa (Haurie et al., 2003). En aquesta fase les cèl·lules aturen la seva divisió, i es modifica l'equip enzimàtic per tal de permetre l'assimilació de fonts de carboni alternatives i la producció d'energia a partir de l'etanol. Aquest procés involucra un canvi global en l'expressió gènica. Com la glucosa no hi és present, s'activa la transcripció de gens relacionats amb la gluconeogènesi, el cicle dels àcids tricarboxílics, el cicle del glioxilat, així com també s'inicia el procés de respiració del llevat, mentre que l'expressió dels gens involucrats en la glicòlisi i en la síntesi proteica disminueix. Curiosament, en el canvi diàuxic també s'activa l'expressió de cinc gens (*FET3*, *FTR1*, *CTH2*, *ARN3* i *FIT2*), tots ells membres del reguló Aft1 i involucrats en l'homeòstasi del Fe intracel·lular (Haurie et al., 2003). Aquesta

inducció és regulada positivament per la ruta dependent de Snf1 (veure el següent apartat **3**), la qual està activada en aquesta fase metabòlica. El factor transcripcional Aft1 és també requerit per la inducció d'aquests gens en el canvi diàuxic. Es desconeix la relació funcional entre Snf1 i Aft1, tot i que s'han postulat diverses opcions entre les quals estaria la participació de Snf1 en l'expressió del reguló Aft1 a través de la regulació d'altres repressors o reguladors addicionals d'aquests gens (Haurie et al., 2003). A més, estudis previs havien descrit que els gens diana d'Aft1 es troben sota el control negatiu d'una de les tres proteïnes quinasa A del llevat, anomenada Tpk2 (Robertson et al., 2000). Considerant que la caiguda dels nivells de glucosa està associada amb la inactivació de les quinases A i l'entrada a la fase diàuxica, es pot establir un lligam funcional entre Aft1 i el complex Snf1/Snf4. L'increment de la concentració de Fe extracel·lular no afecta a la inducció dels gens del reguló del Fe en aquestes condicions, indicant per tant que l'exhauriment de glucosa per sí sol actuaria com a factor inductor de l'expressió del reguló Aft1, tot i que no de tots els gens del mateix (Haurie et al., 2003).

### **3 REGULACIÓ METABÒLICA PER SNF1**

#### **3.1 El complex Snf1**

L'ATP és la forma en què els organismes obtenen la seva energia pels processos metabòlics, a través del trencament dels ponts moleculars dels nutrients i la subseqüent conversió en aquest compost. L'homeòstasi cel·lular depèn del manteniment dels nivells d'ATP. Per tant, les cèl·lules el sintetitzen de forma activa i han desenvolupat mecanismes moleculars dirigits a monitoritzar les variacions en els seus nivells (Hardie, 2011). Existeixen enzims metabòlics que s'encarreguen de detectar els canvis en el rati AMP:ATP cel·lular, com són la glicogen fosforilasa i la 1,6-fosfofructoquinasa en el múscul, o la fructosa 1,6-bifosfat en el fetge, entre altres. La proteïna quinasa activada per l'AMP (AMPK) és un component principal de les vies de senyalització biològiques altament conservades que es troba present en tots els organismes eucariotes i juga un paper crític en regular processos metabòlics en resposta tan a variacions en el subministrament energètic com a la seva demanda. L'AMPK protegeix les cèl·lules d'estressos que poden fer disminuir el balanç energètic cel·lular, és a dir, l'increment del rati AMP:ATP, iniciant un canvi metabòlic que desencadenarà la generació d'ATP i, simultàniament, reduirà les vies de consum d'aquest. Tal i com s'ha dit, l'AMPK actua com a sensor de l'estatus

energètic que manté l'homeòstasi energètica cel·lular, i s'activa no només degut a l'augment en els nivells d'AMP sinó també d'ADP. Addicionalment, s'han descrit funcions alternatives del complex AMPK, incloent la regulació de la biogènesi mitocondrial i la seva eliminació, processos d'autofàgia, de polaritat cel·lular, de proliferació i de creixement cel·lular (Hardie, 2011).

En *S. cerevisiae*, existeix un homòleg de l'AMPK de mamífers anomenat Snf1 (Hedbacker i Carlson, 2008). De forma similar a mamífers, la proteïna quinasa Snf1 té funcions importants en el control metabòlic cel·lular. Snf1 és necessària per l'adaptació de les cèl·lules de llevat en condicions de limitació de glucosa i per l'ús d'altres fonts de carboni alternatives menys preferibles, com la sucrosa (d'aquí ve el seu nom Snf, sucrosa no fermentable), galactosa i etanol, o fonts de carboni no fermentables (Celenza i Carlson, 1986). Aquesta quinasa s'activa quan hi ha esgotament de glucosa (Jiang i Carlson, 1996; McCartney i Schmidt, 2001), tot i que l'AMP no activa Snf1 *in vitro* (Adams et al., 2004; Mitchelhill et al., 1994; Wilson et al., 1996). A més del seu paper primordial en resposta a l'estrès nutricional, el complex Snf1 té altres rols en diversos processos de resposta a nutrients i desenvolupament cel·lular, com la meiosi i l' esporulació (Carlson et al., 1981; Honigberg i Lee, 1998), l'envelliment (Ashrafi et al., 2000), el creixement invasiu (Cullen i Sprague, 2000) i la diferenciació en pseudohifes (Kuchin et al., 2002). A més, Snf1 regula la transcripció de molts gens (Young et al., 2003), controla l'activitat d'enzims metabòlics involucrats en el metabolisme dels àcids grassos i reserva de carbohidrats (Hardy et al., 1994; Mitchelhill et al., 1994; Woods et al., 1994) i regula la funció de l'holoenzim RNA polimerasa II (Kuchin et al., 2000), a part de participar també en processos autofàgics (Wang et al., 2001). Tanmateix, Snf1 està involucrada en la resposta cel·lular a altres estressos mediambientals diferents a l'esgotament de glucosa (veure apartat **3.5.3**).

### **3.2 Subunitats estructurals del complex Snf1**

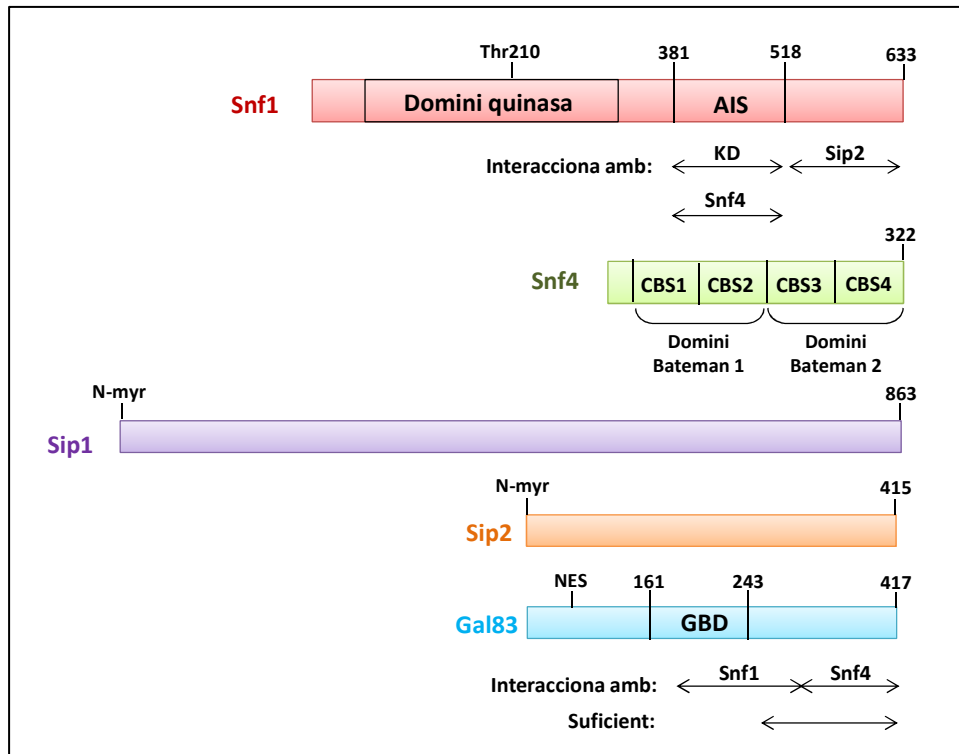
El complex de la quinasa Snf1 de *S. cerevisiae* és heterotrimèric, és a dir, està format per tres subunitats diferents, igual que l'AMPK en organismes superiors. Concretament, està compost per la subunitat catalítica o subunitat  $\alpha$  (Snf1), una de les tres subunitats  $\beta$  (Sip1, Sip2 o Gal83) i la subunitat  $\gamma$  (Snf4). Existeixen, per tant, tres complexos Snf1 alternatius. Tant la subunitat  $\alpha$  com la  $\beta$  i la  $\gamma$  participen en la regulació de l'activitat catalítica de la proteïna.



### 3.2.1 La subunitat catalítica Snf1

La subunitat catalítica de *S. cerevisiae* s'expressa constitutivament i està formada per 633 aminoàcids. Comprèn un domini quinasa a prop de l'extrem N-terminal i una regió reguladora en el C-terminal (Celenza i Carlson, 1984, 1986). La regió C-terminal interacciona directament tan amb la subunitat Snf4 (entre els residus d'aminoàcids 392 i 495) com amb el seu propi domini quinasa (del residu 392 al 518) (Jiang i Carlson, 1996). Existeix una seqüència autoinhibitòria (AIS) entre els residus 381 i 518 que és reconeguda per Snf4 i té efectes antagònics vers aquest motiu proteic (Celenza i Carlson, 1989; Jiang i Carlson, 1996). A més, la regió C-terminal interacciona amb les subunitats  $\beta$  del complex Snf1, identificant d'aquesta manera la unió de Sip2 entre els residus 515 i 633 de la subunitat catalítica (Jiang i Carlson, 1997) (**Figura 6**).

L'activació de la subunitat catalítica Snf1 es dona quan el residu treonina (Thr) 210 és fosforilat en el segment ansa activador (McCartney i Schmidt, 2001). S'ha vist a partir de la seva estructura cristal·lina que aquesta subunitat forma un dímer on l'ansa d'activació, la qual conté el residu Thr210, està amagada (Nayak et al., 2006), tot i que el significat biològic d'aquesta dimerització roman desconegut. S'han identificat proteïnes quinasa "upstream" (Hong et al., 2003; Sutherland et al., 2003) i fosfatases de tipus I (McCartney i Schmidt, 2001; Sanz et al., 2000) que controlen la fosforilació del residu Thr210 (veure apartat **3.3**). Aquesta modificació post-traducciona així com la seva regulació per senyals de dèficit de glucosa no necessiten ni la regió C-terminal de Snf1 com tampoc Snf4 ni les subunitats  $\beta$  (Elbing et al., 2006a; Elbing et al., 2006b; McCartney i Schmidt, 2001).



**Figura 6.** Estructura de les subunitats del complex Snf1. Els números corresponen als residus d'aminoàcids. KD, domini quinasa; AIS, seqüència autoinhibitòria; CBS, repetició cistationina-beta-sintasa; N-myr, seqüència consens de N-miristilació; NES, senyal d'exportació nuclear; GBD, domini d'unió a glicogen [adaptat de (Hedbacker i Carlson, 2008)]. Veure el text pels detalls.

### 3.2.2 Les subunitats $\beta$

El genoma de *S.cerevisiae* codifica per tres subunitats  $\beta$  del complex Snf1: Sip1, Sip2 i Gal83 (**Figura 6**), les dos últimes amb seqüències similars (Erickson i Johnston, 1993). Les tres subunitats tenen funcions redundants ja que cadascuna per sí sola permet el creixement en diverses condicions on es requereix l'activitat del complex Snf1 (Schmidt i McCartney, 2000). Les tres subunitats contenen seqüències C-terminals conservades que intervenen en la seva pròpia interacció amb el complex Snf1 (Yang et al., 1994). Concretament, del residu 154 al 335 de Sip2 i del 198 al 350 de Gal83 és suficient per interaccionar (Jiang i Carlson, 1997). Aquesta regió, anomenada seqüència d'interacció quinasa (KIS), inclou una part del domini d'unió a glicogen (GBD) i les seqüències d'interacció amb Snf1 (**Figura 6**). La seqüència GBD en la subunitat  $\beta 1$  del complex AMPK està conservada en Gal83 i en Sip2, a més Gal83 s'uneix fortament al glicogen *in vitro*, mentre que Sip2 ho fa d'una forma més dèbil (Wiatrowski et al., 2004). En les cèl·lules de llevat, mutants *gal83* causen la inducció de varis processos

dependents del complex Snf1, incloent l'acumulació de glicogen, l'expressió de RNA codificants de la glicogen sintasa, el creixement haploide invasiu, la funció del factor transcripcional Sip4 i l'activació de l'element promotor en resposta a la font de carboni (Wiatrowski et al., 2004). A més, mutacions en GBD mostren fenotips tot i en absència de glicogen (en un mutant que li manca la glicogen sintasa), indicant que aquestes mutacions afecten a la funció del complex Snf1 a través d'un mecanisme independent de la unió de glicogen (Hedbacker i Carlson, 2008).

Les tres subunitats  $\beta$  tenen regions N-terminals diferents que conformen el patró de localització cel·lular del complex Snf1 (veure apartat 3.4). Quan la glucosa és la font de carboni del medi, les tres són citoplasmàtiques, però quan aquesta s'esgota, les subunitats  $\beta$  s'encarreguen de dirigir la localització del complex Snf1 cap al nucli (Vincent et al., 2001). Addicionalment, l'abundància de les subunitats  $\beta$  en les cèl·lules també depèn de la disponibilitat de la glucosa al medi. Gal83 és la isoforma predominant durant el creixement en glucosa, mentre que els nivells de Sip2 augmenten quan aquesta canvia o en fonts de carboni no fermentables. Sip1 és menys abundant que les altres dues, i els seus nivells es mantenen constants (Ghaemmaghami et al., 2003; Vincent et al., 2001). Tot i que les tres subunitats són actives de forma similar (Nath et al., 2002), Gal83 contribueix a la major part de l'activitat del complex Snf1 en resposta a l'esgotament de glucosa degut a la seva abundància en la cèl·lula (Hedbacker et al., 2004a). Sip2 és N-miristolada (Lin et al., 2003), i Sip1 conté una seqüència consens de N-miristolació que és necessària per la seva localització a la membrana vacuolar (Hedbacker et al., 2004b).

Tot i que les tres subunitats  $\beta$  tenen funcions solapades, també manifesten rols diferents. Totes elles tenen rols independents en el creixement haploide invasiu (Vyas et al., 2003). Sip2 s'ha vist implicat en envelliment (Ashrafi et al., 2000; Lin et al., 2001), mentre que Gal83 intervé en la interacció de Snf1 amb el factor transcripcional Sip4 (Schmidt i McCartney, 2000). A més, les tres subunitats formen part del complex Snf1 de manera diferent en funció de l'estrès corresponent i depenent de la quinasa activadora d'aquest complex (McCartney et al., 2005).

### 3.2.3 La subunitat Snf4

La subunitat Snf4 de *S. cerevisiae* és una proteïna de 322 aminoàcids que s'expressa constitutivament i s'uneix tant a la subunitat catalítica Snf1 com a les subunitats  $\beta$ , independentment de la disponibilitat de glucosa (Celenza et al., 1989; Jiang i Carlson, 1997).

Snf4 conté dos parells de repeticions cistationina-beta-sintasa (CBS), anomenats dominis Bateman (**Figura 6**), els quals s'uneixen a derivats d'adenosina (Adams et al., 2004; Scott et al., 2004).

Snf4 és requerida per l'activitat catalítica del complex Snf1, ja que s'uneix a la regió reguladora C-terminal de la subunitat Snf1 contrarestant la seva autoinhibició pel domini AIS (Celenza i Carlson, 1989; Jiang i Carlson, 1996; Leech et al., 2003). Snf4 s'uneix a la seqüència AIS quan les cèl·lules es troben en condicions de limitació de glucosa, i impedeix la interacció entre el domini quinasa i l'AIS. Anàlisis amb mutants *snf4* van demostrar que Snf4 no és necessari per la fosforilació del residu Thr210 en l'ansa d'activació de la subunitat Snf1 regulada per glucosa (Elbing et al., 2006b; McCartney i Schmidt, 2001), tot i que alteracions en diferents residus de Snf4 atenuen la inhibició de la fosforilació de Thr210 i l'activitat del complex Snf1. Per tant, tot i que en absència de Snf4 es dona una fosforilació de Thr210 regulada per glucosa, en el context de l'heterotrímer Snf1, Snf4 és requerit per aquesta modificació post-traduccional. Aquest fet indica que Snf4 juga un paper tan en regulació per autoinhibició com en les interaccions funcionals del complex Snf1 en resposta a la disponibilitat de glucosa. A més, Snf4 conté una seqüència d'un pseudosubstrat que és reconegut per Snf1, el que suggereix que Snf4 podria estar inhibint Snf1 directament (Scott et al., 2007).

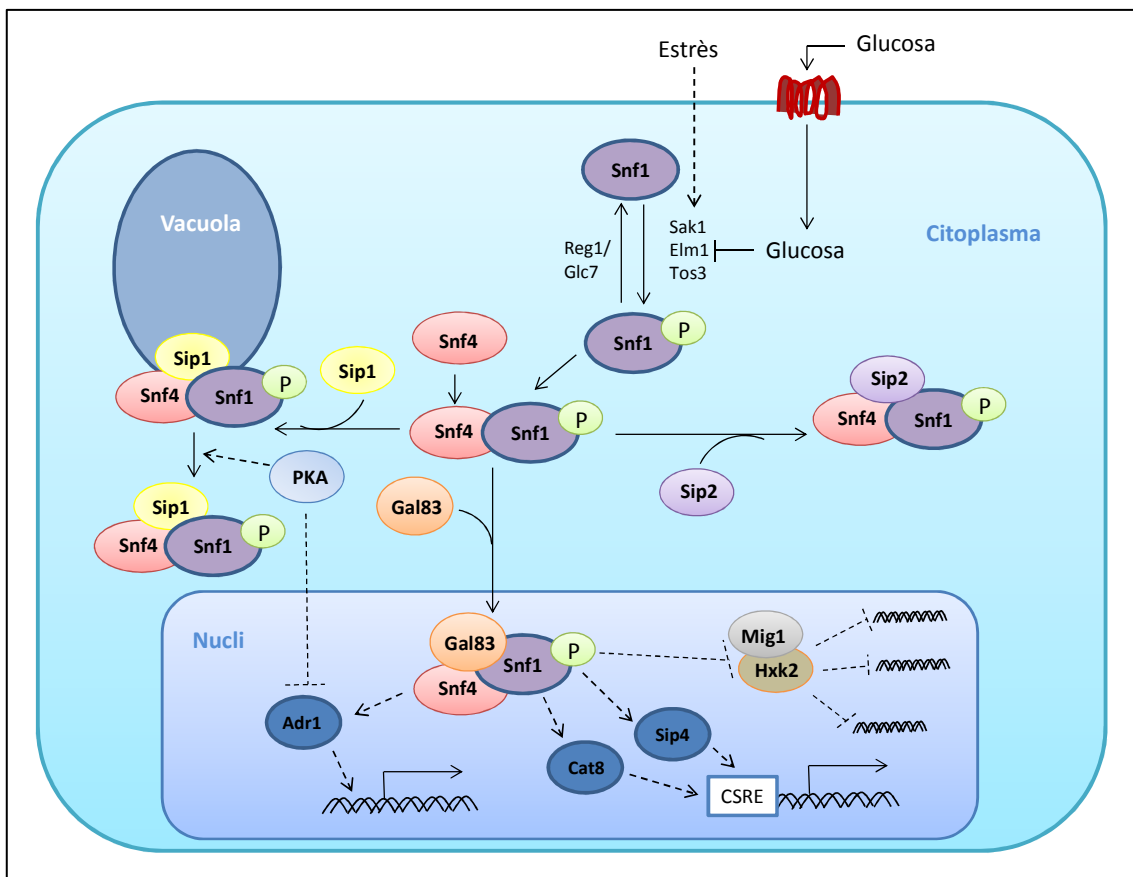
Snf4 es localitza constitutivament tan al nucli com al citoplasma, mentre que Snf1 i les subunitats  $\beta$  són excloses del nucli durant el creixement en concentracions elevades de glucosa (Vincent et al., 2001). Aquest fet suggereix que una subpoblació de Snf4 no està associada o relacionada amb Snf1. Considerant això, Snf4 conté un lloc d'unió consens d'elanguina C on s'uneix aquesta mateixa proteïna de llevat, Elc1. La deleció del gen *ELC1* no afecta a l'activitat catalítica del complex Snf1, i a més el mutant *elc1* no mostra cap defecte en el creixement relacionat amb Snf1, per tant, podria ser que Elc1 participés en les funcions alternatives de Snf4 independents del seu rol en el complex Snf1 (Jackson et al., 2000).

### 3.3 Regulació de l'activitat del complex Snf1

El complex Snf1 s'activa durant el creixement de les cèl·lules de llevat en absència de glucosa. En cèl·lules de mamífer, el complex AMPK manté l'homeòstasi energètica cel·lular i s'activa quan el rati AMP:ATP augmenta. L'AMP, en aquest cas, actua com activador al·lostèric de la

subunitat catalítica del complex (Townley i Shapiro, 2007). Tot i així, no existeix cap activació del complex Snf1 per part de l'AMP (Mitchell et al., 1994; Wilson et al., 1996). L'activitat Snf1 es veu ràpidament incrementada quan les cèl·lules passen d'un medi amb glucosa a un medi respiratori, però després d'aquesta adaptació, l'activitat Snf1 decreix i se'n requereix una mínima part per continuar el creixement (Hedbacker i Carlson, 2006). La manca de glucosa actua com a senyal activadora del complex Snf1 a través de la fosforilació del residu Thr210 de l'ansa d'activació de la subunitat catalítica  $\alpha$ . Aquesta modificació post-traduccional la realitzen una de les tres quinases "upstream" de Snf1: Sak1 (prèviament anomenada Pak1), Elm1 i Tos3 (Hong et al., 2003; Nath et al., 2003) (Figura 7).

Snf1 també es fosforila i s'activa en resposta a altres estressos mediambientals diferents a l'esgotament de glucosa (veure apartat 3.5.3), i algunes d'aquestes respostes són transitòries. Les tres quinases "upstream" de Snf1 també són requerides per l'activació del complex en aquestes condicions independents de la limitació de la glucosa (Hong i Carlson, 2007).



**Figura 7.** Representació de la cascada de senyals d'activació, localització i regulació del complex Snf1 dependent de l'estrès causat per la manca de glucosa en *S. cerevisiae* [adaptat de (Zaman et al., 2008)]. Veure el text pels detalls.

### 3.3.1 Les quinases Sak1, Elm1 i Tos3

Les tres quinases Sak1, Elm1 i Tos3 activen Snf1 per fosforilació del residu Thr210 (Hong et al., 2003; Nath et al., 2003; Sutherland et al., 2003), tenint funcions redundants en la seva capacitat activadora. Tot i que mutants *elm1* tenen diversos fenotips relacionats amb la progressió del cicle cel·lular, localització dels filaments de septina, citocinesi i morfologia cel·lular (Blacketer et al., 1993; Bouquin et al., 2000; Sreenivasan et al., 2003; Sreenivasan i Kellogg, 1999; Sutherland et al., 2003), i mutants *sak1* també tenen defectes en l'acumulació de glicogen, les tres quinases han d'estar absents a la vegada per tal d'abolir l'activitat Snf1 *in vivo* (Hedbacker et al., 2004a; Hong et al., 2003; McCartney et al., 2005). Tot i així, Sak1 juga el paper principal en la regulació de les funcions de Snf1. Les tres quinases tenen contribucions diferents en la regulació cel·lular sota condicions de disponibilitat variable de fonts de carboni, encara que s'ha vist que Sak1 té el paper principal en l'activació de Snf1 acomplexada amb Gal83 (Hedbacker et al., 2004a; Hong et al., 2003; Kim et al., 2005; McCartney et al., 2005).

Sak1 s'associa amb l'heterotrímer Snf1 i forma un complex estable, mentre que Tos3 i Elm1 aparentment ho fan de manera transitòria (Elbing et al., 2006a). Aquesta interacció estable de Snf1 amb Sak1 no està regulada per la glucosa (Elbing et al., 2006a), i la major part de proteïna Sak1 apareix associada amb Snf1, tot i que només una fracció de la quantitat de Snf1 total es troba formant complex amb Sak1 (Elbing et al., 2006a). A més, Tos3 i Elm1 tenen una capacitat més variable a l'hora d'activar el complex Snf1, depenent de l'estrès causat per la font de carboni que hi sigui present (McCartney et al., 2005). La deleció d'*ELM1* redueix l'activitat catalítica del complex Snf1 (tot i que no tan dràsticament com en el cas de la manca de *SAK1*), mentre que l'absència de Tos3 té molt poc efecte sobre aquesta activitat. Tos3 presenta major activitat durant el creixement a llarg termini en medis a base de glicerol o etanol (Kim et al., 2005). La deleció de *TOS3* redueix la taxa de creixement, l'activitat catalítica de Snf1 (lleugerament) i l'expressió d'un gen reporter regulat per un element de resposta a la font de carboni (CSRE) durant el creixement en glicerol i etanol. Tos3 també es fosforila de forma dependent de Snf1.

Sak1 es localitza al citoplasma quan les cèl·lules creixen en medis rics en glucosa, però una part es dirigeix cap a la membrana vacuolar en resposta a l'esgotament d'aquesta font de carboni, igual que Sip1 (Hedbacker et al., 2004a). En canvi, Tos3 es troba al citoplasma en ambdós casos (Kim et al., 2005). Finalment, Elm1 es localitza a la constricció de la gemma i al septe (Bouquin

et al., 2000) degut als seus rols independents del complex Snf1 mencionats anteriorment. Elm1 és necessari per la organització de la xarxa de filaments de septina al septe mitòtic (Bouquin et al., 2000; Sreenivasan i Kellogg, 1999) i coordina el punt de control de posició del fus mitòtic a través de l'activació de Kin4, un altre membre de la família AMPK en el llevat (Caydasi et al., 2010; Moore et al., 2010).

### **3.3.2 La proteïna fosfatasa de tipus 1**

La proteïna fosfatasa de tipus 1 (PP1) reguladora de Snf1 està formada per una subunitat catalítica Glc7 i una subunitat reguladora Reg1, modulant negativament l'activitat catalítica de Snf1. Reg1 interacciona amb el domini quinasa de Snf1 quan aquesta està activa i dirigeix a Glc7 a l'ansa d'activació quinasa de Snf1, resultant en la desfosforilació i subseqüent inactivació del complex (Tu i Carlson, 1995). Quan Snf1 està activada, fosforila i inhibeix a Reg1-Glc7, proveint una retroalimentació positiva durant la transició a la forma activa. Tot i així, també s'ha vist que PP1 és fosforilada en resposta a la limitació de glucosa de forma independent de Snf1 (Sanz et al., 2000). L'expressió, localització i interacció de Reg1 amb Glc7 no sembla estar regulada per la font de carboni present en el medi, tot i que l'activitat de PP1 sí que està determinada per la fosforilació de Reg1, la qual és dependent de la font de carboni. Reg1 és citoplasmàtica i està exclosa del nucli tan en presència com en absència de glucosa en el medi (Dombek et al., 1999). De fet, la desfosforilació de Snf1 està fortament regulada per la presència de glucosa en el medi, més que per la PP1. Tot i així, l'activitat de la fosfatasa no estaria controlada directament per la glucosa, ja que aquest enzim és actiu cap a un altre substrat com el factor de transcripció Mig1 en medis on la concentració de glucosa és baixa. La desfosforilació regulada per glucosa és controlada pels canvis estructurals de l'ansa d'activació que li permetin actuar com a substrat de Glc7 (Rubenstein et al., 2008). D'altra banda, mutants *reg1* presenten nivells elevats de glicogen i fosforilació de Snf1 durant el creixement en presència de glucosa (Ruiz et al., 2011). Tot i així, l'estat actiu de Snf1 es reverteix a través d'altres fosfatases que actuen sobre la quinasa en cèl·lules mancades de Reg1 i en medis amb glucosa, com és el cas de Sit4, una proteïna fosfatasa de tipus 2 (PP2) (Ruiz et al., 2011). Tan PP1 com PP2 són molècules diana de la detecció de glucosa. L'addició de glucosa a medis deficientes d'aquesta font de carboni provoca la ràpida activació post-traducciona d'ambdós enzims, i aquesta activació depèn de les seves subunitats reguladores així com també de les de l'altra fosfatasa (Castermans et al., 2012).

Anàlisis genètics suporten un rol regulador per PP1. L'expressió de les quinases d'AMPK de mamífers LKB1, CaMKK $\alpha$ , o TAK1 en un mutant triple per les tres quinases Sak1, Elm1 i Tos3 de llevat recupera l'activitat de Snf1 regulada per glucosa (Hong et al., 2005; Momcilovic et al., 2006). A més, l'expressió d'aquestes quinases de mamífer en un mutant mancat de Sak1, Tos3, Elm1 i Reg1 mostrava un augment de l'activitat Snf1 dependent de glucosa (Hong et al., 2005). El model hipotètic suggereix que les tres quinases "upstream" estan actives constitutivament i que la funció de PP1 vers el complex Snf1 és regulat de forma positiva per les senyals de glucosa que afecten tan a la fosfatasa com a Snf1 (Hong et al., 2005).

### 3.4 Regulació de la localització subcel·lular del complex Snf1

Les subunitats  $\beta$  juguen un paper estructural en el complex Snf1 i confereixen especificitat a la quinasa per les seves interaccions amb els substrats diana (Schmidt i McCartney, 2000). Les subunitats  $\beta$  també regulen la localització subcel·lular del complex Snf1 en resposta a la font de carboni present. En cèl·lules creixent en medi no fermentatiu, Sip1, Sip2 i Gal83 es localitzen en compartiments diferents, i Gal83 dirigeix específicament el complex quinasa al nucli (Vincent et al., 2001). En canvi, les tres subunitats  $\beta$  resideixen al citoplasma quan les cèl·lules creixen en medis amb glucosa. Quan les cèl·lules passen a un medi no fermentatiu, aquests subunitats assumeixen localitzacions subcel·lulars diferents: Sip1 es dirigeix cap a la vacuola, Sip2 roman citoplasmàtica i Gal83 es mou cap al nucli (**Figura 7**).

Gal83 conté una senyal d'exportació nuclear (NES) rica en leucina en la seva regió N-terminal, que és requerida per la seva distribució citoplasmàtica, i la seva exportació depèn del receptor Crm1 (Gaber et al., 2003). La localització nuclear de Snf1 i Gal83 depèn tan de Gal83 com també de l'estat activat de la subunitat catalítica de Snf1, el qual indicaria que la forma inactiva promou la retenció citoplasmàtica de Gal83 en medi fermentatiu a través de la interacció amb la seva regió C-terminal (Gaber et al., 2003). L'acumulació nuclear del complex Snf1 també requereix Sak1, que és qui té un rol major en l'activació de Snf1. A més, ja que la fosforilació de la glucosa és requerida per la localització citoplasmàtica de Gal83, es va suggerir que la glucosa-6-fosfat podria actuar com a senyal reguladora de la distribució d'aquesta subunitat (Vincent et al., 2001). D'altra banda, Gal83 no afecta significativament a la distribució nucleocitoplasmàtica de la subunitat reguladora Snf4, suggerint que en medi fermentatiu el nucli conté molècules de Snf4 que no estan associades amb Snf1 o Gal83 (Vincent et al., 2001).



D'altra banda, s'han identificat altres vies que controlen la localització nuclear de Gal83 i Snf1 que són independents de la ruta de senyalització per glucosa responsable de la inhibició de l'activitat quinasa de Snf1. Així doncs, el mecanisme encarregat de regular aquesta distribució respon no només a la glucosa sinó que també a altres fonts de carboni fermentables que no inhibeixen l'activitat de Snf1 (Vincent et al., 2001). La via que regula la localització de Gal83 també regularia la distribució de Sip1. En medi fermentatiu, Sip1 es troba al citoplasma, i és dirigit a la vacuola quan les cèl·lules creixen en glicerol o etanol. La localització de Sip1 a la membrana vacuolar és inhibida per l'activitat de la proteïna quinasa A (PKA) (Hedbacker et al., 2004b). En un mutant mancat de les tres subunitats catalítiques de PKA, Sip1 es troba a la vacuola de forma constitutiva, independentment de la disponibilitat de glucosa i, per contra, en un mutant amb activitat PKA elevada, Sip1 està sempre al citoplasma. Aquesta localització a la membrana vacuolar també requereix la seqüència consens de N-miristilació de Sip1 (Hedbacker et al., 2004b).

### 3.5 Funció del complex Snf1

#### 3.5.1 Resposta transcripcional a l'estrès causat per la font de carboni

Snf1 regula la transcripció dels gens involucrats en l'ús de fonts de carboni alternatives (**Figura 7**), en gluconeogènesi, respiració, transport i meiosi. Els gens requerits pel metabolisme de fonts de carboni com la sucrosa, la galactosa i la maltosa responen a Snf1 a través de l'activitat del repressor transcripcional Mig1. Mig1 és una proteïna amb estructura de "dit de zinc" que s'uneix a una seqüència consens rica en GC (Schüller, 2003). En cèl·lules creixent en absència de glucosa, Snf1 fosforila Mig1 per tal d'inhibir la seva activitat repressora. En canvi, en presència de glucosa, Mig1 està desfosforilat i es localitza al nucli, reprimint l'expressió de gens diana com *SUC2*. A més, es creu que Mig1 actua com a repressor associat amb Hxk2, una de les dos hexoquinases de llevat (Ahuatzi et al., 2007).

El complex Snf1 també regula diversos activadors transcripcionals. El factor de transcripció Adr1 activa l'expressió de gens involucrats amb el metabolisme de l'etanol i l'oxidació dels àcids grassos (Young et al., 2003). Estudis transcriptòmics van revelar que Adr1 juga un paper indirecte en altres funcions, com el transport i el metabolisme d'aminoàcids, la meiosi i l'esperulació (Tachibana et al., 2005). Adr1 és regulat negativament per PKA en presència de glucosa, i és activat de forma dependent de Snf1 en condicions d'esgotament d'aquesta font de carboni (Schüller, 2003). En absència de glucosa, Snf1 promou la unió d'Adr1 a la cromatina

(Young et al., 2002). Més concretament, la unió d'Adr1 al seu promotor està regulada per un procés d'acetilació de la histona H3 dependent de Snf1, el qual també permet el reclutament de la RNA polimerasa II. Tan aquest enzim com Adr1 romanen a la regió promotora fins que Snf1 s'inactiva (Young et al., 2012). A més, Adr1 es troba sota el control negatiu de Reg1, ja que la deleció de la subunitat de la fosfatasa fa augmentar els nivells proteics d'Adr1 així com la inducció de gens regulats per Adr1, com *ADH2* (Dombek et al., 2004).

Cat8 i Sip4, dos factors de transcripció regulats per Snf1 no relacionats entre ells, activen l'expressió dels gens requerits per la gluconeogènesi durant el creixement del llevat en absència de glucosa a través de la seva unió amb els CSRE (Randez-Gil et al., 1997; Vincent i Carlson, 1998). Els dos factors transcripcionals no contribueixen de igual forma a l'activació dels gens en medi respiratori, ja que cèl·lules mutants *cat8* no poden créixer en aquest tipus de medi mentre que mutants *sip4* sí. A més, el requeriment de Sip4 en els motius CSRE és molt més estricte que en el cas de Cat8, el qual es pot unir a diferents variants d'aquest motiu (Roth et al., 2004). La transcripció de Cat8 és inhibida per Mig1 i activada per Hap2/3/4/5. Sip4 respon a l'esgotament de glucosa a través d'una interacció regulada per Gal83 i per la fosforilació per Snf1 (Vincent i Carlson, 1999).

El complex Snf1 regula certs gens de resposta a estrès durant el canvi de font de carboni. Hsf1, un factor de transcripció que regula l'expressió de gens induïts per calor a través de la seva unió a l'element de xoc per calor (HSE), és fosforilat per Snf1 en resposta a la manca de glucosa, tot i que no en resposta a estrès per calor (Hahn i Thiele, 2004; Sanz, 2003). Addicionalment, la unió d'Hsf1 als promotors de gens diana, tals com *HSP82*, *CUP1*, *HSP30* i *SSA3*, també depèn de Snf1. D'altra banda, Snf1 regula negativament al factor transcripcional Msn2 en resposta a l'estrès per la font de carboni. Msn2 és ràpidament desfosforilat per PP1 quan s'esgota la glucosa i es dirigeix al nucli per tal d'induir l'expressió de gens diana com *CTT1* (De Wever et al., 2005). Tot i així, estressos per font de carboni de llarg termini provoquen que Snf1 torni a fosforilar Msn2 promovent la seva exportació nuclear i la inhibició de l'expressió de *CTT1*. En canvi, Snf1 és requerit per la fosforilació i subsegüent acumulació nuclear de Gln3, un factor de transcripció de tipus GATA (Bertram et al., 2002).

Existeixen evidències que impliquen a Snf1 en la regulació de la remodelació de la cromatina. La manca de glucosa fa que Snf1 fosforili la Ser10 de la histona H3 en la regió promotora d'*INO1* (Lo et al., 2001; Lo et al., 2005), el qual provoca el reclutament del complex SAGA i

l'acetilació de H3 en la Lys14, induint d'aquesta manera la transcripció. Per tant, Snf1 promou l'activació transcripcional mitjançant el canvi estructural de la cromatina en la regió dels promotors diana.

### **3.5.2 Control d'enzims i transportadors metabòlics en resposta a estrès per la font de carboni**

A part de la implicació a nivell transcripcional, el complex Snf1 regula l'activitat d'enzims involucrats en el metabolisme dels àcids grassos i en la reserva de carbohidrats (Hardy et al., 1994; Wang et al., 2001). Snf1 fosforila i inactiva l'acetil-CoA carboxilasa (Acc1) (Woods et al., 1994), i per tant inhibeix la biosíntesi d'àcids grassos en condicions d'esgotament de glucosa. La fosforilació d'Acc1 també afecta a la transcripció d'*INO1*, un gen important en la biosíntesi de fosfolípids (Shirra et al., 2001). A més, Snf1 controla la fosforilació de l'enzim glicogen sintetasa (Cannon et al., 1994; Hardy et al., 1994) i afecta al manteniment de les reserves de glicogen promovent processos d'autofagia (Wang et al., 2001) jugant, per tant, un paper important en l'acumulació de glicogen en cèl·lules de llevat (François i Parrou, 2001), a part del control que té sobre altres transportadors d'hexoses (Kaniak et al., 2004; Tomás-Cobos i Sanz, 2002).

### **3.5.3 Funcions del complex Snf1 en resposta a altres estressos mediambientals**

Snf1 participa en la resposta de les cèl·lules de llevat a altres estressos mediambientals a part del causat per la font de carboni del medi. Així doncs, mutants *snf1* mostren hipersensibilitat a ions com el sodi o el liti (Alepuz et al., 1997; Portillo et al., 2005; Ye et al., 2008), i a altres compostos tòxics com la higromicina B (Portillo et al., 2005). La hipersensibilitat a diferents anions tòxics suggereix una possible hiperpolarització del potencial de la membrana plasmàtica, que resulta en un augment de l'entrada de cations. En *S. cerevisiae*, el potencial de membrana plasmàtica és determinat per dos transportadors electrogènics principals: la bomba ATPasa-H<sup>+</sup> codificada pel gen essencial *PMA1* i el sistema d'alta afinitat de captació de potassi format per les proteïnes Trk1 i Trk2 (Gaber et al., 1988; Ko i Gaber, 1991; Ramos et al., 1994). La bomba Pma1 genera el gradient electroquímic de protons, mentre que el sistema Trk és el major consumidor del potencial de membrana degut a les altes taxes d'entrada de potassi. Alteracions en aquests sistemes afecten al potencial de membrana i, conseqüentment, a la captació de nutrients i de cations tòxics (Madrid et al., 1998; Vallejo i Serrano, 1989). En presència de glucosa, la forma no fosforilada de la quinasa Snf1 modula el sistema de transport Trk, evidenciant d'aquesta manera que tot i no ser fosforilada pot tenir un rol fisiològic a la

cèl·lula, encara que no es pot descartar la possibilitat que altres llocs de fosforilació contribueixin a la regulació de la seva activitat (Portillo et al., 2005). Per tant, en medi fermentatiu, el complex Snf1 presenta una activitat moderada independent de la fosforilació de Thr210 que podria activar diversos factors transcripcionals diferents al requerits en medis respiratoris. Aquests activarien l'expressió de gens implicats en el transport de potassi, entre altres, que ajudarien a la cèl·lula a adaptar-se a aquestes condicions de creixement fermentatiu. D'altra banda, l'estrès salí causat pel NaCl provoca ràpidament la fosforilació de Snf1, i aquesta és requerida pel seu rol en la tolerància al sodi (Ye et al., 2008). A més, Snf1 controla l'homeòstasi dels ions a través la regulació del gen *ENA1*, el qual codifica per un sistema d'extrusió de sodi (Ye et al., 2008). La quinasa Sak1 juga un paper predominant sobre les altres quinases activadores de Snf1 en el cas de l'estrès salí, igual que en condicions d'esgotament de glucosa. Tot i així, Elm1 té un paper alternatiu en l'adquisició de la tolerància salina a través de l'activació de Snf1. Per tant, front aquest estrès, Snf1 es troba involucrada en una via diferent a la descrita en condicions de manca de glucosa, ja que la fosforilació de Snf1 induïda per l'estrès salí no promou ni la fosforilació com tampoc l'exportació nuclear del repressor Mig1, i aquest paper és dut a terme tan conjuntament com en paral·lel amb la seva quinasa "upstream" Elm1 (Ye et al., 2008).

Snf1 també és necessària per la resistència a agents com la HU, MMS i cadmi en cèl·lules creixent en glucosa, tot i que no és requerida en la defensa front altres factors genotòxics com la radiació ultraviolada (UV) o la gamma, el tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, camptotecina o pleomicina (Dubacq et al., 2004). La HU bloqueja específicament la síntesi de DNA a través de la inhibició de la ribonucleòtid reductasa (RNR) (Eklund et al., 2001). Aquesta inhibició fa disminuir els nivells de deoxinucleòsid trifosfats (dNTPs) i la subseqüent aturada de la força de replicació desencadena l'activació d'una de les vies de reparació de DNA. D'altra banda, el MMS actua com a agent alquilant que reacciona nucleofílicament amb les bases del DNA i les cisteïnes de les proteïnes, i la toxicitat del cadmi també està associada a aquesta unió amb les cisteïnes reactives. Aquest agent també podria inhibir de forma indirecta l'activitat de la RNR a través de l'alquilació de les cisteïnes dels sistemes reductors d'aquest enzim, com el glutatió, les TRXs o les GRXs (Eklund et al., 2001). En el cas de la HU, no es va observar cap hiperfosforilació del complex Snf1, suggerint que tenia un rol independent a aquesta modificació post-traduccionals en presència de glucosa (Dubacq et al., 2004). Per tant, baixos nivells d'activitat de Snf1 eren suficients per conferir a les cèl·lules resistència a HU. L'activitat d'aquesta quinasa contribueix a les rutes específiques que controla sota condicions fisiològiques diferents. Snf1 contribueix

modestament a la fosforilació de Mig3 (un repressor similar a Mig1 i Mig2 en termes d'unió a seqüències de DNA, tot i que no està clar que pugui reemplaçar-los funcionalment) front l'estrès genotòxic en presència de glucosa. Aquesta fosforilació podria inactivar la repressió de gens involucrats en la resistència a HU dependents de Mig3 (Dubacq et al., 2004).

L'estrès per condicions de pH alcalí provoca una resposta transcripcional ràpida en *S. cerevisiae* que inclou varis gens reprimits per glucosa. Els mutants *snf1* també són sensibles a aquesta alcalinització (Casamayor et al., 2012). A més, aquesta sensibilitat es reverteix quan s'afegeix glucosa al medi, i aquesta addició atenua també la fosforilació de Snf1 induïda per pH elevat. La quinasa Elm1 podria tenir un paper important en la protecció front la tolerància a aquest estrès a banda del seu rol en la regulació de Snf1. Tal i com s'ha esmentat, Elm1 està involucrat en la morfogènesi cel·lular i, a més, l'alcalinització del medi imposa un estrès en la paret cel·lular. Per tant, el fenotip de sensibilitat de mutants *elm1* podria ser el resultat de la combinació entre la deficiència de senyal via Snf1 i els defectes morfogènics agreujats per l'estrès de la paret. Snf1 regula, total o parcialment, l'activació d'un grup significatiu de gens induïts a curt termini per estrès alcalí, incloent aquells codificants per transportadors d'hexosa d'alta afinitat i enzims fosforiladors. A part, la funció de Snf1 en l'adaptació a l'escassetat de glucosa i en la tolerància a pH alcalí semblen estar relacionades (Casamayor et al., 2012).

Snf1 també està involucrada en l'estrès iònic per calci i per cadmi. En el primer cas, Snf1 intervé en l'expressió de *GPX1*, una glutatió peroxidasa induïda per calci i en situacions d'esgotament de glucosa (Ohdate et al., 2010). El tractament amb aquest ió causa la fosforilació de Snf1 de forma dependent de les tres quinases "upstream". El temps d'expressió de *GPX1* es veu retardat en un mutant *snf1*, per tant l'activació de la quinasa sembla crucial per la resposta a curt termini de Gpx1 front a un estrès per calci. D'altra banda, s'ha demostrat el rol de Snf1 en la tolerància al cadmi (Thorsen et al., 2009). Mutants *snf1* i en les seves tres quinases activadores són sensibles a cadmi, suggerint que la fosforilació de Snf1 és important per fer front a aquest estrès. Tot i així, la fosforilació basal de Snf1 no augmenta en incrementar els nivells de cadmi. Això, més el fet que mutants *mig1* no són sensibles a cadmi, suggereix que l'acció de Snf1 front aquest estrès és diferent del seu paper en condicions de manca de glucosa. A més, nivells baixos d'activitat Snf1 són suficients per protegir les cèl·lules de llevat front el cadmi en presència de glucosa (Thorsen et al., 2009).

Per tant, Snf1 actua de forma diferent en funció de l'estrès mediambiental. L'exposició de cèl·lules a estrès per sodi, pH alcalí i estrès oxidatiu resulta en la fosforilació del residu Thr210 de Snf1 per sobre dels nivells basals i en l'augment de la seva activitat catalítica, mentre que el tractament amb sorbitol o estrès osmòtic i l'estrès per calor no (Hong i Carlson, 2007). La inhibició del metabolisme respiratori a través de l'addició d'antimicina A a cèl·lules creixent en medi no fermentatiu també provoca l'augment d'activitat de Snf1 (Hong i Carlson, 2007). Mutants *snf1* també presenten termotolerància reduïda en fase estacionària (Thompson-Jaeger et al., 1991). A més, el mutant triple en les tres quinases "upstream" de Snf1 és defectiu en l'activació de la subunitat catalítica i fosforilació de Thr210 en resposta a estrès salí, pH alcalí i estrès oxidatiu (Hong i Carlson, 2007). En la majoria dels casos, Sak1 és la quinasa principal activadora de Snf1 en la cascada de senyals, el qual és consistent amb l'evidència que Sak1 es troba associat amb Snf1 formant un complex estable (Elbing et al., 2006a). Addicionalment, la regulació temporal de Snf1 és diferent durant l'adaptació de les cèl·lules al NaCl o al pH alcalí. Front l'estrès salí, l'activació de Snf1 es dona de forma ràpida i persistent. En canvi, en pH alcalí, Snf1 s'activa ràpidament però la seva activitat torna als nivells basals en una hora. Aquesta observació coincideix amb altres estudis que demostren que els canvis transcripcionals en resposta a pH alcalí són generalment més transitoris que aquells resultants de l'increment de la concentració salina (Causton et al., 2001). Aquests dos estressos també difereixen en la localització subcel·lular de Snf1. Aquesta i la subunitat  $\beta$  Gal83, les quals es troben al citoplasma en cèl·lules no estressades, s'acumulen al nucli en condicions de pH alcalí (Hong i Carlson, 2007). Contràriament, no esdevenen nuclears en resposta a estrès salí tot i que preferiblement romanen excloses del nucli. Les diferents localitzacions confereixen diferent accessibilitat als substrats i contribueixen a l'especificitat del tipus de resposta.

La sensibilitat a estrès tèrmic, el qual no indueix l'augment d'activitat Snf1 en les cèl·lules de llevat, suggereix que nivells baixos d'aquesta activitat són suficients per la termotolerància. Tal i com s'ha mencionat, la fosforilació de Snf1 no és essencial per la resistència a higromicina B o HU, així doncs la seva activitat basal dèbil també seria suficient (Dubacq et al., 2004; Portillo et al., 2005).

Els mecanismes que intervenen en la regulació de l'activitat de Snf1 per diferents estressos són del tot clars. Existeixen evidències que les tres quinases activadores no són sempre requerides per regular la senyalització de la resposta a l'estrès. Així doncs, aquestes senyals poden actuar directament sobre la quinasa Snf1, potser controlant la seva accessibilitat per la

fosforilació o desfosforilació, o també intervenint sobre el complex fosfatasa Reg1-Gcl7 (McCartney i Schmidt, 2001). Tot i així, possiblement Sak1, Elm1 i Tos3 són directament regulades per senyals d'estrès i contribueixen en part a la resposta via Snf1.

### **3.5.4 Papers reguladors del complex Snf1 en altres processos cel·lulars**

A banda del seu paper principal com a factor regulador en l'adaptació de les cèl·lules de llevat al canvi diàuxic, Snf1 també té un rol central en altres processos de desenvolupament cel·lular. La quinasa és requerida per ambdues etapes de la meiosi, la primerenca i la tardana (Honigberg i Lee, 1998). Snf1 permet l'entrada de la cèl·lula en meiosi a través de l'expressió de nivells elevats d'*IME1*, un gen que codifica per un regulador meiòtic (Purnapatre et al., 2002). Snf1 possiblement estaria relacionat també amb Apg1 i Apg13 (Wang et al., 2001), essent així un regulador positiu del procés d'autofàgia. A més, Snf1 juga un paper tan en el creixement de cèl·lules diploides en forma de pseudohifes com en el desenvolupament invasiu filamentós de cèl·lules haploides en resposta a l'escassetat de glucosa en el medi (Cullen i Sprague, 2000) o degut al creixement en diverses fonts de carboni alternatives (Palecek et al., 2002). Snf1 regula la transcripció de *FLO11*, que codifica per una glicoproteïna de la superfície cel·lular, la floculina, requerida per l'adherència i relacionada també amb el procés de filamentació (Vyas et al., 2003). Addicionalment, Snf1 està involucrada en envelliment, ja que tan la sobreexpressió de Snf1 com l'absència o la manca de N-miristilació de Sip2 desencadenen aquest procés (Ashrafi et al., 2000; Lin et al., 2001, 2003).

D'altra banda, Snf1 no només regula dianes nuclears sinó que també modula la funció de proteïnes citosòliques com Rod1, una proteïna de la família de les arrestines que coordina l'endocitosi de transportadors de fonts de carboni alternatives en presència de glucosa (Becuwe et al., 2012). A més, Rod1 també actua com a diana de PP1, tot i que és Snf1 qui el fosforila i per tant l'inactiva en medis amb fonts de carboni alternatives. Quan el medi passa a tenir glucosa, Rod1 intervé en la inactivació catabòlica de transportadors de fonts de carboni no fermentatives, com Jen1. A més, l'expressió de *JEN1* està regulada per Snf1, mostrant així una regulació fisiològica complexa on els efectes transcripcionals i post-transcripcionals estan coordinats (Becuwe et al., 2012).

## **II. OBJECTIUS**





## OBJECTIUS

A partir d'estudis previs sobre els efectes del selenit en cèl·lules de *S. cerevisiae*, els objectius d'aquest treball són el següents:

1. Determinar la funció de la quinasa Snf1/AMPK en la senyalització de l'estrès per selenit i els possibles blancs d'aquesta ruta senyalitzadora.
2. Analitzar la relació entre factors transcripcionals involucrats en l'homeòstasi i transport del Fe com són Aft1, Aft2 i Rim101, i la resposta a l'estrès per selenit.

Pels experiments corresponents es van utilitzar soques de *S. cerevisiae* com a model d'estudi.



### **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 leu2-3,2-111 his3-11,75 ura3-52</i>	Soca salvatge
W303 – 1B	MATa <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,2-111 his3-11,75 ura3-52</i>	Soca salvatge
Wsnf1	W303-1A <i>snf1-1::HIS3</i>	Proporcionada per F. Estruch
WΔ3	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	Proporcionada per J. Ariño
MML348	W303-1A <i>aft1::URA 3</i>	Rodríguez-Manzaneque et al., 2002
MML350	W303-1B <i>aft1::URA3</i>	Rodríguez-Manzaneque et al., 2002
MML830	W303-1A [pCM244 ( <i>tetR'</i> - <i>SSN6</i> )]::LEU2	Molina-Navarro et al., 2008
MML1086	W303-1A <i>aft2::kanMX4</i>	Castells-Roca et al., 2011
MML1088	W303-1A <i>aft1::URA3 aft2::kanMX4</i>	Castells-Roca et al., 2011
MML1304	W303-1A <i>pho84::natMX4</i>	Disrupció de <i>PHO84</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1356	W303-1A <i>aft1::natMX4</i>	Disrupció d' <i>AFT1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1368	W303-1A <i>sak1::natMX4</i>	Disrupció de <i>SAK1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1387	W303-1A <i>sak1::natMX4 elm1::kanMX4</i>	Mutacions <i>sak1::natMX4</i> de MML1368 i <i>elm1::kanMX4</i> de YPDahl21

## Materials i mètodes

Soca	Genotip	Comentaris
MML1389	W303-1A <i>sak1::natMX4 tos3::TRP1</i>	Mutacions <i>sak1::natMX4</i> de MML1368 i <i>tos3::TRP1</i> de YPDahl19
MML1390	W303-1A <i>elm1::kanMX4 tos3::TRP1</i>	Mutacions <i>elm1::kanMX4</i> de YPDahl21 i <i>tos3::TRP1</i> de YPDahl19
MML1392	W303-1A <i>sak1::natMX4 elm1::kanMX4 tos3::TRP1</i>	Mutacions <i>sak1::natMX4</i> de MML1368, <i>elm1::kanMX4</i> de YPDahl21 i <i>tos3::TRP1</i> de YPDahl19
MML1396	W303-1A <i>sip4::kanMX4</i>	Disrupció de <i>SIP4</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1398	W303-1B <i>snf1::HIS3</i>	Espora provinent del creuament de W303-1B x Wsnf1
MML1399	W303-1A <i>jen1::natMX4</i>	Disrupció de <i>JEN1</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1401	W303-1A <i>snf1::HIS3 pho84::natMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML1398 x MML1304
MML1402	W303-1A <i>snf1::HIS3 jen1::natMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML1398 x MML1399
MML1407	W303-1A <i>snf4::kanMX4</i>	Disrupció de <i>SNF4</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1408	W303-1A <i>mig1::kanMX4</i>	Disrupció de <i>MIG1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1417	W303-1A <i>cat8::natMX4</i>	Disrupció de <i>CAT8</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1419	W303-1A <i>adr1::natMX4</i>	Disrupció d' <i>ADR1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1439	W303-1A <i>sip1::natMX4</i>	Disrupció de <i>SIP1</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1440	W303-1B <i>sip2::kanMX4</i>	Disrupció de <i>SIP2</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>

Soca	Genotip	Comentaris
MML1441	W303-1A <i>gal83::HIS3</i>	Mòdul <i>gal83::HIS3</i> traslladat de MSY558 (Schmidt i McCartney, 2000) a W303-1A
MML1442	W303-1A <i>reg1::URA3</i>	Mòdul <i>reg1::URA3</i> traslladat de MCY3278 (Sanz et al., 2000) a W303-1A
MML1443	W303-1B <i>sip1::natMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML1439 x MML1440
MML1445	W303-1A <i>sip1::natMX4 sip2::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML1439 x MML1440
MML1446	W303-1B <i>sip1::natMX4 sip2::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML1439 x MML1440
MML1447	W303-1A <i>snf1::HIS3 trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	Espora provinent del creuament de WΔ3 x MML1398
MML1452	W303-1A <i>sip1::natMX4 gal83::HIS3</i>	Espora provinent del creuament de MML1441 x MML1443
MML1454	W303-1A <i>sip2::kanMX4 gal83::HIS3</i>	Espora provinent del creuament de MML1440 x MML1441
MML1459	W303-1A <i>sip1::natMX4 sip2::kanMX4 gal83::HIS3</i>	Espora provinent del creuament de MML1441 x MML1446
MML1655	W303-1A <i>snf1::HIS3 reg1::URA3</i>	Espora provinent del creuament de MML1398 x MML1442
MML1724	W303-1A <i>snf1::HIS3 elm1::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML1398 x YPDahl21
MML1740	W303-1A <i>rim101::natMX4</i>	Disrupció de <i>RIM101</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>



## Materials i mètodes

Soca	Genotip	Comentaris
MML1746	W303-1A <i>smf3::natMX4</i>	Disrupció de <i>SMF3</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1748	W303-1A <i>gex1::natMX4</i>	Disrupció de <i>GEX1</i> amb el mòdul <i>natMX4</i>
MML1750	W303-1A <i>gex2::kanMX4</i>	Disrupció de <i>GEX2</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1751	W303-1B <i>gex2::kanMX4</i>	Disrupció de <i>GEX2</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1752	W303-1A <i>gex1::natMX4 gex2::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML1748 x MML1751
MML1754	W303-1B <i>aft2::kanMX4</i>	Espora provinent del creuament de W303-1B x MML1086
MML1758	W303-1A <i>aft1::URA3 rim101::natMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML350 x MML1740
MML1760	W303-1A <i>aft2::kanMX4 rim101::natMX4</i>	Espora provinent del creuament de MML1740 x MML1754
MML1781	W303-1A <i>nrg1::kanMX4</i>	Disrupció de <i>NRG1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1783	W303-1A <i>smp1::kanMX4</i>	Disrupció de <i>SMP1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i>
MML1785	W303-1A <i>smp1::kanMX4 rim101::natMX4</i>	Disrupció de <i>SMP1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i> en MML1740
MML1787	W303-1A <i>nrg1::kanMX4 rim101::natMX4</i>	Disrupció de <i>NRG1</i> amb el mòdul <i>kanMX4</i> en MML1740
YPDahl19	W303-1A <i>tos3::TRP1</i>	Proporcionada per S. Hohmann (Ye et al., 2008)
YPDahl21	W303-1A <i>elm1::kanMX4</i>	Proporcionada per S. Hohmann (Ye et al., 2008)

Soca	Genotip	Comentaris
DLY4033	MATa <i>his3 ura3 lys2 trp1</i>	Soca salvatge, proporcionada per G. Pereira (Caydasi et al., 2010)
AKY516	MATa <i>his3 ura3 lys2 trp1 ELM1-GFP::kanMX4</i>	Derivada de DLY4033 (Caydasi et al., 2010)

## 1.2 Soques d'*Escherichia coli*

Per conservar i amplificar els plàsmids es va utilitzar la soca d'*E. coli* DH5α [*endA1*, *hsdR17*(*r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub>*), *supE44*, *thi-1*, F-, I-, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Delta$ (*lacZY-argF*),  $\phi$ 80 $\Delta$ (*lacZ* $\Delta$ M15)] (Hanahan, 1983).

## 2 PLÀSMIDS

Els plàsmids emprats en aquest treball i els comentaris respectius estan detallats en la Taula 2.

**Taula 2.** Plàsmids utilitzats en aquest treball.

Plàsmid	Plàsmid d'origen	Comentaris
	YCplac22	Vector centromèric, marcador <i>TRP1</i> (Gietz i Sugino, 1988)
	YEpl3	Vector episomal, marcador <i>LEU2</i> (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002)
	YEplac195	Vector episomal, marcador <i>URA3</i> (Gietz i Sugino, 1988)
	pCM189	Vector centromèric, marcador <i>URA3</i> , promotor <i>tetO<sub>7</sub></i> (Garí et al., 1997)
pMM412	pUG35	Plàsmid que expressa la proteïna Aft1-GFP clonada entre els llocs de restricció <i>EcoRI-ClaI</i> del vector centromèric pUG35, el qual conté el promotor de <i>MET25</i> i el gen per yEGFP. El plàsmid pUG35 va ser proporcionat per J. Hegemann, de l'Institut de Microbiologia de Düsseldorf, Alemanya
	p416-MET25	Vector centromèric, marcador <i>URA3</i> , proporcionat per U. Mühlenhoff
pFIT3-GFP	p416-MET25	Proporcionat per U. Mühlenhoff, expressa la proteïna GFP sota el control del promotor de <i>FIT3</i>

## Materials i mètodes

Plàsmid	Plàsmid d'origen	Comentaris
pFET3-GFP	p416-MET25	Proporcionat per U. Mühlhoff, expressa la proteïna GFP sota el control del promotor de <i>FET3</i>
	pWS93	Proporcionat per P. Sanz, vector episomal amb la regió 3xHA, marcador <i>URA3</i>
pWS-Snf1	pWS93	Proporcionat per P. Sanz, derivat de pWS93 amb <i>SNF1</i> en fase amb la regió 3xHA
pWS-Snf1-T210A	pWS93	Proporcionat per P. Sanz, derivat de pWS93 amb una substitució T210A en el producte de <i>SNF1</i>
pWS-Snf1-K84R	pWS93	Proporcionat per P. Sanz, derivat de pWS93 amb una substitució K84R en el producte de <i>SNF1</i>
pYcP414	pCM262	Proporcionat per L. Yenush, plàsmid centromèric que sobreexpressa <i>TRK1</i> i expressa un epítip HA a l'extrem C-terminal, marcador <i>TRP1</i>
	pOV84	Proporcionat per O. Vincent, plàsmid que expressa una proteïna Snf1-GFP sota el control del promotor de <i>SNF1</i>
pMM1039	pCM189	<i>GLR1</i> sota el control del promotor <i>tetO</i> , clonat entre els llocs de restricció <i>PmeI-NotI</i> del vector
P1116	YEplac195	Proporcionat per B. Daignan-Fornier, sobreexpressa <i>GLR1</i> amb el seu propi promotor en el vector multicòpia (Pinson et al., 2000)
pHA-Mig1	pKB174	Proporcionat per P. Sanz, plàsmid que expressa el factor transcripcional Mig1 amb un epítip HA a l'extrem C-terminal
pMM1086	YEp13	Nom original del clon aïllat: <i>pdAFT2-4</i> . Conté els gens <i>NAS6</i> (no sencer) i <i>PHO81</i> entre els llocs de restricció <i>EcoRI-HindIII</i> del vector YEp13
pMM1087	YEp13	Nom original del clon aïllat: <i>pdAFT2-6</i> : Conté els gens <i>RUF23</i> , <i>RRT5</i> , <i>RPL29</i> , <i>YFR032C-B</i> , <i>QCR6</i> , <i>PHO4</i> , <i>YFR035C</i> , <i>CDC26</i> i <i>RSC8</i> (no sencer) i entre els llocs de restricció <i>EcoRI-HindIII</i> del vector YEp13
pMM1088	YEp13	Nom original del clon aïllat: <i>pdAFT2-9</i> : Conté els gens <i>NAS6</i> i <i>PHO81</i> entre els llocs de restricció <i>EcoRI-HindIII</i> del vector YEp13
pMM1089	YEp13	Nom original del clon aïllat: <i>pdAFT2-13</i> . Conté els gens <i>NOG1</i> i <i>RPS6A</i> trencats i <i>SSU1</i> i <i>GLR1</i> sencers entre els llocs de restricció <i>EcoRI-HindIII</i> del vector YEp13

### 3 MEDIS DE CULTIU

Els medis de cultiu emprats pel creixement de *S. cerevisiae* es detallen a continuació. Per obtenir medis de cultiu sòlids s'afegava agar al 2%.

- **YPD:** glucosa 2%, peptona 2%, extracte de llevat 1%.
- **YPGal:** galactosa 2%, peptona 2%, extracte de llevat 1%.
- **YPGly:** glicerol 3%, peptona 2%, extracte de llevat 1%.
- **SC** (Sherman, 2002): base nitrogenada per llevats sense aminoàcids (YNB w/o aa, Difco) 0,67%, glucosa 2%, Drop-out sintètic sense histidina, leucina, triptòfan i uracil (Sigma) 0,2%. El Drop-out és la combinació en sec de bases nitrogenades, aminoàcids i vitamines (excepte el suplement adequat en el cas de selecció de plàsmids).
- **Medi d'espulació:** acetat de potassi 1%, extracte de llevat 0,1%, glucosa 0,05%.
- **SD** (Sherman, 2002): com el SC però sense Drop-out.

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

- **LB:** triptona 1%, NaCl 1%, extracte de llevat 0,5%. pH ajustat a 7,5 amb NaOH 1 M. Per la selecció de transformants amb plàsmids portadors del gen de resistència a ampicil·lina es va afegir a aquest medi l'antibiòtic a una concentració final de 50 mg/l en el medi.

### 4 CULTIU DE MICROORGANISMES

Pel cultiu de *S. cerevisiae*, les cèl·lules s'incubaven a 30°C, mentre que en el cas d'*E. coli* es feia a 37°C, en ambdós casos agitant els cultius líquids a 180 r.p.m. La mesura del creixement dels cultius es realitzava mitjançant la lectura de la densitat òptica a 600 nm. En cultius en condicions de baixos nivells de glucosa, la concentració d'aquesta al medi era del 0,05%. Per tal de controlar la concentració de fosfat en el medi de cultiu, el medi SD amb 2% glucosa sense fosfat (Formedium) va ser emprat com a medi basal sense fosfat, al qual s'afegia  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a una concentració final 0,2 mM (condicions de concentració baixa de fosfat) o 7,3 mM (condicions normals de fosfat). En el primer cas, es va addicionar KCl a una concentració final 7,3 mM.

El selenit sòdic (Sigma) s'afegia al medi de cultiu a una concentració final que depenia de l'experiment, a partir d'una solució patró a concentració 1 M. Quan era necessari, es suplementava el medi YPD amb Fe exogen mitjançant l'addició de BPS (àcid sulfònic de batofenantrolina, Fluka) a una concentració final de 90 µM a partir d'una solució patró a 50 mM, més FeSO<sub>4</sub> a 100 µM final a partir d'un patró a 100 mM (Berthelet et al., 2010). Per crear condicions de dèficit de Fe, el BPS s'addicionava al medi a una concentració final de 0,15 mM a partir d'una solució patró a 6 mM preparada en aigua MilliQ estèril. Altres agents suplementats al medi van ser el dietil maleat (DEM) (Aldrich) a una concentració final 1 mM, l'hidroperòxid de *tert*-butil (t-BOOH) (Aldrich) a 0,5 mM de concentració final i la diamida (Sigma) a 1,25 mM. D'aquests dos últims també se'n preparava una solució patró 1 M i 100 mM respectivament, en aigua MilliQ estèril.

Quan es prenen mostres de cultius líquids control o sotmesos a tractaments a diferents temps es feien dilucions quan era necessari amb el mateix tipus de medi per tal que la concentració cel·lular en cap dels casos fos superior a  $4 \times 10^7$  cèl·lules/ml.

## 5 TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 5.1 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 0,1% 8-hidroxiquinolina i saturat amb TE.
- **TE:** 0,5 ml d'una solució Tris-HCl 2 M, pH 8,0; 0,2 ml d'una solució d'EDTA 0,5 M, pH 8,0; aigua fins un volum de 100 ml.
- **NaOAc:** acetat de sodi 0,3 M, pH 8.

#### Procediment:

1. S'inoculaven 10 ml de medi YPD amb una colònia fresca de la soca corresponent de *S. cerevisiae* i es deixava créixer durant 16 hores.
2. El cultiu es centrifugava a 3.000 x g durant 2 min i es passaven les cèl·lules a un tub eppendorf per rentar-les amb 1 ml d'aigua estèril.

3. Les cèl·lules es resuspenien en 200 µl de TNST i després s'afegien 200 µl de FC i 200 µl de perles de vidre (450-600 µm de diàmetre, Sigma).
4. La mescla s'agitava en el vòrtex a màxima velocitat durant 4 min.
5. Posteriorment, s'afegien 200 µl de TE barrejant per inversió. La mescla es centrifugava a 13.200 x g durant 5 min.
6. S'agafava el sobrenedant i es col·locava en un tub nou, al qual se li afegia 1 ml d'etanol 100%. Després de barrejar-ho per inversió, es centrifugava la mescla a 13.200 x g durant 5 min.
7. S'afegien 400 µl de TE juntament amb 3 µl de RNAsa (10 mg/ml) al precipitat 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 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 tornava a centrifugar altre cop a 13.200 x g durant 1 min.
11. El sobrenedant es retirava completament i es centrifugava de nou a la mateixa velocitat. El sobrenedant restant es retirava del tot i el precipitat es deixava assecar en l'aparell Concentrator Plus (Eppendorf) durant 4 min.
12. El precipitat es resuspenia en 50 µl d'aigua MilliQ i es valorava la concentració final obtinguda en l'equip Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer, i també la seva qualitat de forma aproximada per electroforesi en gel d'agarosa (Serva) al 0,8%, comparant la intensitat de les bandes corresponents amb la intensitat de les bandes patró de quantitat coneguda.

## **5.2 Tècniques de DNA recombinant**

### **5.2.1 Amplificació i clonació de gens**

Per la clonació de gens de *S. cerevisiae*, s'amplificaven aquests (amb els oligonucleòtids adequats per cada cas) mitjançant PCR a partir de DNA genòmic de la soca d'interès de *S. cerevisiae* i es duïen a terme les digestions, tan 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 per cadascuna de les digestions. Els fragments de DNA obtinguts després 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 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 insert i vector s'utilitzava l'enzim T4 DNA ligasa (Takara), seguint les instruccions del fabricant.

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

Per la purificació de plàsmids amplificats en *E. coli* es cultivaven les cèl·lules en medi LB amb ampicil·lina a 37°C durant 16 hores, i s'utilitzava el sistema "NucleoSpin® Plasmid QuickPure" (Macherey-Nagel GmbH) segons les indicacions del fabricant.

### **5.2.3 Mètodes de transformació per *E. coli* i *S. cerevisiae***

L'obtenció de cèl·lules competents i la transformació de cultius d'*E. coli* mitjançant el mètode de clorur de calci es feien d'acord amb els protocols estàndards de laboratori (Ausubel et al., 1994). En la transformació de *S. cerevisiae* amb plàsmids es seguia el mètode ràpid amb acetat de liti (Gietz i Sugino, 1988), plaquejant les cèl·lules en medi selectiu SC (segons l'auxotròfia de selecció corresponent) i incubant les plaques a 30°C durant un mínim de 48 hores.

## **5.3 Construcció de mutants nuls simples i múltiples de *S. cerevisiae***

Els mutants nuls per un únic gen es van obtenir seguint el mètode de substitució per homologia de seqüències flanquejants curtes amb el mòdul *kanMX4* (resistència a genètica) (Wach et al., 1994) o *natMX4* (resistència a nourseotricina) (Goldstein i McCusker, 1999), els quals eren amplificats prèviament per PCR amb oligonucleòtids específics per cada gen. Les mutacions es confirmaven a continuació 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 disrupció més uns 300 pb a cada costat i transformant directament la soca receptora amb el producte amplificat.

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).

## 5.4 Anàlisi de l'expressió gènica per Northern blot

### Obtenció de mostres

Inicialment es precultiuava la soca d'interès en 10 ml de cultiu líquid (segons s'indicarà en cada cas) i s'incubava en agitació a 30°C durant 16 hores. Posteriorment, es diluïa el cultiu fins a una concentració d'aproximadament  $1,5 \times 10^6$  cèl·lules/ml i es deixava créixer fins a  $1-2 \times 10^7$  cèl·lules/ml (fase exponencial mitjana). En aquest moment s'afegia l'agent corresponent en cada cas i es prenia una mostra a temps 0 de tractament. A continuació, es prenen mostres a diferents temps, amb un mínim de  $3 \times 10^8$  cèl·lules per mostra. Just després de recollir les cèl·lules, es centrifugaven a  $3.000 \times g$  durant 5 min i es rentaven amb aigua MilliQ a 4°C. Seguidament es congelaven amb nitrogen líquid i o bé es conservaven a -80°C o es continuava fent immediatament l'extracció del RNA.

Tan per fer els rentats dels cultius com per la transferència del RNA a la membrana de Nylon s'utilitzava aigua MilliQ lliure de RNases. El material d'electroforesi i el de transferència es rentava amb aigua i sabó, i després es tornava a passar aigua MilliQ. A més, el material i les mostres es manipulaven amb guants.

### Solucions i materials:

- **Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche):** fragments Fab conjugats amb fosfatasa alcalina.
- **B1:** 25 ml d'una solució de Tris-HCl 2 M, pH 8,0; 25 ml d'una solució de NaCl 2,5 M; aigua fins a 500 ml. Esterilitzat a l'autoclau.
- **B2:** 0,5 g de Blocking Reagent (Roche), 100 ml de B1. Esterilitzat en l'autoclau.
- **B3:** 0,5 ml de dietanolamina (Applied Biosystems), 40 µl de HCl 37%, aigua fins a 50 ml.
- **CDP-Star™ (Roche):** substrat de la fosfatasa alcalina la desfosforilació del qual dona lloc a la formació d'un compost quimioluminiscent.
- **FC:** fenol/cloroform/alcohol isoamílic 25:24:1 amb 0,1% 8-hidroxiquinolina i saturat amb TE.
- **Fenol àcid:** fenol:aigua 3,75:1 (Invitrogen).
- **MagicHyb:** 25 ml d'una solució de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 M, pH 7,2; 1 ml d'una solució d'EDTA 0,5 M, pH 8,0; 20 g de SDS; 0,5 g de Blocking Reagent (Roche); aigua fins a 100 ml. Conservada a 4°C.
- **Membrana de Nylon (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 Nylon.
- **10xNBC:** àcid bòric 0,5 M, citrat de sodi 10 mM, NaOH 50 mM, aigua fins a 1 litre, pH 7,5. Després de preparar aquesta solució s'afegia dietil pirocarbonat 1%, es barrejava per inversió i s'esterilitzava a l'autoclau.
- **Tampó de càrrega 10x:** Ficoll 15%, EDTA disòdic 0,1 M, pH 8,0; blau de bromofenol 0,25%.
- **TE:** 0,5 ml d'una solució de Tris-HCl 2 M, pH 8,0; 0,2 ml d'una solució d'EDTA 0,5 M, pH 8,0; aigua fins a 100 ml. Esterilitzada en l'autoclau.
- **TES:** 0,5 ml d'una solució de Tris-HCl 2 M, pH 8,0; 2 ml d'una solució d'EDTA 0,5 mM, pH 8,0; 0,5 ml d'una solució de SDS 10%; aigua fins a 100 ml. Esterilitzada en l'autoclau.
- **WB:** 10 ml d'una solució de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, pH 7,2; 1 ml d'una solució d'EDTA 0,5 M, pH 8,0; 5 g de SDS; aigua fins a 500 ml.

### Extracció del RNA total:

1. Es resuspenien les cèl·lules en 25 µl de TE i després se'ls hi afegien 25 µl de fenol àcid.
2. S'incubava la mescla a 65°C durant 2 min i després s'afegava un volum igual de perles de vidre (450-600 µm, Sigma).
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 s'agitava amb el vòrtex a velocitat màxima durant 30 s.
5. Es tornava a incubar la mostra a 65°C durant 15 min i es feia una última agitació amb el vòrtex a velocitat màxima durant 30 s. Seguidament s'incubava la mostra en gel durant 5 min.
6. La mescla es centrifugava 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'afegien 500 µl de FC.
7. S'agitava amb el vòrtex a velocitat màxima durant 30 s i després es centrifugava a 13.200 x g durant 5 min a 4°C.
8. Es prenia tot el sobrenedant, es dipositava en un tub nou i s'afegien 40 µl de NaOAc i 1 ml d'etanol 100%.
9. La mescla del tub s'incubava a -20°C durant 1-2 hores per tal que el RNA precipités. Després es centrifugava a 13.200 x g a 4°C durant 5 min.

10. Es rentava el precipitat amb etanol al 70% sense resuspendre'l. Es retirava tot el sobrenedant i es deixava assecar a l'aparell Concentrator Plus (Eppendorf) durant 3 o 4 min, o fins que el precipitat estigués sec.
11. Es resuspenia el RNA en 50 µl d'aigua MilliQ lliure de RNAses.
12. Per la valoració del RNA total extret es feia una dilució 1:100 en aigua MilliQ lliure de RNAses i es mesurava la densitat òptica d'aquesta dilució a 260 nm. Es calculava la concentració considerant que 1 unitat de densitat òptica (260 nm) correspon aproximadament a 40 µg/µl de RNA. Un rati [densitat òptica (260)/densitat òptica (280)] d'aproximadament 2 indicava que el RNA obtingut era pur, i la concentració final s'ajustava entre 5 i 10 µg/µl.
13. El RNA total extret es conservava a -20°C o es processava directament per l'electroforesi en gel d'agarosa.

**Síntesi de sondes de DNA marcades amb Dioxigenin-dUDP (DIG-dUDP):**

La síntesi de sondes per la detecció de mRNA es duia a terme utilitzant el kit "DIG DNA Labeling Mix, 10x concentration" (Roche), seguint les indicacions del fabricant. Com a motlle de síntesi de la sonda s'emprava un fragment del gen d'interès, amplificant per PCR a partir de DNA genòmic amb els oligonucleòtids adequats en cada cas. La qualitat de la sonda es verificava mitjançant Dot-blot. Aquesta tècnica consistia en la fixació de dilucions seriades 1:10 de la sonda a analitzar a la membrana de Nylon mitjançant l'equip Stratalinker 1.800 (Stratagen) irradiant amb llum ultraviolada (12.000 µJ/cm<sup>2</sup>). Després, es procedia a la seva detecció per quimioluminiscència (igual que com s'explicarà més endavant) i es comparava la intensitat de la marca resultant amb la d'una altra sonda prèviament utilitzada per veure'n la qualitat i tenir una idea de la quantitat a emprar en les hibridacions.

**Electroforesi en gel de formaldehid-agarosa:**

1. Es barrejaven 0,8 g d'agarosa (Serva) amb 80 ml d'1xNBC. La mescla s'escalfava fins que l'agarosa es dissolia completament.
2. Es deixava refredar l'agarosa fins a 65°C i s'afegien 2 ml de formaldehid al 37% barrejant bé.
3. La solució d'agarosa es posava a la cubeta d'electroforesi amb els pintes i es deixava solidificar durant 45 min aproximadament. L'1xNBC era usat com a tampó d'electroforesi.
4. Es prenen de 5 a 10 µg de RNA total i es col·locaven a un tub nou.

5. Després s'afegien 2 µl de 10xNBC, 3 µl de formaldehid al 37% i 10 µl de formamida.
6. S'incubava aquesta mescla a 65°C durant 15 min i després s'afegien 2 µl de tampó de càrrega 10x juntament amb 0,5 µl de solució de bromur d'etidi (2 mg/ml).
7. Es carregaven les mostres al gel i es corria l'electroforesi a 100 V durant 90 min.

### **Transferència a la membrana de Nylon i fixació amb rajos UV:**

1. La membrana de Nylon (dimensions 5 x 15 cm) es submergia en aigua MilliQ 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 transferència de RNA acoblat a la bomba de buit, LKB VacuGen X de Pharmacia).
3. S'acoblava l'equip a la bomba de buit i es col·locava a una pressió de 50 mBar.
4. Es cobria el gel amb aigua MilliQ durant 15 min.
5. Es retirava l'aigua i es cobria el gel de nou amb NaOH 0,1 M durant 15 min. Es repetia aquest pas un cop més.
6. Es treia la solució anterior i es cobria el gel amb Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 durant 15 min.
7. Es retirava aquesta solució i després es cobria la càmera del VacuBlot amb aigua MilliQ fins cobrir completament els gels per transferir el RNA durant 90 min.
8. Passat aquest temps, es treia la membrana del VacuBlot i es col·locava sobre una safata amb paper de filtre humit.
9. Es posava la membrana amb la safata a l'equip Stratalinker 1.800 (Stratagen) i s'aplicava llum ultraviolada (12.000 µJ/cm<sup>2</sup>) per tal que el RNA quedés fixat en ella.
10. Usant un transiluminador UV convencional es verificava la transferència i la posició dels rRNA.
11. Per treure el tampó de càrrega i el formaldehid, es rentava la membrana dos cops amb 100 ml de WB a 65°C durant 15 min.

### **Hibridació i rentats:**

1. La solució MagicHyb es preescalfava en un bany a 65°C fins que estava completament líquida.
2. Després dels rentats, la membrana es posava en un tub d'hibridació junt amb 5 ml de MagicHyb i s'incubava durant 1 hora a 65°C amb rotació.

3. Per desnaturalitzar la sonda 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'afegien els 100 µl de la sonda desnaturalitzada en la solució de TE al tub d'hibridació amb 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 preescalfat a la mateixa temperatura. Aquest pas es repetia dos cops més.

**Detecció per quimioluminiscència:**

Tots els passos que venen a continuació es feien a temperatura ambient.

1. Es rentava la membrana dos cops amb 50 ml de B1 durant 5 min.
2. Per bloquejar la membrana s'usaven 50 ml de B2 i s'incubava en agitació suau durant 60 min.
3. Es feia una dilució 1:15.000 de l'anticòs Anti-DIG en B2 i s'incubava en agitació suau durant 30 min.
4. Per retirar l'excés d'anticòs, es rentava la membrana quatre cops amb 50 ml de B1 durant 5 min cada cop.
5. Seguidament, s'incubava la membrana amb 50 ml de B3 durant 5 min i després amb 1 ml de B3 amb CDP-Star diluït 1:100 durant 5 min.
6. Per captar la quimioluminiscència s'utilitzava l'equip ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

**Quantificació de la imatge obtinguda:**

La imatge es podia quantificar emprant 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.

**5.5 Anàlisi de l'expressió gènica utilitzant microordenaments de DNA**

**Obtenció de mostres**

Inicialment es precultivaven la soca salvatge i la soca d'interès en 10 ml de cultiu líquid i s'incubaven en 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. En aquest moment s'afegia l'agent que s'estava assajant i s'agafava una mostra sense tractar corresponent al temps 0. A continuació, es prenen mostres a diferents temps, recollint aproximadament  $6 \times 10^8$  cèl·lules per mostra. Sempre que era necessari es feien les dilucions pertinents per tal que els cultius no superessin una concentració de  $5 \times 10^7$  cèl·lules/ml.

Les mostres eren recol·lectades per filtració amb filtres de nitrocel·lulosa (0,8  $\mu\text{m}$ , *White AAWP*, 25 mm; Millipore) i amb xeringues (BD Plastipak) on hi cabien fins a 60 ml de cultiu com a màxim. El filtre que retenia les cèl·lules es guardava en un tub prèviament refredat i es congelava amb nitrogen líquid abans de guardar-lo al congelador a  $-80^\circ\text{C}$ . Enlloc de congelar-lo amb nitrogen líquid, també es podia guardar a  $0^\circ\text{C}$  per passar a l'extracció del RNA directament.

### **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 un detergent "RNase Zap® Wipes" si es creia convenient.

El RNA total s'aïllava emprant el kit "RiboPure™-Yeast" (Ambion) seguint les instruccions del fabricant. Tot seguit, es realitzava un tractament amb DNAses (seguint el protocol del mateix kit) i es determinava la concentració de RNA final utilitzant l'equip NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer per tenir un valor quantitatiu de la mostra. També es mirava la qualitat del RNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1%.

### **Assaig i anàlisi dels microordenaments de DNA**

Les mostres de RNA s'enviaven al Servei de Genòmica i Bioinformàtica de la Universitat Autònoma de Barcelona per tal de ser analitzades. El servei utilitzava uns microordenaments de DNA genòmic de llevat fabricats en el seu propi laboratori a partir d'un assortit de 6014 ORFs ("Open Reading Frames") diferents de *S. cerevisiae*, amplificades per PCR. Tan la construcció dels microxips com les seves característiques estan detallades en Viladevall et al. (2004).

El marcatge del cDNA a partir del RNA, els passos de prehibridació, hibridació i rentats, l'escaneig dels microxips amb el cDNA, l'extracció de les dades i l'anàlisi informàtic dels resultats es van realitzar tal i com es descriu en Casamayor et al. (2012).

## **5.6 Anàlisi de proteïnes per Western blot**

Els anàlisis per Western blot van ser realitzats de manera general tal i com es descriu en Bellí et al. (1998), amb les particularitats que s'indicaran en cada cas. Els anticossos emprats són els següents: anti-Fosfo-Thr172-AMPK policlonal de conill (1:1000, Cell Signaling Technology), anti-Snf1 de conill [1:1000, proporcionat per P. Sanz (Institut de Biomedicina de València, CSIC)] i anti-Leu1 de conill [1:1000, proporcionat per U. Mühlhoff (Institut de Citobiologia i Citopatologia de la Universitat de Marburg, Alemanya)].

## **6 DETECCIÓ DE LA PROTEÏNA FOSFORILADA I TOTAL DE SNF1**

### **Obtenció de mostres**

En primer lloc es precultiuava la soca d'interès en 10 ml de cultiu líquid (segons s'indicarà en cada cas) i s'incubava en agitació a 30°C durant 16 hores. Posteriorment, es diluïa el cultiu fins a una concentració d' $1,5 \times 10^6$  cèl·lules/ml i es deixava créixer fins que arribés a fase exponencial mitjana. En aquest moment s'afegia l'agent que s'estava assajant i es prenia una mostra sense tractar corresponent al temps 0. A continuació, s'agafaven mostres a diferents temps, recollint  $10^8$  cèl·lules per mostra. En aquest pas la presa de cada mostra havia de ser molt acurada ja que després no es mesurava la quantitat de proteïna obtinguda, per tant era important que es recollissin de forma exacta el nombre de cèl·lules esmentades per tal que totes les mostres fossin equivalents. El processos de manipulació i d'extracció proteica de les mostres es van realitzar seguint el protocol detallat en Orlova et al. (2008), basat en l'escalfament sobtat de les cèl·lules a 100°C per evitar la fosforilació artificial del residu Thr210 de Snf1.

Les cèl·lules no es podien congelar per ser processades amb posterioritat, sinó que s'havia d'extreure la proteïna seguidament sent aquest extret el que podia ser congelat a -20°C.

### **Solucions i materials:**

- **TE 1x:** Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.
- **NaOH 0,2 M.**
- **Tampó de mostra SDS-PAGE:** Tris-HCl 80 mM, pH 6,8; EDTA 10 mM, SDS 4%, glicerol 20%, blau de bromofenol 0,2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%.

- **Tampó Running 1x:** tampó del gel de SDS-PAGE que es preparava a partir de 100 ml de tampó Running 10x (Bio-Rad) i aigua MilliQ fins a 1 litre.
- **Glicina 0,2 M.**

### Ebullició del cultiu i extracció proteica

1. Abans de processar les mostres, es preescalfava un bany a 100°C i a dins es ficaven els matrassos per tal que estiguessin calents.
2. Les 10<sup>8</sup> cèl·lules de cada mostra es transferien al matràs preescalfat i aquest es tornava a posar immediatament al bany a 100°C, agitant-lo entre 5 i 10 s per que la calor es propagués ràpida i uniformement.
3. Es mantenia la mostra a 100°C durant 3 min. Després, es retirava el matràs (amb la mostra) del bany i es deixava que es refredés a temperatura ambient.
4. Un cop la mostra estava temperada, es centrifugava a 3.000 x g durant 5 min a temperatura ambient.
5. El sobrenedant es retirava acuradament, i cada precipitat es resuspensia en 150 µl de TE 1x.
6. Tot seguit s'afegien 150 µl de NaOH 0,2 M i s'incubava la barreja 5 min a temperatura ambient.
7. Es centrifugava la mescla a 10.000 x g durant 1 min i es retirava el sobrenedant acuradament.
8. El precipitat restant es resuspensia en 90 µl de tampó de mostra SDS-PAGE.
9. Es bullia la mostra a 95°C durant 5 min. Després, es deixava temperar a temperatura ambient.
10. La barreja es centrifugava a 10.000 x g durant 5 min.
11. Es recuperava el sobrenedant i les mostres es carregaven al gel de SDS-PAGE (entre 10 i 15 µl de cada mostra) o es guardaven a -20°C per ser utilitzades en un altre moment.

### Preparació del gel de SDS-PAGE:

Per procedir a la separació proteica de les mostres obtingudes, es corrien els sobrenedants en un gel de poliacrilamida amb el detergent aniònic dodecilsulfat sòdic (SDS) (SDS-PAGE). Aquest tipus de gel té les característiques de composició indicades a la **Taula 3**.

**Taula 3.** Composició dels gels separador i empilador per l'electroforesi en SDS-PAGE.

GEL SEPARADOR (9%)		GEL EMPILADOR (5%)	
Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8	1,25 ml	Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8	0,75 ml
Solució d'acrilamida 40% (Bio-Rad)	1,095 ml	Solució d'acrilamida 40% (Bio-Rad)	0,38 ml
Solució de bis-acrilamida 2% (Bio-Rad)	0,605 ml	Solució de bis-acrilamida 2% (Bio-Rad)	0,2 ml
SDS 10%	50 µl	SDS 10%	30 µl
TEMED (Bio-Rad)	5 µl	TEMED (Bio-Rad)	5 µl
Persulfat amònic 10% (Bio-Rad)	25 µl	Persulfat amònic 10% (Bio-Rad)	20 µl
Aigua MilliQ	1,97 ml	Aigua MilliQ	1,63 ml
Volum final	5 ml	Volum final	5 ml

Un cop els dos gels estaven preparats, es carregaven les mostres i es cobria el muntatge amb tampó Running 1x. S'aplicava una corrent de 25 mA/gel i sense limitació de voltatge.

#### Western blot:

Els anticossos emprats en aquest cas per l'anàlisi per Western blot estan descrits en l'apartat 5.5 d'aquesta mateixa secció (anti-Fosfo-Thr172-AMPK i anti-Snf1). L'anticòs anti-Snf1 s'incubava en la mateixa membrana on primer s'havia utilitzat l'anti-Fosfo-Thr172-AMPK. Per tant, es feien uns rentats previs per tal d'eliminar la senyal detectada amb aquest primer anticòs.

1. Es rentava la membrana amb TBST (descriu en el protocol de Bellí et al., 1998) 2 cops durant 5 min a temperatura ambient.
2. Després, s'incubava la membrana amb glicina 0,2 M durant 4 min.
3. Es feien dos rentats més de 10 min amb TBST, abans de continuar amb els altres rentats característics del Western blot.



## **7 ESTUDIS FENOTÍPICS DEL CREIXEMENT**

### **7.1 Anàlisi del creixement microbià en medi sòlid**

Pels assajos de sensibilitat a diferents condicions ambientals (per exemple, en presència o absència de selenit), les cèl·lules creixien exponencialment en medi YPD fins al voltant de  $2 \times 10^7$  cèl·lules/ml, equivalent a 0,6 unitats de densitat òptica (600 nm). Seguidament, es plaquejaven mitjançant dilucions seriades (1:5) sobre medi YPD, SC o YPGal sòlid. Les plaques s'incubaven durant un mínim de 48 hores a 30°C.

### **7.2 Anàlisi del creixement microbià en medi líquid**

Una altra manera d'estudiar el creixement sota diferents condicions es basava en el cultiu de les soques d'interès en medi líquid amb els tractaments determinats i específics en cada cas. Per dur a terme l'experiment, es precultivava la soca d'interès en 10 ml de cultiu líquid (diferent en funció de l'assaig) i s'incubava en agitació a 30°C durant 16 hores. Posteriorment, es diluïa el cultiu fins a una concentració d' $1,5 \times 10^6$  cèl·lules/ml i es deixava créixer fins que estigués en fase exponencial mitjana. Els cultius exponencials es diluïen fins a una densitat òptica a 600 nm de 0,1 (equivalent aproximadament a  $3 \times 10^6$  cèl·lules/ml) en una placa de 24 pous ("Multiwell™" de Becton Dickinson Labware). S'afegia un volum del cultiu a cada pou de la placa, juntament amb la concentració adequada de l'agent a testar o sense agent (cultiu control). L'aparell PowerWave XS (de BioTek Instruments) recollia les dades de la densitat òptica a 600 nm de cadascun dels pous, agitats contínuament, amb periodicitat d'una hora al llarg de 37 o 40 hores d'incubació a 30°C.

## **8 ANÀLISIS METABOLÒMICS DE *S. cerevisiae* PER ESPECTOMETRIA DE MASSES**

Els estudis metabolòmics de les soques d'interès de *S. cerevisiae* es van realitzar seguint uns protocols adaptats de Castrillo et al. (2003) i Dunn i Winder (2011).

### **Solucions i materials:**

- **Metanol (Carlo Erba):** amb grau de puresa apte per poder ser emprat en HPLC.

- **Tricina 0,1 M, pH 7,4:** solució patró que es preparava cada cop a menys de 48 hores de realitzar l'experiment, s'esterilitzava a l'autoclau i es guardava a 4°C abans de ser utilitzada.
- **Cloroform (Sigma):** amb grau de puresa apte per poder ser emprat en HPLC.
- **Nitrogen líquid i gel sec.**
- **Solució de "Quenching":** 60% de metanol i 40% de Tricina 10 mM pH 7,4. La Tricina s'afegia a partir de la solució patró de concentració 0,1 M preparada recentment.
- **Solució salina:** clorur de sodi (Serva) al 0,85% (v/v) dissolt en aigua i filtrat.
- **Solució d'extracció 1:** metanol al 80% i aigua MilliQ al 20% (v/v).
- **Solució d'extracció 2:** cloroform.
- **Solució d'extracció 3:** aigua MilliQ.
- **Formaldehid (Sigma).**

#### **Obtenció de mostres**

En primer lloc es precultivaven les soques a analitzar en 10 ml de medi líquid SC i s'incubaven en 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. En aquest moment s'afegia l'agent objecte d'assaig i es prenia paral·lelament una mostra sense tractar corresponent al temps 0. Posteriorment, s'agafaven mostres a diferents temps, recollint  $2,6 \times 10^8$  cèl·lules per mostra. Es separaven 200 µl de cada mostra en un tub eppendorf on hi havia 10 µl de formaldehid (Sigma), per tal de determinar el número de cèl·lules en cada temps de tractament. El tub es podia guardar a 4°C fins que aquest nombre fos quantificat en un aparell comptador i mesurador de partícules Coulter Z2.

En aquest tipus d'experiment, cada cop que es recollia la mostra es duïen a terme una sèrie de passos per tal d'aturar instantàniament el metabolisme cel·lular.

1. Es refredaven 40 ml de solució de "Quenching" en un tub de centrífuga de 50 o 100 ml en el congelador a -80°C durant 1 hora.
2. En el moment de recollida de la mostra, es transferia la mostra del cultiu de forma ràpida i acurada al tub on hi havia la solució de "Quenching". S'havia de mantenir la relació 1:4 (v/v) entre el cultiu a recollir i la solució de "Quenching". El cultiu es dipositava amb pipeta al centre del tub de centrífuga per assegurar-se que les cèl·lules

- no quedessin enganxades a les parets del tub. Allí podrien congelar-se i trencar-se, i per tant s'estaria perdent mostra a ser analitzada.
3. S'invertia el tub on hi havia la mostra i la solució de "Quenching" ràpidament tres vegades per assegurar-se l'homogeneïtzació completa de la barreja.
  4. Es centrifugava la mostra a 4.000 x g durant 5 min preferiblement a -20°C, i en qualsevol cas per sota de 0°C.
  5. El sobrenedant es retirava ràpidament i la mostra es tornava a centrifugar a 4.000 x g durant 30 s a -20°C. Es tornava a descartar el sobrenedant de forma acurada utilitzant una pipeta.
  6. S'afegien 10 ml de solució salina al precipitat de cèl·lules restant en el tub de centrífuga. La mescla s'agitava al vòrtex a velocitat màxima durant 15 s.
  7. Després, la barreja es centrifugava a 4.000 x g durant 5 min a 4°C.
  8. El sobrenedant es descartava i es tornava a centrifugar la mescla a 4.000 x g durant 30 s a 4°C. Es tornava a retirar el sobrenedant acuradament amb la pipeta.
  9. El precipitat resultant es congelava amb nitrogen líquid i es guardava al congelador a -80°C. Alternativament, es podia mantenir el tub amb el precipitat en gel sec per seguir amb l'extracció dels metabòlits.

### Extracció de metabòlits polars i apolars

Durant el procés d'extracció, es mantenien les mostres en gel sec, assegurant-se d'aquesta manera que no es reactivava el metabolisme de les cèl·lules recollides.

1. S'afegien 400 µl de la solució d'extracció 1 al precipitat que quedava en el tub de centrífuga. La barreja s'agitava al vòrtex a velocitat màxima durant 30 s.
2. Tot seguit, es transferia la mescla a un tub eppendorf i s'afegia 1 µg de fenilalanina deuterada-C13 (Phe<sup>D</sup>) com a estàndard intern del procés d'extracció. Per agregar aquesta concentració final, s'empraven 10 µl d'una solució de Phe<sup>D</sup> patró a 0,1 mg/ml.
3. S'agregaven 250 µl més de solució d'extracció 1 al tub de centrífuga i la mescla s'agitava al vòrtex a velocitat màxima durant 30 s per tal de resuspendre les cèl·lules restants en el tub. La suspensió es transferia al tub eppendorf on ja es trobaven els 400 µl de mostra previs.
4. S'afegien 600 µl de solució d'extracció 2 a la barreja i s'agitava al vòrtex a velocitat màxima durant 30 s.
5. La mescla s'introduïa en nitrogen líquid durant 1 min.

6. Es treia el tub del nitrogen líquid i es deixava descongelar en gel sec. Un cop la mescla estava descongelada, s'agitava a velocitat màxima durant 30 s. Aquest pas de congelació i descongelació en gel sec es repetia tres vegades, de manera que s'expandia el volum d'aigua intracel·lular i promovia la ruptura de la paret cel·lular. El trencament de les parets cel·lulars així com també la dels orgànuls intracel·lulars era important en el procés d'extracció per tal que els metabòlits s'alliberessin cap a la solució d'extracció.
7. Després, la barreja es centrifugava a 13.000 x g durant 15 min a -9°C per separar el precipitat cel·lular de la solució d'extracció.
8. El sobrenedant es transferia a un tub eppendorf nou, on s'afegien 350 µl de solució d'extracció 3. La mescla s'agitava al vòrtex a velocitat màxima durant 30 s.
9. La mostra es centrifugava a 13.000 x g durant 15 min a temperatura ambient. Aquesta centrifugació resultava en una solució bifàsica, formada per una fase superior on es trobaven els metabòlits polars, el metanol i l'aigua, i una fase inferior composta pels metabòlits apolars i el cloroform.
10. La fase superior resultant de la centrifugació es transferia a un tub Pirex, igual que la fase inferior. Ambdós tubs es marcaven com extracte metanol/aigua i extracte de cloroform, respectivament, i es guardaven al congelador a -80°C fins al moment de ser processats.

### **Espectrometria de masses i anàlisi dels resultats**

Les mostres s'enviaven al Servei de Metabolòmica de l'IRB Lleida (a càrrec de la Dra. Mariona Jové) per tal de ser processades. El mètode analític es duia a terme mitjançant espectrometria de masses electrospray. La fase polar de metanol/aigua s'evaporava en l'equip Vacuum i es resuspensia en 100 µl d'aigua/etanol (50/50, v/v). La mostra es processava en un equip Agilent 1290 LC System acoblat a un aparell ESI-Q-TOF MS/MS 6520 (Agilent Technologies), emprant una columna amb una mida de partícula d'1,8 µm. Per tal d'integrar i determinar la intensitat dels pics de la mostra es va utilitzar el software MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies).

En primer lloc, es van realitzar anàlisis de metabolòmica dirigida per determinar la concentració de glucosa-6-fosfat. En aquest cas es van usar els valors de massa/càrrega (m/z) següents: m/z 259.0224 [M-M]<sup>-</sup>. Els nivells es van ajustar a l'estàndard intern afegit en el procés d'extracció (Phe-C13, m/z 165.076 [M-M]<sup>-</sup>).

D'altra banda, també es van fer anàlisis de metabolòmica no dirigida, utilitzant el mateix processador MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies) per extreure les característiques moleculars de les mostres. Per fer la comparació i l'anàlisi estadístic entre els grups es va usar el processador GeneSpring (Agilent Technologies). Per a l'associació de les masses significativament diferents ( $p < 0,05$ ) que s'obtenien amb el GeneSpring a possibles compostos, s'utilitzaven diferents bases de dades (Wishart, 2009; Markley i Cui, 2008; Suizdak i Abagyan Lab 2010), a més de les pàgines webs següents: "German Research Center for Environmental Health 2010" (<http://metabolomics.helmholtz-muenchen.de/masstrix2/>), "LIPID MAPS 2010" (<http://lipidmaps.org/>) i "KEGG pathways database 2010" (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) i seguidament es comprovaven aquests possibles compostos a través de la fragmentació de les masses per MS/MS. Els resultats obtinguts s'introduïen a la vegada a altres bases de dades MS/MS (Suizdak i Abagyan Lab 2010) i "LIPID MAPS 2010" (<http://lipidmaps.org/>) per veure si la cerca realitzada a partir de l'anàlisi MS/MS coincidia amb la de l'anàlisi MS que s'havia fet prèviament.

## 9 DETECCIÓ DELS NIVELLS DE FERRO INTRACEL·LULAR

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

### Obtenció de mostres

Inicialment es precultivaven la soca salvatge i les soques mutants d'interès en 10 ml de cultiu líquid (indicat en cada cas). Els cultius s'incubaven en agitació a 30°C durant 16 hores. Seguidament, es diluïen fins a una concentració d' $1,5 \times 10^6$  cèl·lules/ml i es deixaven créixer fins que arribessin a fase exponencial mitjana. En aquest moment s'afegia l'agent d'assaig i es prenia paral·lelament una mostra sense tractar corresponent al temps 0. Posteriorment, s'agafaven mostres a diferents temps de tractament, recollint  $7 \times 10^8$  cèl·lules per mostra.

Després de recollir les cèl·lules, es centrifugaven a 3.000 x g durant 5 min i es rentaven amb aigua MilliQ a 4°C. Es descartava acuradament el sobrenedant i el precipitat resultant es separava en tres tubs independents amb tap de rosca per mesurar el Fe per triplicat. Seguidament les mostres es congelaven amb nitrogen líquid i es conservaven a -80°C o, alternativament, es podia continuar amb el procés.

**Processament cel·lular i mesura dels nivells de Fe:**

1. Les cèl·lules de cada mostra es digerien afegint una mescla de 285 µl d'aigua MilliQ i 214 µl d'àcid nítric al 7%. La barreja s'agitava al vòrtex a velocitat màxima pocs segons i després s'incubaven les mostres en agitació a una temperatura entre 95°C i 100°C durant un mínim de 16 hores.
2. Passat aquest temps, els tubs es centrifugaven a 12.300 x g durant 5 min a temperatura ambient, i es transferien 400 µl del sobrenedant a un tub eppendorf nou. A aquest tub també s'afegien 300 µl d'aigua MilliQ, 160 µl d'ascorbat sòdic (a partir d'una solució patró a 38 mg/ml preparada al moment) i 126 µl d'acetat d'amoni (provinent d'una solució d'acetat d'amoni saturada, diluïda al 3%).
3. Es mesurava la densitat òptica a 420 nm. Aquesta mesura servia com a control de que cada mostra tingués el mateix número de cèl·lules. També es feia una altra mesura de densitat òptica a 535 nm. Seguidament s'afegien 16 µl d'un quelant de Fe com el BPS (a partir d'una solució patró a 34 mg/ml preparada a l'inici de l'experiment) i es mesclava bé amb la barreja anterior.
4. Seguidament, l'absorbància específica del complex ferro-quelant es llegia a una longitud d'ona de 535 nm, en un espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401 PC.
5. Amb les dades obtingudes a l'espectrofotòmetre, es calculaven els nivells relatius de Fe intracel·lular, segons es descriu en Tamarit et al. (2006).

**10 ASSAIG DE L'ACTIVITAT DE PROMOTORS BASAT EN EL REPORTER GFP**

L'assaig de l'activitat de promotors basat en l'emissió de fluorescència de la proteïna GFP es va realitzar segons el procés descrit en Molik et al. (2007).

Es feien créixer les cèl·lules de llevat portadores del plàsmid amb el reporter GFP en medi mínim suplementat amb els aminoàcids necessaris durant 16 hores a 30°C. 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. En aquest moment s'afegia l'agent del tractament si s'esqueia i es prenia una mostra sense tractar corresponent al temps 0.

Als temps de tractament desitjats, es recollien un mínim de  $8,3 \times 10^7$  cèl·lules/ml per cada temps d'assaig i per cada mostra. Les cèl·lules es centrifugaven a 1.500 x g durant 5 min a temperatura ambient. Es descartava el sobrenedant de forma acurada i es resuspenien les

cèl·lules en 3 ml d'aigua MilliQ. Es determinava la densitat òptica (600 nm) cel·lular de cada mostra i les cèl·lules es diluïen de manera que en cada pou d'una placa de 24 pous ("Multiwell™" de Becton Dickinson Labware) hi hagués  $3,3 \times 10^7$  cèl·lules/ml.

El fluorímetre Infinite M200 (Tecan) recollia les dades de l'emissió de fluorescència del reporter GFP sota el control dels promotors del gens d'interès, dins d'un espectre d'emissió entre 500 nm i 550 nm, sent el pic màxim d'emissió a 514 nm. La longitud d'ona d'excitació era de 480 nm. L'aparell agitava la placa abans de prendre la mesura i, un cop llegides totes les mostres, es podien calcular els valors de fluorescència relatius per cada mostra, restant com a blanc el valor obtingut a una longitud d'ona de 600 nm.

## **11 DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES**

### **11.1 Determinació de les activitats aconitasa i malat deshidrogenasa**

Les activitats aconitasa i malat deshidrogenasa (MDH) es van determinar en cèl·lules creixent en el medi YPGly, tal i com es descriu en Robinson et al. (1987).

#### **Obtenció dels extractes proteics**

Es va fer créixer la soca salvatge en medi YPD abans de passar-la a medi YPGly. Un cop les cèl·lules estaven creixent en fase exponencial en YPD, se'n centrifugaven un nombre determinat de cèl·lules a  $3.000 \times g$  durant 4 min i es rentaven amb YPGly. Després, es resuspenia el sediment cel·lular en medi YPGly i s'incubava el cultiu nou en agitació a 30°C durant unes 16 hores més abans d'iniciar l'experiment. Les cèl·lules en YPGly s'anaven mantenint en fase exponencial i es deixaven créixer fins a una concentració de  $2 \times 10^7$  cèl·lules/ml. En aquest moment s'afegia l'agent a assajar i paral·lelament s'agafava una mostra sense tractar corresponent al temps 0, prenent a continuació mostres a diferents temps del tractament.

1. Es centrifugaven  $10^9$  cèl·lules a  $2.900 \times g$  durant 2 min a 4°C. Es rentaven les cèl·lules amb aigua MilliQ a 0°C, es descartava el sobrenedant i el sediment de cèl·lules es separava en tres tubs eppendorf independents amb un terç de les cèl·lules totals per cada tub, de manera que així es podia determinar les activitats respectives per triplicat. Les mostres es podien congelar en nitrogen líquid i guardar al congelador a -80°C o es podien mantenir en gel per extreure la proteïna seguidament.

2. S'afegien 100 µl de tampó Tris-HCl 100 mM pH 7,5 al precipitat. Aquest tampó es preparava just abans d'iniciar l'experiment. Si es preparava 1 ml de tampó, s'afegien 100 µl de Tris-HCl 1 M pH 7,5; una barreja d'inhibidors de proteases formada per aprotinina, leupeptina, antipaïna (els quals a partir d'una solució patró a 10 mM es deixaven a una concentració final 25 µM), quimiotripsina, pepstatina (els que a partir d'una solució patró a 1 mg/ml es deixaven a 1 µg/ml de concentració final) i fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF) (a partir d'una solució patró a 0,2 M es deixava a una concentració final 1 mM), i aigua MilliQ fins arribar als 1000 µl de volum final. Les cèl·lules es resuspenien en aquest tampó i després s'afegien 200 µl de perles de vidre (450-600 µm de diàmetre, Sigma).
3. Es trencaven les cèl·lules per agitació en l'equip FastPrep FP 120 (Thermo Savant) durant 45 s a força 6,0 M/S i a 4°C. Es feien dos cicles de trencament en total.
4. A continuació, la suspensió es centrifugava a 12.300 x g durant 2 min a 4°C. Es recuperava el sobrenedant corresponent a l'extracte proteic, i l'activitat enzimàtica es determinava immediatament.

### **Mesura de les activitats**

Per determinar l'activitat aconitasa, s'afegien 4 µl de l'extracte proteic de cadascuna de les mostres a 500 µl de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,5 i NaCl a 29 mg/ml. Es mesurava la densitat òptica de la barreja a 240 nm (temps inicial), i aleshores s'afegia el substrat cis-aconitasa (4 µl d'una solució patró a 7 mg/ml) per tal de començar la reacció en la cubeta d'assaig. Es mesurava la densitat òptica (a 240 nm) de la suspensió després d'1 min de reacció amb un espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401 PC. Un cop recollides totes les dades, es podia calcular l'activitat específica (unitats/mg) de cada mostra a partir de la fórmula següent:

$$\text{Activitat específica} = \frac{\left[ \frac{((\text{OD (1 min)} - \text{OD (0 min))})}{4,28} \right] \times 125}{\text{concentració proteica (mg/ml)}}$$

D'altra banda, per determinar l'activitat MDH, s'afegien 10 µl de l'extracte proteic de cadascuna de les mostres a 950 µl de tampó fosfat potàssic 0,1 M pH 7,4 amb NADH a una concentració de 2 mg/ml. Es mesurava la densitat òptica de la mescla a 340 nm (temps inicial), i després s'afegia el substrat oxalacetat (20 µl d'una solució patró concentrada a 3,2 mg/ml) per tal de començar la reacció en la cubeta. Es mesurava la densitat òptica de la suspensió



després d'1 min de reacció en un espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401 PC. En aquest cas es calculava l'activitat específica (unitats/mg) de cada mostra a partir de la fórmula següent:

$$\text{Activitat específica} = \frac{\left[ \frac{((\text{OD (1 min)} - \text{OD (0 min))})}{6,22} \right] \times 100}{\text{concentració proteica (mg/ml)}}$$

La concentració de proteïna total de l'extracte es determinava emprant el kit "DC Protein Assay" (Bio-Rad) i seguint les instruccions del fabricant.

### 11.2 Determinació de l'activitat isopropilmalat isomerasa (Leu1)

L'activitat es determinava en cèl·lules creixent en un medi sense leucina, per evitar l'acció inhibidora d'aquesta, tal i com es descriu a Pierik et al. (2009).

#### Solucions i materials:

Els reactius es preparaven el mateix dia de la determinació de l'activitat.

- **Tampó TNETG:** Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; EDTA 2,5 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10% (v/v), Tritó X-100 0,5% (v/v). Es preparava 1 ml de volum final, per tant es barrejaven 10 µl de Tris-HCl 1 M, pH 7,4; 5 µl d'EDTA 0,5 M; 75 µl de NaCl 2 M; 100 µl de glicerol, 50 µl de Tritó X-100 i aigua MilliQ fins arribar a 1 ml.
- **PMSF:** aquest inhibidor de proteases es preparava a una concentració de 200 mM dissolt en etanol 100%. El PMSF es mantenia al congelador a -20°C i es treia just al moment d'utilitzar-lo, ja que s'hidrolitza ràpidament.
- **Tampó Leu1:** Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 50 mM.
- **Àcid DL-treo-3-isopropilmàlic (Wako):** actua com a substrat de la reacció enzimàtica, i es preparava a una concentració de 10 mM a partir d'un patró de 100 mM, diluït en aigua MilliQ. La solució patró a 100 mM també estava dissolta en aigua MilliQ i es podia guardar al congelador a -20°C.

#### Obtenció dels extractes proteics

Inicialment es precultiuaven les cèl·lules en 10 ml de medi mínim SC líquid, incubant en agitació a 30°C durant 16 hores. Després, es diluïa el cultiu fins a una concentració d' $1,5 \times 10^6$  cèl·lules/ml i es deixava créixer fins a fase exponencial mitjana. Llavors es tractava el cultiu amb l'agent a assajar i paral·lelament es prenia una mostra sense tractar corresponent al

temps 0. A continuació, s'agafaven mostres a diferents temps de tractament, recollint  $10^9$  cèl·lules per mostra.

1. Les cèl·lules es centrifugaven a  $2.000 \times g$  durant 5 min a temperatura ambient.
2. Es feia un rentat amb 10 ml d'aigua MilliQ, les cèl·lules es resuspenien en aigua i es passaven a un tub eppendorf, del qual es mesurava la densitat òptica a 600 nm per tal d'ajustar el nombre de cèl·lules exactes al tub. Les mostres es mantenien en gel a partir d'aquest pas.
3. Les cèl·lules es resuspenien en 100  $\mu$ l de tampó TNETG. Abans de fer la resuspensió, s'afegien 2  $\mu$ l de l'inhibidor PMSF a la suspensió. A més, també s'afegien 100  $\mu$ l de perles de vidre (450-600  $\mu$ m de diàmetre, Sigma).
4. Es trencaven les cèl·lules per agitació en l'equip FastPrep FP 120 (Thermo Savant) durant 1 min a força 6,0 M/S i a 4°C. Es feien tres cicles de trencament en total, mantenint les cèl·lules en fred 1 min entremig de cada cicle.
5. Es passava la suspensió cel·lular a un altre tub nou per separar-les de les perles de vidre.
6. La mostra es centrifugava a  $2.000 \times g$  durant 5 min a 4°C. El sobrenedant es transferia a un tub eppendorf nou i es tornava a centrifugar a 13.000 durant 10 min a la mateixa temperatura que abans.
7. El sobrenedant es recollia en un altre tub i es mantenia en gel. Aquesta part recollida corresponia a l'extracte proteic i s'emprava per determinar immediatament l'activitat Leu1.

#### **Determinació de l'activitat:**

Abans de mesurar l'activitat de l'enzim Leu1, es preparava el tampó Leu1 i el substrat de la reacció, l'àcid DL-*treo*-3-isopropilmàlic, a una concentració final 10 mM. Ambdós reactius es mantenien en gel juntament amb la mostra a analitzar fins que la reacció començava.

L'activitat Leu1 es mesurava en l'espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401 PC. En la cubeta s'afegien, inicialment, 970  $\mu$ l de tampó Leu1 i 20  $\mu$ l del substrat. Es feia una mesura espectrofotomètrica a una longitud d'ona de 235 nm durant 90 s. Es recollia aquesta dada com a fons intern de cada reacció, el qual es restava del valor final obtingut. A continuació, s'afegien ràpidament 10  $\mu$ l de la mostra a analitzar a la mateixa cubeta on ja hi havia el tampó i

el substrat, i es tornava a mesurar a 235 nm durant 6 min, per veure que la pendent obtinguda indicativa de l'activitat era sostinguda en el temps. Un cop recollides totes les dades, es calculaven els valors relatius d'activitat Leu1 de cadascuna de les mostres.

Al final de l'experiment, es determinava la concentració de proteïna total de l'extracte obtingut utilitzant el kit "DC Protein Assay" (Bio-Rad), d'acord amb les instruccions del fabricant.

## 12 DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE GLUTATIÓ REDUÏT I OXIDAT

Les concentracions cel·lulars del GSH i el GSSG es van determinar amb el mètode del reactiu d'Ellman, seguint el protocol descrit en Ayer et al. (2010).

### Solucions i materials:

- **Àcid 5-sulfosalicílic (Sigma).**
- **Tampó de trencament:** tampó fosfat salí (PBS), amb HCl 8 mM i àcid 5-sulfosalicílic a l'1,3% (w/v).
- **Tampó de reacció:** tampó fosfat potàssic 0,1 M; EDTA 1 mM, pH 7,4.
- **NADPH (Sigma):** es preparava immediatament abans de l'assaig, amb una solució patró a 4 mg/ml dissolta en el tampó de reacció.
- **Glutatió reductasa (Sigma).**
- **DTNB (reactiu d'Ellman) (Sigma):** l'àcid 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoic es preparava a una concentració de 2 mg/ml i es mantenia a les fosques.
- **2-vinilpiridina (Sigma).**
- **Trietanolamina (Fluka) 1,5 M:** emprada per bloquejar el GSH de la mostra.
- **GSSG (Sigma).**

### Obtenció dels extractes cel·lulars

Es precultivaven les corresponents soques en 10 ml de cultiu líquid en medi mínim SC. Els cultius s'incubaven en 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 assolissin la fase exponencial mitjana. En aquest moment s'afegia l'agent a assajar i paral·lelament es prenia

una mostra sense tractar corresponent al temps 0. A continuació, s'agafaven mostres a diferents temps, recollint  $6,6 \times 10^8$  cèl·lules per mostra.

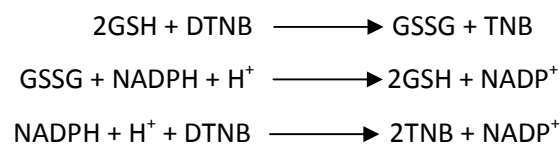
En el moment de recollir les mostres, es separaven 200  $\mu\text{l}$  en un tub eppendorf on hi havia 10  $\mu\text{l}$  de formaldehid (Sigma) que serviria per determinar el nombre de cèl·lules. D'altra banda, per cada temps de tractament també es determinava el volum cel·lular a partir de cèl·lules no fixades, en un aparell Coulter Z2. En aquest darrer cas la determinació es feia immediatament, mentre que per les mostres fixades el tub es podia guardar a 4°C fins que la mostra fos quantificada també en l'aparell Coulter Z2.

Els extrems cel·lulars s'obtenien segons el següent protocol.

1. Les cèl·lules es centrifugaven a 10.000 x g durant 20 s a 4°C.
2. A continuació es rentaven dos vegades amb el tampó de trencament, mantingut a 0°C, i es resuspenien en el mateix tampó.
3. S'afegia a la mostra un volum de perles de vidre (450-600  $\mu\text{m}$ , Sigma) equivalent al de la suspensió de cèl·lules.
4. Es trencaven les cèl·lules per agitació en l'equip FastPrep FP 120 (Thermo Savant) durant 30 s a força 6,0 M/S i a 4°C. Es feien entre 4 i 5 cicles de trencament en total.
5. Es deixaven les mostres en gel durant 15 min.
6. Seguidament, les cèl·lules es centrifugaven a 12.000 x g durant 5 min a 4°C.
7. Es prenia el sobrenedant resultant (200  $\mu\text{l}$  totals aproximadament) i es separava en dos tubs eppendorf. En un s'afegien 100  $\mu\text{l}$  exactes de mostra per mesurar el GSSG i la resta es guardava en l'altre tub. Ambdues mostres es podien guardar al congelador a -80°C per ser processades en un altre moment o es podien mantenir en gel per determinar immediatament la concentració de glutatió.

### **Mesura espectrofotomètrica del glutatió**

El mètode enzimàtic de detecció dels nivells de glutatió es basava en les reaccions següents:



## Materials i mètodes

---

La formació de TNB (aparició de color groc a la cubeta) es mesurava espectrofotomètricament a una longitud d'ona de 412 nm durant 1 min, en un espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401 PC.

En primer lloc, es feia una corba patró amb diferents concentracions de GSSG: 15 µM, 10 µM, 7,5 µM i 5 µM a partir d'una concentració patró de GSSG 100 µM. Per determinar els valors de la corba patró, s'afegien els reactius en la cubeta de reacció en el següent ordre: 156,2 µl de tampó de reacció, 58,4 µl de NADPH, 20 µl de l'enzim glutatió reductasa, 25 µl de la mostra de GSSG en aquest cas i 20 µl de DTNB. La mescla es barrejava bé i es feia una mesura de la densitat òptica. Un cop obtinguda la corba patró, es mesuraven els nivells de glutatió total afegint a la cubeta enlloc de GSSG un volum determinat de la mostra, més tampó de reacció fins arribar a 25 µl.

A continuació, es feia un tractament al tub prèviament guardat on hi havien 100 µl exactes d'extracte per tal de determinar els nivells de GSSG de cada mostra. Així doncs, d'aquests 100 µl d'extracte se'n separaven 60 µl a un tub nou, on s'afegien ràpidament 1,56 µl del reactiu 2-vinilpiridina i 4,8 µl de trietanolamina 1,5 M. La barreja s'incubava durant 1 hora en obscuritat a temperatura ambient, i després es feia la mesura espectrofotomètrica de les mostres igual que s'havia fet abans. D'aquesta manera, es podia calcular la concentració de glutatió total, la concentració de GSSG i la de GSH (corresponent a la diferència entre els dos valors anteriors), a partir de la recta patró realitzada a l'inici de l'experiment. Aquestes dades indicaven els pmols de glutatió en la reacció de la cubeta, i els pmols de glutatió per cèl·lula s'obtenien a partir de la fórmula matemàtica següent:  $\text{pmols de glutatió/cèl·lula} = \frac{G \times E}{N \times C}$ , on G=pmols de

glutatió en la reacció; E=µl totals d'extracte cel·lular recollit; N=µl de mostra emprats en la reacció i C=nombre de cèl·lules recollides en la mostra (determinades a partir de la concentració mesurada en l'aparell Coulter Z2). Per determinar la concentració de glutatió s'utilitzava el valor del volum cel·lular també obtingut amb l'aparell Coulter Z2.

A partir de les concentracions de GSH i GSSG es va determinar el potencial redox del parell (indicatiu de l'estat redox de l'ambient cel·lular) mitjançant l'equació de Nernst ( $E_n$ ) (Schafer i Buettner, 2001).

$$E_h(\text{mV}) = E_0 - 2,303 \frac{k \times T}{n \times F} \times \log \frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]^2}, \text{ on } E_0 = \text{potencial estàndard del GSH (-0,24 V) a pH 7;}$$

$k$ =constant de Boltzmann (8,31 J/molxK),  $T$ =temperatura absoluta (303 K),  $n$ =nombre d'electrons transferits (2) i  $F$ =constant de Faraday (96,406 J/V).

## 13 TÈCNIQUES DE MICROSCOPIA

### 13.1 Detecció de proteïnes marcades amb GFP

Les respectives soques expressant una proteïna marcada amb GFP es cultivaven en medi líquid i un cop arribaven a fase exponencial mitjana els cultius es tractaven amb l'agent a assajar si era el cas. Es prenen alíquotes a diferents temps sempre en creixement exponencial, que s'incubaven directament amb Hoesch (5 µg/ml) durant 6 min en la foscor, per tal de tenyir el nucli d'aquestes cèl·lules. En paral·lel, s'observava l'emissió de fluorescència pel GFP. Amb aquesta finalitat s'utilitzava un microscopi de fluorescència Olympus BX51 segons les tècniques estàndards (Tatchell i Robinson, 2002). Els filtres emprats van ser el l'U-MNUA2 i l'U-MNB3, per les tincions amb Hoesch i GFP, respectivament. El filtre U-MNUA2 té un rang de longitud d'ona ( $\lambda$ ) d'excitació entre 360 i 370 nm i d'emissió de llum blava entre 420 i 460 nm. El filtre U-MNBA3 té un rang de  $\lambda$  d'excitació entre 470-495 nm i d'emissió entre 510-550 nm.

### 13.2 Immunolocalització de Mig1-HA

Es van realitzar experiments d'immunofluorescència per localitzar el repressor Mig1 marcat amb l'epítip HA. Es va utilitzar anticòs anti-HA 3F10 de rata (Roche) com anticòs primari i l'anti-IgG de rata Alexa488 de cabra (Molecular Probes) com a secundari. Aquest assaig es va fer paral·lelament amb una tinció amb DAPI (4,8-diamino-2-fenilindol) per tal de tenyir els nuclis de les cèl·lules i poder així visualitzar-los al mateix temps.

#### Solucions

- **SB:** sorbitol 1,2 M en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, pH 7,5.
- **PBS:** 0,25 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 2,5 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8,6 g/l NaCl, pH 7,0-7,4
- **BS:** 0,5% de Blocking Reagent diluït en PBS.
- **Zymoliasa 20T:** 50 mg/ml de Zymoliasa 20T diluït en SB.

- **Paraformaldehid:** 4 g de paraformaldehid dissolts en 100 ml d'aigua prèviament escalfada, on s'afegien 3,4 g de sacarosa els quals també es dissolien a la barreja. La mescla es filtrava abans de ser utilitzada.
- **Dithiothreitol (DTT) (Sigma) i MgCl<sub>2</sub> (Sigma).**

Pels assajos d'immunolocalització, les soques es cultivaven en medi líquid i un cop arribaven a fase exponencial mitjana es tractaven amb l'agent a assajar. Es recollien entre 3 i  $5 \times 10^7$  cèl·lules/ml per mostra i per temps de tractament, es centrifugaven a 760 x g durant 2 min i es resuspenien en 100 µl de paraformaldehid. Les cèl·lules es fixaven en aquesta solució durant 15 min en rotació.

1. Es recollien les cèl·lules per centrifugació a 760 x g durant 2 min, es rentaven amb 500 µl de SB i es resuspenien en el mateix volum del mateix tampó.
2. A la suspensió s'afegien 40 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M i 4 µl de Zymoliasa 20T.
3. Les cèl·lules s'incubaven a 37°C durant 15 min per obtenir els protoplasts, la formació dels quals també es controlava observant en el microscopi òptic. Es recollien les cèl·lules per centrifugació a 760 x g durant 2 min i es descartava el sobrenedant.
4. Es rentaven les cèl·lules amb 1 ml de SB i es resuspenien en 100 µl del mateix tampó.
5. S'afegien 20 µl de les cèl·lules als pous del portaobjectes, el qual s'havia de tractar prèviament. El tractament consistia en afegir polilisina al 0,1% durant 10 min, rentar el portaobjectes dos vegades amb 50 µl d'aigua MilliQ i deixar-lo assecar durant 30 min aproximadament. Aquest pas era millor fer-lo a l'inici de l'experiment. Les cèl·lules en el portaobjectes s'incubaven en una cambra humitejada amb PBS a temperatura ambient durant 10 min.
6. Les cèl·lules es rentaven amb 50 µl de PBS i s'incubaven amb el mateix volum del mateix tampó contenint saponina o Tritó X-100 0,1% durant 4 min.
7. Es tornaven a rentar les cèl·lules amb 50 µl de PBS, i després es bloquejaven amb 50 µl de BS durant 30 min.
8. Les cèl·lules s'incubaven amb l'anticòs anti-HA 3F10 de rata en BS (dilució 1:100) durant 1 hora.
9. Les cèl·lules es rentaven 3 vegades amb PBS. Després, s'incubaven amb l'anticòs secundari anti-Igs de rata Alexa488 de cabra en BS (dilució 1:200) durant 1 hora en la foscor.

10. Després, es feien 3 rentats més amb 50 µl de PBS i s'incubaven les cèl·lules amb DAPI a 2 µg/ml durant 10 min en la foscor (Silva et al., 2005).
11. Es tornaven a rentar les cèl·lules dos cops amb 50 µl de PBS i es deixaven assecar durant 15 min a temperatura ambient en la foscor. Finalment, les mostres s'analitzaven per microscòpia de fluorescència, igualment amb el microscopi Olympus BX51 i el filtre U-MNBA3 descrit anteriorment.

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

L'objectiu de la tècnica era la identificació de gens capaços de suprimir o revertir un fenotip de sensibilitat a un agent determinat (en aquest cas el selenit) i en una soca específica (un mutant *aft2*) emprant una genoteca de *S. cerevisiae*. El mutant en qüestió es va fer créixer exponencialment i es va transformar amb una genoteca de DNA genòmic de llevat continguda en el plàsmid multicòpia YEp13 (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002) segons el mètode de transformació de *S. cerevisiae* descrit en l'apartat 5.2.3 d'aquesta mateixa secció. La mescla de la transformació es va plaquejar en medi SC sòlid amb tots els aminoàcids excepte la leucina, pel qual la soca n'és auxòtrofa, i en presència de selenit sòdic 3 mM. Les plaques es van incubar durant 5 o 6 dies a 30°C. La soca salvatge W303-1A es va transformar en paral·lel com a control per tal de quantificar l'eficiència de transformació. Es van realitzar tres transformacions independents en les condicions selectives amb selenit indicades, que corresponien a l'equivalent d'aproximadament 60.000 transformants en condicions no selectives.

Dels clons obtinguts a partir de la transformació realitzada en la soca mutant *aft2*, se'n va recuperar el plàsmid utilitzant el kit "Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II" (Zymo Research) i seguint les indicacions del fabricant. Després, es van amplificar els plàsmids obtinguts del llevat en cèl·lules d'*E. coli* "DH5α™ Subcloning Efficiency™" (Invitrogen), seguint el protocol de transformació segons les instruccions del fabricant. Es van realitzar anàlisis de restricció per demostrar que els plàsmids pertanyien a la genoteca (ja que tots ells contenien dos fragments comuns d'una mida determinada) i a més el patró de restricció específic de cadascun d'ells servia de marcador de clons independents. L'últim pas del procés consistia en retransformar els plàsmids amb patrons de restricció diferents entre ells en la soca mutant *aft2* per tal de confirmar la seva estabilitat en aquestes cèl·lules i la capacitat de rescatar el fenotip de sensibilitat a selenit mitjançant assajos de viabilitat descrits en l'apartat 7.1 d'aquesta secció.





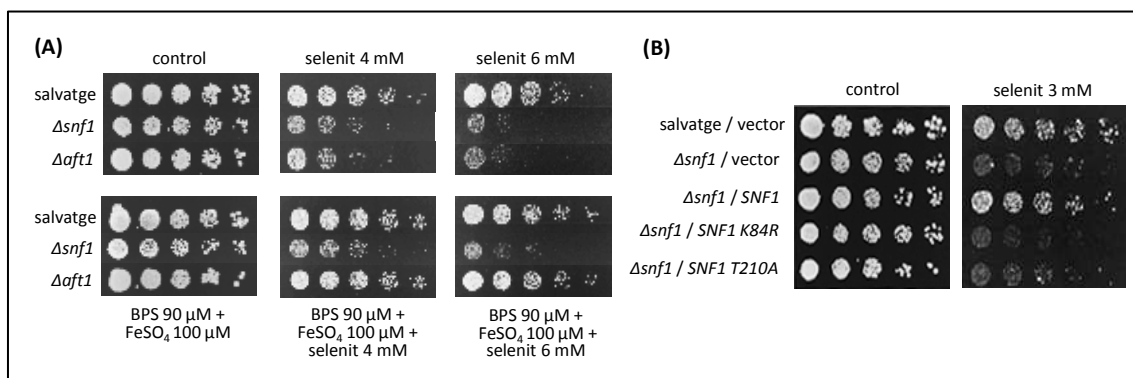
## **IV. RESULTATS**



## 1 PAPER DE SNF1 EN LA DEFENSA FRONT A LA TOXICITAT PER SELENIT

### 1.1 L'activitat de la quinasa Snf1 protegeix front la toxicitat per selenit

En *S. cerevisiae*, Snf1 participa en la resposta front a la toxicitat de diversos estressos mediambientals a part de l'estrès metabòlic causat per la manca de glucosa (Hong i Carlson, 2007). Es va testar, per tant, la sensibilitat d'aquest llevat a l'estrès generat pel selenit. Tan la soca salvatge com la mutant *snf1* estan afectades per l'agent, encara que el mutant *snf1* es mostra hipersensible comparat amb la soca salvatge (**Figura 8A**). D'altra banda, està descrit que el tractament amb selenit en *S. cerevisiae* indueix l'expressió dels gens del sistema d'alta afinitat de captació de Fe dependents d'Aft1 (Salin et al., 2008). Així doncs, es va determinar la sensibilitat d'una soca mutant *aft1* a selenit, en paral·lel amb les altres dues soques. Aquesta soca també és sensible a l'agent, però aquest fenotip es reverteix quan s'addiciona Fe a les plaques on es fa l'assaig de sensibilitat, tal i com era d'esperar. En canvi, el mutant *snf1* continua sent hipersensible a la toxicitat per selenit tot i trobar-se en condicions de repleció de Fe. Per tant, aquesta observació suporta el fet que Snf1 juga un paper protector front la toxicitat per selenit que és independent del Fe intracel·lular.

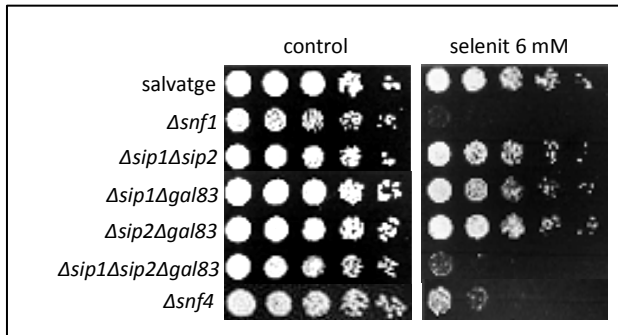


**Figura 8.** (A) Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A), *Δsnf1* (Wsnf1) i *Δaft1* (MML348) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic a les concentracions indicades i amb l'agent més condicions de repleció de Fe (BPS + FeSO<sub>4</sub>). Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores. (B) Com en (A), però en aquest cas les cèl·lules es van plaquejar sobre SC sòlid amb selenit sòdic 3 mM i es van incubar a 30°C durant 72 hores. Les soques emprades són: salvatge (W303-1A) i *Δsnf1* (Wsnf1) transformades amb el vector pWS93, i *Δsnf1* transformada amb pWS-Snf1, pWS-Snf1-T210A i pWS-Snf1-K84R.

El fet que Snf1 participi en la resposta front l'estrès causat per selenit requeria saber si el paper que té és degut a la seva pròpia activitat o si, per contra, només depèn de la proteïna en sí independentment que sigui funcional o no. Per això, es van emprar mutants de llevat que

expressaven dues formes mutades de Snf1. El mutant *snf1-K84R* expressa una forma de Snf1 mancada del residu Lys84, el qual és requerit per la unió d'ATP i, per tant, li resta molt poca activitat quinasa. D'altra banda, el mutant *snf1-T210A* conté la proteïna Snf1 sense el residu Thr210, el qual és necessari per la seva fosforilació i conseqüent activació de Snf1 (Hedbacker i Carlson, 2008; Hong et al., 2003; McCartney i Schmidt, 2001). L'assaig de viabilitat mostrava com cap d'ambdues formes mutades de Snf1 rescata el fenotip d'hipersensibilitat del mutant *snf1* front al selenit, comparant-ho amb el major creixement que manifesta una soca *snf1* portadora d'un plàsmid amb Snf1 en la seva forma salvatge (**Figura 1B**). Aquests resultats permeten confirmar que l'activitat de Snf1 és necessària per la resposta o per la recuperació front l'estrès causat pel selenit.

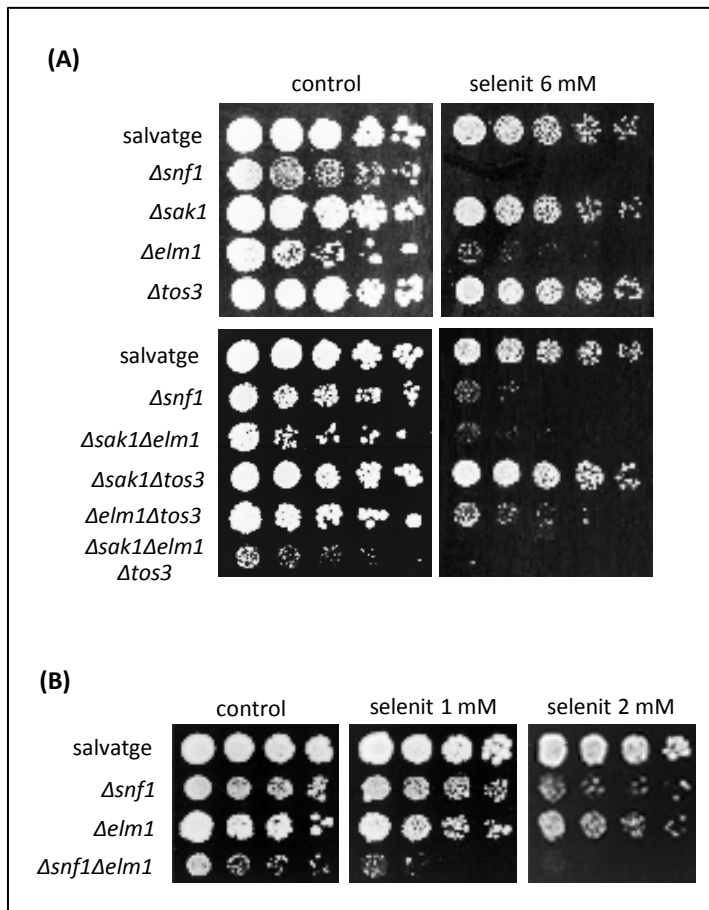
Les subunitats  $\beta$  Sip1, Sip2 i Gal83 juguen un paper estructural en el complex Snf1, confereixen especificitat a la quinasa per les seves interaccions amb els substrats diana i també regulen la localització cel·lular del complex en resposta als diferents estressos (Schmidt i McCartney, 2000; Vincent et al., 2001). En condicions de dèficit de glucosa, Gal83 s'internalitza al nucli juntament amb Snf1, mentre que Sip1 es dirigeix cap a la vacuola i Sip2 roman dispersat pel citosol (Hedbacker i Carlson, 2006; Vincent et al., 2001). En aquesta situació de manca de glucosa Gal83 és l'activador principal de Snf1, tot i que les altres dues subunitats  $\beta$  tindrien rols redundants, tal i com s'observa en el creixement dels mutants simples i dobles respectius en medi sense glucosa (Schmidt i McCartney, 2000). El fet que en escassetat de glucosa es doni aquesta situació no significa que hagi de ser igual en altres estressos que promouen l'activació de Snf1, per tant es va analitzar la participació de les tres subunitats  $\beta$  en la protecció front l'estrès causat pel selenit mitjançant assajos de viabilitat. La soca mancada de les tres subunitats  $\beta$  és igual de sensible al selenit que el mutant *snf1*, mentre que les soques que expressen únicament una de les tres subunitats mostren un fenotip igual que el de la soca salvatge (**Figura 9**). Per tant, Sip1, Sip2 i Gal83 per sí soles no podrien activar Snf1 amb eficiència completa per contrarestar la toxicitat del selenit. D'altra banda, la soca mutant *snf4* també és hipersensible al selenit, fet que corrobora el paper de Snf4 en l'activació de Snf1, tot i que aquest mutant no presenta un fenotip de sensibilitat tan agreujat com el dels mutants mancats de les subunitats  $\alpha$  o  $\beta$  (**Figura 9**).



**Figura 9.** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta sip1\Delta sip2$  (MML1445),  $\Delta sip1\Delta gal83$  (MML1452),  $\Delta sip2\Delta gal83$  (MML1454),  $\Delta sip1\Delta sip2\Delta gal83$  (MML1459) i  $\Delta snf4$  (MML1407) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixen exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic 6 mM. Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores.

## 1.2 La quinasa Elm1 juga un paper principal en la resposta front la toxicitat per selenit

L'activació de Snf1 i la fosforilació del residu Thr210 en resposta a l'estrès causat pel dèficit de glucosa, entre altres, és duta a terme per tres quinases "upstream" de la cascada senyalitzadora de Snf1, és a dir, Sak1, Elm1 i Tos3. Les tres actuen de forma redundants, tot i que en molts casos (com en condicions d'esgotament de glucosa) Sak1 juga el paper més rellevant (Hedbacker i Carlson, 2008). En el cas del selenit, es va analitzar la sensibilitat dels mutants nuls individuals de cadascuna de les tres quinases de Snf1 (**Figura 10A**). Únicament el mutant *elm1* és més sensible que la soca salvatge, manifestant gairebé els mateixos nivells de sensibilitat que el mutant *snf1*, el qual suggereix que Elm1 juga un paper important en la resposta a l'estrès causat pel selenit. Aquest fet es va confirmar assajant la sensibilitat al selenit dels dobles mutants per les tres quinases (**Figura 10A**). Les cèl·lules que expressen solament la quinasa Tos3 són tan sensibles a selenit com el mutant *snf1* o aquell mancat de les tres quinases "upstream", indicant que Tos3 no juga cap paper protector front aquest estrès. D'altra banda, la soca que expressa únicament Sak1 mostra un fenotip de sensibilitat intermedi, mentre que les cèl·lules que només tenen Elm1 com a quinasa "upstream" presenten la mateixa sensibilitat al selenit que la soca salvatge. Per tant, es pot concloure que Elm1 és suficient per protegir les cèl·lules front aquest agent, tot i que en la seva absència Sak1 podria esdevenir responsable d'aquesta protecció.



**Figura 10. (A)** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta sak1$  (MML1368),  $\Delta elm1$  (YPDahl21),  $\Delta tos3$  (YPDahl19),  $\Delta sak1\Delta elm1$  (MML1387),  $\Delta sak1\Delta tos3$  (MML1389),  $\Delta elm1\Delta tos3$  (MML1390) i  $\Delta sak1\Delta elm1\Delta tos3$  (MML1392) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixen exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic 6 mM. Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores. **(B)** Com en **(A)**, però en aquest cas les cèl·lules es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic a les concentracions indicades. Les soques emprades són: salvatge,  $\Delta snf1$ ,  $\Delta elm1$  i  $\Delta snf1\Delta elm1$  (MML1724).

En condicions d'estrès causat pel dèficit de glucosa, Snf1 i Elm1 pertanyen a la mateixa cascada senyalitzadora encarregada de contrarestar els efectes perjudicials conseqüents. En canvi, ambdues quinases juguen papers independents paral·lels front l'estrès causat pel sodi (Ye et al., 2008). Per esbrinar quin dels dos casos tenia lloc en un estrès per selenit, es va estudiar la sensibilitat d'un doble mutant *snf1 elm1* a aquest agent, comparant-ho amb la sensibilitat observada en els mutants simples. El doble mutant mostra un fenotip de sensibilitat additiu (**Figura 10B**), indicant que, a més del seu paper com activador de Snf1, Elm1 té funcions protectores front la toxicitat del selenit que són independents de la quinasa Snf1.

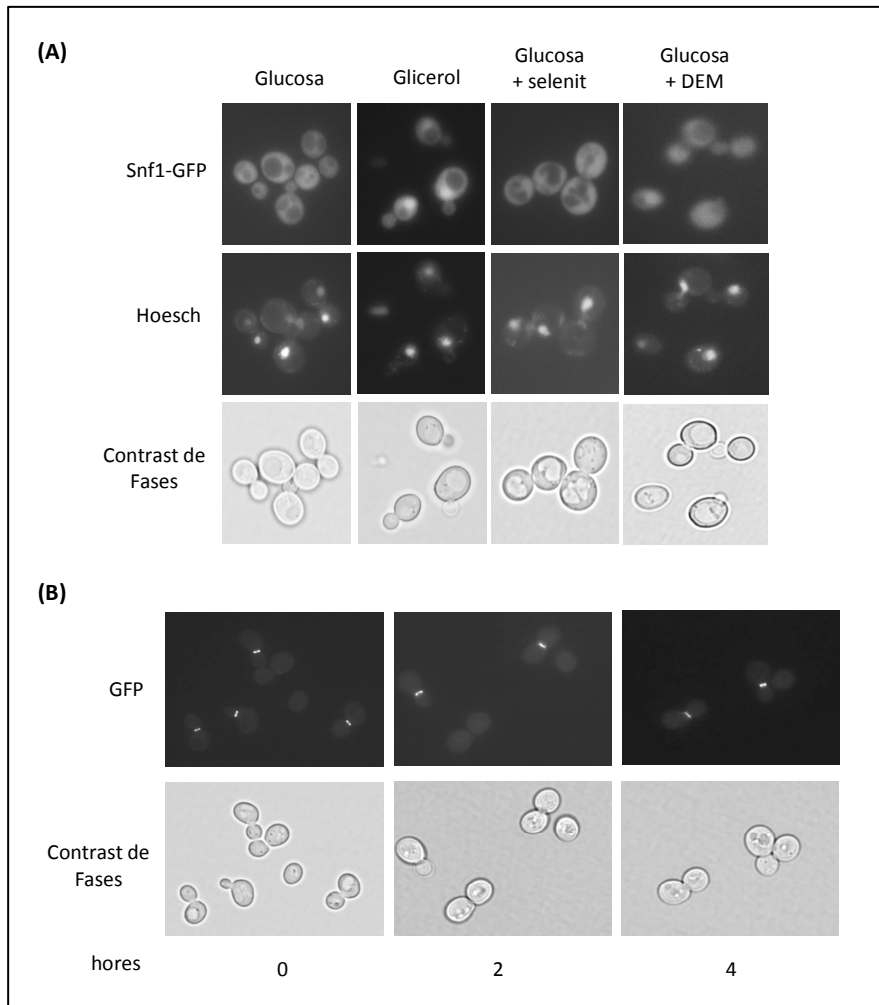
### 1.3 El paper protector de Snf1 front la toxicitat causada pel selenit no requereix de l'activitat dels seus efectors nuclears coneguts

#### 1.3.1 Snf1 es localitza al citosol durant un tractament amb selenit

Una fracció de Snf1 resideix al nucli en condicions de dèficit de glucosa, i aquesta localització ve regulada per la subunitat  $\beta$  Gal83 (Vincent et al., 2001). Altres estressos mediambientals

també provoquen la localització nuclear de Snf1, com és el cas de l'estrès per pH alcalí (Hong i Carlson, 2007). Es va determinar la localització de Snf1 durant un tractament amb selenit emprant una construcció Snf1-GFP. De la mateixa manera, també es va observar la seva localització quan les cèl·lules eren tractades amb un altre agent que fa reduir els nivells de GSH, com és el DEM. La quinasa es manté en el citosol al llarg de tot el període d'ambdós tractaments, contràriament al que succeeix en cèl·lules que es van passar d'un medi fermentatiu amb glucosa a un medi respiratori a base de glicerol (**Figura 11A**), en el qual Snf1 es dirigeix al nucli al trobar-se en una situació de manca de glucosa. Aquests resultats suggereixen que el paper protector de Snf1 front a la toxicitat per selenit no requereix la seva localització en forma activa en el nucli, i concorden amb el paper principal d'Elm1 com a quinasa activadora de Snf1 front un estrès per selenit. De fet, Elm1 ha estat caracteritzada com una quinasa localitzada a la constricció de la gemma i al septe (Bouquin et al., 2000) necessària per la organització de la xarxa de filaments de septina al septe mitòtic (Bouquin et al., 2000; Sreenivasan i Kellogg, 1999) i per la coordinació del punt de control de posició del fus mitòtic (Caydasi et al., 2010; Moore et al., 2010). Emprant una construcció funcional Elm1-GFP (Caydasi et al., 2010), es va poder observar com Elm1 roman a la constricció de la gemma en cèl·lules tractades amb selenit (**Figura 11B**).



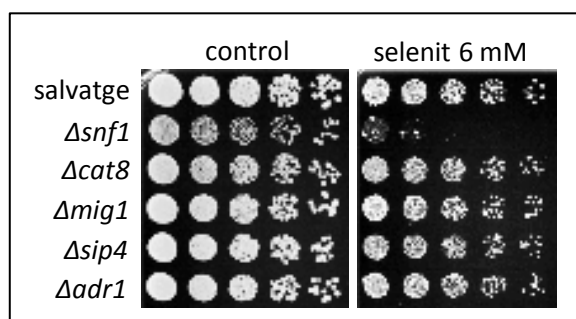


**Figura 11. (A)** Localització de Snf1 en resposta a diferents tractaments. El plàsmid pOV84 expressa la proteïna Snf1-GFP sota el control del promotor de *SNF1* i va ser transformat en la soca salvatge (W303-1A). Aquestes cèl·lules creixent en medi SC en fase exponencial sense tractament (en glucosa) o després de 2 hores de tractament amb selenit sòdic 4 mM o DEM 1 mM es visualitzaven a través del microscopi de fluorescència. Paral·lelament, es van passar les cèl·lules a medi YPGly i es van observar al mateix microscopi 1 hora després. A més, es va determinar la posició dels nuclis mitjançant la tinció amb Hoesch. Es mostren també els camps de contrast de fases corresponents a cada cas. **(B)** Localització d'Elm1 al llarg d'un tractament amb selenit. Cèl·lules de la soca AKY5516 creixent en medi YPD en fase exponencial sense tractament (temps 0) o després de les hores indicades de tractament amb selenit sòdic 4 mM es van observar en el microscopi de fluorescència. També es mostren els camps de contrast de fases corresponents.

### 1.3.2 La cascada de senyals induïda pel selenit no està relacionada amb el rol funcional de Snf1 en el nucli

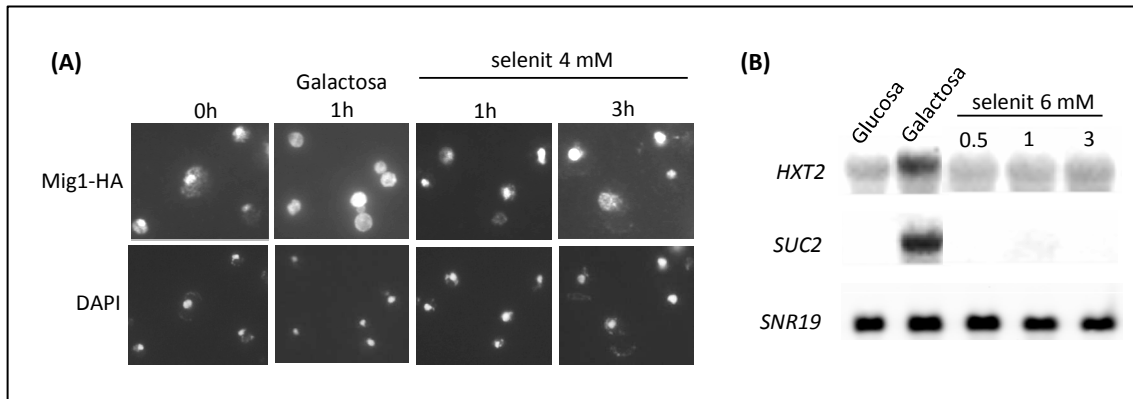
Es va poder confirmar que Snf1 té un paper independent al de les seves funcions nuclears fins ara descrites sota un estrès causat pel selenit a través d'altres experiments a banda de la determinació de la seva localització subcel·lular. En primer lloc, soques mutants en gens

nuclears diana de Snf1 com són *CAT8*, *MIG1*, *SIP4* o *ADR1* (Hedbacker i Carlson, 2008; Young et al., 2003) presenten el mateix fenotip de sensibilitat front al selenit que la soca salvatge (**Figura 12**), evidenciant d'aquesta manera que cap d'ells està involucrat en la protecció front aquest agent.



**Figura 12.** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta cat8$  (MML1417),  $\Delta mig1$  (MML1408),  $\Delta sip4$  (MML1396) i  $\Delta adr1$  (MML1419) front a selenit sòdic 6 mM. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic i es van incubar a 30°C durant 48 hores.

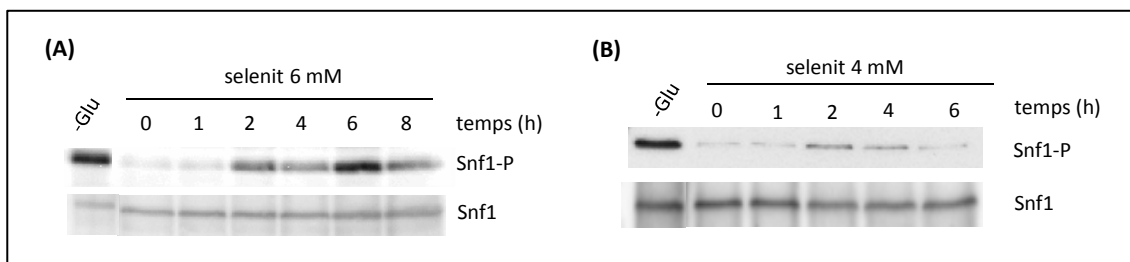
Després, es va determinar la localització d'un dels efectors nuclears de Snf1, Mig1, com a reporter de l'activitat nuclear de la quinasa. En condicions de dèficit de glucosa o en creixement en fonts de carboni alternatives, Snf1 fosforila Mig1 promovent la seva exportació del nucli i d'aquesta manera inhibint la seva activitat repressora de gens regulats per glucosa, amb la seva conseqüent inducció (Treitel et al., 1998). En canvi, en presència de glucosa, Mig1 està desfosforilat i es localitza al nucli, reprimint l'expressió de gens diana com *SUC2*. A més, es creu que Mig1 actua com a repressor associat amb Hxt2, una de les dos hexoquinases de llevat (Ahuatzi et al., 2007), el producte gènic de les quals també està reprimint per Mig1 en aquestes condicions. Les observacions al microscopi de fluorescència van mostrar que mentre que en cèl·lules que s'havien passat a condicions de dèficit de glucosa com és un medi amb galactosa apareixia una localització citoplasmàtica de Mig1, sota un tractament de 3 hores amb selenit aquest repressor es mantenia en el nucli (**Figura 13A**). D'aquesta manera, es pot assumir que Snf1 no estaria entrant al nucli ni afectant a la funció de Mig1 sota un estrès per aquest agent. Paral·lelament, es van determinar els nivells de mRNA per assajos de Northern blot de dos dels gens reprimits per Mig1 en condicions de disponibilitat de glucosa, *SUC2* i *HXT2*. Els resultats obtinguts mostren que ambdós gens s'indueixen en cèl·lules control creixent durant una hora en galactosa, tal i com estava descrit. En canvi, no es detecta inducció de cap dels dos gens després de tres hores de tractament amb selenit (**Figura 13B**), evidenciant que Snf1 no entra al nucli ni fosforila Mig1, i per tant aquest factor continua duent a terme el seu paper repressor d'aquells gens. Globalment, tots aquests experiments recolzen que la cascada senyalitzadora induïda pel selenit no regula l'activitat de gens nuclears diana de Snf1 com *MIG1*, i que Snf1 juga el seu paper protector front aquest agent al citosol.



**Figura 13.** Localització i regulació del repressor Mig1 durant un tractament amb selenit. **(A)** Assajos d'immunolocalització de la construcció Mig-HA front diferents tractaments. Cèl·lules transformades amb el plàsmid pHA-Mig1 creixent exponencialment en medi SC i tractades amb selenit sòdic als temps indicats o transferides a un medi amb galactosa al 2% enlloc de glucosa van ser observades per immunofluorescència amb anticossos anti-HA. També es va determinar la posició dels nuclis mitjançant la tinció amb DAPI. **(B)** Anàlisi d'expressió gènica per Northern blot dels gens especificats en la soca salvatge (W303-1A) creixent en medi YPD (glucosa) sense o amb selenit als temps indicats en hores, o bé creixent en medi YPGal (galactosa) durant 1 hora. El gen *SNR19* va ser emprat com a control de càrrega.

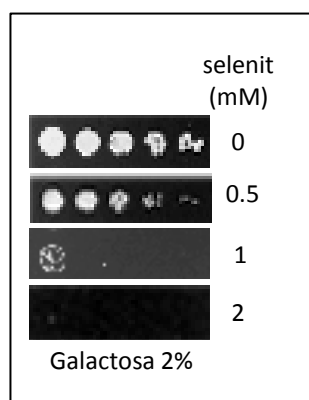
#### 1.4 La fosforilació de Snf1 no es correlaciona amb la seva protecció front la toxicitat causada pel selenit

El següent pas va ser determinar si el complex Snf1 es fosforila en el residu Thr210 després de tractar les cèl·lules amb selenit. Es van realitzar experiments de Western blot emprant un anticòs que reconeix específicament la forma fosforilada de Snf1 en el residu Thr210 del segment ansa activador. Els resultats obtinguts mostren com el selenit provoca una hiperfosforilació de Snf1 en el residu Thr de forma moderada, la qual es manifesta a partir de 2 hores de tractament amb l'agent i a temps més tardans (**Figura 14A**). Per tant, la fosforilació de Snf1 ocorre en cèl·lules creixent en medi que conté els nivells normals de glucosa (concentració de 2%), i els nivells d'aquesta modificació post-traducciona no arriben als observats en situacions de dèficit de glucosa. A més, el tractament amb selenit a concentracions més baixes provoca una hiperfosforilació de Snf1 més dèbil i menys sostinguda al llarg del tractament amb l'agent (**Figura 14B**). Aquestes observacions suggereixen que la hiperfosforilació retardada i moderada de Snf1 en resposta al tractament del llevat amb selenit podria estar reflectint efectes indirectes no necessàriament relacionats amb el mecanisme protector de la quinasa front l'agent.



**Figura 14.** Anàlisi per Western blot dels nivells de la forma fosforilada (part superior de les respectives imatges) i dels nivells de proteïna total de Snf1 (part inferior de les imatges). Els nivells de fosforilació de Snf1 al cap de 30 min d’haver estat en condicions de dèficit de glucosa (0,05%) es mostren com a control. **(A)** Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van tractar amb selenit sòdic 6 mM i es va analitzar la proteïna equivalent a  $10^8$  cèl·lules per carril, utilitzant anticossos contra el residu Thr210 fosforilat o contra la proteïna Snf1 total. **(B)** Com en **(A)**, però en aquest cas les cèl·lules es van tractar amb selenit sòdic 4 mM.

Es van realitzar altres assajos per tal de confirmar que la hiperfosforilació de Snf1 per sobre dels nivells basals no és necessària pel paper protector de la quinasa front a l’estrès causat pel selenit. Així doncs, tot i sabent que Snf1 es fosforila intensament en el residu Thr210 en resposta al creixement de cèl·lules de llevat en fonts de carboni alternatives a la glucosa, els assajos de viabilitat mostren com la sensibilitat d’aquestes cèl·lules sota un tractament amb selenit incrementa quan creixen en medis amb galactosa (**Figura 15**) o glicerol (Izquierdo et al., 2010) com a única font de carboni comparant-la amb la sensibilitat en un medi amb glucosa.

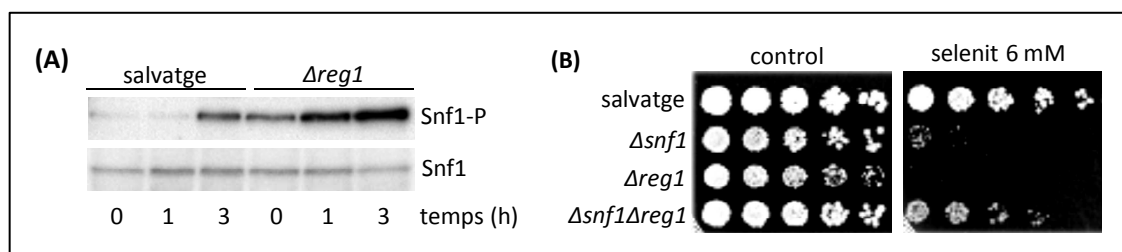


**Figura 15.** Assaig de sensibilitat de la soca salvatge (W303-1A) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPGal (galactosa al 2%) durant 24 hores com a mínim es van plaquejar sobre YPGal sòlid amb selenit sòdic a les concentracions indicades. Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores.

La hipersensibilitat incrementada al selenit manifesta en cèl·lules creixent en medis respiratoris podria ser deguda a la major producció de ROS que es dona en aquestes condicions, les quals es sumarien a les generades pel mateix selenit augmentant així els seus efectes nocius. Per tant, en el cas del selenit la hiperfosforilació de Snf1 no juga cap paper protector ni en cèl·lules que es trobin en medis fermentatius ni en altres fonts de carboni alternatives.

## Resultats

D'altra banda, també es va determinar la sensibilitat a selenit d'un mutant en *REG1*, el qual codifica per la fosfatasa de tipus PP1 reguladora de la fosforilació de Snf1. Així doncs, aquest mutant presenta una fosforilació constitutiva de Snf1 en medis amb glucosa (Castermans et al., 2012; Rubenstein et al., 2008) i, a més, els resultats obtinguts per Western blot demostren com el selenit provoca una fosforilació de la quinasa addicional per sobre dels nivells basals esmentats (**Figura 16A**), i a temps més avançats que en la soca salvatge. Tot i així, aquesta fosforilació incrementada del mutant *reg1* no confereix una major resistència front a la toxicitat causada pel selenit comparant-ho amb la soca salvatge. De fet l'absència de Reg1 fa que les cèl·lules siguin igual de sensibles a l'agent que quan a aquestes els hi manca Snf1 (**Figura 16B**). Aquesta observació evidencia el fet que el selenit podria estar interferint de forma directa o indirecta amb Reg1 i probablement amb altres fosfatases. Sorprenentment, el doble mutant mostra un fenotip intermedi de resistència (**Figura 16B**).



**Figura 16. (A)** Anàlisi per Western blot dels nivells de fosforilació (part superior de la imatge) i dels nivells de proteïna total de Snf1 (part inferior de la imatge). Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van tractar amb selenit sòdic 6 mM i es va analitzar la proteïna equivalent a  $10^8$  cèl·lules per carril, utilitzant anticossos contra el residu Thr210 fosforilat o contra la proteïna Snf1 total. **(B)** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta reg1$  (MML1442) i  $\Delta snf1\Delta reg1$  (MML1655) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic 6 mM. Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores.

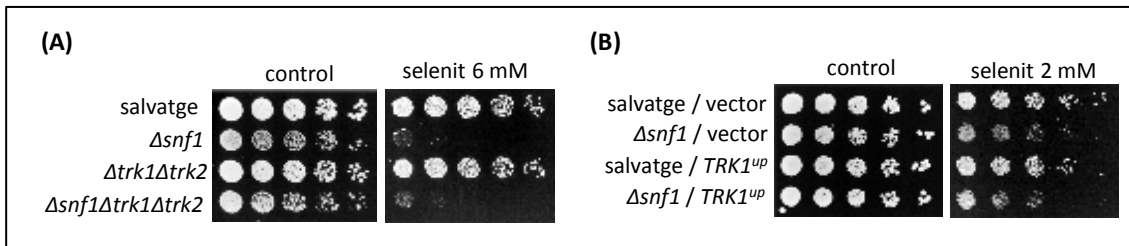
En conclusió, aquest conjunt de resultats indiquen que tot i que la fosforilació basal de Snf1 és necessària per tal que la quinasa s'activi i protegeixi front la toxicitat per selenit, un increment d'aquesta modificació post-traducciona (com l'observat en un mutant *reg1*) no provoca una major protecció front aquest tipus d'estrès. Per tant, l'augment de fosforilació de Snf1 causat pel selenit no és un requisit essencial per tal que la quinasa pugui dur a terme la seva funció protectora en aquestes condicions.

## 1.5 Els efectes tòxics del selenit no són provocats per una situació de dèficit de glucosa

### 1.5.1 El selenit no causa efectes nocius a nivell de membrana plasmàtica

L'observació d'una hiperfosforilació moderada i retardada de Snf1 quan les cèl·lules es sotmeten a un tractament amb selenit sembla indicar que aquest agent no provoca uns efectes representatius d'una situació de dèficit de glucosa. A priori, aquests efectes podrien explicar la sensibilitat d'un mutant *snf1* al selenit, tot i que els estudis de fosforilació semblen descartar-los. Un altre factor que anul·la aquesta hipòtesi és el resultat del Northern blot mostrat a la **Figura 13B**, ja que el selenit no causa la inducció dels gens *HXT2* o *SUC2*, els quals s'expressen en condicions d'esgotament de glucosa regulats pel repressor Mig1.

Tot i així, es van realitzar altres experiments per descartar completament la hipòtesi del dèficit de glucosa causat pel selenit. En primer lloc, es va plantejar una situació hipotètica en la qual el selenit podria estar afectant la superfície cel·lular, de manera que es generaria una despolarització de la membrana plasmàtica evitant l'entrada de la glucosa i la subseqüent activació de Snf1. Així doncs, un mutant *snf1* seria hipersensible al no poder activar la quinasa en condicions de dèficit de glucosa. El sistema de transport de potassi d'alta afinitat format per les proteïnes Trk1 i Trk2 és un factor determinant del potencial electroquímic de la membrana en cèl·lules de llevat (Ariño et al., 2010). En el cas que el selenit provoqués la despolarització de la membrana, mutants hiperpolaritzats  $\Delta trk1\Delta trk2$  serien menys sensibles a l'agent i l'absència d'ambdues proteïnes podria rescatar, almenys parcialment, la sensibilitat al selenit de cèl·lules mutants en Snf1 (Portillo et al., 2005). De la mateixa manera, la sobreexpressió de *TRK1* despolaritza la membrana plasmàtica (Yenush et al., 2005) i això agreujaria la sensibilitat al selenit en absència de Snf1. La **Figura 17** mostra com ni l'absència de Trk1 i Trk2 rescata la sensibilitat de cèl·lules mutants *snf1* a la toxicitat provocada pel selenit d'una banda, ni la sobreexpressió de *TRK1* fa que aquest mateix mutant estigui més afectat. Per contra, els assajos de sensibilitat mostren com la soca sobreexpressora presenta un fenotip similar al seu control sense la sobreexpressió del gen. En aquest darrer cas es va emprar una concentració de selenit menor ja que si teòricament les cèl·lules *snf1* mutants amb *TRK1* sobreexpressat eren més sensibles, podria ser que a concentracions més elevades no haguessin sobreviscut. En resum, tot aquest conjunt d'experiments permeten descartar un efecte del selenit sobre la polarització de la membrana plasmàtica.



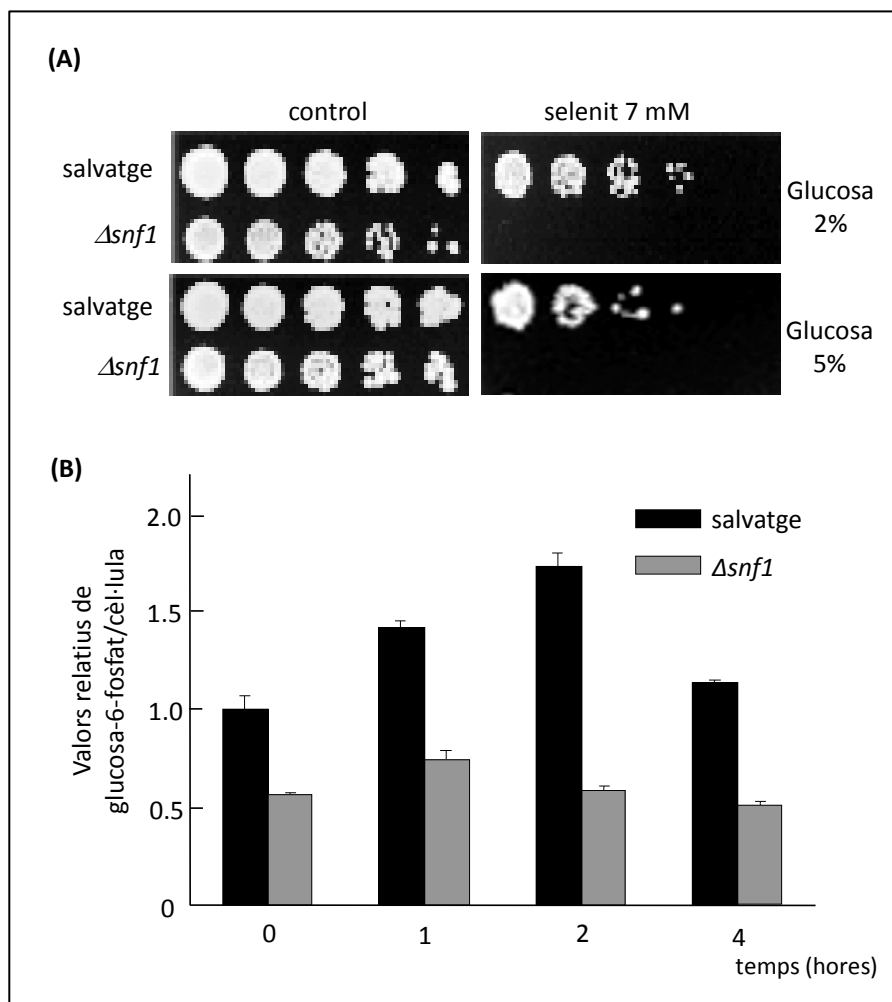
**Figura 17. (A)** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta trk1\Delta trk2$  (W $\Delta$ 3) i  $\Delta snf1\Delta trk1\Delta trk2$  (MML1447) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic 6 mM. Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores. **(B)** Com en **(A)**, però en aquest cas les soques salvatge i  $\Delta snf1$  transformades amb el vector control YCplac22 i el plàsmid pYCp414 creixent exponencialment en medi SC es van plaquejar sobre SC sòlid amb selenit sòdic 2 mM.

### 1.5.2 Els nivells intracel·lulars de glucosa no es veuen afectats pel selenit

Tot seguit, es va continuar amb la realització d'assajos que descartaven una possible relació entre el selenit i els seus possibles efectes sobre els nivells intracel·lulars de glucosa. Un cop vist que polarització de la membrana plasmàtica no estava afectada, es va determinar si la sensibilitat causada pel selenit podria ser revertida en cèl·lules de llevat creixent en medi amb nivells més elevats de glucosa que els normals. En el cas que la hipersensibilitat del mutant *snf1* estigués provocada per què la seva funció relacionada amb la caiguda dels nivells de glucosa fos deficitària, un increment de la concentració d'aquest metabòlit podria suprimir aquest fenotip, tot i que es va veure que aquesta tampoc era la situació real. Així, en la **Figura 18A** s'observa com la sensibilitat del mutant *snf1* comparada amb la de la soca salvatge no varia quan ambdues soques creixen en un medi amb glucosa al 5%, contràriament al que succeeix en altres estressos com per exemple en condicions alcalines (Casamayor et al., 2012).

Finalment, es van mesurar per espectrometria de masses els nivells de glucosa-6-fosfat al llarg d'un tractament amb selenit per tal de determinar els possibles efectes de l'agent front l'entrada de glucosa, i la conseqüent conversió en glucosa-6-fosfat. La glucosa passa a glucosa-6-fosfat en un primer pas de la glicòlisi, catalitzat per l'hexoquinasa, de manera que mesurar els nivells de glucosa-6-fosfat equival a mesurar els de glucosa recent transportada i previs a la seva catabolització. Tal i com era d'esperar, els nivells de glucosa-6-fosfat no baixen en cèl·lules salvatges tractades amb selenit durant 4 hores (**Figura 18B**). Contràriament, els nivells intracel·lulars de glucosa-6-fosfat augmenten a temps inicials de tractament i a les 4 hores tornen a baixar fins als nivells inicials. Aquest increment inicial dels nivells de glucosa podria estar relacionat amb la inducció de gens relacionats amb la síntesi de carbohidrats causada pel

selenit (Salin et al., 2008). En cèl·lules mutants *snf1*, s'observa la mateix perfil cinètic de la glucosa-6-fosfat intracel·lular, encara que les concentracions del metabòlit són més baixes que en la soca salvatge al llarg de tot el tractament amb selenit i també a temps inicials (**Figura 18B**).



**Figura 18.** (A) Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A) i  $\Delta snf1$  (Wsnf1) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid a les concentracions de glucosa indicades més selenit sòdic 7 mM. Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores. (B) Concentracions relatives de glucosa-6-fosfat per cèl·lula. Les mostres es van recollir a partir de les soques salvatge i  $\Delta snf1$  creixent exponencialment en medi YPD i tractades amb selenit sòdic 3 mM als temps indicats. Les concentracions de glucosa-6-fosfat es van passar a valors relatius prenent com a unitat el valor corresponent de cèl·lules salvatges no tractades. El gràfic indica la mitjana de sis experiments diferents, amb l'error estàndard. La concentració del metabòlit en termes de valor absolut equival a  $4,8 \times 10^{-11}$  nmols de glucosa-6-fosfat per cèl·lula per unitat de valor relatiu.

En resum, el conjunt d'experiments demostren com no existeix un efecte del selenit que causi una disminució dels nivells intracel·lulars de glucosa en relació a les cèl·lules no tractades, i



## Resultats

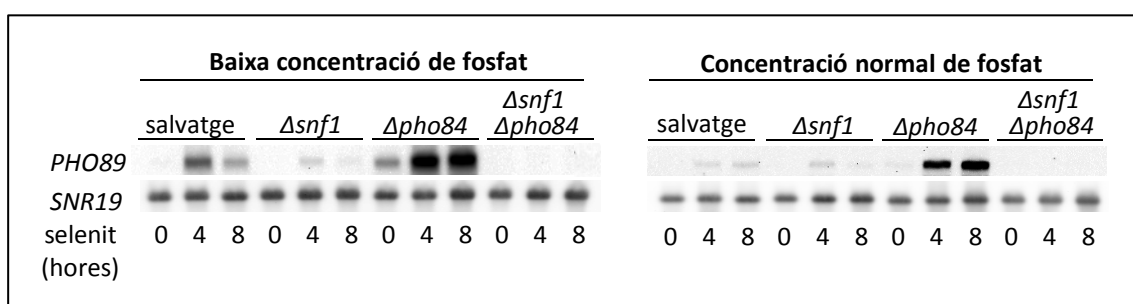
corroborar el fet que la fosforilació de Snf1 a temps avançats de tractament amb l'agent no està provocada per condicions de dèficit del metabòlit.

### 1.6 La toxicitat provocada pel selenit requereix l'entrada de l'agent a les cèl·lules

Per tal de continuar indagant quins podien ser els motius de la hipersensibilitat d'un mutant *snf1* al selenit, un cop ja descartada la relació amb el seu paper conegut en condicions de dèficit de glucosa, es va estudiar si el mutant mancat de la quinasa continua sent hipersensible a l'agent quan s'inhibeix la seva entrada a la cèl·lula.

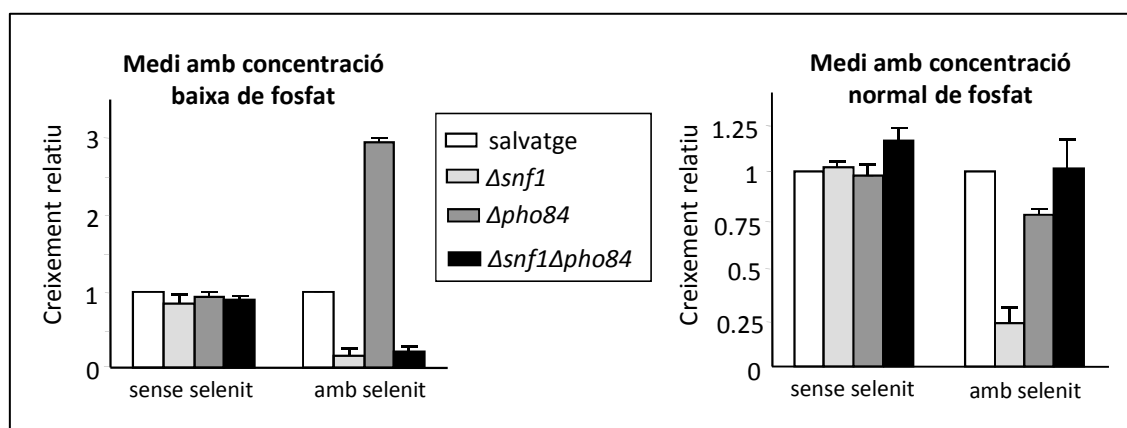
En condicions de creixement fermentatiu, tal i com s'empra en aquest estudi, el selenit entra a les cèl·lules de *S. cerevisiae* a través dels transportadors del sistema d'alta afinitat d'entrada de fosfat, preferentment per Pho84, en medis on la concentració de fosfat és baixa, i per ambdós sistemes d'alta i de baixa afinitat de transport de fosfat en condicions normals de concentració de fosfat (Lazard et al., 2010).

En primer lloc es va observar com un altre transportador de fosfat d'alta afinitat, Pho89, és induït a nivell transcripcional durant un tractament amb selenit i a més l'expressió del gen depèn de Snf1 tan en medis on la concentració de fosfat és baixa com en medis que disposen de fosfat a concentracions normals (**Figura 19**).



**Figura 19.** Efecte del selenit sobre l'expressió de gens del sistema d'alta afinitat de fosfat en medis amb concentracions normals o baixes de fosfat. Anàlisi per Northern blot de l'expressió de *PHO89* durant el tractament amb selenit sòdic 3 mM als temps indicats en les soques següents: salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta pho84$  (MML1304) i  $\Delta snf1 \Delta pho84$  (MML1401). Les mostres es van recollir de cultius exponencials de les soques esmentades creixent en medis amb concentració baixa de fosfat i medis amb concentració normal de fosfat, ambdós suplementats amb selenit quan era el cas. Es van analitzar 25  $\mu$ g de RNA total per carril. Es va utilitzar l'expressió del gen *SNR19* com a control de càrrega.

Aquest resultat va ajudar a entendre el mecanisme d'entrada del selenit a les cèl·lules de llevat. Per tant, en cèl·lules mancades de *Snf1* i *Pho84* creixent en medis amb concentració baixa de fòsfat no s'expressa cap transportador de fòsfat del sistema d'alta afinitat i aleshores el transport d'aquest compost es veu compromès. Així, l'expressió de *Pho89*, l'altre transportador de fòsfat d'alta afinitat, depèn de *Snf1* a nivell transcripcional (**Figura 19**), i per tant en la seva absència en el mutant doble *snf1 pho84* no hi ha transportadors d'alta afinitat disponibles per l'entrada de fòsfat. Aquesta situació s'agreuja en presència de selenit, ja que competeix amb la poca quantitat de fòsfat que hi ha al medi per poder entrar a la cèl·lula a través dels transportadors del sistema de baixa afinitat de fòsfat, els quals resten funcionals (Lazard et al., 2010). Les condicions resultants de dèficit de fòsfat explicarien el creixement pertorbat de les cèl·lules mutants en *SNF1* i *PHO84* en presència de selenit i en medis amb concentracions de fòsfat baixes (**Figura 20**).



**Figura 20.** Efecte del selenit en el creixement cel·lular en medis amb concentracions baixes i normals de fòsfat. El creixement relatiu de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta pho84$  (MML1304) i  $\Delta snf1\Delta pho84$  (MML1401) en els dos medis (amb concentració de fòsfat baixa i normal) sense i amb selenit 3 mM va ser enregistrat en l'aparell PowerWave XS. Cada soca tractada i sense tractar creixia en un dels pous de la placa "Multiwell™" en agitació contínua durant 24 hores, i els valors corresponents a la densitat òptica després d'aquestes 24 hores de creixement es relativitzaven a partir del valor obtingut en la soca salvatge com a unitat. Es representa la mitjana de tres experiments independents, amb la desviació estàndard.

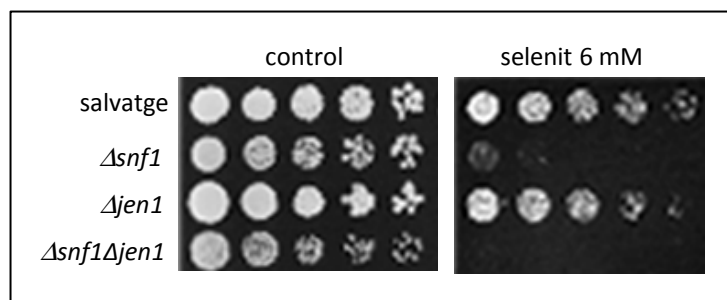
Tot i així, en condicions normals de fòsfat la sensibilitat del doble mutant *snf1* i *pho84* al selenit és la mateixa que en la soca salvatge (**Figura 20**). Això es deu a que en absència dels transportadors d'alta afinitat *Pho84* i *Pho89* i en condicions on les concentracions de fòsfat són les normals (7,3 mM), l'ió fòsfat té més afinitat pels transportadors que no el selenit, per tant presenta avantatge a l'hora d'entrar a la cèl·lula a través del sistema de transport de fòsfat de

## Resultats

baixa afinitat (Lazard et al., 2010). Per tant, la toxicitat provocada pel selenit en un mutant *snf1* és menor i la soca pot créixer sense estar afectada per l'agent.

La resistència de la soca mutant *pho84* al selenit en medis amb fosfat a concentracions baixes es deu a que, en aquest cas, s'indueix l'expressió transcripcional de l'altre transportador del sistema d'alta afinitat Pho89 i aquest té més especificitat per l'ió fosfat que pel selenit. Per tant tot i que l'agent competeix per entrar, la seva captació es veu reduïda i la toxicitat cel·lular subseqüent és menor.

D'altra banda, en condicions de creixement respiratori on hi ha una font de carboni alternativa a la glucosa, el selenit és incorporat a les cèl·lules de llevat a través del transportador Jen1. Jen1 facilita la internalització de metabòlits monocarboxils com el piruvat i el lactat i permet l'entrada del selenit amb elevada afinitat (Mcdermott et al., 2010). Els assajos de sensibilitat realitzats mostren com el doble mutant *snf1 jen1* és igual de sensible al selenit que en absència només de Snf1 (**Figura 21**), tal i com era d'esperar. Prèviament (**Figura 17**) ja s'ha demostrat que el selenit no provoca efectes nocius a nivell de membrana plasmàtica, a més, també s'ha vist que en condicions fermentatives el selenit ha de ser internalitzat pel sistema d'alta afinitat de transport de fosfat per ser tòxic. Per tant, es pot concloure que la presència o absència de Jen1 és irrellevant a l'hora d'entendre els efectes tòxics del selenit front les cèl·lules de llevat, almenys en les condicions experimentals emprades en l'estudi.



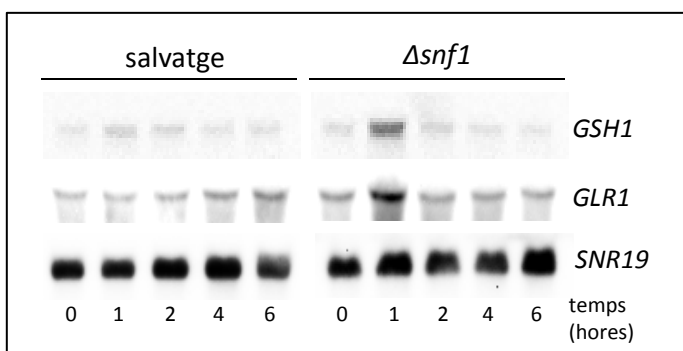
**Figura 21.** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta jen1$  (MML1399) i  $\Delta snf1\Delta jen1$  (MML1402) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic 6 mM i es van incubar a 30°C durant 48 hores.

En resum, els resultats obtinguts demostren que la toxicitat del selenit causada en cèl·lules mutants *snf1* requereix l'entrada de l'agent a dins de la cèl·lula, tan en condicions fermentatives com sembla ser en respiratòries, i que el sistema Pho84/Pho89 és essencial per aquesta entrada.

### 1.7 La sensibilitat del mutant *snf1* als efectes del selenit està relacionada amb alteracions en el metabolisme del glutatió

Tal i com es mostra en la **Figura 1** el selenit provoca una disminució ens els nivells de GSH, fent reduir el rati GSH/GSSG intracel·lular. El tripèptid glutatió és un regulador redox essencial de grups tiol proteics (Toledano et al., 2007), per tant la seva alteració pot resultar en la pertorbació de diversos processos cel·lulars. Aquesta disminució dels nivells de GSH provocada pel selenit en llevat també s'observa en altres organismes (Brozmanová et al., 2010). Conseqüentment, la sobreexpressió del gen de la glutatió reductasa (*GLR1*) de *S. cerevisiae* rescata el fenotip de sensibilitat del selenit (Pinson et al., 2000) i a més, el propi agent indueix l'expressió d'aquest gen en cèl·lules de llevat, així com també la d'altres gens relacionats amb el metabolisme del glutatió, com *GSH1* (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteïna sintetasa) (Salin et al., 2008). L'alteració en el metabolisme del GSH podria explicar, per tant, els efectes tòxics diferencials que s'observen en mutants *snf1*, de manera que es van realitzar diferents experiments per tal de comprovar aquesta hipòtesi.

En primer lloc, els resultats obtinguts per Northern blot confirmen com el selenit provoca un inducció transitòria tan del gen *GLR1* com de *GSH1* més pronunciada en cèl·lules mutants *snf1* que en la soca salvatge, el qual suggereix que podria haver-hi una major alteració en el metabolisme del GSH en absència de Snf1 (**Figura 22**).

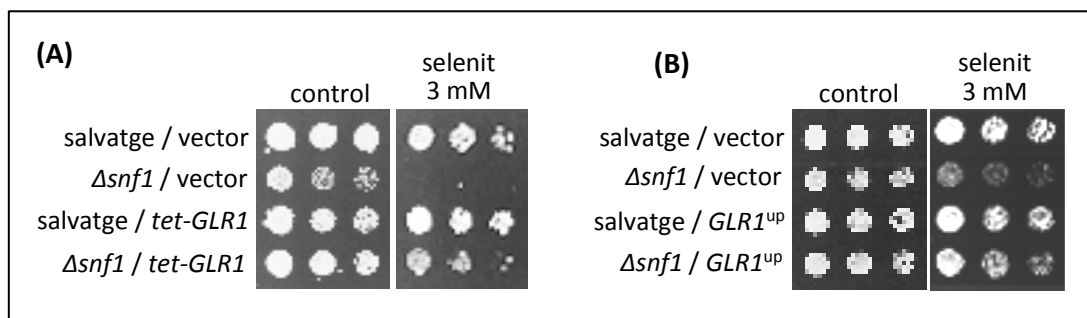


**Figura 22.** Anàlisi per Northern blot de l'expressió de *GSH1* i *GLR1* durant el tractament amb selenit sòdic 6 mM en medi YPD als temps indicats en les soques salvatge (W303-1A) i  $\Delta snf1$  (Wsnf1) creixent exponencialment. Es van analitzar 25  $\mu$ g de RNA total per carril. Es va utilitzar l'expressió del gen *SNR19* com a control de càrrega.

Les cèl·lules sense Snf1 necessitarien més producte dels gens *GLR1* i *GSH1* per contrarestar els efectes tòxics del selenit, que en aquest cas semblarien ser més exacerbats. Així doncs, tal i com es descriu en Pinson et al. (2000), si la sobreexpressió de *GLR1* rescata el fenotip d'hipersensibilitat del selenit en una soca salvatge, també hauria de succeir en la soca mutant *snf1*. Aquesta hipòtesi es va confirmar al realitzar assajos de viabilitat tan en soques que sobreexpressaven *GLR1* sota el control del seu propi promotor en un vector multicòpia com en

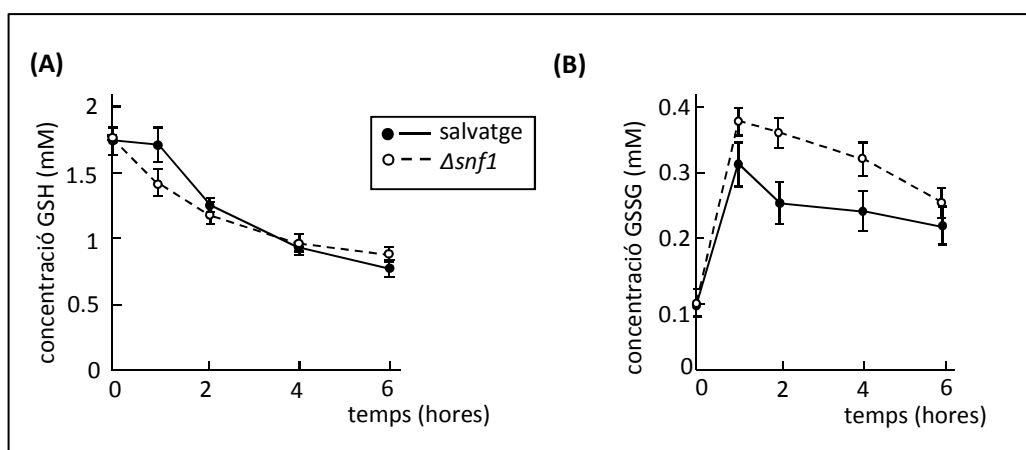
## Resultats

aquelles on el gen estava sobreexpressat sota el control d'un promotor extern *tetO<sub>7</sub>* (**Figura 23**). En cèl·lules mutants per *Snf1*, la sobreexpressió del gen *GLR1* a partir d'un plàsmid multicòpia o a través del promotor *tetO<sub>7</sub>*, més la major inducció del propi gen cromosòmic observada en la **Figura 22**, permeten el rescat de la hipersensibilitat provocada pel selenit, i suporten la hipòtesi que el metabolisme del GSH es troba especialment alterat en el mutant *snf1* en presència de selenit.



**Figura 23.** (A) Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A) i  $\Delta snf1$  (Wsnf1) transformades amb el vector control pCM189 o el seu derivat pMM1039 (*tetO<sub>7</sub>-GLR1*) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi SC amb tots els aminoàcids excepte el marcador de selecció es van plaquejar sobre SC sòlid amb selenit sòdic 3 mM i es van incubar a 30°C durant 48 hores. (B) Com en (A), però en aquest cas les soques salvatge i  $\Delta snf1$  es van transformar amb el vector multicòpia YEplac195 com a control i amb el seu derivat P116, el qual sobreexpressa *GLR1* sota el control del seu propi promotor.

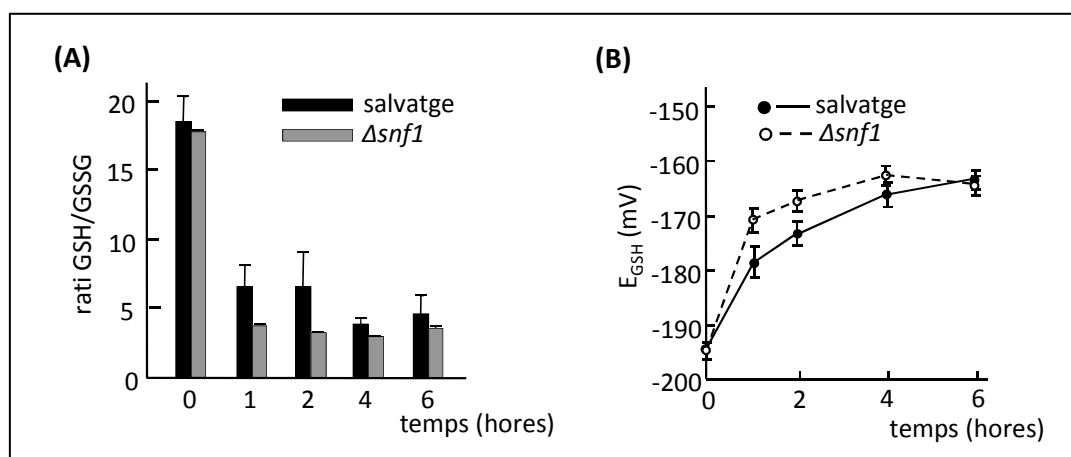
Amb la finalitat de corroborar aquesta hipòtesi, es van realitzar altres experiments més encarats a analitzar els nivells i l'estat redox del glutatió en condicions d'estrès per selenit. Així doncs, es van mesurar espectrofotomètricament les concentracions de GSH i GSSG de les soques salvatge i mutant *snf1* un cop sotmeses a un tractament amb selenit. Com a resultat, es va observar una disminució dels nivells de GSH en ambdues soques seguint el mateix perfil cinètic durant les 6 hores del tractament amb selenit (**Figura 24A**). Contràriament, la concentració de GSSG augmenta fins a nivells significativament més elevats en cèl·lules mutants *snf1*, a partir de les 2 hores inicials de tractament (**Figura 24B**).



**Figura 24.** (A) Concentració intracel·lular de GSH de cèl·lules que estaven creixent exponencialment en medi SC i van ser tractades amb selenit sòdic 2 mM als temps indicats. La línia contínua correspon a la soca salvatge (W303-1A), mentre que la discontinua correspon al mutant *snf1* ( $\Delta snf1$ ). Els valors es van obtenir a partir de tres experiments independents (també s'indica la desviació estàndard). (B) Com en (A) però en aquest cas representa la concentració intracel·lular de GSSG de les mateixes soques.

Considerant els valors de concentració obtinguts, les cèl·lules mutants *snf1* presenten un rati inferior GSH/GSSG durant les primeres hores de tractament amb selenit (**Figura 25A**). Així doncs, es pot assumir que els efectes inhibitoris del selenit en la soca mutant *snf1* són causats per l'acumulació de GSSG relativa a GSH. A més, es va calcular el potencial redox GSH ( $E_{GSH}$ ) a partir de les concentracions de GSH i GSSG, el qual determina l'estat redox de l'ambient intracel·lular (**Figura 25B**). Aquest potencial comença gairebé amb els mateixos valors en ambdós cultius no tractats però incrementa aproximadament 16 mV en la soca salvatge i 24 mV en el mutant *snf1* al cap d'una hora de tractament amb selenit. Els dos potencials s'acaben igualant en ambdues soques després de tractar-les amb l'agent durant 6 hores.

Aquests resultats confirmen per tant que l'homeòstasi del glutatió està alterada més profundament en cèl·lules mutants *snf1* tractades amb selenit que en la soca salvatge. Aquesta alteració provocaria la major acumulació de GSSG en absència de la quinasa i per tant podria explicar els resultats fenotípics d'hipersensibilitat a l'agent. La sobreexpressió de gens encarregats de regular aquest balanç GSH/GSSG, tals com *GLR1* i *GSH1*, rescatarien els efectes tòxics en el mutant.

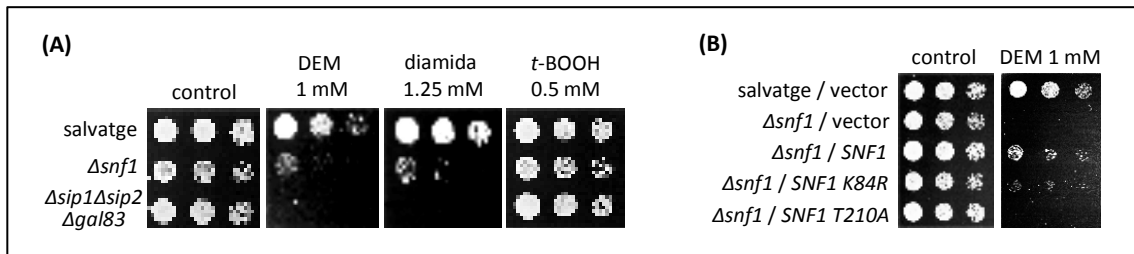


**Figura 25. (A)** Rati entre les concentracions intracel·lulars de GSH i GSSG en les soques salvatge (W303-1A) i  $\Delta snf1$  ( $\Delta snf1$ ) creixent exponencialment en medi SC i tractades amb selenit sòdic 2 mM als temps indicats, a partir dels valors representats en la **Figura 23**. La barra d'error representa la desviació estàndard de la mitjana de tres experiments independents. **(B)** Potencial redox del parell GSH/GSSG ( $E_{GSH}$ ) en la soca salvatge (línia contínua) i  $\Delta snf1$  (línia discontinua) calculat a partir dels valors de concentració de GSH i GSSG de la **Figura 23**, emprant l'equació de Nernst. La barra d'error mostra la desviació estàndard de la mitjana de tres experiments diferents.

### 1.8 L'activitat quinasa de Snf1 protegeix front agents causants de l'oxidació del GSH

Veient que els resultats apuntaven a que hi ha una major alteració en el metabolisme del glutatió provocada pel selenit en absència de Snf1, es va plantejar la hipòtesi que aquesta quinasa podria tenir un rol general en defensa front l'oxidació d'aquest compost, i que el selenit seria un cas més d'agent oxidant del glutatió. Per provar aquesta hipòtesi, es van dur a terme diferents experiments. En primer lloc, es va analitzar la sensibilitat de les soques salvatge i mutant *snf1* a altres agents que provoquen alteracions en l'homeòstasi del GSH (com en el cas del selenit) degut a l'oxidació causada per ells mateixos sobre el GSH, tals com el DEM (Plummer et al., 1981) o la diamida (Kosower et al., 1969). Es va observar com en absència de Snf1 les cèl·lules presenten hipersensibilitat a ambdós agents, ja sigui per manca de la pròpia proteïna o pel dèficit de les tres subunitats  $\beta$  del complex Snf1 (**Figura 26A**). Contràriament, les mateixes soques no presenten aquest fenotip d'hipersensibilitat a agents com el *t*-BOOH, la qual cosa permet descartar un paper protector general de l'activitat quinasa Snf1 front condicions d'estrès oxidatiu. A més, també es va confirmar que la funció de Snf1 és necessària per contrarestar els efectes dels agents oxidants del GSH, ja que en soques mutants en l'activitat de la quinasa, tals com les mutacions *K84R* i *T210A*, es manifesta el mateix fenotip d'hipersensibilitat a selenit que en un mutant nul *snf1* (**Figura 26B**). Aquests dos primers resultats corroboren, doncs, el paper protector de Snf1 front l'oxidació del GSH.

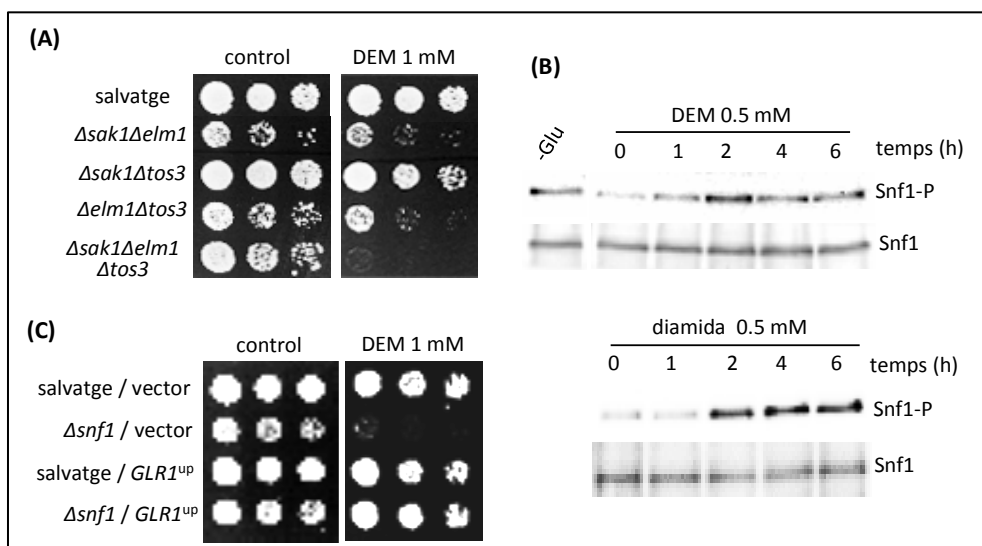
A continuació, es va determinar quina era la quinasa activadora de Snf1 en un tractament amb DEM. Com en el cas del selenit, Elm1 és suficient per conferir una resistència a aquest agent igual que l'observada en cèl·lules salvatge (**Figura 27A**). A més, el DEM no provoca la migració de Snf1 cap al nucli (**Figura 11A**), també com en el cas del selenit. Tot això indica que s'activa la mateixa cascada de senyals Elm1-Snf1 en els casos del DEM i del selenit.



**Figura 26. (A)** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1) i  $\Delta sip1\Delta sip2\Delta gal83$  (MML1459) front a diversos agents. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb DEM, diamida i *t*-BOOH a les concentracions indicades, i les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores. **(B)** Com en **(A)**, però en aquest cas les cèl·lules es van plaquejar sobre SC sòlid amb DEM 1 mM i es van incubar a 30°C durant 72 hores. Les soques emprades són: salvatge (W303-1A) i  $\Delta snf1$  (Wsnf1) transformades amb el vector pWS93, i  $\Delta snf1$  transformada amb pWS-Snf1, pWS-Snf1-K84R i pWS-Snf1-T210A.

D'altra banda, experiments de Western blot revelaven la hiperfosforilació de Snf1 en el residu Thr210 provocada tan per DEM com per diamida. Aquesta hiperfosforilació només s'observava després de dos hores de tractament amb els agents respectius (**Figura 27B**). La fosforilació tardana en comparació amb la que té lloc en condicions de dèficit de glucosa suggereix que la modificació post-traducciona de la quinasa no és necessària per fer front a la toxicitat provocada per aquests agents oxidants de GSH, altre cop igual que en el cas del selenit. Finalment, es va confirmar que la sobreexpressió de *GLR1* en cèl·lules mutants *snf1* protegeix front la toxicitat generada pel DEM i rescata, així doncs, la hipersensibilitat provocada per l'agent (**Figura 27C**), de la mateixa manera que succeeix en el cas del selenit (**Figura 23B**). En resum, tots els resultats mostren que l'activitat de Snf1 juga un paper general en protegir les cèl·lules de llevat front a situacions que porten a l'oxidació del glutatió, ja sigui com la presència de selenit, de DEM o de diamida.





**Figura 27. (A)** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta sak1\Delta elm1$  (MML1387),  $\Delta sak1\Delta tos3$  (MML1389),  $\Delta elm1\Delta tos3$  (MML1390) i  $\Delta sak1\Delta elm1\Delta tos3$  (MML1392) front a DEM. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb DEM 1 mM. Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores. **(B)** Anàlisi per Western blot dels nivells de la forma fosforilada (Snf1-P) i proteïna total de Snf1 (Snf1). Els nivells de fosforilació de Snf1 al cap de 30 min d’haver estat en condicions de dèficit de glucosa (0,05%) es mostren com a control. Les cèl·lules es van tractar amb els agents respectius i es van recollir i analitzar amb els mateixos anticossos emprats a la **Figura 14**. **(C)** Com en **(A)**, però en aquest cas les soques salvatge i  $\Delta snf1$  creixent exponencialment en medi SC es van transformar amb el vector multicòpia YEplac195 com a control i amb el seu derivat P116, el qual sobreexpressa  $GLR1$  sota el control del seu propi promotor, i es van plaquejar sobre medi SC sòlid.

### 1.9 Anàlisi transcriptòmic de les soques salvatge i mutant $snf1$ tractades amb selenit

A banda de la descripció del paper protector de Snf1 front a selenit i altres agents oxidants del glutatió, es van realitzar anàlisis transcriptòmics amb microordenaments de DNA de les soques salvatge i mutant  $snf1$  tractades amb selenit. L’objectiu era obtenir informació relacionada amb la quinasa Snf1 (concretament quins gens es veien alterats en la seva absència) i el seu paper en la defensa front la toxicitat causada per l’agent, ja que anàlisis transcriptòmics de la soca salvatge tractada amb selenit amb la finalitat de determinar els gens alterats en aquesta situació d’estrès ja havien estat realitzats (Salin et al., 2008).

A la **Taula 4** es mostren els gens que s’indueixen en la soca  $\Delta snf1$  tractada amb selenit 6 mM respecte la soca salvatge. Els gens esmentats augmenten la seva expressió en el mutant al cap d’una i/o quatre hores de tractament (a la taula no es distingeix entre aquestes situacions) com a mínim més de dos cops respecte els seus nivells a temps inicials una vegada normalitzats respecte de la soca salvatge.

**Taula 4.** Gens induïts en una soca  $\Delta snf1$  respecte a la soca salvatge durant el seu creixement exponencial en medi YPD i sota els efectes d'un tractament amb selenit 6 mM fins a 4 hores.

NOM	ID	Descripció
<i>PHO3</i>	<i>YBR092C</i>	Fosfatasa àcida similar a Pho5 expressada constitutivament.
<i>SER3</i>	<i>YER081W</i>	3-fosfoglicerat deshidrogenasa, catalitza el primer pas de la biosíntesi de la serina i la glicina.
<i>DML1</i>	<i>YMR211W</i>	Proteïna essencial involucrada en la partició del mtDNA.
<i>SPL2</i>	<i>YHR136C</i>	Proteïna similar als inhibidors de quinases dependents de ciclins.
<i>HAC1</i>	<i>YFL031W</i>	Factor de transcripció que regula la resposta al mal plegament proteic, a través de "Unfolded Protein Response".
<i>MTW1</i>	<i>YAL034W-A</i>	Component essencial del complex del cinetocor.

Els resultats mostren com hi ha pocs gens que s'indueixen significativament en el mutant *snf1* durant el tractament amb selenit de manera diferencial respecte de la soca salvatge. Aquests gens no es van poder associar a cap categoria funcional representativa, ja que eren molt pocs i amb rols molt diferents entre ells. Contràriament, els resultats de l'anàlisi transcriptòmic revelaven més gens reprimits en absència de Snf1 respecte la soca salvatge quan ambdues es tractaven amb selenit al llarg de 4 hores. Es va considerar que un gen estava reprimat diferencialment en un mutant *snf1* quan els seus nivells normalitzats eren menors de 0,5 respecte de la mostra no tractada (temps 0) almenys en una de les dues mostres tractades (temps 1 i/o 4 hores). En la **Taula 5** es mostra tan els gens esmentats com la seva descripció.

## Resultats

**Taula 5.** Gens reprimits en una soca *Δsnf1* respecte a la soca salvatge durant el seu creixement exponencial en medi YPD i sota els efectes d'un tractament amb selenit 6 mM fins a 4 hores.

NOM	ID	Descripció
<i>PRM5</i>	<i>YIL117C</i>	Proteïna transmembrana regulada per una feromona.
<i>ARG1</i>	<i>YOL058W</i>	Arginosuccinat sintetasa, catalitza la formació del L-arginosuccinat a partir de la citrulina i el L-aspartat en la ruta de biosíntesi de l'arginina.
<i>KDX1</i>	<i>YKL161C</i>	Proteïna quinasa implicada en la cascada de senyalització regulada per Slt2.
<i>PCL5</i>	<i>YHR071W</i>	Ciclina fosforilada per la quinasa Pho85.
<i>YPC1</i>	<i>YBR183W</i>	Ceramidasa alcalina que també té activitat ceramida sintasa reversa (CoA-independent), catalitza tan la descomposició com la síntesi de la fitoceramida.
<i>AFR1</i>	<i>YDR085C</i>	Proteïna requerida per la formació de projeccions ("shmoos") induïda per una feromona; regula l'arquitectura de la septina durant la conjugació.
<i>GDE1</i>	<i>YPL110C</i>	Glicerofosfocolina (GroPCho) fosfodiesterasa; hidrolitza la GroPCho a colina i glicerofosfat.
<i>PIR3</i>	<i>YKL163W</i>	Proteïna de la paret cel·lular O-glicosilada.
<i>SED1</i>	<i>YDR077W</i>	Glicoproteïna majoritària de paret amb estructura GPI, induïda per estrès.
<i>FBP26</i>	<i>YJL155C</i>	Fructosa-2,6-bisfosfatasa, requerida pel metabolisme de la glucosa.
<i>QDR1</i>	<i>YL121W</i>	Transportador multidroga de la família majoritària de facilitadors.
<i>MET16</i>	<i>YPR167C</i>	3'-fosfoadenilsulfat reductasa, redueix el 3'-fosfoadenilil sulfat a adenosina-3',5'-bisfosfat i sulfit lliure, involucrada en l'assimilació de sulfat i en el metabolisme de la metionina.
<i>SRY1</i>	<i>YKL218C</i>	3-hidroxiaspartat deshidratasa, desamina el L-threo-3-hidroxiaspartat per formar oxalacetat i amoníac.
<i>ARG4</i>	<i>YHR018C</i>	Argininosuccinat liasa, catalitza el pas final de la via de síntesi de l'arginina.

Taula 5. Continuació.

NOM	ID	Descripció
<i>CPA2</i>	<i>YJR109C</i>	Subunitat gran de la carbamoil fosfat sintetasa, la qual catalitza un pas de la síntesi de la citrulina, un precursor de l'arginina.
<i>GSC2</i>	<i>YGR032W</i>	Subunitat catalítica de la 1,3-beta-glican sintasa, involucrada en la formació de la capa interna de la paret de l'esporeta.
<i>RPM2</i>	<i>YML091C</i>	Subunitat proteica de la RNAsa P mitocondrial.
<i>COM2</i>	<i>YER130C</i>	Proteïna de funció desconeguda.
<i>Desconegut</i>	<i>YHR180W</i>	ORF dubtosa.
<i>Desconegut</i>	<i>YGR146C</i>	Proteïna de funció desconeguda, induïda pel factor de transcripció relacionat amb l'homeòstasi del ferro Aft2.

En aquest cas, s'observa un major nombre de gens reprimits diferencialment en absència de la quinasa Snf1 degut al tractament amb selenit. Dins d'aquest subgrup, es va utilitzar el programa bioinformàtic Funcassociate (<http://llama.med.harvard.edu/Software.html>) per determinar les categories funcionals GO (Gene Ontology) sobrerepresentades ( $p < 0,001$ ). Resulten tres categories corresponents a rols en processos metabòlics de molècules petites, i processos metabòlics i biosintètics de l'arginina. Les tres categories es podrien englobar en una mateixa referida a processos metabòlics en general.

Al llarg d'aquest estudi s'ha vist com el paper protector de Snf1 front la toxicitat causada pel selenit té lloc en el citoplasma de les cèl·lules de llevat, per tant la resposta transcripcional no dóna necessàriament una idea dels esdeveniments que poden estar succeint durant aquest estrès i la seva resposta. En aquesta situació, el selenit no provoca l'entrada de Snf1 cap al nucli, per tant la quinasa no estaria actuant com a factor activador i/o repressor de cap sèrie de gens. La resposta transcriptòmica diferencial obtinguda representaria un efecte indirecte de cèl·lules mutants *snf1* tractades amb selenit, però no permet treure una conclusió clara del mecanisme general de defensa front l'agent.

### 1.10 Anàlisi metabòlic de les soques salvatge i mutant *snf1* tractades amb selenit

D'altra banda, es van realitzar experiments de metabòlica per intentar esbrinar els possibles canvis en fluxos metabòlics que succeeixen en una situació d'estrès causada pel selenit i altre cop comparant la soca mutant *snf1* amb la soca salvatge. Concretament, es van analitzar els metabòlits els nivells dels quals variaven en una soca mutant *snf1* tractada amb selenit durant 1, 2 i 4 hores respecte a la soca salvatge. En la **Taula 6** es representen els compostos mencionats. Els termes "augmenta" o "disminueix" indiquen el sentit del canvi entre els nivells del metabòlit en la soca mutant *snf1* respecte la soca salvatge tractades amb selenit pels períodes indicats. Només es mostren aquells metabòlits pels que en algun temps (sense tractar o tractat amb el selenit) els seus nivells relatius en el mutant *snf1* siguin superiors a 2 o inferiors a 0,5 respecte del control (soca salvatge). Dins d'una visió general, en els resultats de l'anàlisi metabòlic apareixen molècules relacionades amb les rutes de síntesi i degradació de la glucosa, d'aminoàcids com l'arginina principalment, així com també vies de síntesi de nucleòtids. La quinasa Snf1 està implicada en diversos canvis metabòlics en condicions de dèficit de glucosa, per tant és lògic que ja a temps inicials (sense tractament amb selenit) apareguin metabòlits relacionats amb el seu rol. Es pot concloure que a temps inicials canvien els nivells de compostos relacionats amb la degradació de l'alanina, la biosíntesi i la degradació de l'arginina (cal recordar que en l'anàlisi transcriptòmic ja s'havia observat la repressió de la transcripció de gens de la biosíntesi de l'arginina en el mutant *snf1*, **Taula 5**), i la degradació del glutamat. En la primera hora de tractament amb selenit, apareixen compostos que participen en la via oxidativa i no oxidativa de la pentosa-fosfat, en el metabolisme dels nucleòtids, en les principals vies del metabolisme del carboni, de la ribosa i desoxiribosa fosfat, de la purina, el cicle RuMP i l'assimilació del formaldehid, la fermentació de la purina i la biosíntesi de la riboflavina, del mononucleòtid de flavina (FMN) i del dinucleòtid de flavina-adenina (FAD). En la segona hora de tractament amb l'agent, hi ha molècules relacionades altre cop amb la biosíntesi i la degradació de l'arginina, gluconeogènesi i fermentació de la glucosa, la degradació del glutamat, la glicòlisi, la via no oxidativa de la pentosa-fosfat, el metabolisme dels nucleòtids, la biosíntesi de poliamina, la fermentació de purina, les vies principals del metabolisme del carboni, el cicle RuMP i l'assimilació del formaldehid, la síntesi de sucrosa, la biosíntesi de l'UDP-N-acetilgalactosamina i el cicle de la xilulosa-monofosfat. Finalment, al últim temps de tractament, es troben metabòlits implicats en processos de biosíntesi de desoxiribonucleòtids pirimidínics, de biosíntesi de nucleòtids de purina, de biosíntesi d'histidina, de metabolisme de nucleòtids i fermentació de purina.

**Taula 6.** Llista de metabòlits que varien els seus nivells en una soca mutant *snf1* tractada amb selenit 3 mM durant 4 hores en medi SC respecte a una soca salvatge. Disminueix: nivells menors en el mutant  $\Delta snf1$  (Wsnf1); augmenta: nivells majors en el mutant. Els resultats corresponen a la mitjana de 6 experiments independents.

Compost	Regulació $\Delta snf1$ versus salvatge			
	Temps inicial	Se 1 hora	Se 2 hores	Se 4 hores
DL-ornitina	Disminueix	disminueix	disminueix	-
5-metilcitolina	Disminueix	-	-	-
Alantoïna	Augmenta	-	-	-
Desoxitimidina monofosfat (dTMP)	Disminueix	-	-	-
Àcid D-sacàric	Augmenta	-	-	-
Fructosa-6-fosfat	Disminueix	-	disminueix	-
Glutatió oxidat	Disminueix	-	-	-
Inosina/Adenosina/3-Desoxiguanosina	Augmenta	augmenta	disminueix	disminueix
Àcid mirístic/àcid isomirístic	-	-	-	augmenta
Àcid N-acetil-L-glutàmic	Disminueix	-	-	-
Octanal	Disminueix	-	augmenta	-
Estearamida	Disminueix	-	-	-
UDP-glucosa	Disminueix	-	-	-
Àcid 6-hidroxinicotínic	-	augmenta	-	-
Adenina	-	augmenta	-	-
Dihidouracil	-	disminueix	-	-
Glucosamina	-	augmenta	-	-
O-succinil-L-homoserina	-	augmenta	-	-
Ribulosa 5-fosfat	-	disminueix	-	-
Sulfanilamida	-	disminueix	disminueix	disminueix
Xantina	-	disminueix	disminueix	-
25-hidroxi-colesterol	-	-	disminueix	-
Àcid 2-hexildecànic	-	-	augmenta	-
Acetilcisteïna	-	-	disminueix	-
Digitoxosa	-	-	disminueix	-
Dihidro-4,4-dimetil-2,3-furandiona	-	-	disminueix	-
Glutaral (Glutaraldehyd)	-	-	augmenta	-
Glicilprolina	-	-	disminueix	augmenta
Hipoxantina	-	-	disminueix	disminueix
Inosina 5'-monofosfat (IMP)	-	-	augmenta	-
L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina)	-	-	-	disminueix
Àcid N-acetil-b-neuramínic	-	-	augmenta	-
N-acetil-L-histidina	-	-	augmenta	-
Àcid nicotínic/Niacinamida	-	-	disminueix	augmenta
Orcinol	-	-	disminueix	-
Àcid pelargònic	-	-	augmenta	-
1-(5'-fosforibosil)-5-amino-4-imidazolecarboxamida	-	-	-	augmenta
Àcid 2-aminohexadecànic	-	-	-	disminueix
5-hidroxitriptòfan	-	-	-	augmenta
Adenosina 5'-difosfat	-	-	-	disminueix
D-Arabinono-1,4-lactona/àcid citramàlic	-	-	-	augmenta
Desoxiuridina monofosfat (dUMP)	-	-	-	augmenta
Dietanolamina	-	-	-	augmenta
Fosfoetanolamina	-	-	-	augmenta
Piridoxamina	-	-	-	augmenta
Taurina	-	-	-	augmenta

Els resultats mostren un grup molt heterogeni de molècules que no estan molt relacionades entre elles, per tant es pot concloure que la funció de Snf1 en la resposta front al selenit no està relacionada amb un canvi metabòlic determinat i específicament provocat per l'agent, sinó que pot implicar una varietat de processos metabòlics.

## 2 PAPER DELS REGULADORS DEL SISTEMA D'ALTA AFINITAT DEL FERRO EN LA PROTECCIÓ FRONT LA TOXICITAT CAUSADA PEL SELENIT

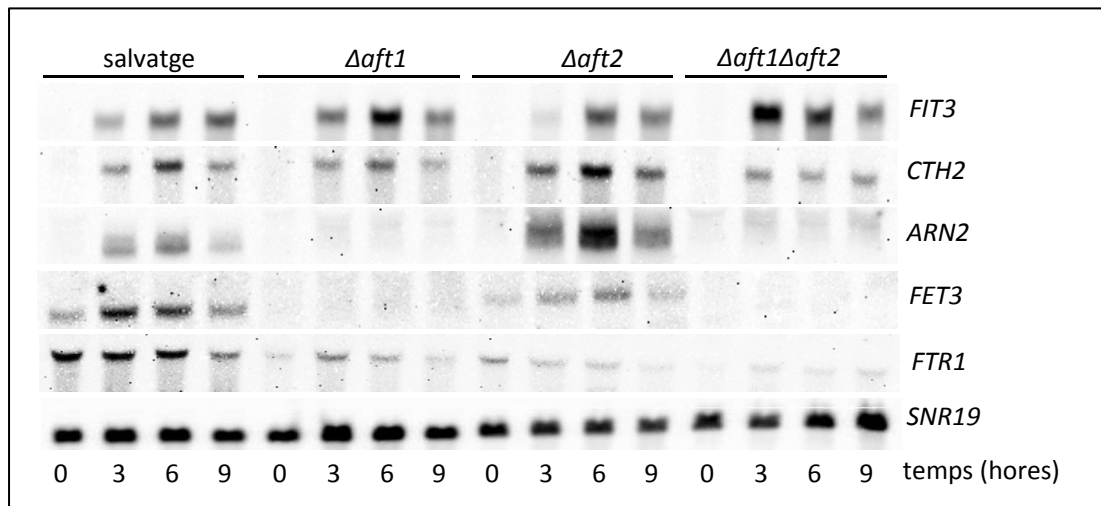
### 2.1 El selenit provoca la inducció del reguló Aft1 fins a temps llargs de tractament en *S. cerevisiae*

#### 2.1.1 Els gens del reguló Aft1 s'indueixen pel selenit de forma dependent i independent a aquest factor transcripcional

Estudis transcriptòmics previs en el llevat *S. cerevisiae* tractat amb selenit en condicions fermentatives revelaven la inducció dels gens del reguló Aft1 (Salin et al., 2008). Aquest conjunt de gens està involucrat en la captació de Fe a través del sistema d'alta afinitat (veure apartat 2.2 de la secció d'Introducció), així com en el manteniment de l'homeòstasi intracel·lular d'aquest metall. Per tant, aquestes observacions manifestaven l'existència d'una relació entre l'estrès induït pel selenit i l'homeòstasi del Fe.

En primer lloc, es van corroborar els anàlisis transcriptòmics esmentats, variant tan la durada del tractament amb selenit com la concentració emprada de l'agent. El treball citat anteriorment estava limitat als primers 80 min després de l'addició del metall i la concentració utilitzada era menor, 1 enlloc de 6 mM. En aquest estudi es va estendre el tractament fins a 9 hores després d'afegir el selenit per veure si la resposta de la inducció dels gens del reguló Aft1 era sostinguda. Així doncs, els anàlisis per Northern blot d'aquest treball mostren com 3 gens d'aquest reguló (*FIT3*, *CTH2* i *ARN2*) s'indueixen de forma significativa per sobre dels nivells basals almenys fins a les 9 hores de tractament amb selenit (**Figura 29**). D'altra banda, respecte als gens codificants de membres del complex transportador de Fe d'alta afinitat de la membrana plasmàtica, l'expressió de *FET3* s'indueix transitòria i moderadament, mentre que els nivells de mRNA de *FTR1* no incrementen al llarg de tot el tractament amb l'agent. Per tant, aquests dos gens del reguló Aft1 segueixen patrons d'inducció diferents causats per la toxicitat del selenit. Aquestes diferències s'observen també en relació a la dependència dels seus

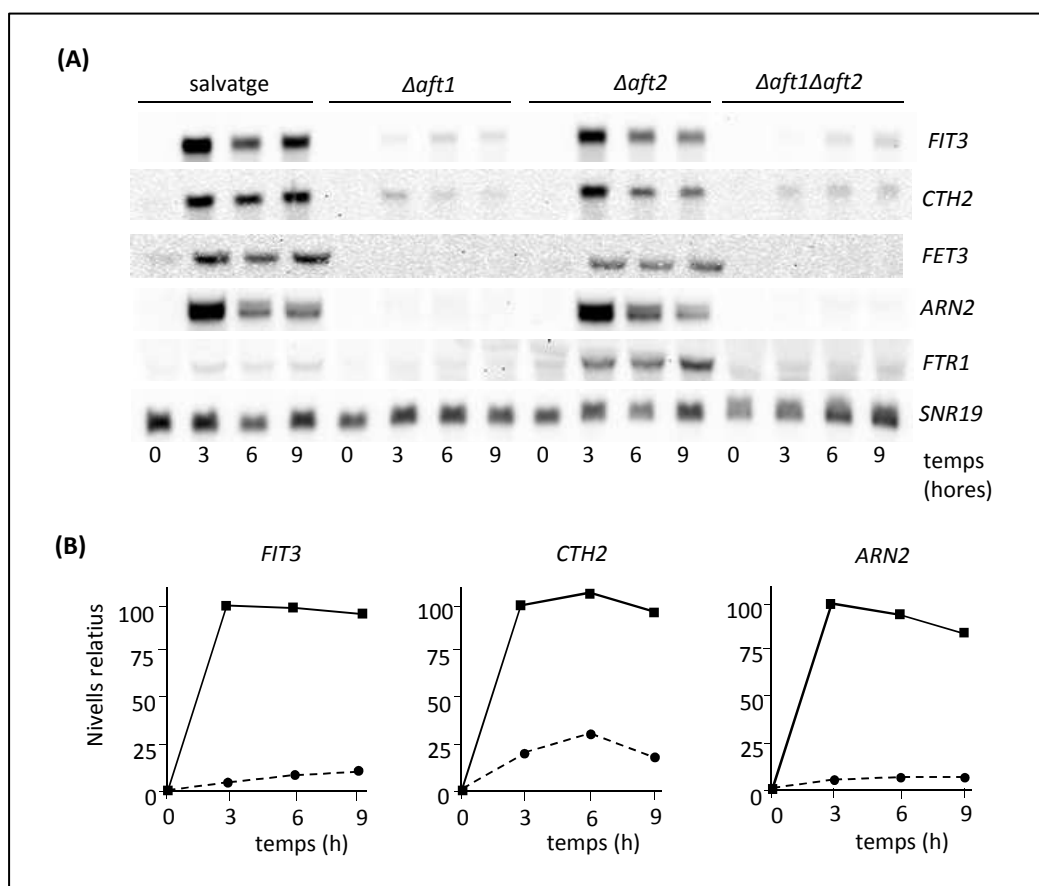
factores transcripcionals, Aft1 i Aft2. Així, la inducció de *FET3* i *ARN2* depèn d'Aft1 però no d'Aft2, mentre que la de *FIT3* i *CTH2* és independent d'ambdós factors transcripcionals (**Figura 29**). Els resultats també mostren com Aft2 podria tenir un paper repressor en l'expressió d'*ARN2* durant les condicions d'estrès causades pel selenit, donat que els seus nivells d'inducció són superiors en un mutant *aft2* en presència de selenit en comparació amb la soca salvatge.



**Figura 29.** Efecte del selenit en l'expressió de gens del sistema de captació de Fe d'alta afinitat. Anàlisi per Northern blot de l'expressió dels gens esmentats durant el tractament amb selenit sòdic 6 mM als temps indicats en les soques següents: salvatge (W303-1A),  $\Delta aft1$  (MML348),  $\Delta aft2$  (MML1086) i  $\Delta aft1\Delta aft2$  (MML1088). Les mostres es van recollir de cultius de les soques citades creixent en medi YPD suplementat amb selenit. Es van analitzar 25  $\mu$ g de RNA total per carril. Es va utilitzar l'expressió del gen *SNR19* com a control de càrrega.

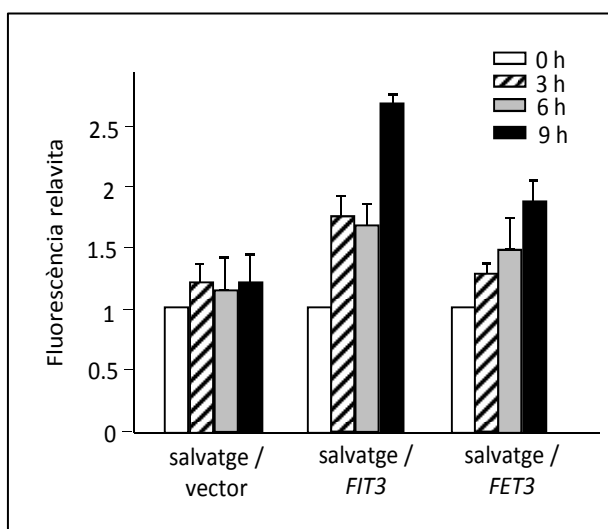
Tal i com està descrit, els gens del reguló Aft1 incrementen la seva expressió quan la cèl·lula es troba en condicions de dèficit de Fe, situació provocada quan aquestes són tractades amb agents quelants del metall com és el BPS. Es va comparar, doncs, els nivells respectius d'inducció per selenit i per manca de Fe. En aquest segon cas, els gens no segueixen patrons d'inducció diferents entre ells i tots depenen del factor Aft1, però no d'Aft2 (**Figura 30A**). En condicions d'estrès causat pel selenit, els nivells d'inducció d'alguns dels gens del reguló, com *FIT3*, *CTH2* i *ARN2* són entre un 10 i un 25% comparant-los amb les obtinguts en situacions de dèficit de Fe (**Figura 30B**).





**Figura 30. (A)** Efecte del BPS en l'expressió de gens del sistema de captació de Fe d'alta afinitat. Anàlisi per Northern blot de l'expressió dels gens esmentats durant el tractament amb BPS 0,15 mM als temps indicats en les soques següents: *salvatge* (W303-1A),  $\Delta aft1$  (MML348),  $\Delta aft2$  (MML1086) i  $\Delta aft1\Delta aft2$  (MML1088). Les mostres es van recollir de cultius exponencials de les soques citades creixent en medi YPD suplementat amb BPS. Es van analitzar 25  $\mu$ g de RNA total per carril. Es va utilitzar l'expressió del gen *SNR19* com a control de càrrega. **(B)** Quantificació dels nivells d'expressió dels gens *FIT3*, *CTH2* i *ARN2* de la soca *salvatge* sota un tractament amb selenit i amb BPS als temps indicats, emprant el programa "ImageJ". Les gràfiques representen els nivells relatius on s'agafa com a valor 100 el de les mostres tractades amb BPS al llarg de 3 hores. Les mostres d'ambdós tractaments s'analitzaven en el mateix Northern blot per permetre la seva comparació.

Encara que la inducció del reguló Aft1 causada pel selenit sigui inferior a l'observada en situacions de manca de Fe, l'expressió d'aquests gens provocada pel primer agent es va corroborar també a partir d'assajos de l'activitat de dos promotors de gens del reguló basats en el reporter GFP. La **Figura 31** mostra com la fluorescència de la GFP expressada d'ambdós promotors augmenta al llarg de les 9 hores de tractament amb selenit, essent major la provocada pel promotor de *FIT3* que pel de *FET3*, incrementant-se en el primer cas fins a 2,5 cops els seus nivells d'expressió a partir del nivell basal.



**Figura 31.** Assaig de l'activitat dels promotors *FIT3* i *FET3* basat en la fluorescència del reporter GFP. S'empraven  $3,3 \times 10^7$  cèl·lules per cada temps de tractament amb selenit sòdic 3 mM de la soca salvatge (W303-1A) transformada amb els plàsmids pFIT3-GFP i pFET3-GFP, respectivament. Els cultius estaven creixent exponencialment en medi SC líquid. La mateixa soca transformada amb p416-MET25 (vector) es va emprar com a control. La barra d'error mostra la desviació estàndard de la mitjana de tres experiments diferents.

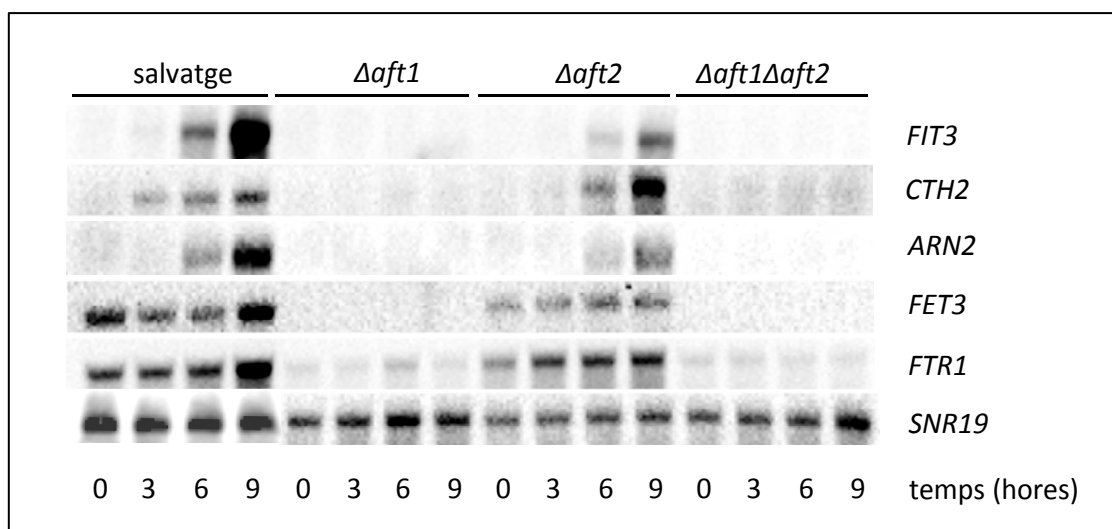
### 2.1.2 El patró d'inducció de l'expressió del reguló Aft1 causat pel selenit és específic de l'agent

La inducció d'alguns gens del reguló Aft1 provocada pel selenit de forma independent d'aquest factor transcripcional, com la de *FIT3* i *CTH2*, crida l'atenció ja que fins al moment l'expressió descrita d'aquests gens sempre havia seguit un patró d'inducció comú front a diversos estressos a més de condicions de dèficit de Fe. En la primera part d'aquesta secció de Resultats s'ha demostrat com la toxicitat del selenit està relacionada amb alteracions en el metabolisme del glutatió. A més està descrit que la sobreexpressió del gen de la glutatió reductasa (*GLR1*) de *S. cerevisiae* rescata el fenotip de sensibilitat a selenit (Pinson et al., 2000). Per tant, existiria la possibilitat que aquest patró d'inducció del reguló Aft1 es repetís en condicions d'estrès oxidatiu i/o alteració en l'homeòstasi del glutatió en la cèl·lula.

Tot i així, l'anàlisi per Northern blot mostra com la inducció del reguló Aft1 provocada per agents oxidants de glutatió, com el DEM (**Figura 32**), segueix el mateix patró d'inducció que aquell descrit en altres estressos de tipus oxidatiu (Castells-Roca et al., 2011) i en condicions de dèficit de Fe (**Figura 30A**), entre altres. Així, en la **Figura 32** s'observa com l'expressió d'alguns gens com *FIT3* o *CTH2* no es dona fins a les 6 hores de tractament amb DEM, temps d'inducció llargs considerant que és una resposta a nivell transcripcional. En qualsevol cas, en aquesta situació l'expressió de tots els gens del reguló Aft1 analitzats depèn d'Aft1 però no d'Aft2, diferent a l'observat en el cas del selenit. Per tant, el perfil d'expressió d'aquest reguló en resposta a selenit és característic i específic dels efectes directes o indirectes provocats pel selenit que fan que s'activi. Tot i que el selenit és un agent oxidant del glutatió igual que el

## Resultats

DEM, el seu efecte causant d'alteracions en l'homeòstasi del Fe sembla no estar relacionat amb aquest rol oxidant.



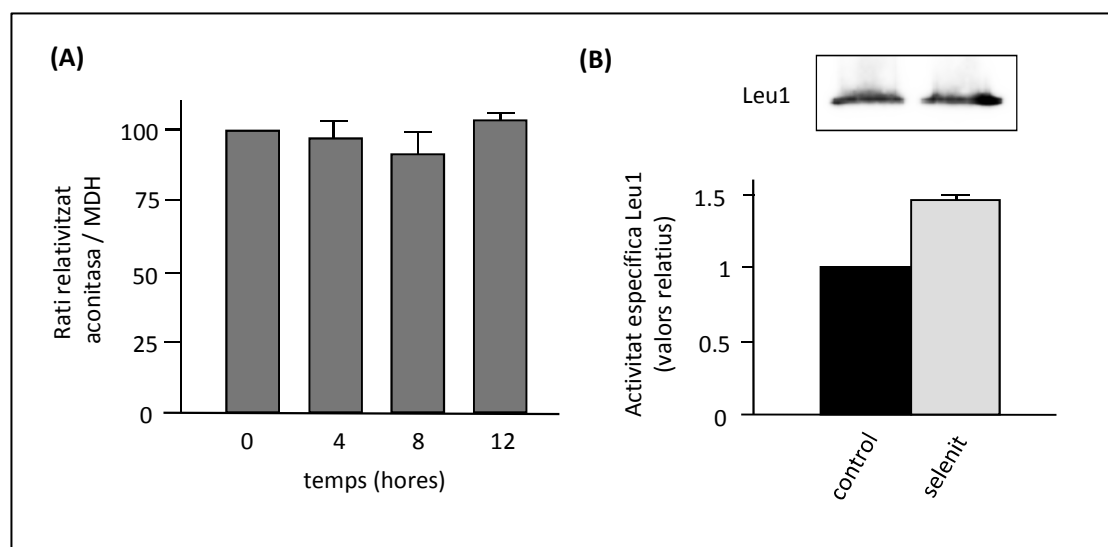
**Figura 32.** Efecte del DEM en l'expressió de gens del reguló Aft1. Anàlisi per Northern blot de la inducció dels gens del reguló al llarg del tractament amb DEM 1 mM als temps indicats en les soques següents: salvatge (W303-1A),  $\Delta aft1$  (MML348),  $\Delta aft2$  (MML1086) i  $\Delta aft1\Delta aft2$  (MML1088). Les soques creixent exponencialment en medi YPD líquid es van tractar amb DEM i es van recollir les mostres corresponents als diferents temps. Es van analitzar 25  $\mu$ g de RNA total per carril. Es va utilitzar l'expressió del gen *SNR19* com a control de càrrega.

### 2.2 El selenit no interfereix en els centres ferro-sofre en *S. cerevisiae*

L'expressió dels gens del reguló Aft1 augmenta en mutants defectius en la biogènesi mitocondrial dels centres ferro-sofre (Bellí et al., 2004; Hausmann et al., 2008), ja que algunes molècules generades per aquesta maquinària biosintètica del mitocondri són requerides en la regulació de l'activitat d'Aft1 (Kaplan i Kaplan, 2009; Lill i Mühlhoff, 2008; Pujol-Carrion et al., 2006). Així doncs, la disrupció pel selenit dels centres ferro-sofre existents o la inhibició d'algun pas de la seva biogènesi seria una hipòtesi que justificaria la inducció observada d'alguns gens del reguló Aft1, ja que en aquesta condició les cèl·lules detectarien una situació de manca de Fe -al no poder sensar-lo correctament- i s'activaria aquesta resposta transcripcional.

Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, es va mesurar l'activitat de l'aconitasa, un enzim mitocondrial que conté centres ferro-sofre en la seva estructura i que són necessaris per la seva activitat. En la **Figura 33A** s'observa com l'activitat d'aquest enzim no es veu alterada al llarg del tractament amb selenit, indicant que els centres ferro-sofre no semblen estar

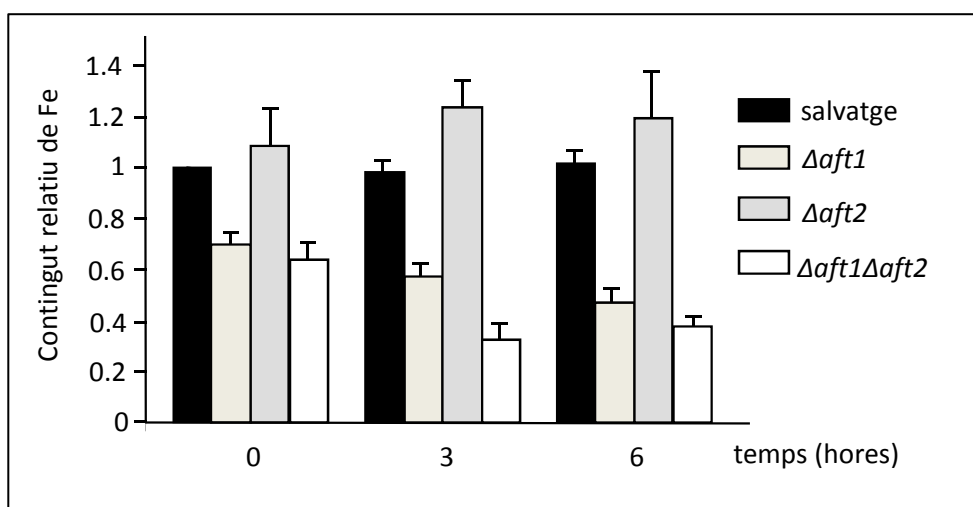
afectats. A banda del mitocondri i altres compartiments cel·lulars, també hi ha proteïnes que contenen aquests centres ferro-sofre en el citoplasma. Per tant es va analitzar l'activitat d'una d'elles, la isopropilmalat deshidrogenasa (Leu1). La **Figura 33B** mostra que no només l'activitat no decreix, sinó que inclús incrementa lleugerament, descartant d'aquesta manera l'afectació del selenit en aquesta proteïna citosòlica. A més, el Western blot de la mateixa figura revela que no hi ha canvis en els nivells de proteïna Leu1 entre ambdós estats, sense i amb selenit. En resum, aquests resultats descarten el fet que la inducció del reguló Aft1 provocada pel selenit es degui a una desregulació en l'estructura de centres ferro-sofre per part de l'agent o a un efecte directe d'aquest en la seva maquinària biosintètica mitocondrial.



**Figura 33.** El selenit no interfereix en l'estructura dels centres ferro-sofre proteics ni en la seva biogènesi. **(A)** Activitat aconitasa d'una soca salvatge (W303-1A) tractada amb selenit sòdic 3 mM als temps indicats creixent exponencialment en medi YPGal líquid. Els valors representen el rati de la mesura d'activitat aconitasa respecte l'activitat malat deshidrogenasa (MDH), i es pren el valor a temps inicial per relativitzar la resta. Les barres d'error mostren la desviació estàndard de la mitjana de tres experiments diferents. **(B)** Activitat Leu1 de la soca salvatge (MML830) tractada amb selenit sòdic 3 mM durant 4 hores creixent en fase exponencial en medi SC líquid. El gràfic representa el rati entre la soca tractada amb l'agent i la mateixa sense tractar, prenent la mostra sense tractar com a referència per relativitzar els valors. La barra d'error representa la desviació estàndard de la mitjana de tres experiments independents. Es mostra també l'anàlisi per Western blot dels nivells de proteïna Leu1 de les mateixes mostres (sense i amb selenit) emprades per determinar l'activitat enzimàtica. Es van analitzar 10 µg de proteïna per carril, utilitzant l'anticòs anti-Leu1 de conill a una dilució 1:1000.

D'altra banda, es van mesurar els nivells de Fe intracel·lular total de cèl·lules de *S. cerevisiae* tractades amb selenit, ja que tot i que aquest agent no té un efecte directe en les proteïnes amb centres ferro-sofre, podria estar alterant de forma indirecta el contingut de Fe de la

cèl·lula. Els resultats mostren com els nivells de Fe globals en la soca salvatge tractada amb selenit no varien durant les 6 hores de tractament (**Figura 34**). Tal i com està descrit, el mutant *aft1* (Blaiseau et al., 2001) presenta uns nivells de Fe inferiors a la soca salvatge, observant en aquest treball que aquests baixen moderadament al llarg del tractament amb selenit. En canvi, el mutant *aft2* presenta un contingut de Fe similar a la soca salvatge i aquest no està afectat significativament quan la soca és tractada amb selenit (**Figura 34**). En una situació hipotètica, el selenit podria estar disminuint els nivells totals de Fe intracel·lulars, la cèl·lula detectaria aquesta manca de Fe i activaria d'aquesta manera l'expressió dels gens del reguló Aft1 (o d'alguns d'ells) per tal de mantenir l'homeòstasi intracel·lular del metall.



**Figura 34.** Mesura dels nivells de Fe intracel·lulars de les següents soques: salvatge (W303-1A),  $\Delta aft1$  (MML348),  $\Delta aft2$  (MML1086) i  $\Delta aft1\Delta aft2$  (MML1088). Les soques creixent en fase exponencial en medi YPD líquid es van tractar amb selenit sòdic 6 mM i es van recollir de l'ordre de  $7 \times 10^8$  cèl·lules per cada temps de tractament amb l'agent. El gràfic pren com a valor de referència l'obtingut en la soca salvatge a temps inicial sense tractament, i a partir d'aquest es relativitzen tots els altres. Les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana de tres experiments diferents.

### 2.3 El factor transcripcional Aft2 té un rol funcional en la protecció de la cèl·lula front la toxicitat per selenit

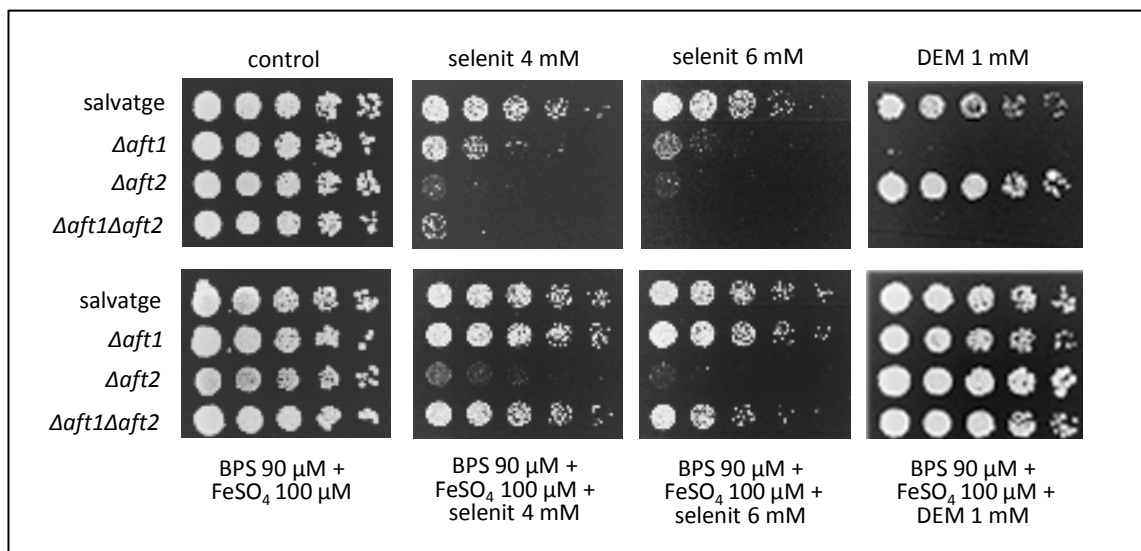
#### 2.3.1 L'activitat protectora d'Aft2 front al selenit és independent de la seva funció en l'homeòstasi del ferro

Tot i tenir funcions solapades en resposta a canvis en l'homeòstasi del Fe en cèl·lules de llevat, tan Aft1 com Aft2 tenen rols divergents (Blaiseau et al., 2001; Rutherford et al., 2001). Addicionalment, estudis amb la col·lecció completa de mutants nuls de *S. cerevisiae* van

revelar que Aft1 i Aft2 podien participar també en altres funcions diferents a la regulació de l'homeòstasi del Fe (Berthelet et al., 2010).

A partir dels estudis que revelaven la inducció pel selenit de gens del reguló Aft1 i de l'existència d'altres funcions d'ambdós factors transcripcionals Aft1 i Aft2 a banda de la regulació de l'homeòstasi del Fe i que a part no són redundants entre elles (Berthelet et al., 2010; Blaiseau et al., 2001; Rutherford et al., 2001), es van realitzar assajos de viabilitat amb soques mutants per ambdós factors de transcripció més el doble mutant per veure si tenien alguna funció en la protecció front el selenit.

Els resultats (**Figura 35**) mostren com les dos soques mutants per Aft1 i Aft2 més el doble mutant són hipersensibles a la toxicitat causada pel selenit. Les dades referides al mutant *aft1* ja s'havien mostrat a la **Figura 8**. El fenotip de sensibilitat és rescatat en el cas del mutant *aft1* i el doble mutant *aft1 aft2* quan s'afegeix Fe a les plaques on es fa l'assaig de sensibilitat, el qual significa que el rol d'Aft1 en relació amb el selenit depèn dels nivells de Fe intracel·lulars. D'altra banda, el mutant *aft2* continua sent hipersensible a la toxicitat per l'agent tot i estar en una situació de replació de Fe (**Figura 35**). Per tant, aquesta observació recolza la hipòtesi que Aft2 té una funció protectora front la toxicitat causada pel selenit que no depèn del Fe intracel·lular.



**Figura 35.** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A), *Δaft1* (MML348), *Δaft2* (MML1086) i *Δaft1Δaft2* (MML1088) front a selenit sòdic i DEM. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic o DEM a les concentracions indicades i amb ambdós agents més condicions de replació de Fe (BPS + FeSO<sub>4</sub>). Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores.

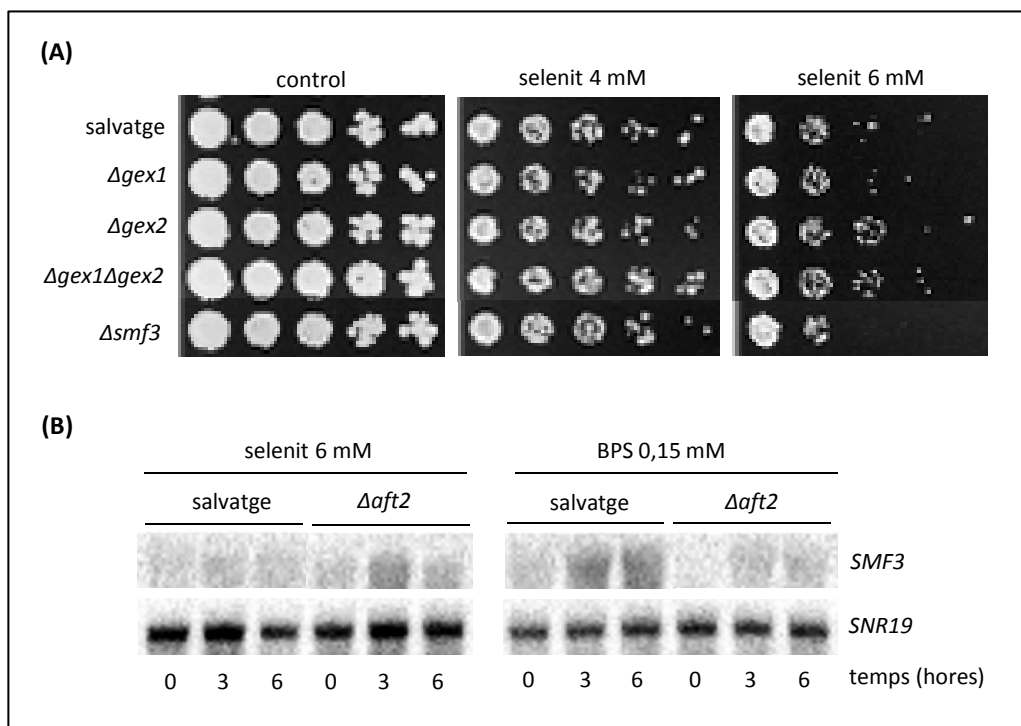
D'altra banda, en el cas del paper protector de la quinasa Snf1 front la toxicitat per selenit s'havia vist que els efectes de l'agent en el mutant *snf1* estan relacionats amb alteracions en el metabolisme del glutatió. Tot i així, sembla ser que la funció protectora d'Aft2 front a l'agent no comparteix aquest fenotip, ja que els assajos de viabilitat mostren com el mutant *aft2* ni tan sols és sensible a agents que provoquen alteracions en l'homeòstasi del GSH, com és el DEM (**Figura 35**). Per contra, tan el mutant *aft1* com el doble mutant *aft1 aft2* sí que presenten hipersensibilitat a l'agent oxidant del GSH i aquest fenotip es reverteix quan s'addiciona Fe a les plaques on es fa l'assaig de sensibilitat (**Figura 35**). Per tant, es pot concloure que Aft2 presenta un rol protector front la toxicitat per selenit que és independent del Fe intracel·lular i que no està relacionat amb l'oxidació del GSH provocada pel selenit.

### 2.3.2 El paper protector d'Aft2 front al selenit no està relacionat amb funcions conegudes regulades per aquest factor de transcripció

Aft2 participa en altres processos cel·lulars independents de l'homeòstasi del Fe, tot i que no són tan coneguts com en el cas d'Aft1 (veure apartat **2.4.2** de la secció d'Introducció). La funció d'Aft2 té lloc en condicions exacerbades de dèficit de Fe provocades pels efectes acumulatius de la disminució d'aquest element i la pèrdua de funció d'Aft1. No obstant, tot i que la majoria de gens del reguló estan controlats principalment per Aft1 en condicions de dèficit de Fe, en aquesta mateixa situació Aft2 actua com a regulador directe de l'expressió de *SMF3* i *MRS4*, gens involucrats en el transport de Fe al mitocondri i a la vacuola, respectivament (Courel et al., 2005). Recentment s'ha vist també que Aft2 és el regulador principal del gen *GEX1* (i del seu paràleg, *GEX2*) de manera que la proteïna Gex1 s'acumula en condicions de manca de Fe tot i que té funcions independents a l'homeòstasi del Fe com a intercanviador de glutatió en les membranes vacuolar i plasmàtica (Dhaoui et al., 2011).

Es van dur a terme assajos de viabilitat front selenit amb soques mutants en alguns dels gens diana coneguts d'Aft2 citats anteriorment, per veure si el paper protector d'Aft2 davant l'agent es podia relacionar amb la funció d'alguns d'aquests. Cap d'aquests mutants en gens diana d'Aft2 és hipersensible a la toxicitat provocada pel selenit (**Figura 36A**), descartant per tant la seva participació en el paper protector d'Aft2. Addicionalment, experiments de Northern blot van acabar de descartar el paper de *SMF3* en relació amb el selenit, ja que d'una banda l'expressió d'aquest gen no s'indueix en presència de selenit en una soca salvatge (**Figura 36B**), i de l'altra sembla que sí s'expressi en absència d'Aft2 tot i que de forma moderada. Per tant,

en aquestes condicions d'estrès, Aft2 no estaria regulant a *SMF3*. Per contra, tal i com s'ha descrit (Courel et al., 2005), i també en aquest treball, en condicions de dèficit de Fe s'activa l'expressió de *SMF3* i aquesta depèn d'Aft2.



**Figura 36. (A)** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A),  $\Delta gex1$  (MML1748),  $\Delta gex2$  (MML1750),  $\Delta gex1\Delta gex2$  (MML1752) i  $\Delta smf3$  (MML1746) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment es van plaquejar sobre YPD sòlid amb selenit sòdic a les concentracions indicades, i les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores. **(B)** Anàlisi per Northern blot de l'expressió de *SMF3* durant el tractament amb selenit sòdic o BPS als temps indicats en les soques salvatge (W303-1A) i  $\Delta aft2$  (MML1086). Les soques creixent exponencialment en medi YPD líquid es van tractar amb selenit i amb BPS i es van recollir les mostres corresponents als diferents temps. Es van analitzar 25 µg de RNA total per carril. Es va utilitzar l'expressió del gen *SNR19* com a control de càrrega.

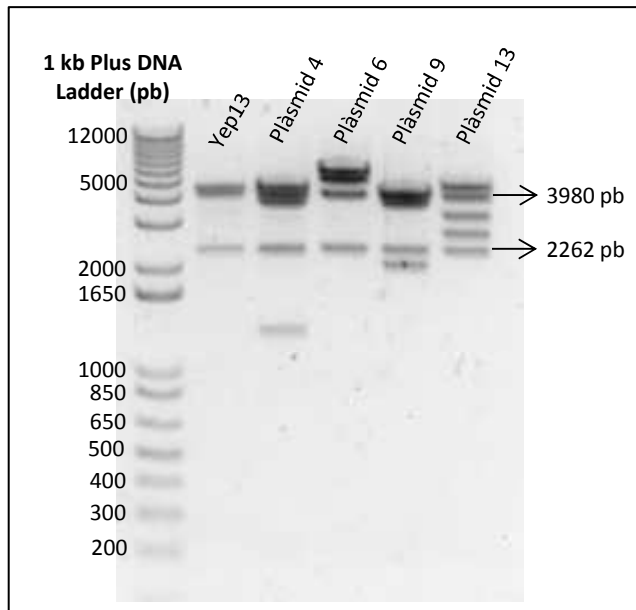
Així doncs, caldria continuar indagant en possibles gens diana del factor transcripcional Aft2 que tinguessin un efecte protector front la toxicitat provocada pel selenit, ja que els gens fins ara descrits sembla que no tinguin cap relació en aquest rol nou d'Aft2. Aquest és independent d'Aft1 i dels nivells de Fe intracel·lulars, sumant així una nova funció d'Aft2 no dependent del seu paràleg.



### 2.3.3 Aïllament i identificació de supressors de la sensibilitat del mutant *aft2* al selenit

Un cop descartada la hipòtesi d'una possible relació entre la toxicitat provocada pel selenit i la funció dels gens diana d'*Aft2* coneguts fins el moment, es va realitzar una recerca de candidats capaços de suprimir la sensibilitat de la soca  $\Delta aft2$  al selenit. L'objectiu d'aquest experiment era trobar nous gens diana d'*Aft2* capaços de rescatar l'efecte d'hipersensibilitat que provoca el selenit a la soca mutant deficient en aquest factor transcripcional, i així poder definir d'una manera més concreta possibles dianes d'*Aft2* en la ruta senyalitzadora de resposta a l'agent. Alternativament, aquesta estratègia podria permetre conèixer millor els mecanismes generals pels quals el selenit causa toxicitat en les cèl·lules del llevat.

Així doncs, el primer pas va ser transformar la soca mutant *aft2* amb una genoteca de DNA de *S. cerevisiae* en el vector YEp13, i seguir tots els passos subsegüents tal i com s'explica en l'apartat **14** de la secció de Materials i mètodes. De la transformació inicial, es van obtenir 42 clons mutants *aft2* que creixien en medi sense leucina (per tant portadors d'un plàsmid de la genoteca) i amb selenit sòdic 3 mM. D'aquestes colònies s'obtenia el plàsmid a partir de cultius derivats de les mateixes i s'amplificava en *E. coli*. El següent pas va ser fer un anàlisi de restricció d'aquests plàsmids emprant els enzims *EcoRI* i *HindIII*. En aquest anàlisi s'esperava trobar els patrons de restricció diferents que equivaldrien a clons independents capaços de revertir la sensibilitat de la soca mutant *aft2* al selenit. Segons el mapa de restricció del plàsmid YEp13, els dos enzims digeririen el vector de tal manera que s'obtindrien dos fragments comuns d'una mida determinada. L'aparició d'aquestes dues bandes comuns en tots els clons serviria com a control que el plàsmid que s'estaria obtenint era realment derivat de YEp13 (**Figura 37**). Després, es tornava a transformar la soca  $\Delta aft2$  amb els plàsmids supressors que no tinguessin el patró de restricció repetit entre ells. Els transformants resultants s'analitzaven mitjançant assajos de viabilitat per confirmar que rescataven el fenotip d'hipersensibilitat al selenit en cèl·lules mancades d'*Aft2*.



**Figura 37.** Gel d'electroforesi en agarosa al 0,8% amb els fragments derivats dels plàsmids supressors de la sensibilitat del mutant *aft2* a selenit sòdic 3 mM. Es van digerir 750 ng de cadascun dels plàsmids amb els enzims *EcoRI-HindIII*. Es va digerir també el plàsmid YEp13 com a control. Les mides de cada fragment es podien saber comparant-ho amb les del marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Les bandes de 3980 i 2262 pb corresponen a dos fragments del vector presents en tots els clons de la genoteca.

En la **Figura 37** es mostra el patró de restricció dels quatre plàsmids finals que un cop retransformats en el mutant *aft2* continuaven rescatant el fenotip d'hipersensibilitat a selenit. Cap dels altres plàsmids amb patrons de restricció característics tornaven a rescatar el fenotip d'hipersensibilitat, indicant que la resistència original a l'agent segurament anava lligada a mutacions revertents cromosòmiques i no al plàsmid. En el conjunt del treball el plàsmid 4 es va obtenir un cop, el 6 dos cops, el 9 quatre cops i el 13 fins a sis vegades. Els inserts d'aquests quatre plàsmids es van caracteritzar seqüenciant els seus dos extrems, i la seva descripció es troba detallada a la **Taula 7**.

Els resultats mostren com cadascun dels plàsmids conté més d'un gen, tot i que es van descartar els gens trencats en els extrems dels respectius inserts. Així doncs, el plàsmid 4 conté el gen *PHO81*, el qual codifica per un inhibidor de quinases dependents de ciclins (CKI) que regula els complexos quinasa dependents de ciclins (CDK) Pho80-Pho85 i Pcl7-Pho85 en resposta als nivells de fòsfor cel·lulars. El clon 6 conté diversos gens sencers. En primer lloc, *RUF23*, *RRT5*, *YFR032C-B* i *YFR035C* corresponen a seqüències gèniques la funció proteica de les quals roman desconeguda. *RPL29*, *QCR6* i *CDC26* codifiquen respectivament per una subunitat ribosomal, per una subunitat del complex citocrom bc(1) i per una subunitat del complex promotor de l'anafase o ciclosoma (APC/C). També hi ha el gen *PHO4*, el qual és un factor de transcripció que actua cooperativament amb Pho2 en resposta a condicions de limitació de fòsfor. El plàsmid 9 és similar al 4 ja que conté el gen *PHO81* però a més també té *NAS6*, un gen que codifica per una proteïna relacionada amb l'assemblatge del proteosoma.

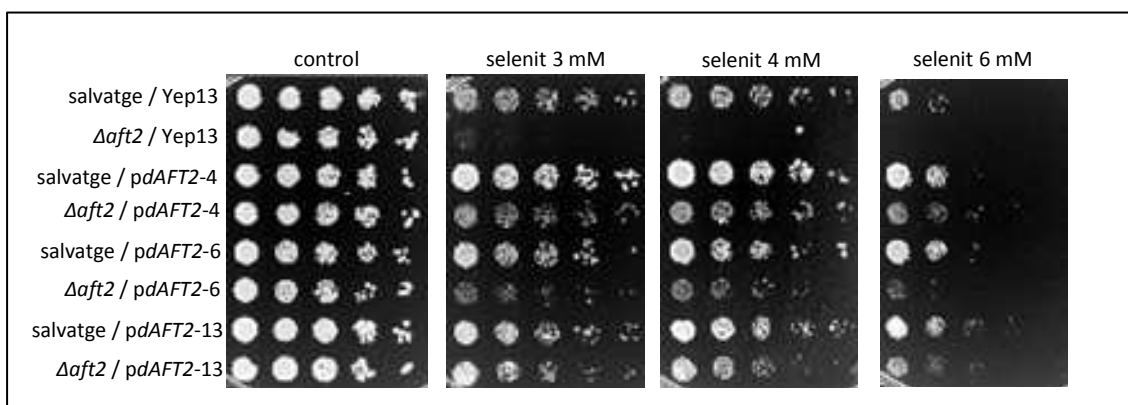
## Resultats

Finalment, el plàsmid 13 conté dos gens complets, *SSU1* i *GLR1*, els quals codifiquen per una bomba de sulfat de la membrana plasmàtica involucrada en el metabolisme i flux del sulfat i per la glutatió reductasa citosòlica i mitocondrial que converteix el GSSG a GSH, respectivament. Cal remarcar que en aquest anàlisi no es va obtenir cap clon portador del gen *AFT2*, el qual indica que o bé no està present en la col·lecció de clons utilitzada o bé que no es van emprar condicions saturants d'anàlisi.

**Taula 7.** Plàsmids de la genoteca en YEp13 aïllats en aquest estudi com supressors de la hipersensibilitat de la soca *Δaft2* (MML1086) al selenit sòdic 3 mM. S'indica des d'on comença fins a on acaba cadascun dels inserts de cada plàsmid, i els gens que es troben en aquella regió. En cada insert es poden trobar fragments gènics trencats (escrits entre barres) o gens amb l'ORF sencera.

Nº plasmid	Cromosoma	Nucleòtid inicial	Nucleòtid final	Gens
Plàsmid 4	VII	954258	959673	<i>/NAS6/</i> <i>PHO81</i>
Plàsmid 6	VI	221646	227939	<i>RUF23</i> <i>RRT5</i> <i>RPL29</i> <i>YFR032C-B</i> <i>QCR6</i> <i>PHO4</i> <i>YFR035C</i> <i>CDC26</i> <i>/RSC8/</i>
Plàsmid 9	VII	953474	959441	<i>NAS6</i> <i>PHO81</i>
Plàsmid 13	XVI	371742	377805	<i>/NOG1/</i> <i>SSU1</i> <i>GLR1</i> <i>/RPS6A/</i>

A continuació es van realitzar assajos de viabilitat amb concentracions creixents de selenit amb transformants tan de la soca salvatge com del mutant *aft2* portadors dels respectius plàsmids (**Figura 38**). L'objectiu era determinar si els plàsmids només rescataven la sensibilitat del mutant o bé també conferien resistència a altes concentracions de selenit en la soca salvatge.



**Figura 38.** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A) i  $\Delta aft2$  (MML1086) transformades amb el vector YEp13, *pdAFT2-4* (pMM1086), *pdAFT2-6* (pMM1087) i *pdAFT2-13* (pMM1089) front a selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi SC amb tots els aminoàcids menys la leucina, es van plaquejar sobre SC sòlid amb selenit a les concentracions indicades, i les plaques es van incubar a 30°C durant 72 hores.

La **Figura 38** confirma com els plàsmids 4, 6 i 13 transformats en la soca  $\Delta aft2$  confereixen protecció front la toxicitat provocada pel selenit, comparant-ho amb el fenotip d'hipersensibilitat observat en el mutant sense cap d'aquests vectors supressors. El plàsmid 9 no es va analitzar ja que era semblant al plàsmid 4 però amb un gen de més (*NAS6*). D'altra banda, els assajos de viabilitat també mostren com la soca salvatge millora moderadament el seu creixement en presència de selenit quan és transformada amb els plàsmids supressors comparant-ho amb la soca salvatge control. Tot i així, es pot observar clarament que el rescat de la hipersensibilitat del mutant *aft2* es manifesta en major grau que la millora del creixement de la soca salvatge quan aquestes s'exposen a selenit, ja que el mutant transformat amb qualsevol dels tres plàsmids pot créixer fins i tot a concentracions tan elevades com la soca salvatge (**Figura 38**). Aquests resultats apunten a dos gens implicats en el metabolisme del fòsfat (*PHO4* i *PHO81*), a més de *GLR1* i potser *SSU1* (veure apartat de Discussió), com importants en la toxicitat del selenit encara que cap d'ells serien gens diana específics d'Aft2.

### 2.4 La proteïna Rim101 confereix protecció front la toxicitat causada pel selenit

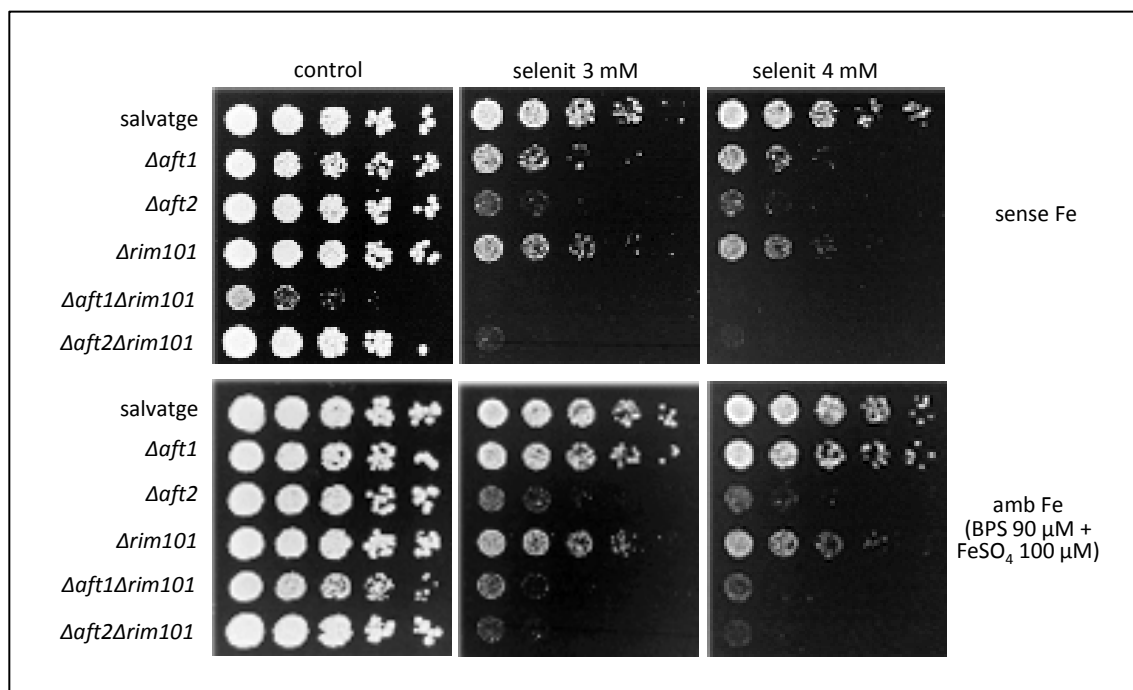
#### 2.4.1 El rol protector de Rim101 front el selenit no està relacionat amb les funcions d'Aft1 i Aft2 en aquest estrès

El paper complex d'Aft1 (i possiblement també el d'Aft2) es va demostrar, addicionalment, per interaccions genètiques existents entre la cascada de senyals regulada per Aft1 i la via de resposta a pH alcalí senyalitzada per Rim101 (Berthelet et al., 2010). Entre les diverses funcions independents a la seva actuació en la regulació de l'homeòstasi del Fe, Aft1 participa paral·lelament junt amb la via de resposta a pH alcalí regulada per *RIM101* en la regulació de processos similars, i ambdues vies estan connectades entre sí amb els nivells de Fe (Berthelet et al., 2010). *RIM101* participa en diversos processos cel·lulars com la resposta a estrès per pH alcalí (Hayashi et al., 2005) i l'esperulació (Li i Mitchell, 1997; Su i Mitchell, 1993), entre altres. De forma similar, Aft1 està implicat en els mateixos processos, incloent l'esperulació (Gil et al., 1991).

Degut a les interaccions genètiques existents entre Aft1, Aft2 i Rim101, es va analitzar a través d'assajos de viabilitat la possible relació entre ambdós factors transcripcionals Aft i la proteïna Rim101 a l'hora de protegir les cèl·lules de *S. cerevisiae* front una situació d'estrès provocada pel selenit. D'una banda, Rim101 regula la resposta a nivell transcripcional en condicions d'estrès per pH alcalí (Hayashi et al., 2005), i de l'altra té un paper activador d'alguns gens del sistema de captació de Fe (Lamb et al., 2001; Serrano et al., 2002) i un rol repressor sobre altres gens del reguló Aft1 (Barwell et al., 2005). Totes aquestes funcions de Rim101 plantejaven la hipòtesi que la proteïna pogués tenir un paper protector front un altre estrès com el causat pel selenit i que existís alguna relació amb la regulació de l'homeòstasi del Fe.

En primer lloc, els resultats mostren com el mutant *rim101* és hipersensible al selenit, més moderadament que en el cas de la soca mutant *aft2* i de forma similar al mutant *aft1* (**Figura 39**). Per tant, es pot concloure que Rim101 juga un paper protector front la toxicitat provocada pel selenit. A diferència del mutant *aft1*, la hipersensibilitat de la soca  $\Delta$ *rim101* no es reverteix quan s'addiciona Fe a les plaques on es fa l'assaig de viabilitat. Per tant, això suporta que Rim101 protegeix front la toxicitat per selenit de forma independent dels nivells de Fe intracel·lulars. La via de resposta a pH alcalí regulada per *RIM101* participa en processos cel·lulars de forma paral·lela a la rutes dependents de Fe (Berthelet et al., 2010). Tot i així, ambdues vies també participen en rutes biològiques diferents. Per conèixer quin dels casos es

dóna en condicions d'estrès per selenit, es va analitzar la sensibilitat dels dobles mutants *aft1 rim101* i *aft2 rim101* a l'agent, comparant-ho amb el fenotip observat en els mutants simples. Tan el primer doble mutant com el segon mostren un fenotip de sensibilitat additiu (**Figura 39**) indicant que el rol protector de Rim101 front a la toxicitat provocada per selenit no està relacionat amb el mecanisme protector d'Aft1 ni d'Aft2, és a dir, que les vies senyalitzadores actuen paral·lelament entre elles en aquestes condicions d'estrès. El fenotip d'hipersensibilitat del doble mutant *aft1 rim101* es recupera moderadament en condicions de repleció de Fe, però aquest rescat es dóna molt probablement a través de la relació entre la via regulada per Aft1 i els nivells de Fe intracel·lulars. De fet, ja estava descrit que la interacció negativa entre les mutacions *aft1* i *rim101* es podia revertir amb la incorporació extra de Fe, per tant la via de *RIM101* regularia processos que actuarien paral·lelament amb vies dependents del Fe intracel·lular (Berthelet et al., 2010). En el cas del doble mutant *aft2 rim101*, com la sensibilitat al selenit d'ambdós mutants simples no està relacionada amb el Fe intracel·lular, és perfectament explicable que la repleció de Fe tampoc rescati la hipersensibilitat del doble mutant.

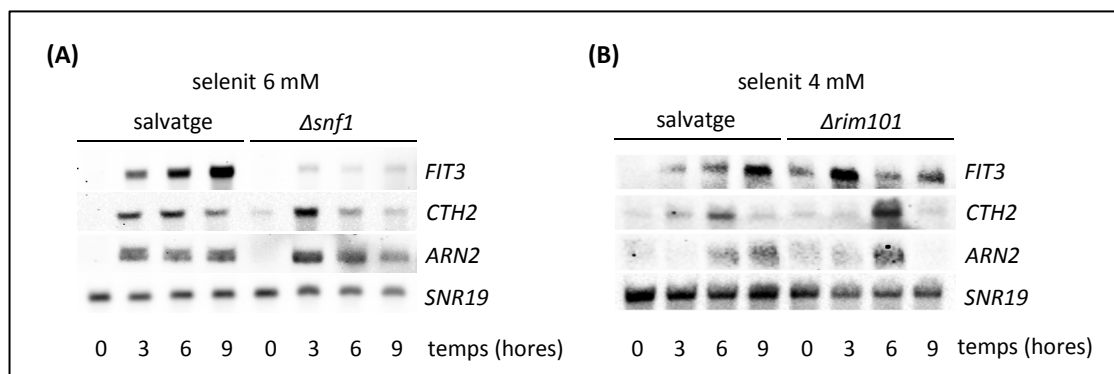


**Figura 39.** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A), *Δaft1* (MML348), *Δaft2* (MML1086), *Δrim101* (MML1740), *Δaft1Δrim101* (MML1758) i *Δaft2Δrim101* (MML1760) front selenit sòdic. Les cèl·lules creixent en fase exponencial en medi YPD líquid es van plaquejar sobre el mateix medi sòlid amb selenit sòdic a les concentracions indicades i sobre plaques amb l'agent en condicions de repleció de Fe (BPS + FeSO<sub>4</sub>). Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores.

### 2.4.2 La inducció dels gens del reguló Aft1 no depèn de Rim101 en cèl·lules tractades amb selenit, però sí de Snf1 en alguns casos

Dins de la resposta transcripcional a estrès alcalí (Lamb et al., 2001; Serrano et al., 2002), Rim101 regula l'expressió de gens relacionats amb diversos processos biològics, entre els quals es troben gens de bombes de ions (*ENA1* i *VMA4*), de transport en resposta a la limitació d'alguns ions (*CTR3*, *FRE1*, *PHO11/12* i *PHO84*), transportadors de sideròfors de Fe (*ARN4*), factors transcripcionals (*NRG2* i *TIS11*) i gens que codifiquen per proteïnes de membrana. Altres estudis han demostrat que en condicions fermentatives i d'estrès alcalí el gen del reguló Aft1 *ARN4* s'indueix de forma dependent a Rim101 (Barwell et al., 2005; Lamb et al., 2001; Lamb i Mitchell, 2003). Addicionalment, els nivells d'expressió dels gens *FRE2*, *FRE3*, *FRE4*, *ARN2* i *FIT1* es redueixen en cèl·lules mutants *rim101* en les mateixes condicions d'estrès alcalí (Barwell et al., 2005). Per contra, l'expressió d'*ARN1* (Barwell et al., 2005; Lamb i Mitchell, 2003), *FRE1* (Lamb et al., 2001) i del reporter *FET3-lacZ* (Berthelet et al., 2010) augmenta en absència de Rim101 sota un tractament alcalí. Per tant, Rim101 actua com a inductor o repressor dels gens del reguló Aft1 en aquestes condicions, tenint un rol força complex. D'altra banda, ja que el selenit induceix l'expressió de gens del sistema de captació de Fe en *S. cerevisiae*, es volia indagar l'existència d'una possible relació entre el reguló Aft1, la via regulada per *RIM101* i la toxicitat cel·lular causada pel selenit especialment en cèl·lules mutants *rim101*. A més, ja que en condicions de pas de metabolisme fermentatiu a respiratori, és a dir, durant el canvi diàuxic, també s'indueixen certs gens del reguló Aft1 i aquesta inducció és regulada positivament per la via dependent de Snf1 (Haurie et al., 2003), es va ampliar l'estudi de la inducció del reguló Aft1 per selenit a mutants *snf1*.

Experiments de Northern blot revelen, per una banda, que l'expressió d'alguns gens del sistema de captació de Fe depèn de la quinasa Snf1 (**Figura 40A**), però tots ells s'indueixen de forma independent a Rim101 (**Figura 40B**) en condicions d'estrès provocat pel selenit.



**Figura 40.** Efecte del selenit en l'expressió de gens del sistema de captació de Fe d'alta afinitat. **(A)** Anàlisi per Northern blot de l'expressió dels gens esmentats durant el tractament amb selenit sòdic als temps indicats en les soques salvatge (W303-1A) i  $\Delta snf1$  (Wsn1). Les mostres es van recollir de cultius exponencials de les soques citades creixent en medi YPD suplementat amb selenit. Es van analitzar 25  $\mu$ g de RNA total per carril. Es va utilitzar l'expressió del gen *SNR19* com a control de càrrega. **(B)** Com en **(A)**, però utilitzant les soques salvatge i  $\Delta rim101$  (MML1740).

Així doncs, es planteja la situació que sota un tractament amb selenit, la inducció del reguló Aft1 no està relacionada amb el mecanisme protector de Rim101 front la toxicitat causada per l'agent. Aquest resultat corrobora els fenotips observats en la **Figura 39**, en els quals no s'observa cap relació entre Aft1 i Rim101 referint-se a la protecció front al selenit. Per tant, tot i que en condicions d'estrès per pH alcalí Rim101 jugui un paper regulador del sistema de captació de Fe ja sigui de forma positiva o negativa (o almenys d'alguns gens del sistema), sembla que en situacions d'estrès per selenit no intervé en aquest procés biològic, confirmant que la relació entre el selenit i la funció de Rim101 és independent del Fe.

D'altra banda, la **Figura 40A** mostra com l'expressió de *FIT3* depèn parcialment de Snf1 sota condicions d'estrès per selenit, però no és aquest el cas de *CTH2* ni *ARN2*. Així doncs, el selenit actuaria com a factor mediambiental capaç d'induir certs gens de captació de Fe de la mateixa manera que en condicions de canvi diàuxic, on la quinasa Snf1 actua com a reguladora d'aquesta expressió gènica. En resum, la relació entre el selenit i l'homeòstasi del Fe resulta un procés molt complex que engloba tan factors que regulen aquest sistema i que formen part d'altres respostes a estressos com diferències en la resposta provocada per l'agent que permeten establir una relació amb el reguló Aft1 o no.



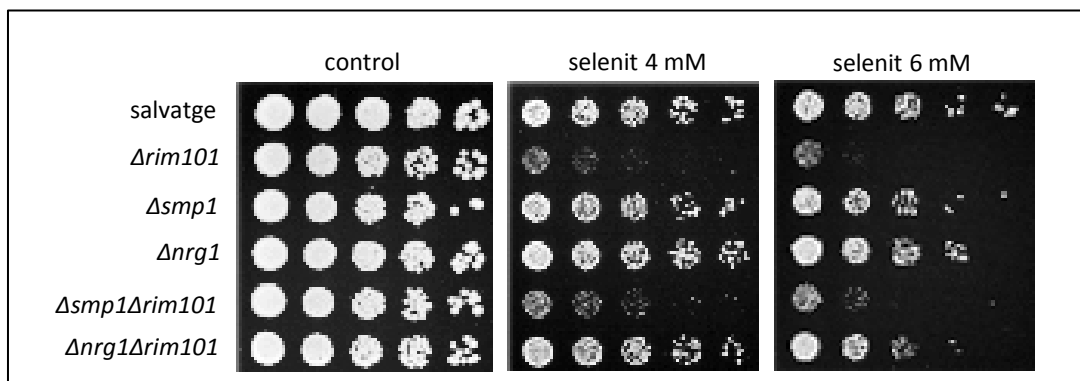
### 2.4.3 Efectes del selenit en gens diana coneguts del factor transcripcional Rim101

La repressió transcripcional d'alguns gens és la funció biològica principal de Rim101. Rim101 es va descobrir a través d'anàlisis mutagènics com a un activador de l'expressió gènica durant la fase meiòtica i l'esperulació (Su i Mitchell, 1993). D'altra banda, aquest factor de transcripció actua com a repressor a través de la unió a promotors (Peñalva et al., 2008) i indirectament com activador mitjançant la repressió de gens que actuen negativament, és a dir, repressors també, com *SMP1* i *NRG1* (Lamb i Mitchell, 2003). En condicions de pH alcalí, Rim101 s'associa al promotor de *NRG1*, permetent així l'expressió de gens reprimits per Nrg1, com són *ZPS1* i *ENA1*. Ena1 és requerit pel creixement en medi alcalí i tolerància a Na<sup>+</sup> i Li<sup>+</sup>. La repressió de *SMP1* actua com a regulador negatiu del creixement invasiu i de l'esperulació, tot i que existeixen altres proteïnes diana de Rim101 que intervenen en l'esperulació (Lamb i Mitchell, 2003).

Així doncs, es va determinar la sensibilitat de soques mutants en els repressors regulats per Rim101 a selenit, tan dels mutants simples com els dobles amb *RIM101*, per veure si la cascada de senyals regulada per Rim101 en la protecció front l'agent seguia la mateixa via de repressió dels gens que actuaven negativament (*NRG1* i *SMP1*) en condicions d'estrès per pH alcalí.

Considerant únicament els fenotips de sensibilitat dels mutants simples, només es pot concloure que a banda de la hipersensibilitat del mutant *rim101*, els mutants en els dos repressors Smp1 i Nrg1 presenten un fenotip igual que la soca salvatge i per tant no estan afectats per la toxicitat de l'agent (**Figura 41**). Tot i així, els fenotips dels dobles mutants donen més informació sobre el mecanisme protector de Rim101. En el cas del doble mutant *smp1 rim101* la soca continua sent hipersensible a l'agent degut a la manca de Rim101. D'altra banda, es pot observar com en absència del repressor Nrg1 i del seu regulador negatiu Rim101, les cèl·lules manifesten un fenotip gairebé salvatge front la toxicitat causada pel selenit (**Figura 39**). En altres paraules, l'absència de *NRG1* és epistàtica sobre la de *RIM101*, apuntant a que, en la resposta a selenit, Nrg1 (però no Smp1) actua per sota de Rim101. Així doncs, aquest resultat suggereix que quan les cèl·lules són tractades amb selenit, es desencadenen una sèrie de respostes entre les quals es troba l'activació de la via regulada per *RIM101* amb la subsegüent repressió d'un dels seus gens repressors diana, *NRG1*. Aquesta repressió sembla ser beneficiària per la cèl·lula ja que permet la seva recuperació sota un tractament amb selenit. Nrg1 regula negativament els gens *ENA1* i *ZPS1* en condicions de pH

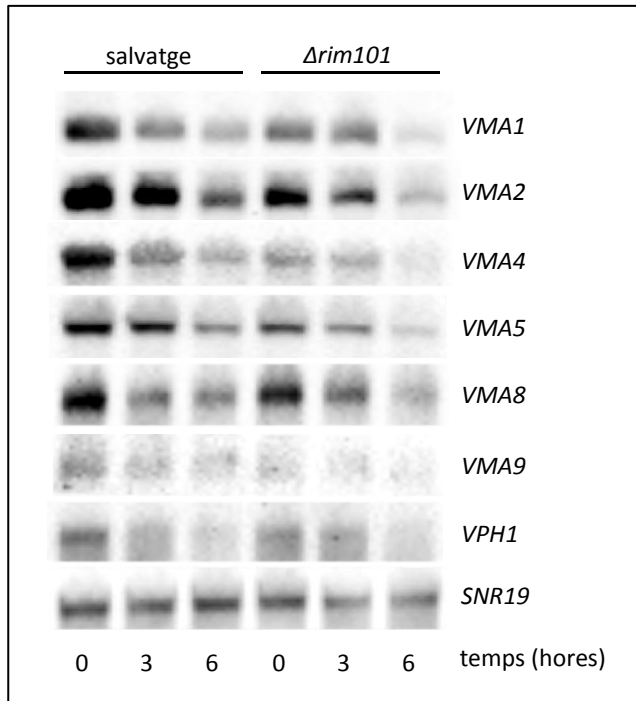
alcalí, tot i que caldria esbrinar si aquests gens es veuen afectats en situacions d'estrès provocades pel selenit.



**Figura 41.** Assaig de sensibilitat de les soques salvatge (W303-1A), *Δrim101* (MML1740), *Δsmp1* (MML1783), *Δnrg1* (MML1781), *Δsmp1Δrim101* (MML1785) i *Δnrg1Δrim101* (MML1787) front selenit sòdic. Les cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD líquid es van plaquejar sobre el mateix medi sòlid amb selenit sòdic a les concentracions indicades. Les plaques es van incubar a 30°C durant 48 hores.

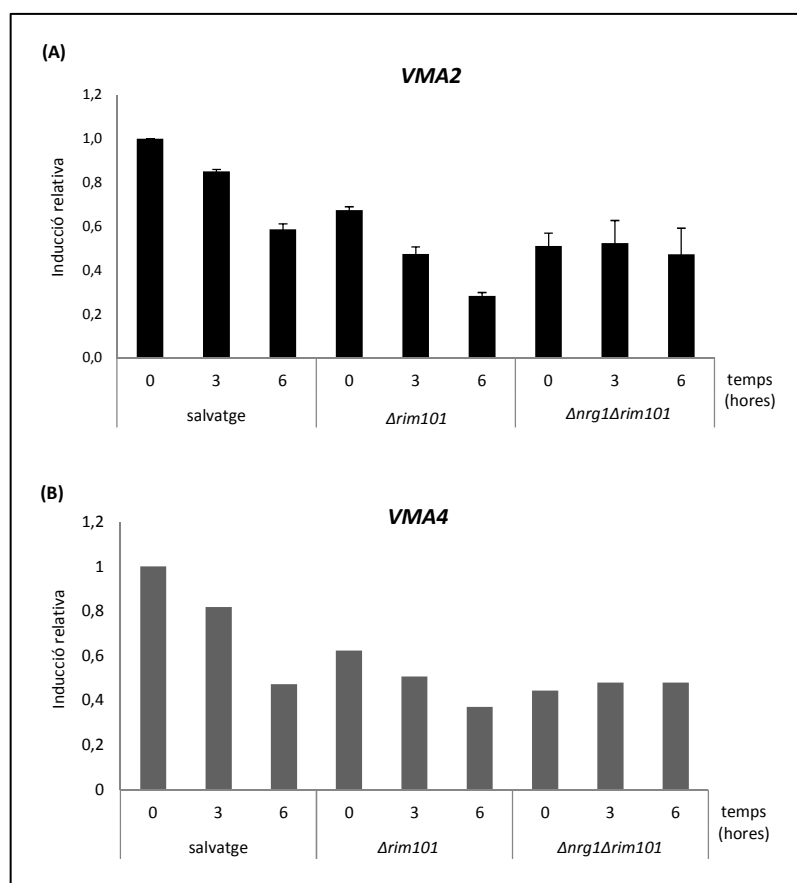
Entre els gens regulats per Rim101 en la resposta transcripcional a pH alcalí (Lamb et al., 2001; Serrano et al., 2002), a més d'*ENA1* se n'han trobat d'altres relacionats amb bombes de ions com *VMA4*. Aquest últim codifica per una subunitat de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> de la vacuola que és necessària pel creixement de les cèl·lules de llevat en condicions de pH alcalí, a més d'altres processos biològics (Van Zeebroeck et al., 2011). Al dependre l'expressió de *VMA4* de Rim101 en condicions d'estrès alcalí, es va voler determinar si l'expressió transcripcional de diverses subunitats de la bomba també estaven afectades quan les cèl·lules eren tractades amb selenit, i si aquest efecte podia dependre de Rim101. Per aquest anàlisi es van escollir aquells gens de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> mutants dels quals determinen un fenotip d'hipersensibilitat a selenit a partir d'un estudi recent de Mániková et al. (2012).

L'anàlisi per Northern blot mostra com l'expressió dels gens d'algunes subunitats de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar disminueix durant el tractament de la soca salvatge amb selenit. A més, aquest fenotip s'exacerba en absència de Rim101, efecte especialment rellevant en el cas de *VMA2* i *VMA4* (**Figura 42**). L'afectació transcripcional de les subunitats vacuolars per part del selenit podria contribuir a la toxicitat de l'agent considerant que la detoxificació d'aquest té lloc a la vacuola, i que el seu segrest a aquest orgànuł està relacionat amb l'activitat de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> (Brozmanová et al., 2010). L'efecte seria més acusat en absència de Rim101 com a controlador positiu de l'expressió de gens d'alguna de les subunitats.



**Figura 42.** Efecte del selenit en l'expressió de gens de les subunitats de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar. Es va analitzar per Northern blot l'expressió dels gens esmentats durant el tractament amb selenit sòdic 3 mM als temps indicats en les soques salvatge (W303-1A) i Δrim101 (MML1740). Les mostres es van recollir de cultius exponencials en medi YPD suplementat amb selenit. Es van analitzar 25 μg de RNA total per carril. Es va utilitzar l'expressió del gen SNR19 com a control de càrrega.

Considerant els dos resultats anteriors, en primer lloc el fenotip salvatge d'hipersensibilitat al selenit del doble mutant *nrg1 rim101* (**Figura 41**) i, en segon lloc, la disminució de l'expressió de diversos gens de les subunitats de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar quan les cèl·lules es tracten amb l'agent (**Figura 42**), de forma més intensa en absència de Rim101, es van analitzar els nivells d'expressió de dos gens de l'anomenada ATPasa, *VMA2* i *VMA4*, en la soca Δ*nrg1Δrim101*. A part d'aquesta soca, també es van quantificar els nivells d'expressió d'ambdós gens en les soques salvatge i mutant *rim101* durant les sis hores de tractament amb selenit. Es van escollir aquests dos gens perquè són dos dels que mostraven una diferència més clara entre la soca salvatge i la mutant *rim101* quan ambdues es sotmetien a un tractament amb selenit (**Figura 42**). Els resultats de la **Figura 43** confirmen que els nivells d'expressió tan del gen *VMA2* com de *VMA4* són inferiors en el mutant *rim101* en cèl·lules no tractades, i que disminueixen durant el tractament amb selenit en les soques salvatge i Δ*rim101*. Addicionalment, s'observa com els nivells d'expressió d'ambdós gens es mantenen en el doble mutant *nrg1 rim101* quan aquesta soca és tractada amb l'agent, de manera que a temps llargs de tractament els nivells d'expressió en el doble mutant es mantenen similars als de la soca salvatge (**Figura 43**).



**Figura 43.** Quantificació dels nivells relatius d'expressió de dos gens de la bomba ATPasa V-H<sup>+</sup> sota un tractament amb selenit. **(A)** L'expressió del gen *VMA2* es va determinar a partir de mostres recollides de cèl·lules salvatge (W303-1A),  $\Delta rim101$  (MML1740) i  $\Delta nrg1\Delta rim101$  (MML1787) creixent exponencialment en medi YPD líquid i tractades amb selenit sòdic 3 mM als temps indicats. Es pren el valor de la soca salvatge a temps 0 com a unitat per relativitzar la resta. Les barres mostren la mitjana de tres experiments independents amb la desviació estàndard. **(B)** Com en **(A)**, però amb el gen *VMA4* en un únic experiment.

Així doncs, es pot concloure que la soca  $\Delta nrg1\Delta rim101$  pot mantenir la transcripció dels gens *VMA2* i *VMA4* a nivells semblants a la soca salvatge durant un tractament amb selenit a temps llargs, el qual significaria que no existeix una desregulació en l'expressió de les subunitats de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar provocada per l'agent i per tant aquest podria continuar sent detoxificat a la vacuola. Això es pot correlacionar amb el fenotip de sensibilitat del mutant *nrg1 rim101* similar al de cèl·lules salvatges (**Figura 41**). En tot cas, els resultats d'aquest treball confirmen que l'expressió de *VMA2* i *VMA4* és regulada per Rim101/Nrg1 tan en condicions constitutives com al llarg del tractament amb selenit, encara que la participació de Nrg1 seria diferent en unes condicions o altres.



## **V. DISCUSSIÓ**



## DISCUSSIÓ

El Se és considerat un element traça essencial per mamífers que intervé en diversos processos cel·lulars. A concentracions baixes, aquest agent té propietats anticancerígenes (Letavayová et al., 2006). El fet que el Se sigui un oligoelement essencial en la dieta per mamífers es deu a que forma part d'un grup de proteïnes anomenades selenoenzims, tals com les TR i GPX (Lu i Holmgren, 2009), les quals participen en la defensa front l'estrès oxidatiu cel·lular. D'altra banda, a dosis elevades el Se esdevé un compost tòxic per la seva capacitat de generació de ROS i de dany en el DNA (Brozmanová et al., 2010; Letavayová et al., 2006; Spallholz, 1997). En aquest estudi, *S. cerevisiae* representa un model adequat per estudiar la toxicitat provocada pel Se ja que aquest microorganisme manca de selenoproteïnes, de manera que el Se no és incorporat a les proteïnes en forma de selenocisteïna i permet la separació dels efectes metabòlics o avantatjosos dels efectes funcionals o nocius.

Dins les cèl·lules de *S. cerevisiae*, el Se a altes concentracions és un compost mutagènic, tòxic i cancerigen (Letavayová et al., 2008; Letavayová et al., 2006), de manera que té com a efecte directe la inducció d'estrès oxidatiu i consegüentment de generació de ROS, les quals poden produir dany al DNA. L'espècie química principalment responsable de la toxicitat del Se és el  $H_2Se$ , el qual promou un canvi en el rati entre el GSH i el GSSG, encara que a la natura la forma química del Se més abundant és el selenit, que dins de la cèl·lula pot ser convertit a  $H_2Se$ . Les ROS generades com a conseqüència de la reacció entre el  $H_2Se$  i l'oxigen molecular dins de la cèl·lula (Seko i Imura, 1997) també promouen l'oxidació del GSH. Així doncs, el Se es podria definir com un agent responsable d'alteracions en l'homeòstasi del GSH, ja que causa l'oxidació del compost reduït de forma indirecta. A part d'aquest efecte nociu, el selenit (o derivats) provoca la ruptura de la doble cadena de DNA i l'aturada del cicle cel·lular (Letavayová et al., 2008; Pinson et al., 2000). El trencament de la doble cadena és provocat pel  $H_2Se$  a través d'un mecanisme que depèn de la presència d' $O_2$  (Peyroche et al., 2012).

Aquest treball tenia l'objectiu d'estudiar la senyalització de l'estrès per Se i els mecanismes protectors diversos que tenen les cèl·lules de *S. cerevisiae* front els efectes perjudicials descrits del Se. Fins al moment s'havia identificat el sistema de detoxificació de *S. cerevisiae* front l'agent, però no les vies de senyalització implicades ni els blancs d'aquestes vies. El selenit s'elimina de les cèl·lules a través del seu transport cap a la vacuola com a conjugat del GSH per



la bomba vacuolar Ycf1, la qual també intervé en la detoxificació d'altres metalls (Pinson et al., 2000). A més, un cop dins de la cèl·lula, el selenit és reduït a  $Se^0$ , el qual és menys tòxic. De fet, probablement siguin els derivats del selenit els que són transportats cap a la vacuola, i aquest segrest depèn de la reducció enzimàtica de l'agent a  $Se^0$  al citoplasma, procés relacionat amb l'activitat de l'ATPasa  $V-H^+$  (Brozmanová et al., 2010).

Així doncs, en aquest estudi s'han caracteritzat quatre proteïnes relacionades amb la senyalització de l'estrès i la protecció de les cèl·lules front la toxicitat provocada pel selenit. No totes quatre tenen la mateixa rellevància en quant al seu rol protector front aquesta situació d'estrès, ja que soques mutants en aquestes manifesten graus diferents de sensibilitat a l'agent. Les quatre proteïnes estan dividides en dos categories funcionals: tres d'elles corresponen a factors transcripcionals i una a un transductor de senyals. Les tres primeres són Aft1, Aft2 i Rim101, ja siguin com a activadors o repressors transcripcionals; i la quarta és Snf1, una proteïna quinasa que intervé en situacions d'estrès provocat pel dèficit de glucosa en la cèl·lula. Tots aquests reguladors confereixen protecció a les cèl·lules de *S. cerevisiae* en condicions d'estrès causades pel selenit, ja que els respectius mutants són hipersensibles al mateix. A banda d'aquesta situació, està descrit que participen en la resposta a altres tipus d'estressos mediambientals. Addicionalment, estudis transcriptòmics de cèl·lules de *S. cerevisiae* tractades amb selenit van revelar la inducció de gens del sistema de captació de Fe d'alta afinitat, entre altres gens d'altres categories funcionals (Salin et al., 2008). Per tant, es va proposar un lligam entre el selenit i l'homeòstasi del Fe, ja que l'agent podria estar tenint un efecte directe o indirecte en la regulació del flux intracel·lular d'aquest element o en l'activitat d'enzims dependents de Fe. Aquest treball ha demostrat una diversitat de situacions relacionades amb el lligam entre l'homeòstasi del Fe i la protecció front la toxicitat per selenit. De fet, en la majoria dels casos els nivells intracel·lulars de Fe no semblen jugar cap paper rellevant en la protecció per part dels components descrits anteriorment. Així, en el cas de Snf1, Aft2 i Rim101, el seu paper protector front el selenit és independent a aquests nivells de Fe, ja que l'addició de Fe a la cèl·lula no reverteix el fenotip d'hipersensibilitat de les soques mancades dels factors reguladors. En canvi, el paper funcional d'Aft1 sí està relacionat amb l'homeòstasi del Fe en condicions d'estrès per selenit, ja que la sensibilitat de la soca mutant *aft1* es recupera en incrementar els nivells de Fe intracel·lular. Tot i així, s'han descrit altres funcions d'Aft1 no relacionades amb l'homeòstasi del Fe (Berthelet et al., 2010). Com s'ha dit, l'objectiu del treball era indagar la cascada de senyals o mecanismes protectors per part dels quatre components front el selenit, i intentar, si es donava el cas, establir un lligam també

entre ells. Per exemple, Aft1 i Aft2 són factors transcripcionals paràlegs en resposta a situacions de dèficit de Fe, tot i que a banda de les funcions solapades d'ambdós factors en la resposta als canvis en l'homeòstasi del Fe en les cèl·lules de llevat, també tenen papers divergents. A més, Aft1 participa en paral·lel amb la via de resposta a pH alcalí regulada per *RIM101* en el control de processos biològics similars, i ambdues vies sí estan connectades amb els nivells de Fe (Berthelet et al., 2010). Prèviament, també s'havia observat com en el canvi diàuxic s'incrementa l'expressió d'alguns gens del reguló Aft1 i aquesta inducció és regulada positivament per la ruta dependent de Snf1, quinasa que es troba activa en aquesta fase del metabolisme (Haurie et al., 2003). Així doncs, en altres situacions també s'havia establert una relació entre Aft1 i Snf1, tot i que es desconeix la relació funcional entre ambdós transductors de senyals. En resum, existien precedents de situacions on sembla haver-hi una relació funcional entre Snf1, Aft1, Aft2 i Rim101, o més aviat entre alguns d'ells.

### **Relació entre la quinasa Snf1 i l'estrès per selenit**

El complex quinasa Snf1 participa en la resposta a l'estrès metabòlic en cèl·lules de llevat, i la seva activitat quinasa és requerida per l'adaptació de les cèl·lules a condicions de dèficit de glucosa i creixement en fonts de carboni alternatives (Hedbacker i Carlson, 2008). Addicionalment a la seva funció relacionada amb el canvi metabòlic cel·lular, Snf1 també juga un paper protector en defensa front diversos estressos mediambientals (veure apartat 3.5.3 de la secció d'Introducció), tot i que aquest rol no sempre requereix de l'activació addicional de Snf1 per sobre dels nivells basals d'activitat (Dubacq et al., 2004; Ohdate et al., 2010). Contràriament, l'estrès oxidatiu provocat per peròxid també causa l'activació de Snf1, però en aquest cas no sembla que la quinasa participi en la protecció front la toxicitat per aquest agent (Dubacq et al., 2004; Hong i Carlson, 2007). En l'estudi present s'ha vist que les cèl·lules de *S. cerevisiae* requereixen l'activitat de Snf1 per defensar-se front el tractament amb selenit. Tot i que la quinasa es fosforila a temps avançats de tractament amb l'agent, comparant-ho amb la fosforilació d'aquesta en condicions d'estrès salí o per dèficit de glucosa, on la modificació post-traducciona es dona de forma molt ràpida (Hong i Carlson, 2007), la seva activitat basal és suficient per protegir les cèl·lules front el selenit. A més, aquest estudi demostra que tot i provocar situacions de tipus nutricional o genètic en les que Snf1 està permanentment fosforilada en el residu Thr210, les cèl·lules no manifesten resistència addicional a l'agent. Donat que els nivells de fosforilació de Snf1 estan regulats principalment per l'activitat de Reg1 (Castermans et al., 2012; Rubenstein et al., 2008), la modificació post-traducciona tardana de

la quinasa observada durant un tractament amb selenit podria ser conseqüència de la inactivació de Reg1 (i de fosfatases del tipus 1 i 2 alternatives) per l'agent. De fet, s'ha descrit la modulació inhibidòria de l'activitat de fosfatases PP1 per part del selenit en cèl·lules humanes (Celik et al., 2007). La hipòtesi que el selenit podria afectar l'activitat de Reg1 i altres fosfatases en cèl·lules de llevat es recolza en diverses observacions. En primer lloc, aquest estudi mostra com el mutant *reg1* és hipersensible a l'agent. D'altra banda, en altres experiments previs relacionats amb aquest treball també es va observar que un mutant en *PPZ1*, un gen que codifica per una fosfatasa homòloga a les fosfatases de tipus 1, tampoc és capaç de créixer en presència de selenit. En cèl·lules de llevat, la fosfatasa Ppz1 juga un paper en la regulació de l'homeòstasi de cations entre altres processos biològics (Ariño et al., 2010).

En aquest treball es demostra que la toxicitat per selenit i el requeriment de Snf1 per protegir les cèl·lules front l'agent no estan relacionats amb fenòmens de despolarització de la membrana plasmàtica i/o situacions de dèficit de glucosa. A més, també s'ha vist com el selenit ha d'entrar a la cèl·lula per dur a terme el seu efecte perjudicial, principalment a través del sistema d'alta afinitat de captació de fosfat, el qual és el regulador més important de l'entrada de selenit en cèl·lules de llevat creixent en medis amb glucosa (Lazard et al., 2010). Un cop dins de la cèl·lula, el selenit no provoca la mobilització de Snf1 cap al nucli, contràriament al que succeeix en condicions de dèficit de glucosa i la conseqüent resposta transcripcional. Per tant, almenys els passos inicials de la resposta regulada per Snf1 front la toxicitat provocada per selenit sembla que ocorrin al citoplasma. Addicionalment, cap dels reguladors transcripcionals caracteritzats que participen en la resposta a l'estrès metabòlic provocat pel dèficit de glucosa (Cat8, Mig1, Sip4 o Adr1) semblen ser rellevants en la protecció front el selenit. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en altres estudis (McCartney i Schmidt, 2001; Ye et al., 2008), en els quals es demostra que l'exposició de les cèl·lules a elevades dosis de sodi desencadena una fosforilació elevada de Snf1 sense la fosforilació subsegüent de Mig1 ni tampoc la inducció dels gens reprimits per glucosa. De fet, la quinasa Snf1 no només regula dianes nuclears, sinó que també modula la funció de proteïnes residents en el citoplasma, tals com Rod1, una arrestina reguladora de fenòmens d'endocitosi de transportadors de fonts de carboni alternatives en presència de glucosa en el medi (Becuwe et al., 2012). En aquest cas, Snf1 fosforila i conseqüentment inactiva Rod1 en medis amb fonts de carboni alternatives. Així doncs, Snf1 tindria una varietat de dianes, i tot i que majoritàriament s'esperaria que fossin dianes nuclears, també actuaria a nivell citosòlic. Els estudis transcriptòmics fets en el curs d'aquest treball tampoc han permès identificar categories

funcionals de gens expressats diferencialment en el mutant *snf1* en comparació a la soca salvatge al llarg del tractament amb l'agent que permetessin explicar l'efecte tòxic del selenit en el mutant, a banda de l'afectació d'alguns gens implicats en el metabolisme de l'arginina. Aquesta observació concordaria amb el paper majoritàriament si no exclusivament citoplasmàtic de Snf1 front el selenit.

D'altra banda, la quinasa Elm1 activadora de Snf1 juga un paper molt important en resposta al tractament amb selenit. A més de tenir funcions redundants amb Sak1 i Tos3 a l'hora d'activar Snf1 en condicions de limitació de glucosa, Elm1 és necessària per la organització de la xarxa de filaments de septina durant la citoquinesi (Bouquin et al., 2000; Sreenivasan i Kellogg, 1999) i coordina el punt de control de posició del fus mitòtic a través de l'activació de Kin4, un altre membre de la família AMPK en el llevat (Caydasi et al., 2010; Moore et al., 2010). Diferents regions de la proteïna podrien participar en la gran diversitat de funcions d'Elm1 (Caydasi et al., 2010; Elbing, et al., 2006b; Moore et al., 2010). En aquest estudi s'ha vist com Elm1 no es deslocalitza de la constricció de la gemma en cèl·lules tractades amb selenit. A més, està descrit que el selenit no provoca alteracions significatives en el cicle cel·lular del llevat o en la morfogènesi cel·lular (Izquierdo et al., 2010; Pinson et al., 2000). El fet que Elm1 es mantingui al septe mitòtic durant el tractament amb selenit suporta la hipòtesi que les molècules d'Elm1 residents allí no participen en la resposta front la toxicitat provocada pel selenit, i a més defensa l'existència de funcions addicionals alternatives d'aquesta quinasa en el citoplasma. En qualsevol cas, els resultats obtinguts demostren que Elm1 juga un paper en la defensa front el selenit que és independent del rol de Snf1, similarment al que es dona en la participació d'ambdues quinases en una situació d'estrès salí (Ye et al., 2008). Tot i així, l'activació de Snf1 provocada per Elm1 durant el tractament amb selenit no deixa de ser singular ja que en condicions de dèficit de glucosa, i altres estressos mediambientals, és la quinasa Sak1 la que té el paper principal en l'activació de Snf1 (Hedbacker et al., 2004a; Hong et al., 2003; Kim et al., 2005; McCartney et al., 2005).

La relació entre la cascada de senyals desencadenades pel selenit i l'activitat de la quinasa Snf1 s'estableix a partir de la via reductiva del selenit que té lloc tan a dins com a fora de la cèl·lula (**Figura 1**). El selenit provoca la reducció del GSH i l'increment del GSSG en les cèl·lules de llevat (Lazard et al., 2011; Tarze et al., 2007). Aquesta davallada del rati GSH/GSSG s'exacerba en absència de Snf1 a les quatre hores de tractament amb selenit. De fet, les diferències entre cèl·lules salvatges i mutants *snf1* es deuen principalment a l'augment relatiu del GSSG del

mutant més que a les dissemblances en els nivells de GSH entre ambdues soques. Està descrit que la sobreexpressió del gen *GLR1* (glutatió reductasa) protegeix les cèl·lules del llevat front els efectes tòxics del selenit (Pinson et al., 2000). Seguint aquesta línia, la sobreexpressió de *GLR1* en cèl·lules  $\Delta snf1$  permet el creixement del mutant en presència del selenit a nivells similars que en la soca salvatge. Aquest resultat justifica els canvis (comparat amb la soca salvatge) en el potencial redox del parell GSH/GSSG com la causa primària de la hipersensibilitat del mutant *snf1* al selenit. Tanmateix, el mutant es mostra també hipersensible a agents com el DEM o la diamida, els quals fan incrementar els nivells de GSSG relatiu al GSH. A més, la sobreexpressió de *GLR1* també permet el creixement de cèl·lules  $\Delta snf1$  al mateix nivell que cèl·lules salvatges en presència de DEM. Per tant, la relació entre la toxicitat pel selenit i la protecció cel·lular regulada per Snf1 reflecteix un rol general addicional de la quinasa en la detecció i en la resposta als canvis redox intracel·lulars que tenen lloc a causa d'un increment dels nivells de GSSG. Igual que en el cas del selenit, tan la diamida com el DEM provoquen una fosforilació tardana de Snf1, el qual indica que la possible alteració dels mecanismes moduladors de la fosforilació de Snf1 no és específica del selenit, i permet l'extensió a un rang ampli d'agents que estarien comprometent l'homeòstasi redox intracel·lular.

El paper senyalitzador d'Elm1/Snf1 en la inducció de la resposta protectora a l'augment del rati GSSG/GSH no sembla estar relacionat amb cap de les funcions fins ara conegudes d'ambdues quinases, i a més no involucra tampoc a cap de les dianes nuclears de Snf1 descrites. Altres estudis van caracteritzar funcions alternatives de Snf1 no relacionades amb el seu paper com a regulador metabòlic. Així doncs, anàlisis de l'interactoma de Snf1 en cèl·lules de llevat emprant microordenaments de proteïnes van revelar dianes comuns entre Snf1 i la quinasa Akl1 involucrada en funcions del citoesquelet (Fasolo et al., 2011). Un altre treball que emprava un sistema integratiu de dades metabòliques, proteòmiques i transcriptòmiques va revelar que Snf1, a part de les altres funcions addicionals relacionades amb processos metabòlics, podia actuar com a regulador de l'homeòstasi redox a través de l'activitat de Yap1, un factor de transcripció que intervé en la resposta a estrès oxidatiu (Usaitte et al., 2009). En línies cel·lulars humanes, el  $H_2O_2$  activa l'AMPK com a part del mecanisme protector regulat per mTORC1 (Alexander et al., 2010). En un altre estudi amb cèl·lules humanes cancerígenes provinents del colon, el selenat provoca una activació tardana de l'AMPK a través de la formació de ROS, i aquest procés és essencial per tal d'aturar la proliferació cel·lular mitjançant la inhibició de la via regulada per COX-2 (Hwang et al., 2006). Un altre estudi amb

línies cel·lulars humanes van demostrar també l'activació de l'AMPK per canvis redox en les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  induïts pel  $H_2O_2$  (Zmijewski et al., 2010). Amb tots aquests exemples, aquest treball suggereix que el canvi del parell redox GSH/GSSG cap a un ambient més oxidant indueix d'alguna manera una via regulada per Snf1 que resulta en la protecció de les cèl·lules de llevat front aquestes condicions oxidants, com per exemple rescatant la funció d'algunes molècules redox sensibles que són essencials per la proliferació cel·lular. Alternativament, una altra hipòtesi que podria explicar els fets que tenen lloc en condicions d'estrès per selenit seria que Snf1 podria estar activant funcions cel·lulars que cooperarien amb el sistema reductor de GSH en el manteniment de l'homeòstasi redox del mateix en presència de selenit i altres agents oxidants. En base a aquestes observacions, la participació de l'activitat AMPK en la regulació de l'homeòstasi redox cel·lular podria ser una propietat general de cèl·lules eucariotes. Tot i així, faltaria determinar i caracteritzar els efectors que participen a la part final de la cascada de senyals Snf1/AMPK amb una funció important en la resposta a canvis en el rati GSH/GSSG d'una banda, i de l'altra quin seria el mecanisme pel qual el complex quinasa detectaria aquests canvis redox.

### **El factor transcripcional Aft1, els nivells intracel·lulars de ferro i el selenit**

El reguló Aft1 pot ser activat per diferents estressos mediambientals a més de per condicions de dèficit de Fe. En *S. cerevisiae*, aquest reguló s'indueix quan es tracten les cèl·lules amb altes concentracions de zinc (Pagani et al., 2007), amb HU (Dubacq et al., 2006) i amb cisplatina (Kimura et al., 2007), o també quan es sotmeten a un estrès provocat pel cobalt (Stadler i Schweyen, 2002), entre altres. En el darrer cas, estudis recents han demostrat que la resistència de les cèl·lules al cobalt no depèn en la seva totalitat de l'activació del sistema de captació de Fe d'alta afinitat regulat per Aft1, sinó que altres mecanismes podrien estar implicats en aquesta funció protectora, com la relocalització intracel·lular del Fe en compartiments determinats (Alkim et al., 2013). En general, els mecanismes moleculars involucrats en la resposta a aquests estressos no han estat caracteritzats. Estudis transcriptòmics en cèl·lules de llevat tractades amb selenit han revelat la inducció de gens relacionats amb diverses categories funcionals, entre ells aquells que participen en la resposta a la manca de Fe així com en el manteniment de l'homeòstasi intracel·lular d'aquest metall (Salin et al., 2008).

En aquest treball es va corroborar la inducció del reguló Aft1 en cèl·lules de *S. cerevisiae* tractades amb selenit. Tot i així, mentre en l'anàlisi transcriptòmic descrit (Salin et al., 2008) només es caracteritzaven els gens induïts fins als 80 minuts de tractament amb selenit, en l'estudi present (que implicava tan estudis transcriptòmics globals com l'estudi de gens específics mitjançant anàlisis per Northern blot) es va allargar l'anàlisi fins a les nou hores de tractament per poder veure si la inducció d'aquests gens era sostinguda o no, i a més es va incrementar fins a sis cops la concentració de selenit emprada (6 mM), concentració a la qual les cèl·lules salvatges tenien només en part afectat el creixement. En primer lloc, es va observar com la inducció dels gens del reguló Aft1 analitzats era sostinguda al llarg del tractament amb selenit en una soca salvatge. Tot i així, el perfil d'inducció del reguló Aft1 era diferent en funció del gen durant l'estrès provocat per l'agent. Mentre que els gens *FIT3*, *CTH2* i *ARN2* s'indueixen de forma significativa per sobre dels nivells basals, *FET3* ho fa de manera transitòria i moderada, i *FTR1* no varia els seus nivells de mRNA als llarg de tot el tractament. No només existeixen discrepàncies en la intensitat i durada de la inducció del reguló Aft1, sinó que també n'hi ha en relació amb la dependència dels factors transcripcionals Aft1 i Aft2. Així doncs, l'expressió incrementada de *FET3* i *ARN2* depèn d'Aft1 però no d'Aft2, mentre que la de *FIT3* i *CTH2* no depèn de cap d'ambdós factors. Aquesta situació és interessant per dos motius. En primer lloc és poc comú que la inducció transcripcional d'alguns gens del sistema de captació de Fe no depengui del factor Aft1, ja que això significa que existeix algun altre regulador de l'expressió dels gens d'aquest sistema i que no és el seu paràleg Aft2. D'altra banda, el patró d'inducció de l'expressió del reguló Aft1 causat pel selenit és específic de l'agent, ja que aquest treball demostra com en altres situacions d'estrès, com per exemple en condicions d'alteració de l'homeòstasi del GSH, el reguló Aft1 segueix el mateix patró d'inducció que aquell descrit en situacions de dèficit de Fe o en altres situacions d'estrès (Castells-Roca et al., 2011), on tots els gens del reguló analitzats depenen del factor transcripcional Aft1 però no d'Aft2.

Els efectes transcripcionals d'Aft1 no es limiten a la regulació de l'homeòstasi del Fe. Estudis basats en anàlisis genètics sintètics revelen funcions divergents entre ambdós factors de transcripció Aft1 i Aft2 i no relacionades amb els nivells de Fe intracel·lulars (Berthelet et al., 2010). Tot i així, algunes hipersensibilitats del mutant *aft1* a substàncies químiques com la HU (Dubacq et al., 2006), el SDS, la cafeïna o el MMS, entre altres, es poden reprimir afegint Fe exogen (Berthelet et al., 2010). Per contra, el mutant *aft1* és sensible al NaCl o al calcofluor white, i aquest fenotip no es reverteix afegint Fe extra a la cèl·lula. Per tant, Aft1 té un paper

protector front aquests compostos que és independent del Fe (Berthelet et al., 2010). En condicions d'estrès per selenit, el rol que juga Aft1 en relació amb l'agent sí depèn dels nivells de Fe intracel·lulars. Tot i així, els mecanismes moleculars que podrien relacionar el selenit amb aquests nivells del metall romanen desconeguts. En aquest estudi s'ha vist com els nivells de Fe intracel·lular no disminueixen al llarg d'un tractament amb selenit en una soca salvatge, mentre que en el mutant *aft1*, que ja parteix d'uns nivells basals inferiors als de la soca salvatge (Blaiseau et al., 2001), hi ha una caiguda addicional dels nivells. D'altra banda, el selenit podria estar afectant a l'homeòstasi del Fe de dues maneres. En primer lloc, l'agent podria interaccionar amb el Fe en el medi de cultiu (Su i Suarez, 2000) fent que aquest metall no fos accessible per la cèl·lula. Una segona hipòtesi seria que el selenit podria reemplaçar el sofre dels centres ferro-sofre de les proteïnes (Rutherford et al., 2005). Addicionalment, la inducció del reguló Aft1 es dona en mutants defectius en la biogènesi mitocondrial dels centres ferro-sofre (Bellí et al., 2004; Hausmann et al., 2008). D'aquesta manera, podria estar succeint que el selenit provoqués una disrupció dels centres ferro-sofre o estigués inhibint algun pas de la seva ruta biosintètica. Aquest estudi no va poder confirmar aquesta hipòtesi ja que es va veure com el selenit no interferia sobre els centres ferro-sofre de les proteïnes analitzades, ja fossin residents del mitocondri o del citoplasma. Així doncs, tot i que no es pot descartar l'alteració dels centres ferro-sofre d'altres proteïnes per part del selenit, com per exemple aquelles que es trobin a la membrana mitocondrial, no sembla que l'efecte tòxic de l'agent es pugui explicar en base a l'alteració directa dels centres ferro-sofre. No obstant, el descens en els nivells intracel·lulars de Fe en presència de selenit en el mutant *aft1* podria explicar la hipersensibilitat d'aquest a l'agent i el rescat del fenotip per addició de Fe al medi de cultiu. En aquesta línia, el selenit podria interferir negativament amb l'entrada de Fe a la cèl·lula, una situació que seria particularment delicada quan falta el factor transcripcional Aft1.

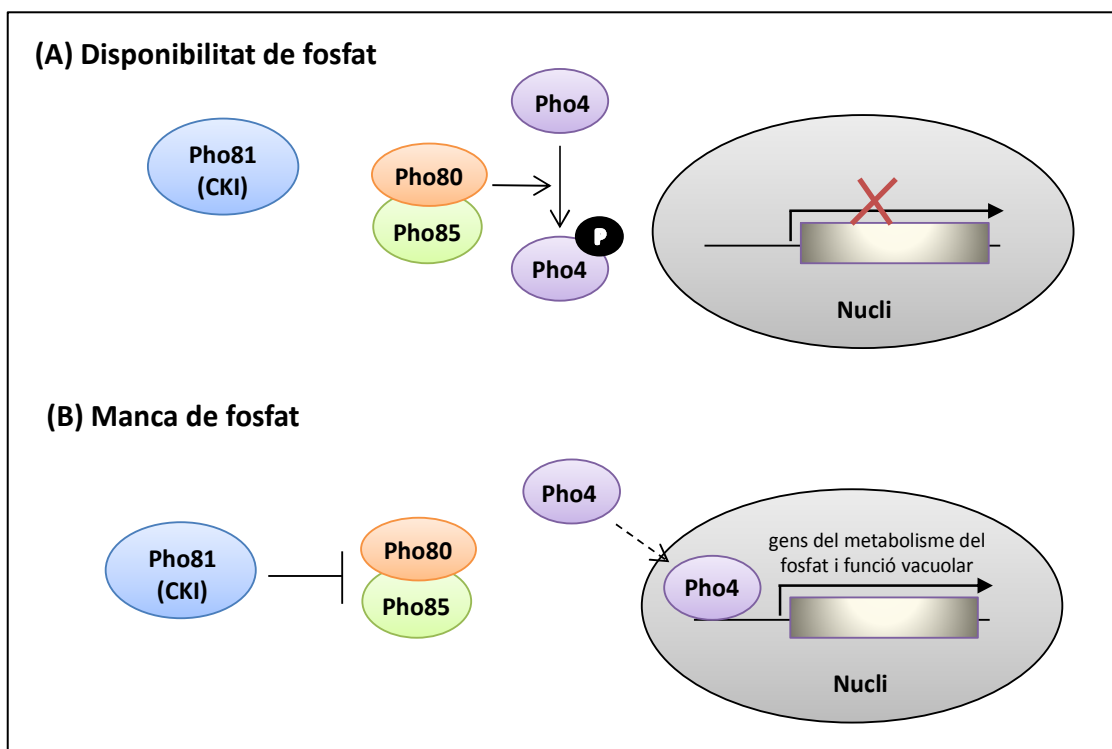
### **El rol protector del factor transcripcional Aft2 front el selenit**

Fins ara, s'havia atribuït a Aft2 un paper secundari en la regulació de l'homeòstasi del Fe, el qual ha estat emmascarat per la funció principal d'Aft1 en aquest procés. Tot i així, estudis amb una col·lecció de mutants nuls de *S. cerevisiae* van mostrar que Aft1 i Aft2 participen en altres funcions addicionals al seu paper relacionat amb l'homeòstasi del Fe (Berthelet et al., 2010). En l'estudi present s'ha caracteritzat un nou rol d'Aft2 en la protecció front la toxicitat provocada per selenit. També s'ha determinat que aquesta funció protectora d'Aft2 és independent del seu paràleg Aft1 i no depèn de l'addició de Fe al medi. Així mateix, el mutant



*aft2* presenta un contingut relatiu de Fe intracel·lular més o menys constant al llarg del tractament amb selenit, en contrast al mutant *aft1*. Això defineix una nova situació en la qual Aft2 presenta un rol divergent a la seva funció més coneguda. Altres estudis també van descriure funcions d'Aft2 no relacionades directament amb els nivells de Fe, com la de regulador principal de l'expressió de *GEX1*, un transportador involucrat en el transport de metalls que també actua com a intercanviador de GSH (Dhaoui et al., 2011). No obstant, la manca de *GEX1* i/o del seu paràleg *GEX2* no condueix al mateix fenotip que la manca d'*AFT2* en relació amb el selenit, el qual descarta que la hipersensibilitat del mutant *aft2* sigui directament deguda a defectes en la transcripció dels gens *GEX*. En qualsevol cas, els estudis de Dhaoui et al. (2011) apunten una relació entre Aft2 i el GSH.

Un cop descartada la relació entre la sensibilitat del mutant *aft2* al selenit i els seus efectors coneguts, es va fer una cerca de gens candidats que en condicions de sobreexpressió poguessin rescatar el fenotip d'hipersensibilitat del mutant *aft2* front l'agent. D'aquesta manera es podria estar indagant nous gens diana d'Aft2, a banda d'intentar caracteritzar el mecanisme protector d'Aft2 front el selenit. Entre els diversos candidats analitzats, es van trobar quatre gens responsables del rescat de la sensibilitat en cèl·lules mutants *aft2* però que també milloraven el creixement de cèl·lules salvatges en presència de l'agent. Així doncs, no es van poder identificar nous gens diana específics d'Aft2 tot i que els resultats podien ajudar a comprendre els mecanismes d'acció i de defensa front el selenit. En primer lloc, es van identificar dos gens relacionats amb el sistema de captació i transport de fosfat. D'una banda, Pho81 és un CKI que regula l'activació de determinats complexos (com Pho80-Pho85) en resposta als nivells de fosfat. D'altra banda, Pho4 és un factor de transcripció que actua en resposta a condicions de limitació de fosfat. Més concretament, Pho4 és un factor transcripcional regulat positivament i de forma indirecta per Pho81, ja que en condicions d'abundància de fosfat, el complex ciclina quinasa Pho80-Pho85 es troba actiu fosforilant i inactivant Pho4, de manera que aquest roman al citoplasma i no s'activa la transcripció de gens involucrats en el metabolisme del fosfat i en la funció de la vacuola (Kaffman et al., 1994; Komeili i O'Shea, 2000; O'Neill et al., 1996). En canvi, quan el fosfat inorgànic és escàs a la cèl·lula de llevat, Pho81 s'uneix i inhibeix el complex Pho80-Pho85, de manera que Pho4 en la seva forma desfosforilada es transloca al nucli i activa la transcripció gènica (Komeili i O'Shea, 2000) (**Figura 44**).



**Figura 44.** (A) Regulació de l'activitat de Pho4 en condicions d'abundància de fosfat. (B) Activació de Pho4 en condicions de manca de fosfat [adaptat de (Huang et al., 2007)]. Veure el text pels detalls.

Altres autors havien demostrat que el transportador de fosfat d'alta afinitat Pho84 incorpora el selenit en cèl·lules de *S. cerevisiae* (Lazard et al., 2010), essent aquest el sistema principal d'entrada de l'agent. L'entrada del selenit depèn de la concentració de fosfat al medi, és a dir, a baixes concentracions de fosfat l'agent entra a la cèl·lula pel sistema de transport d'alta afinitat, principalment per Pho84. Quan hi ha concentracions altes de fosfat al medi, el selenit és internalitzat mitjançant el mecanisme de transport de baixa afinitat (Lazard et al., 2010). Aquest treball també ha demostrat que la inducció d'un altre transportador d'alta afinitat, Pho89, depèn de la quinasa Snf1 durant el tractament amb selenit en medis amb concentracions de fosfat baixes. Amb tots aquests resultats es justifica l'aïllament de dos clons de la genoteca que codifiquen per dos components que formen part del sistema de transport del fosfat. Una hipòtesi podria ser que la sobreexpressió de gens relacionats amb el mecanisme de captació de fosfat (com són Pho4 directament i Pho81 indirectament) faria incrementar el número de transportadors d'alta afinitat, i donat que aquests tenen molta més afinitat pel fosfat que pel selenit (Lazard et al., 2011), hi hauria una inhibició competitiva de l'entrada de selenit. Addicionalment, Pho4 regula la transcripció de gens relacionats amb funcions vacuolars, i donat que aquest orgànel forma part del sistema de detoxificació del

selenit (Brozmanová et al., 2010), l'increment de l'expressió d'aquests gens permetria una major eliminació de l'agent i per tant les cèl·lules de llevat serien més resistents.

L'altre clon aïllat com a supressor de la sensibilitat del mutant *aft2* al selenit porta els gens *SSU1* i *GLR1*. Aquests gens ja havien estat descrits prèviament en funcions relacionades amb l'estrès causat pel selenit (Pinson et al., 2000). *SSU1* codifica per una bomba de detoxificació de sulfid de la membrana plasmàtica, i podria facilitar la sortida del selenit de les cèl·lules de llevat disminuint així la seva concentració intracel·lular (Pinson et al., 2000). D'altra banda, la sobreexpressió de *GLR1*, a l'incrementar els nivells de GSH, podria promoure a la reducció del selenit a seleni elemental, el qual és menys tòxic. En tot cas, és remarcable que la sobreexpressió d'aquests dos gens, la qual té efectes additius en cèl·lules salvatges (Pinson et al., 2000), sigui molt més efectiva sobre cèl·lules  $\Delta aft2$  que sobre cèl·lules salvatges pel que fa al creixement en presència de selenit. En treballs futurs caldrà discriminar entre els efectes de la sobreexpressió de *SSU1* d'una banda i la de *GLR1* de l'altra en el cas del mutant *aft2*. En un principi, els resultats apunten a una relació entre Aft2 i el GSH, en la línia dels estudis abans esmentats relatius al gen *GEX1*.

En resum, la causa de la hipersensibilitat exacerbada de la soca  $\Delta aft2$  al selenit continua sent desconeguda, encara que diverses dades apunten també a una relació amb el GSH. Si aquesta relació implica junts a Snf1 i Aft2 roman per ser estudiat.

### **El rol protector del factor transcripcional Rim101 front el selenit**

En aquest estudi es demostra també que Rim101 està involucrat en el mecanisme de resposta cel·lular front la toxicitat provocada pel selenit. Aquesta proteïna participa en la resposta a estrès causat per pH alcalí (Hayashi et al., 2005; Serrano et al., 2002) i en processos com l'esperulació (Li i Mitchell, 1997), entre d'altres. En la resposta a situacions d'estrès per pH alcalí, Rim101 té un paper activador d'alguns gens del reguló Aft1 (Lamb et al., 2001; Serrano et al., 2002) i també reprimeix altres gens del sistema de captació de Fe (Barwell et al., 2005). Addicionalment, existeixen interaccions genètiques entre Aft1 i Rim101, de manera que Aft1 actua de forma paral·lela amb la via de resposta a pH alcalí dependent de Rim101 en la regulació d'altres processos cel·lulars (Berthelet et al., 2010). Estudis recents revelen com el fong patògen *Cryptococcus neoformans* s'enfronta a les condicions de limitació de Fe creades pel seu hoste vertebrat a través de factors que regulen la captació del metall, entre els quals es

troba Rim101 (Kronstad et al., 2013). El treball present demostra que la funció protectora de Rim101 front el selenit no està relacionada amb Aft1, ni tampoc promou la inhibició de l'expressió del reguló en la seva absència.

Entre les funcions descrites de Rim101 es troba la repressió gènica a través de la unió a promotors (Peñalva et al., 2008) i/o indirectament l'activació mitjançant la repressió de gens que actuen de forma negativa, és a dir, gens repressors com *SMP1* o *NRG1* (Lamb i Mitchell, 2003). Aquest últim rol és el que Rim101 confereix en resposta a l'estrès per pH alcalí, és a dir, la inhibició de l'expressió del repressor Nrg1 permet el creixement de les cèl·lules de llevat en condicions alcalines. Altres estudis suporten la idea que el complex endosomal requerit pel transport ordenat de proteïnes cap a la vacuola o cap al lisosoma (ESCRT) regula l'expressió del gen *PMR1*, el qual codifica per una bomba de calci de l'aparell de Golgi, a través de la cascada de senyals Rim101/Nrg1 en cèl·lules de llevat (Zhao et al., 2013). En l'estudi present es mostra un altre exemple de participació de la via reguladora Rim101/Nrg1. En cèl·lules tractades amb selenit, s'activa com a resposta una cascada de senyals que ve regulada també per la via Rim101/Nrg1, ja que la repressió del gen *NRG1* per Rim101 permetria el creixement al llarg del tractament amb l'agent (**Figura 41**). De la mateixa manera, l'altre repressor l'expressió del qual és inactivada en condicions d'estrès per pH alcalí per Rim101 com és Smp1 no sembla estar relacionat amb la resposta front a la toxicitat per selenit.

Dins de la resposta transcripcional a estrès per pH alcalí dependent de Rim101 (Lamb et al., 2001; Serrano et al., 2002), s'havien identificat gens relacionats amb bombes de ions, com *ENA1* o *VMA4*, aquest últim codificant d'una subunitat de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> de la vacuola. Aquesta bomba de protons és la responsable del procés d'acidificació de la vacuola, de la regulació del pH del citoplasma i a més juga un paper important en la defensa front a estrès oxidatiu provocat per agents com el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la menadiona o la diamida (Kane, 2007; Li i Kane, 2009). El selenit, com exemple d'un altre agent oxidant, també està relacionat amb les funcions de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar. Està descrit que els compostos derivats del selenit, tals com el Se<sup>0</sup>, són transportats cap a la vacuola com a conjugats del glutatió per la proteïna Ycf1, una bomba vacuolar que també està involucrada en la detoxificació del cadmi i altres metalls (Pinson et al., 2000). El segrest del selenit a la vacuola depèn de la reducció enzimàtica d'aquest agent a Se<sup>0</sup> en el citoplasma, la qual està relacionada amb l'activitat de l'ATPasa V-H<sup>+</sup>. Addicionalment, estudis transcriptòmics i genètics globals van revelar que mutants en diverses subunitats de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar mostren hipersensibilitat en el creixement en presència de selenit

(Mániková et al., 2012). Altres treballs també mostren com mutants defectius en les subunitats de la mateixa bomba vacuolar són hipersensibles a la toxicitat provocada pel plom (Sousa et al., 2013). Amb aquests antecedents, el present estudi va intentar relacionar la toxicitat del selenit amb la funció de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar i la via de senyalització regulada per Rim101/Nrg1. Es va observar una disminució, exacerbada en alguns casos en absència de Rim101, de l'expressió d'alguns gens codificants per algunes de les subunitats de la bomba vacuolar en cèl·lules tractades amb selenit, en especial de *VMA2* i *VMA4*, el qual conduiria a la pèrdua de funció de la bomba i a la incapacitat de detoxificar el selenit en absència de Rim101. Aquesta caiguda de l'expressió dels dos gens en cèl·lules tractades amb selenit no es produeix quan, a més de Rim101, també manca Nrg1. El manteniment funcional de la bomba en absència d'ambdós factors permetria el creixement del doble mutant en presència de selenit mostrat en la **Figura 41**. Aquestes observacions suggereixen que en absència de Rim101, el factor Nrg1 estaria reprimint algun gen encarregat de contrarestar els efectes tòxics del selenit relacionats amb la desregulació de les subunitats de l'ATPasa V-H<sup>+</sup>, i per això la soca mutant *rim101* també és hipersensible a la toxicitat provocada per l'agent. De fet, en *S. cerevisiae* la maquinària ESCRT és requerida per l'activació de Rim101 com a factor transcripcional repressor (Rothfels et al., 2005; Xu et al., 2004). Donat que aquest sistema s'encarrega d'ordenar les proteïnes que tinguin com a destí la vacuola o el lisosoma, una possible hipòtesi seria que el complex ESCRT podria estar regulant l'expressió d'algun gen relacionat amb el manteniment de la funció de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar a través de la cascada de senyals Rim101/Nrg1. Caldria continuar investigant en els efectes "downstream" de la repressió de Nrg1 per veure quins gens tenen alterada la seva expressió al llarg del tractament amb selenit en estudis transcriptòmics globals amb mutants simples i dobles en *RIM101* i *NRG1*.

En resum, en aquesta memòria s'han descrit i caracteritzat quatre factors que participen en la resposta a la toxicitat generada pel selenit. No tots ells tenen la mateixa rellevància a l'hora de protegir les cèl·lules front el selenit, a part que tampoc actuen en el mateix compartiment cel·lular ni comparteixen necessàriament funcions. S'ha demostrat com Snf1 desencadena una resposta al citoplasma, en canvi la resta actuen a nivell nuclear regulant directament l'expressió gènica. Tot i que la cascada d'activació de senyals que succeeix abans d'arribar als components descrits sembla més caracteritzada, manca una explicació clara de la regulació que té lloc per cadascun dels factors reguladors en la resposta a l'estrès per selenit. En tot cas, aquest treball recolza per una banda el paper de la relació GSH/GSSG, i per tant l'estat redox de la cèl·lula, en la senyalització de l'estrès per selenit, i per l'altra el paper que la vacuola té en

la detoxificació de l'agent. Estudis transcriptòmics com els apuntats poden ajudar a desvelar noves funcions de gens implicats en la protecció front el selenit.



## **VI. CONCLUSIONS**





## CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball s'ha pogut extreure les següents conclusions:

1. El complex quinasa Snf1 és necessari per protegir les cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* front la toxicitat provocada pel selenit. L'activitat de Snf1 és necessària per la protecció front l'agent, així com la presència de les subunitats  $\beta$  del complex quinasa.
2. La protecció conferida per Snf1 involucra la quinasa activadora Elm1, encara que aquesta també té funcions de defensa front la toxicitat del selenit que són independents de Snf1. En absència d'Elm1, Sak1 podria encarregar-se en part d'activar Snf1 amb la conseqüent protecció.
3. Durant el tractament amb selenit Snf1 roman al citoplasma, i la funció protectora de la quinasa no requereix de les seves dianes nuclears conegudes. Conseqüentment, la quinasa no estaria actuant directament com a factor activador i/o repressor de gens en resposta al selenit. A més, Elm1 roman a la constricció de la gemma en cèl·lules tractades amb l'agent.
4. Els nivells de la fosforilació del residu Thr210, localitzat en l'ansa d'activació de Snf1 i essencial per aquesta activitat, augmenten a temps llargs de tractament amb selenit, tot i que l'activitat basal de Snf1 és suficient per la defensa front l'agent.
5. El dèficit de glucosa no és la causa dels efectes tòxics del selenit ni en cèl·lules salvatges ni en el mutant *snf1*, ja que l'agent no afecta la polarització de la membrana plasmàtica amb la conseqüent possible alteració del transport de glucosa i, a més, la mesura directa dels nivells intracel·lulars de glucosa-6-fosfat no mostren diferències significatives respecte de les cèl·lules no tractades. A més, el selenit ha d'entrar a l'interior de la cèl·lula per ser tòxic, utilitzant el sistema de transport de fòsfat d'alta afinitat.
6. La hipersensibilitat de la soca  $\Delta snf1$  al selenit està relacionada amb alteracions en l'homeòstasi redox del glutatió. El mutant presenta nivells més elevats de glutatió oxidat respecte del reduït al llarg del tractament amb l'agent comparant-los amb els de la soca salvatge. El fenotip d'hipersensibilitat del mutant *snf1* és rescatat per la sobreexpressió del gen *GLR1*, el qual codifica per una glutatió reductasa.

## Conclusions

---

7. Snf1 té un rol general protector en cèl·lules de llevat en situacions on hi ha un ambient intracel·lular més oxidant com a conseqüència de la presència d'agents que fan augmentar els nivells de glutatió oxidat respecte del reduït, com el dietil maleat o la diamida. En aquestes condicions, les cèl·lules de llevat requereixen l'activitat de la quinasa Snf1 de forma dependent d'Elm1 per contrarestar els efectes tòxics dels respectius oxidants.
8. El selenit indueix l'expressió de gens del sistema de captació de Fe d'alta afinitat dependent del factor Aft1, encara que de manera específica, ja que no tots els gens del reguló segueixen el mateix perfil d'inducció. Addicionalment, en aquestes condicions alguns dels gens del reguló s'indueixen de forma independent d'Aft1.
9. Aft1 juga un paper protector front la toxicitat provocada pel selenit relacionat amb els nivells intracel·lulars de Fe. Tot i així, el selenit no interfereix directament amb l'estructura de centres ferro-sofre de proteïnes mitocondrials i citoplasmàtiques, ja que les activitats d'aquestes no es veuen afectades per l'agent.
10. Aft2, factor transcripcional paràleg d'Aft1, confereix protecció front la toxicitat causada pel selenit. Aquesta funció és independent del rol protector d'Aft1 i també dels nivells intracel·lulars de Fe. Addicionalment, la funció protectora d'Aft2 front el selenit tampoc està relacionada amb funcions prèviament conegudes regulades per aquest factor.
11. La hipersensibilitat d'un mutant *aft2* al selenit és rescatada per la sobreexpressió dels gens *PHO81*, *PHO4*, *SSU1* i *GLR1*. Aquests, tot i no ser dianes específiques d'Aft2, rescaten de forma més intensa la sensibilitat del mutant comparant-ho amb la soca salvatge, ja que en aquesta última la sobreexpressió d'aquests gens únicament permet millorar el creixement de la soca. Aquestes observacions permeten confirmar l'associació de la toxicitat del selenit amb el transport de fosfat i l'homeòstasi del glutatió.
12. La proteïna Rim101 juga un paper protector davant l'estrès per selenit que no depèn dels nivells intracel·lulars de Fe. La hipersensibilitat a l'agent del mutant mancat de Rim101 és rescatada per l'absència simultània de Nrg1, un repressor gènic que és diana de Rim101 a nivell transcripcional, fet que defineix la participació de la via Rim101/Nrg1 en aquesta protecció.
13. L'expressió dels gens d'algunes subunitats de la bomba ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar com *VMA2* i *VMA4* es reprimeix durant un tractament amb selenit en la soca salvatge, i de forma més exacerbada en absència de Rim101. La manca de Nrg1 fa que la transcripció d'aquests dos

gens es mantingui durant el tractament llarg amb selenit, a nivells similars als de la soca salvatge. Aquestes observacions apunten a l'associació entre la via Rim101/Nrg1, l'expressió de subunitats de l'ATPasa V-H<sup>+</sup> vacuolar i la detoxificació del selenit mitjançant funcions vacuolars.



## **VII. BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

Adams, J., Chen, Z., Van Denderen, B. J., Morton, C. J., Parker, M. W., Witters, L. A., Stapleton, D., Kemp, B. E. (2004). Intracellular control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Science*, 13(1), 155–165.

Ahuatzi, D., Herrero, P., de La Cera, T., Moreno, F. (2004). The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14440–14446.

Ahuatzi, D., Riera, A., Peláez, R., Herrero, P., Moreno, F. (2007). Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4485–4493.

Alepuz, P. M., Cunningham, K. W., Estruch, F. (1997). Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Molecular Microbiology*, 26(1), 91–98.

Alexander, A., Cai, S. L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K. H., Inoki, K., Guan, K. L., Shen, J., Person, M. D., Kusewitt, D., Mills, G. B., Kastan, M. B., Walker, C. L. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 107(9), 4153–4158.

Alkim, C., Benbadis, L., Yilmaz, U., Cakar, Z. P., François, J. M. (2013). Mechanisms other than activation of the iron regulon account for the hyper-resistance to cobalt of a *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by evolutionary engineering. *Metallomics*, 5(8), 1043-1060.

Amodeo, G. A., Rudolph, M. J., Tong, L. (2007). Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature*, 449(7161), 492-495.

Anjaria, K. B., Madhvanath, U. (1988). Genotoxicity of selenite in diploid yeast. *Mutation Research*, 204(4), 605–614.

Ariño, J., Ramos, J., Sychrová, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 95–120.

Ashrafi, K., Lin, S. S., Manchester, J. K., Gordon, J. I. (2000). Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes and Development*, 14(15), 1872–1885.

Auesukaree, C., Homma, T., Kaneko, Y., Harashima, S. (2003). Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(4), 843–850.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.

Ayer, A., Tan, S. X., Grant, C. M., Meyer, A. J., Dawes, I. W., Perrone, G. G. (2010). The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(12), 1956–1968.

Barwell, K. J., Boysen, J. H., Xu, W., Mitchell, A. P. (2005). Relationship of *DFG16* to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 4(5), 890–899.



- Batista-Nascimento, L., Toledano, M. B., Thiele, D. J., Rodrigues-Pousada, C. (2013). Yeast protective response to arsenate involves the repression of the high affinity iron uptake system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(5), 997–1005.
- Becuwe, M., Vieira, N., Lara, D., Gomes-Rezende, J., Soares-Cunha, C., Casal, M., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., Paiva, S., Léon, S. (2012). A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *Journal of Cell Biology*, 196(2), 247–259.
- Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., Herrero, E. (1998). An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 26(4), 942–947.
- Bellí, G., Molina, M. M., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J. E., Herrero, E. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12386–12395.
- Berthelet, S., Usher, J., Shulist, K., Hamza, A., Maltez, N., Johnston, A., Fong, Y., Harris, L. J., Baetz, K. (2010). Functional genomics analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* iron responsive transcription factor Aft1 reveals iron-independent functions. *Genetics*, 185(3), 1111–1128.
- Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalho, J., Chan, T. F., Ai, W., Zheng, X. F. (2002). Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), 1246–1252.
- Blacketer, M. J., Koehler, C. M., Coats, S. G., Myers, A. M., Madaule, P. (1993). Regulation of dimorphism in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the novel protein kinase homolog Elm1p and protein phosphatase 2A. *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), 5567–5581.
- Blaiseau, P. L., Lesuisse, E., Camadro, J. M. (2001). Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 34221–34226.
- Blessing, H., Kraus, S., Heindl, P., Bal, W., Hartwig, A. (2004). Interaction of selenium compounds with zinc finger proteins involved in DNA repair. *European Journal of Biochemistry*, 271(15), 3190–3199.
- Bouquin, N., Barral, Y., Courbeyrette, R., Blondel, M., Snyder, M., Mann, C. (2000). Regulation of cytokinesis by the Elm1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 113(8), 1435–1445.
- Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M. (2012). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3289–3303.
- Broznanová, J., Mániková, D., Vlčková, V., Chovanec, M. (2010). Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Archives of Toxicology*, 84(12), 919–938.
- Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S., Oshima, Y. (1991). The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Molecular and Cellular Biology*, 11(6), 3229–3238.
- Cannon, J. F., Pringle, J. R., Fiechter, A., Khalil, M. (1994). Characterization of glycogen-deficient Glc mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 136(2), 485–503.
- Carlson, M., Osmond, B. C., Botstein, D. (1981). Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*, 98(1), 25–40.

- Casal, M., Cardoso, H., Leão, C. (1996). Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 142(6), 1385–1390.
- Casal, M., Paiva, S., Queirós, O., Soares-Silva, I. (2008). Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 974–994.
- Casamayor, A., Serrano, R., Platara, M., Casado, C., Ruiz, A., Ariño, J. (2012). The role of the Snf1 kinase in the adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to alkaline pH stress. *Biochemical Journal*, 444(1), 39–49.
- Casas, C., Aldea, M., Espinet, C., Gallego, C., Gil, R., Herrero, E. (1997). The *AFT1* transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(7), 621–637.
- Cássio, F., Leão, C., Van Uden, N. (1987). Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(3), 509–513.
- Castells-Roca, L., Mühlhoff, U., Lill, R., Herrero, E., Bellí, G. (2011). The oxidative stress response in yeast cells involves changes in the stability of Aft1 regulon mRNAs. *Molecular Microbiology*, 81(1), 232–248.
- Castermans, D., Somers, I., Kriel, J., Louwet, W., Wera, S., Versele, M., Janssens, V., Thevelein, J. M. (2012). Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell Research*, 22(6), 1–20.
- Castrejon, F., Gomez, A., Sanz, M., Duran, A., Roncero, C. (2006). The *RIM101* pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryotic Cell*, 5(3), 507–517.
- Castrillo, J. I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J., Oliver, S. G. (2003). An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry*, 62(6), 929–937.
- Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S., Young, R. A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12(2), 323–337.
- Caydasi, A. K., Kurtulmus, B., Orrico, M. I., Hofmann, A., Ibrahim, B., Pereira, G. (2010). Elm1 kinase activates the spindle position checkpoint kinase Kin4. *Journal of Cell Biology*, 190(6), 975–989.
- Celenza, J. L., Carlson, M. (1984). Cloning and genetic mapping of *SNF1*, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 4(1), 49–53.
- Celenza, J. L., Carlson, M. (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*, 233(4769), 1175–1180.
- Celenza, J. L., Carlson, M. (1989). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11), 5034–5044.
- Celenza, J. L., Eng, F. J., Carlson, M. (1989). Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11), 5045–5054.

## Bibliografia

---

- Celik, H. A., Kircelli, F., Saydam, G., Aydin, H. H. (2007). Potential involvement of serine/threonine protein phosphatases in apoptosis of HepG2 cells during selenite treatment. *Biological Trace Element Research*, 117(1-3), 65–75.
- Chambers, P., Issaka, A., Palecek, S. P. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* JEN1 promoter activity is inversely related to concentration of repressing sugar. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 8–17.
- Chen, O. S., Kaplan, J. (2000). CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 7626–7632.
- Cherest, H., Davidian, J. C., Thomas, D., Benes, V., Ansong, W., Surdin-Kerjan, Y. (1997). Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 145(3), 627–635.
- Collinson, E. J., Wheeler, G. L., Garrido, E. O., Avery, A. M., Avery, S. V, Grant, C. M. (2002). The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16712–16717.
- Conklin, D. S., McMaster, J. A., Culbertson, M. R., Kung, C. (1992). COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), 3678–3688.
- Courel, M., Lallet, S., Camadro, J. (2005). Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), 6760-6771.
- Couturier, J., Jacquot, J. P., Rouhier, N. (2009). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(15), 2539–2557.
- Cullen, P. J., Sprague, G. F. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97(25), 13619–13624.
- De Wever, V., Reiter, W., Ballarini, A., Ammerer, G., Brocard, C. (2005). A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *The EMBO Journal*, 24(23), 4115–4123.
- Dhaoui, M., Auchère, F., Blaiseau, P. L., Lesuisse, E., Landoulsi, A., Camadro, J. M., Haguenaer-Tsapis, R., Belgareh-Touzé, N. (2011). Gex1 is a yeast glutathione exchanger that interferes with pH and redox homeostasis. *Molecular Biology of the Cell*, 22(12), 2054–2067.
- Dombek, K. M., Kacherovsky, N., Young, E. T. (2004). The Reg1-interacting proteins, Bmh1, Bmh2, Ssb1, and Ssb2, have roles in maintaining glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 39165–39174.
- Dombek, K. M., Voronkova, V., Raney, A., Young, E. T. (1999). Functional analysis of the yeast Glc7-binding protein Reg1 identifies a protein phosphatase type 1-binding motif as essential for repression of ADH2 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), 6029-6040.
- Drake, E. N. (2006). Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. *Medical Hypotheses*, 67(2), 318–322.
- Dubacq, C., Chevalier, A., Courbeyrette, R., Petat, C., Gidrol, X., Mann, C. (2006). Role of the iron mobilization and oxidative stress regulons in the genomic response of yeast to hydroxyurea. *Molecular Genetics and Genomics*, 275(2), 114–124.

- Dubacq, C., Chevalier, A., Mann, C. (2004). The protein kinase Snf1 is required for tolerance to the ribonucleotide reductase inhibitor hydroxyurea. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2560-2572.
- Dunn, W. B., Winder, C. L. (2011). Sample preparation related to the intracellular metabolome of yeast: methods for quenching, extraction, and metabolite quantitation. *Methods in Systems Biology*, 500, 277–297.
- Eckers, E., Bien, M., Stroobant, V., Herrmann, J. M., Deponte, M. (2009). Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: the catalytic redox mechanism. *Biochemistry*, 48(6), 1410–1423.
- Eklund, H., Uhlin, U., Färnegårdh, M., Logan, D. T., Nordlund, P. (2001). Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 77(3), 177–268.
- El-bayoumy, K., Chae, Y., Upadhyaya, P., Reddy, B. S. (1992). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors and DNA adduct formation in the mammary glands of female Sprague-Dawley rats by the synthetic organoselenium compound, 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Cancer Research*, 52(9), 2402-2407.
- Elbing, K., McCartney, R. R., Schmidt, M. C. (2006a). Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 393(3), 797–805.
- Elbing, K., Rubenstein, E. M., McCartney, R. R., Schmidt, M. C. (2006b). Subunits of the Snf1 kinase heterotrimer show interdependence for association and activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26170–26180.
- Emerit, J., Beaumont, C., Trivin, F. (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 55(6), 333–339.
- Erickson, J. R., Johnston, M. (1993). Genetic and molecular characterization of *GAL83*: its interaction and similarities with other genes involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 135(3), 655–664.
- Estruch, F., Treitel, M. A., Yang, X., Carlson, M. (1992). N-terminal mutations modulate yeast Snf1 protein kinase function. *Genetics*, 132(3), 639–650.
- Fairweather-Tait, S. J., Collings, R., Hurst, R. (2010). Selenium bioavailability : current knowledge and future research, 91(2). *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1484S-1491S.
- Falcone, G., Nickerson, W. J. (1963). Reduction of selenite by intact yeast cells and cell-free preparations. *Journal of Bacteriology*, 85(4), 754–762.
- Fasolo, J., Sboner, A., Sun, M. G., Yu, H., Chen, R., Sharon, D., Kim, P. M., Gerstein, M., Snyder, M. (2011). Diverse protein kinase interactions identified by protein microarrays reveal novel connections between cellular processes. *Genes and Development*, 25(7), 767–778.
- François, J., Parrou, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 339–355.
- Froissard, M., Belgareh-Touzé, N., Dias, M., Buisson, N., Camadro, J. M., Haguenaer-Tsapis, R., Lesuisse, E. (2007). Trafficking of siderophore transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and intracellular fate of ferrioxamine B conjugates. *Traffic*, 8(11), 1601–1616.

## Bibliografía

---

- Gaber, R. F., Styles, C. A., Fink, G. R. (1988). *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 8(7), 2848–2859.
- Gaber, R. F., Ottow, K., Andersen, H. A., Kielland-Brandt, M. C. (2003). Constitutive and hyperresponsive signaling by mutant forms of *Saccharomyces cerevisiae* amino acid sensor Ssy1. *Eukaryotic Cell*, 2(5), 922–929.
- Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(9), 837–848.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241–4257.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737–741.
- Gharieb, M. M., Gadd, G. M. (2004). Role of glutathione in detoxification of metal(loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals*, 17(2), 183–188.
- Gietz, R. D., Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 74(2), 527–534.
- Gil, R., Zueco, J., Sentandreu, R., Herrero, E. (1991). *RCS1*, a gene involved in controlling cell size in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 7(1), 1–14.
- Goldstein, A. L., McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(14), 1541–1553.
- Gomes, D. S., Pereira, M. D., Panek, A. D., Andrade, L. R., Eleutherio, E. C. A. (2008). Apoptosis as a mechanism for removal of mutated cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Grx2 under cadmium exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(2), 160–166.
- Gopalakrishna, R., Chen, Z., Gundimeda, U. (1997). Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 348(1), 37–48.
- Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O., Winge, D. R. (2000). Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 32310–32316.
- Gutteridge, J. M. C., Rowley, D. A., Halliwell, B. (1982). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of “catalytic” iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. *Biochemical Journal*, 206(3), 605–609.
- Haas, H., Eisendle, M., Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 149–187.
- Hahn, J. S., Thiele, D. J. (2004). Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5169–5176.

- Hamza, A., Baetz, K. (2012). Iron-responsive transcription factor Aft1 interacts with kinetochore protein Iml3 and promotes pericentromeric cohesin. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 4139–4147.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580.
- Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes and Development*, 25(18), 1895–1908.
- Hardy, T. A., Huang, D., Roach, P. J. (1994). Interactions between CAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 27907–27913.
- Hartwig, A., Blessing, H., Schwerdtle, T., Walter, I. (2003). Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicology*, 193(1-2), 161–169.
- Hartwig, A., Schwerdtle, T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*, 127(1-3), 47–54.
- Hassett, R. F., Romeo, A. M., Kosman, D. J. (1998). Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Role of dioxygen and Fe(II). *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7628–7636.
- Haurie, V., Boucherie, H., Sagliocco, F. (2003). The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45391–45396.
- Hausmann, A., Samans, B., Lill, R., Mühlenhoff, U. (2008). Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8318–8330.
- Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., Maeda, T. (2005). Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9478–9490.
- Hedbacker, K., Carlson, M. (2006). Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 1950–1956.
- Hedbacker, K., Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), 2408–2420.
- Hedbacker, K., Hong, S. P., Carlson, M. (2004). Pak1 protein kinase regulates activation and nuclear localization of Snf1-Gal83 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 24(18), 8255–8263.
- Hedbacker, K., Townley, R., Carlson, M. (2004). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 24(5), 1836–1843.
- Hedges, D., Proft, M., Entian, K. D. (1995). *CAT8*, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(4), 1915–1922.
- Herrero, E., de la Torre-Ruiz, M. A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(12), 1518–1530.

## Bibliografía

---

- Herrero, E., Bellí, G., Casas, C. (2010). Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Current Protein and Peptide Science*, 11(8), 659–668.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(11), 1217–1235.
- Ho, E. (2004). Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(10), 572–578.
- Hong, S. P., Carlson, M. (2007). Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282(23), 16838–16845.
- Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D., Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 100(15), 8839–8843.
- Hong, S. P., Momcilovic, M., Carlson, M. (2005). Function of mammalian LKB1 and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 21804–21809.
- Honigberg, S. M., Lee, R. H. (1998). Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 18(8), 4548–4555.
- Huang, D., Friesen, H., Andrews, B. (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Molecular Microbiology*, 66(2), 303–314.
- Huynen, M. A., Spronk, C. A. E. M., Gabaldón, T., Snel, B. (2005). Combining data from genomes, Y2H and 3D structure indicates that BolA is a reductase interacting with a glutaredoxin. *FEBS Letters*, 579(3), 591–596.
- Hwang, J. T., Kim, Y. M., Surh, Y. J., Baik, H. W., Lee, S. K., Ha, J., Park, O. J. (2006). Selenium regulates cyclooxygenase-2 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways by activating AMP-activated protein kinase in colon cancer cells. *Cancer Research*, 66(20), 10057–10063.
- Ip, C. (1998). Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *Journal of Nutrition*, 128(11), 1845–1854.
- Izquierdo, A., Casas, C., Herrero, E. (2010). Selenite-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*: protective role of glutaredoxins. *Microbiology*, 156(9), 2608–2620.
- Izquierdo, A., Casas, C., Mühlenhoff, U., Lillig, C. H., Herrero, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryotic Cell*, 7(8), 1415–1426.
- Jackson, T., Kwon, E., Chachulska, A. M., Hyman, L. E. (2000). Novel roles for elongin C in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1491(1-3), 161–176.
- Jelinsky, S. A., Estep, P., Church, G. M., Samson, L. D. (2000). Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), 8157–8167.
- Jensen, L. T., Culotta, V. C. (2002). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron. *Journal of Molecular Biology*, 318(2), 251–260.

Jiang, R., Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes and Development*, 10(24), 3105–3115.

Jiang, R., Carlson, M. (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular and Cellular Biology*, 17(4), 2099–2106.

Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Breikreutz, B. J., Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science*, 297(5580), 395–400.

Kaffman, A., Herskowitz, I., Tjian, R., O'Shea, E. K. (1994). Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science*, 263(5150), 1153–1156.

Kane, P. M. (2007). The long physiological reach of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(5-6), 415–421.

Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J. H., Johnston, M. (2004). Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 3(1), 221–231.

Kaplan, C. D., Kaplan, J. (2009). Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chemical Reviews*, 109(10), 4536–4552.

Kawahata, M., Masaki, K., Fujii, T., Iefuji, H. (2006). Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. *FEMS Yeast Research*, 6(6), 924–936.

Kim, D., Yukl, E. T., Moënne-Loccoz, P., Montellano, P. R. (2006). Fungal heme oxygenases: Functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry*, 45(49), 14772–14780.

Kim, M. D., Hong, S. P., Carlson, M. (2005). Role of Tos3, a Snf1 protein kinase Kinase, during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources. *Eukaryotic Cell*, 4(5), 861–866.

Kim, Y., Lampert, S. M., Philpott, C. C. (2005). A receptor domain controls the intracellular sorting of the ferrichrome transporter, ARN1. *The EMBO Journal*, 24(5), 952–962.

Kimura, A., Ohashi, K., Naganuma, A. (2007). Cisplatin upregulates *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in iron homeostasis through activation of the iron insufficiency-responsive transcription factor Aft1. *Journal of Cellular Physiology*, 210(2), 378–384.

Klinge, S., Hirst, J., Maman, J. D., Krude, T., Pellegrini, L. (2007). An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(9), 875–877.

Ko, C. H., Gaber, R. F. (1991). *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 11(8), 4266–4273.

Komeili, A., O'Shea, E. K. (2000). Nuclear transport and transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(3), 355–360.

Kosower, N. S., Kosower, E. M., Wertheim, B., Correa, W. S. (1969). Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37(4), 593-596.



- Kronstad, J. W., Hu, G., Jung, W. H. (2013). An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, 21(9), 457–65.
- Kuchin, S., Treich, I., Carlson, M. (2000). A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97(14), 7916–7920.
- Kuchin, S., Vyas, V. K., Carlson, M. (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12), 3994–4000.
- Kumánovics, A., Chen, O. S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., Dingra, N. N., Outten, C. E., Keller, G., Winge, D., Ward, D. M., Kaplan, J. (2008). Identification of *FRA1* and *FRA2* as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10276–10286.
- Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A., Mitchell, A. P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1850–1856.
- Lamb, T. M., Mitchell, A. P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 23(2), 677–686.
- Lapinskas, P. J., Lin, S. J., Culotta, V. C. (1996). The role of the *Saccharomyces cerevisiae* *CCC1* gene in the homeostasis of manganese ions. *Molecular Microbiology*, 21(3), 519–528.
- Lazard, M., Blanquet, S., Fiscaro, P., Labarraque, G., Plateau, P. (2010). Uptake of selenite by *Saccharomyces cerevisiae* involves the high and low affinity orthophosphate transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32029–32037.
- Lazard, M., Ha-Duong, N. T., Mounié, S., Perrin, R., Plateau, P., Blanquet, S. (2011). Selenodiglutathione uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar ABC-transporter Ycf1p. *FEBS Journal*, 278(21), 4112–4121.
- Lee, T. A., Jorgensen, P., Bognar, A. L., Peyraud, C., Thomas, D., Tyers, M. (2010). Dissection of combinatorial control by the Met4 transcriptional complex. *Molecular Biology of the Cell*, 21(3), 456–469.
- Lee, W., St Onge, R. P., Proctor, M., Flaherty, P., Jordan, M. I., Arkin, A. P., Davis, R. W., Nislow, C., Giaever, G. (2005). Genome-wide requirements for resistance to functionally distinct DNA-damaging agents. *PLoS Genetics*, 1(2), e24.
- Leech, A., Nath, N., McCartney, R. R., Schmidt, M. C. (2003). Isolation of mutations in the catalytic domain of the Snf1 kinase that render its activity independent of the Snf4 subunit. *Eukaryotic Cell*, 2(2), 265–273.
- Lesage, P., Yang, X., Carlson, M. (1996). Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Molecular and Cellular Biology*, 16(5), 1921–1928.
- Letavayová, L., Vlasáková, D., Spallholz, J. E., Brozmanová, J., Chovanec, M. (2008). Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 638(1-2), 1–10.

- Letavayová, L., Vlcková, V., Brozmanová, J. (2006). Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*, 227(1-2), 1–14.
- Lewinska, A., Bartosz, G. (2008). A role for yeast glutaredoxin genes in selenite-mediated oxidative stress. *Fungal Genetics and Biology*, 45(8), 1182–1187.
- Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Naik, S. G., Lees, N. S., Hoffman, B. M., Riggs-Gelasco, P. J., Huynh, B. H., Johnson, M. K., Outten, C. E. (2009). The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry*, 48(40), 9569–9581.
- Li, H. F., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2008). Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist*, 178(1), 92–102.
- Li, L., Chen, O. S., McVey Ward, D., Kaplan, J. (2001). CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29515–29519.
- Li, Liangtao, Kaplan, J. (2004). A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33653–33661.
- Li, S. C., Kane, P. M. (2009). The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(4), 650–663.
- Li, W., Mitchell, A. P. (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*, 145(1), 63–73.
- Lill, R., Mühlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 669–700.
- Lillig, C. H., Berndt, C., Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(11), 1304–1317.
- Lin, S. S., Manchester, J. K., Gordon, J. I. (2001). Enhanced gluconeogenesis and increased energy storage as hallmarks of aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 36000–36007.
- Lin, S. S., Manchester, J. K., Gordon, J. I. (2003). Sip2, an N-myristoylated beta subunit of Snf1 kinase, regulates aging in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting cellular histone kinase activity, recombination at rDNA loci, and silencing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13390–13397.
- Lo, W. S., Duggan, L., Emre, N. C., Belotserkovskya, R., Lane, W. S., Shiekhattar, R., Berger, S. L. (2001). Snf1: a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, 293(5532), 1142–1146.
- Lo, W. S., Gamache, E. R., Henry, K. W., Yang, D., Pillus, L., Berger, S. L. (2005). Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *The EMBO Journal*, 24(5), 997–1008.
- Lu, J., Jiang, C., Kaeck, M., Ganther, H., Vadhanavikit, S., Ip, C., Thompson, H. (1995). Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. *Biochemical Pharmacology*, 50(2), 213–219.
- Lu, J., Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 723–727.

- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., Grant, C. M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular Biology of the Cell*, 9(5), 1081–1091.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A., Eide, D. (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 19(12), 2845–2855.
- Madrid, R., Gómez, M. J., Ramos, J., Rodríguez-Navarro, A. (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14838–14844.
- Mániková, D., Vlasáková, D., Letavayová, L., Klobočnicková, V., Griač, P., Chovanec, M. (2012). Selenium toxicity toward yeast as assessed by microarray analysis and deletion mutant library screen: a role for DNA repair. *Chemical Research in Toxicology*, 25(8), 1598–15608.
- Mániková, D., Vlasáková, D., Lodušková, J., Letavayová, L., Vlasáková, D., Krascšenitsová, E., Vlčková, V., Brozmanová, J., Chovanec, M. (2010). Investigations on the role of base excision repair and non-homologous end-joining pathways in sodium selenite-induced toxicity and mutagenicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*, 25(2), 155–162.
- Markley, J., Cui, Q. (2008). MMCD: Madison Metabolomics Consortium Database. <http://mmcd.nmr.fam.wisc.edu/>.
- Martinez, P., Zvyagilskaya, R., Allard, P., Persson, B. L. (1998). Physiological regulation of the derepressible phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 2253–2256.
- Matsumoto, K., Toh-e, A., Oshima, Y. (1981). Isolation and characterization of dominant mutations resistant to carbon catabolite repression of galactokinase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1(2), 83–93.
- McCartney, R. R., Schmidt, M. C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36460–36466.
- McCartney, R. R., Rubenstein, E. M., Schmidt, M. C. (2005). Snf1 kinase complexes with different beta subunits display stress-dependent preferences for the three Snf1-activating kinases. *Current Genetics*, 47(6), 335–344.
- Mcdermott, J. R., Rosen, B. P., Liu, Z. (2010). Jen1p: a high affinity selenite transporter in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 21(22), 3934–3941.
- Measday, V., Baetz, K., Guzzo, J., Yuen, K., Kwok, T., Sheikh, B., Ding, H., Ueta, R., Hoac, T., Cheng, B., Pot, I., Tong, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Boone, C., Hieter, P., Andrews, B. (2005). Systematic yeast synthetic lethal and synthetic dosage lethal screens identify genes required for chromosome segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 102(39), 13956–13961.
- Mehdi, Y., Hornick, J. L., Istasse, L., Dufresne, I. (2013). Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 18(3), 3292–3311.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17205–17208.

- Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9397-9400.
- Mesecke, N., Spang, A., Deponte, M., Herrmann, J. M. (2008). A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Molecular Biology of the Cell*, 19(6), 2673–2680.
- Mitchelhill, K. I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L. A., Kemp, B. E. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2361–2364.
- Molik, S., Lill, R., Mühlenhoff, U. (2007). Methods for studying iron metabolism in yeast mitochondria. *Methods in Cell Biology*, 80, 261-280.
- Molina-Navarro, M. M., Castells-Roca, L., Bellí, G., García-Martínez, J., Marín-Navarro, J., Moreno, J., Pérez-Ortín, J. E., Herrero, E. (2008). Comprehensive transcriptional analysis of the oxidative response in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 17908–17918.
- Momcilovic, M., Hong, S. P., Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25336–25343.
- Moore, J. K., Chudalayandi, P., Heil-Chapdelaine, R. A., Cooper, J. A. (2010). The spindle position checkpoint is coordinated by the Elm1 kinase. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 493–503.
- Moore, R. E., Kim, Y., Philpott, C. C. (2003). The mechanism of ferrichrome transport through Arn1p and its metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 100(10), 5664–5669.
- Morgan, K. L., Estevez, A. O., Mueller, C. L., Cacho-Valadez, B., Miranda-Vizueté, A., Szewczyk, N. J., Estevez, M. (2010). The Glutaredoxin GLRX-21 functions to prevent selenium-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicological Sciences*, 118(2), 530–543.
- Nath, N., McCartney, R. R., Schmidt, M. C. (2002). Purification and characterization of Snf1 kinase complexes containing a defined beta subunit composition. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50403–50408.
- Nath, N., McCartney, R. R., Schmidt, M. C. (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3909–3917.
- Nayak, V., Zhao, K., Wyce, A., Schwartz, M. F., Lo, W. S., Berger, S. L., Marmorstein, R. (2006). Structure and dimerization of the kinase domain from yeast Snf1, a member of the Snf1/AMPK protein family. *Structure*, 14(3), 477–485.
- O'Neill, E. M., Kaffman, A., Jolly, E. R., O'Shea, E. K. (1996). Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science*, 271(5246), 209–212.
- Ohdate, T., Izawa, S., Kita, K., Inoue, Y. (2010). Regulatory mechanism for expression of *GPX1* in response to glucose starvation and Ca in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of Snf1 and Ras/cAMP pathway in Ca signaling. *Genes to Cells*, 15(1), 59–75.
- Ojeda, L., Keller, G., Mühlenhoff, U., Rutherford, J. C., Lill, R., Winge, D. R. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17661–17669.

## Bibliografía

---

Orlova, M., Barrett, L., Kuchin, S. (2008). Detection of endogenous Snf1 and its activation state: application to *Saccharomyces* and *Candida* species. *Yeast*, 25(10), 745–754.

Pagani, M. A., Casamayor, A., Serrano, R., Atrian, S., Ariño, J. (2007). Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: a genome-wide study. *Molecular Microbiology*, 65(2), 521–537.

Palecek, S. P., Parikh, A. S., Huh, J. H., Kron, S. J. (2002). Depression of *Saccharomyces cerevisiae* invasive growth on non-glucose carbon sources requires the Snf1 kinase. *Molecular Microbiology*, 45(2), 453–469.

Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E., Arst, H. N. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology*, 16(6), 291–300.

Perrone, G. G., Tan, S. X., Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(7), 1354–1368.

Peyroche, G., Saveanu, C., Dauplais, M., Lazard, M., Beuneu, F., Decourty, L., Malabat, C., Jacquier, A., Blanquet, S., Plateau, P. (2012). Sodium selenide toxicity is mediated by O<sub>2</sub>-dependent DNA breaks. *PLoS One*, 7(5), e36343.

Philpott, C. C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(7), 636–645.

Philpott, C. C., Protchenko, O. (2008). Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 7(1), 20–27.

Pierik, A. J., Netz, D. J. A., Lill, R. (2009). Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nature Protocols*, 4(5), 753–766.

Pinson, B., Sagot, I., Daignan-Fornier, B. (2000). Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 36(3), 679–687.

Pinson, B., Merle, M., Franconi, J. M., Daignan-Fornier, B. (2004). Low affinity orthophosphate carriers regulate *PHO* gene expression independently of internal orthophosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35273–35280.

Plummer, J. L., Smith, B. R., Sies, H., Bend, J. R. (1981). Chemical depletion of glutathione *in vivo*. *Methods in Enzymology*, 77, 50–59.

Porras, P., Padilla, C. A., Krayl, M., Voos, W., Bárcena, J. A. (2006). One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16551–16562.

Portillo, F., Mulet, J. M., Serrano, R. (2005). A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Letters*, 579(2), 512–516.

Protchenko, O., Ferea, T., Rashford, J., Tiedeman, J., Brown, P. O., Botstein, D., Philpott, C. C. (2001). Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49244–49250.

Protchenko, O., Philpott, C. C. (2003). Regulation of intracellular heme levels by *HMX1*, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36582–36587.

- Puig, S., Askeland, E., Thiele, D. J. (2005). Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell*, 120(1), 99–110.
- Pujol-Carrion, N., Bellí, G., Herrero, E., Nogues, A., de la Torre-Ruiz, M. A. (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 119(21), 4554–4564.
- Purnapatre, K., Piccirillo, S., Schneider, B. L., Honigberg, S. M. (2002). The *CLN3/SWI6/CLN2* pathway and *SNF1* act sequentially to regulate meiotic initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells*, 7(7), 675–691.
- Raguzzi, F., Lesuisse, E., Crichton, R. R. (1988). Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 231(1), 253–258.
- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R., Rodriguez-Navarro, A. (1994). TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 176(1), 249–252.
- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M., Entian, K. D. (1997). Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Molecular and Cellular Biology*, 17(5), 2502–2510.
- Rayman, M. P. (2007). Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(4), 527–542.
- Rees, E. M., Thiele, D. J. (2007). Identification of a vacuole-associated metalloredutase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21629–21638.
- Riedel, G., Sanders, J. (1996). The influence of pH and media composition on the uptake of inorganic selenium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(9), 1577–1583.
- Robertson, L. S., Causton, H. C., Young, R. A., Fink, G. R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97(11), 5984–5988.
- Robinson, J. B., Inman, L., Sumegi, B., Srere, P. A. (1987). Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolon. *Journal of Biological Chemistry*, 262(4), 1786–1790.
- Rodríguez-Manzaneque, M. T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), 8180–8190.
- Rodríguez-Manzaneque, M. T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1109–1121.
- Rosen, B. P., Liu, Z. (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environment International*, 35(3), 512–515.
- Roth, S., Kumme, J., Schuller, H. J. (2004). Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 45(3), 121–128.

- Rothfels, K., Tanny, J. C., Molnar, E., Friesen, H., Commisso, C., Segall, J. (2005). Components of the ESCRT pathway, *DFG16*, and *YGR122w* are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative regulatory element of the *DIT1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), 6772–6788.
- Rothstein, A. (1963). Interactions of arsenate with the phosphate-transporting system of yeast. *Journal of General Physiology*, 46(5), 1075–1085.
- Rubenstein, E. M., McCartney, R. R., Zhang, C., Shokat, K. M., Shirra, M. K., Arndt, K. M., Schmidt, M. C. (2008). Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 222–30.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W. J., Stark, M. J., White, M. F. (2006). The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Molecular Cell*, 23(6), 801–808.
- Ruiz, A., Xu, X., Carlson, M. (2011). Roles of two protein phosphatases, Reg1-Glc7 and Sit4, and glycogen synthesis in regulation of SNF1 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 108(16), 6349–6354.
- Rutherford, J. C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P. O., Winge, D. R. (2001). A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 98(25), 14322–14327.
- Rutherford, J. C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P. O., Winge, D. R. (2001). A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 98(25), 14322–14327.
- Rutherford, J. C., Jaron, S., Winge, D. R. (2003). Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27636–27643.
- Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Mühlenhoff, U., Lill, R., 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10135–10140.
- Salin, H., Fardeau, V., Piccini, E., Lelandais, G., Tanty, V., Lemoine, S., Jacq, C., Devaux, F. (2008). Structure and properties of transcriptional networks driving selenite stress response in yeasts. *BMC Genomics*, 9, 333.
- Sanz, P. (2003). Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 31(1), 178–181.
- Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A., Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 20(4), 1321–1328.
- Schafer, F. Q., Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191–1212.
- Schmidt, M. C., McCartney, R. R. (2000). Beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *The EMBO Journal*, 19(18), 4936–4943.
- Schüller, H. J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 43(3), 139–160.

- Scott, J. W., Hawley, S. A., Green, K. A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G. A., Norman, D. G., Hardie, D. G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *Journal of Clinical Investigation*, 113(2), 274–284.
- Scott, J. W., Ross, F. A., Liu, J. K., Hardie, D. G. (2007). Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the gamma subunit. *The EMBO Journal*, 26(3), 806–815.
- Seitomer, E., Balar, B., He, D., Copeland, P. R., Kinzy, T. G. (2008). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* null allele strains identifies a larger role for DNA damage versus oxidative stress pathways in growth inhibition by selenium. *Molecular Nutrition Food and Research*, 52(11), 1305–1315.
- Seko, Y., Imura, N. (1997). Active oxygen generation as a possible mechanism of selenium toxicity. *Biomedical and Environmental Sciences*, 10(2-3), 333–339.
- Serrano, R., Bernal, D., Simón, E., Ariño, J. (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19698–19704.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R., Ariño, J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular Microbiology*, 46(5), 1319–1333.
- Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J., Garcia, E., Rolfes, R., Brown, P. O., Botstein, D., Philpott, C. C. (2004). Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1233–1243.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 350, 3-41.
- Shiobara, Y., Yoshida, T., Suzuki, K. T. (1998). Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 152(2), 309–314.
- Shirra, M. K., Patton-Vogt, J., Ulrich, A., Liuta-Tehlivets, O., Kohlwein, S. D., Henry, S. A., Arndt, K. M. (2001). Inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase activity restores expression of the *INO1* gene in a *snf1* mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5710–5722.
- Silva, R. D., Sotoca, R., Johansson, B., Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M. T., Peinado, J. M., Côrte-Real, M. (2005). Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 58(3), 824–834.
- Singh, A., Kaur, N., Kosman, D. J. (2007). The metalloreductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), 28619–28626.
- Sinha, R., El-Bayoumy, K. (2004). Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. *Current Cancer Drug Targets*, 4(1), 13–28.
- Sinha, R., Kiley, S. C., Lu, J. X., Thompson, H. J., Moraes, R., Jaken, S., Medina, D. (1999). Effects of methylselenocysteine on PKC activity, cdk2 phosphorylation and *gadd* gene expression in synchronized mouse mammary epithelial tumor cells. *Cancer Letters*, 146(2), 135–145.
- Sohn, O. S., Fiala, E. S., Upadhyaya, P., Chae, Y., El-bayoumy, K. (1999). Comparative effects of phenylenebis(methylene)selenocyanate isomers on xenobiotic metabolizing enzymes in organs of female CD rats. *Carcinogenesis*, 20(4), 615–621.



- Sors, T. G., Ellis, D. R., Salt, D. E. (2005). Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*, 86(3), 373–389.
- Sousa, C. A., Perez, R. R., Soares, E. V. (2013). *Saccharomyces cerevisiae* mutants affected in vacuole assembly or vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase are hypersensitive to lead (Pb) toxicity. *Current Microbiology*, doi:10.1007/s00284-013-0438-y
- Spallholz, J. E. (1997). Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomedical and Environmental Sciences*, 10(2-3), 260–270.
- Sreenivasan, A., Bishop, A. C., Shokat, K. M., Kellogg, D. R. (2003). Specific inhibition of Elm1 kinase activity reveals functions required for early G1 events. *Molecular and Cellular Biology*, 23(17), 6327–6337.
- Sreenivasan, A., Kellogg, D. (1999). The Elm1 kinase functions in a mitotic signaling network in budding yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), 7983–7994.
- Stadler, J. A., Schweyen, R. J. (2002). The yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39649–39654.
- Stewart, M. S., Davis, R. L., Walsh, L. P., Pence, B. C. (1997). Induction of differentiation and apoptosis by sodium selenite in human colonic carcinoma cells (HT29). *Cancer Letters*, 117(1), 35–40.
- Stolz, J., Hoja, U., Meier, S., Sauer, N., Schweizer, E. (1999). Identification of the plasma membrane H<sup>+</sup>-biotin symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18741–18746.
- Su, C. M., Suarez, D. L. (2000). Selenate and selenite sorption on iron oxides: An infrared and electrophoretic study. *Soil Science Society of America Journal*, 64(1), 101–111.
- Su, S. S., Mitchell, A. P. (1993). Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics*, 133(1), 67–77.
- Suizdak, G., Abagyan Lab (2010). METLIN: Scripps Center for Mass Spectrometry. <http://metlin.scripps.edu/>.
- Sutherland, C. M., Hawley, S. A., McCartney, R. R., Leech, A., Stark, M. J., Schmidt, M. C., Hardie, D. G. (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Current Biology*, 13(15), 1299–1305.
- Tachibana, C., Yoo, J. Y., Tagne, J. B., Kacherovsky, N., Lee, T. I., Young, E. T. (2005). Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. *Molecular and Cellular Biology*, 25(6), 2138–2146.
- Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeno, A., Ros, J. (2006). Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Analytical Biochemistry*, 351(1), 149–151.
- Tarze, A., Dauplais, M., Grigoras, I., Lazard, M., Ha-Duong, N. T., Barbier, F., Blanquet, S., Plateau, P. (2007). Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenite against *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8759–8767.
- Tatchell, K., Robinson, L. C. (2002). Use of green fluorescent protein in living yeast cells. *Methods in Enzymology*, 351, 661–683.

- Thompson-Jaeger, S., Francois, J., Gaughran, J. P., Tatchell, K. (1991). Deletion of Snf1 affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics*, 129(3), 697–706.
- Thorsen, M., Perrone, G. G., Kristiansson, E., Traini, M., Ye, T., Dawes, I. W., Nerman, O., Tamás, M. J. (2009). Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 10(1), 105.
- Toledano, M. B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D., Tacnet, F. (2007). The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Letters*, 581(19), 3598–3607.
- Tomás-Cobos, L., Sanz, P. (2002). Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HXT1 glucose transporter gene. *Biochemical Journal*, 368(2), 657–663.
- Townley, R., Shapiro, L. (2007). Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science*, 315(5819), 1726–1729.
- Treitel, M. A., Kuchin, S., Carlson, M. (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6273–6280.
- Tu, J., Carlson, M. (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14(23), 5939–5946.
- Ueta, R., Fukunaka, A., Yamaguchi-Iwai, Y. (2003). Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 50120–50127.
- Urbanowski, J. L., Piper, R. C. (1999). The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 38061–38070.
- Usaitte, R., Jewett, M. C., Oliveira, A. P., Yates, J. R., Olsson, L., Nielsen, J. (2009). Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator. *Molecular Systems Biology*, 5, 319.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Vallejo, C. G., Serrano, R. (1989). Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Yeast*, 5(4), 307–319.
- Van Zeebroeck, G., Kimpe, M., Vandormael, P., Thevelein, J. M. (2011). A split-ubiquitin two-hybrid screen for proteins physically interacting with the yeast amino acid transceptor Gap1 and ammonium transceptor Mep2. *PLoS One*, 6(9), 14.
- Veatch, J. R., McMurray, M. A., Nelson, Z. W., Gottschling, D. E. (2009). Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell*, 137(7), 1247–1258.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A., Ariño, J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43614–43624.

## Bibliografia

---

- Vincent, O., Carlson, M. (1998). Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *The EMBO Journal*, 17(23), 7002–7008.
- Vincent, O., Carlson, M. (1999). Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *The EMBO Journal*, 18(23), 6672–6681.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes and Development*, 15(9), 1104–1114.
- Vyas, V. K., Kuchin, S., Berkey, C. D., Carlson, M. (2003). Snf1 kinases with different b-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Molecular and Cellular Biology*, 23(4), 1341–1348.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(13), 1793–1808.
- Wang, H., Yang, X., Zhang, Z., Xu, H. (2003). Both calcium and ROS as common signals mediate Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>-induced apoptosis in SW480 human colonic carcinoma cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97(2), 221–230.
- Wang, Z., Wilson, W. A., Fujino, M. A., Roach, P. J. (2001). Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5742–5752.
- White, M. A., Riles, L., Cohen, B. A. (2009). A systematic screen for transcriptional regulators of the yeast cell cycle. *Genetics*, 181(2), 435–446.
- Wiatrowski, H. A., Van Denderen, B. J., Berkey, C. D., Kemp, B. E., Stapleton, D., Carlson, M. (2004). Mutations in the Gal83 glycogen-binding domain activate the Snf1/Gal83 kinase pathway by a glycogen-independent mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 352–361.
- Wilson, W. A., Hawley, S. A., Hardie, D. G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Current Biology*, 6(11), 1426–1434.
- Wishart, D. (2009). HMDB: Human Metabolome Database. Available: <http://hmdb.ca/>.
- Woods, A., Munday, M., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D. (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(30), 19509–19515.
- Wycherly, B. J., Moak, M. A., Christensen, M. J. (2004). High dietary intake of sodium selenite induces oxidative DNA damage in rat liver. *Nutrition and Cancer*, 48(1), 78–83.
- Wykoff, D. D., O’Shea, E. K. (2001). Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 159(4), 1491–1499.
- Xu, W., Smith, F. J., Subaran, R., Mitchell, A. P. (2004). Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5528–5537.

- Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., Klausner, R. D. (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14(6), 1231–1239.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., Klausner, R. D. (1996). Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *The EMBO Journal*, 15(13), 3377–3384.
- Yamaguchi-Iwai, Yuko, Ueta, R., Fukunaka, A., Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18914–18918.
- Yang, X., Jiang, R., Carlson, M. (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *The EMBO Journal*, 13(24), 5878–5886.
- Ye, T., Elbing, K., Hohmann, S. (2008). The pathway by which the yeast protein kinase Snf1p controls acquisition of sodium tolerance is different from that mediating glucose regulation. *Microbiology*, 154(9), 2814–2826.
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., Serrano, R. (2005). pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), 8683–8692.
- Young, E. T., Dombek, K. M., Tachibana, C., Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 26146–26158.
- Young, E. T., Kacherovsky, N., Van Riper, K. (2002). Snf1 protein kinase regulates Adr1 binding to chromatin but not transcription activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38095–38103.
- Young, E. T., Zhang, C., Shokat, K. M., Parua, P. K., Braun, K. A. (2012). The AMP-activated protein kinase Snf1 regulates transcription factor binding, RNA polymerase II activity, and mRNA stability of glucose-repressed genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 29021–29034.
- Yuen, K. W., Warren, C. D., Chen, O., Kwok, T., Hieter, P., Spencer, F. A. (2007). Systematic genome instability screens in yeast and their potential relevance to cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 104(10), 3925–3930.
- Zaman, S., Lippman, S. I., Zhao, X., Broach, J. R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual Review of Genetics*, 42, 27–81.
- Zhao, Y., Du, J., Xiong, B., Xu, H., Jiang, L. (2013). ESCRT components regulate the expression of the ER/Golgi calcium pump gene *PMR 1* through the Rim101/Nrg 1 pathway in budding yeast. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(5), 336–344.
- Zhou, N., Xiao, H., Li, T., Nur-E-Kamal, A., Liu, L. F. (2003). DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29532–29537.
- Zmijewski, J. W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E. R., Abraham, E. (2010). Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 33154–33164.
- Zvyagilskaya, R. A., Lundh, F., Samyn, D., Pattison-Granberg, J., Mouillon, J. M., Popova, Y., Popoya, Y., Thevelein, J. M., Persson, B. L. (2008). Characterization of the Pho89 phosphate transporter by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 685–696.



## **VIII. ARTICLE**



# The AMPK Family Member Snf1 Protects *Saccharomyces cerevisiae* Cells upon Glutathione Oxidation

Maria Pérez-Sampietro, Celia Casas, Enrique Herrero\*

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida, Spain

## Abstract

The AMPK/Snf1 kinase has a central role in carbon metabolism homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. In this study, we show that Snf1 activity, which requires phosphorylation of the Thr210 residue, is needed for protection against selenite toxicity. Such protection involves the Elm1 kinase, which acts upstream of Snf1 to activate it. Basal Snf1 activity is sufficient for the defense against selenite, although Snf1 Thr210 phosphorylation levels become increased at advanced treatment times, probably by inhibition of the Snf1 dephosphorylation function of the Reg1 phosphatase. Contrary to glucose deprivation, Snf1 remains cytosolic during selenite treatment, and the protective function of the kinase does not require its known nuclear effectors. Upon selenite treatment, a null *snf1* mutant displays higher levels of oxidized versus reduced glutathione compared to wild type cells, and its hypersensitivity to the agent is rescued by overexpression of the glutathione reductase gene *GLR1*. In the presence of agents such as diethyl maleate or diamide, which cause alterations in glutathione redox homeostasis by increasing the levels of oxidized glutathione, yeast cells also require Snf1 in an Elm1-dependent manner for growth. These observations demonstrate a role of Snf1 to protect yeast cells in situations where glutathione-dependent redox homeostasis is altered to a more oxidant intracellular environment and associates AMPK to responses against oxidative stress.

**Citation:** Pérez-Sampietro M, Casas C, Herrero E (2013) The AMPK Family Member Snf1 Protects *Saccharomyces cerevisiae* Cells upon Glutathione Oxidation. PLoS ONE 8(3): e58283. doi:10.1371/journal.pone.0058283

**Editor:** Michael Polymenis, Texas A&M University, United States of America

**Received:** December 21, 2012; **Accepted:** February 1, 2013; **Published:** March 5, 2013

**Copyright:** © 2013 Pérez-Sampietro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was funded by Ministerio de Economía y Competitividad (Spain) (grants BFU2010-17656 and CSD2007-0020) and Generalitat de Catalunya (grant 2009/SGR/196). MPS is the recipient of a predoctoral fellowship from Generalitat de Catalunya. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: enric.herrero@cmb.udl.cat

## Introduction

The AMP-activated protein kinase (AMPK) family is constituted by protein complexes that participate in metabolic stress responses addressed to maintain cellular ATP levels in eukaryotes [1]. Full activity of the catalytic  $\alpha$  subunit of the AMPK complex requires phosphorylation of a T-loop threonine residue, as well as binding of the  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. The only member of the AMPK family in *Saccharomyces cerevisiae* is Snf1, which plays a key role in adaptation of cells to glucose limitation and use of alternative carbon sources [2,3]. Snf1 activity requires the participation of the regulatory  $\gamma$  subunit Snf4 and one of the three  $\beta$  subunits Gal83, Sip1 or Sip2. Upon glucose limitation, activation of Snf1 needs phosphorylation of the T-loop Thr210 residue. This is carried out by one of the three redundant kinases Sak1, Elm1 or Tos3 [4,5]. Although Sak1 plays the most relevant role in such activation, only the absence of the three upstream Snf1-activating kinases causes complete inability for growth on carbon sources other than glucose, which indicates a partially redundant function of Sak1, Elm1 and Tos3 on Snf1 activation in glucose-limited conditions [4,5]. On the other hand, the phosphorylation state of Thr210 is negatively regulated by the protein phosphatase 1 (PP1) complex. This is composed by the Glc7 catalytic subunit and the Reg1 regulatory subunit [6]. This complex seems to be the direct or indirect sensor of the cellular glucose status [7,8]. Recently, PP2A-type phosphatases have also been implicated in regulating Snf1 phosphorylation and activity [8,9]. Activated Snf1 in glucose limitation conditions

regulates the expression of multiple genes, which are not necessarily related to carbon source metabolism [10]. Among the best-characterized nuclear protein targets of Snf1 are the Mig1 repressor and the Cat8, Sip4 and Adr1 transcriptional activators [3].

In addition to glucose limitation Snf1 also participates in the response of yeast cells to other environmental stresses. Thus, a null *snf1* mutant is hypersensitive to sodium and lithium or to hygromycin B [11–13], calcium excess [14], alkaline pH conditions [15], genotoxics such as hydroxyurea and methyl methane sulfonate [16], and cadmium [17]. Most of these stresses, when applied in normal glucose concentration conditions, cause phosphorylation of Snf1 Thr210, with Sak1 playing the major but not exclusive Snf1-activation role. Nevertheless, the levels of Snf1 activity required for responding to the above stresses are lower than those required for responding to glucose depletion [12–14,16]. In some cases, such as the response to hydroxyurea or cadmium, the detectable phosphorylation levels of Snf1 upon stress do not rise over basal levels [14,16] and a Snf1 mutant protein in which the Thr210 residue has been replaced with alanine is still able to protect against hygromycin B [11].

Selenium (Se) is an essential microelement in human cells present as selenocysteine in selenoproteins [18]. Among the latter, there are enzymes protecting against oxidation of macromolecules by reactive oxygen species. On the other hand, at high concentrations Se may be toxic because of the generation of oxidative stress conditions and DNA damage [18,19]. *S. cerevisiae* is



an adequate model to study the molecular basis of Se toxicity since this yeast lacks selenoproteins and therefore, Se is not required as growth factor. In *S. cerevisiae* the more toxic form of Se is selenide. This can be formed from other Se forms such as selenite [20], the predominant environmental form. In the presence of glucose, selenite enters the yeast cell through the high affinity phosphate transporter Pho84 in low phosphate conditions and through both Pho84 and the low affinity transporters Pho87/Pho90/Pho91 in high phosphate conditions [21]. Once inside the cell, selenite causes double-strand breaks, high mutagenicity rate, cell cycle arrest and protein hypercarbonylation which is indicative of extensive protein oxidative damage [22–24]. Overall, these effects may be indicative of intracellular oxidative stress caused by selenite. Transcriptomic studies [25] have demonstrated selenite-mediated upregulation of genes involved in high affinity iron uptake (whose expression is under the control of the Aft1 transcription factor) and in stress and protein degradation responses.

Based on the stress effects caused by selenite in yeast cells and on the protective role of Snf1 in defense against a diversity of stresses in addition to glucose depletion, this led us to explore the role of the Snf1 pathway in the response to selenite stress and in a broader perspective, in the response to changes in the redox state of the cell. Our results show that Snf1 activity is required to protect yeast cells against situations that decrease the ratio of reduced versus oxidized glutathione, including selenite treatment. We also demonstrate that such protective role of Snf1 takes place at the cytosol and does not correlate with extensive phosphorylation of Thr210 upon selenite addition. Overall, this study reveals a relationship between Snf1 kinase and redox regulation processes in yeast cells.

## Materials and Methods

### Strains and Plasmids

Strains employed in this study (W303 genetic background unless otherwise indicated) are listed in Table 1. Plasmids pWS93 and its derivatives pWS-Snf1, pWS-Snf1-T210A and pWS-Snf1-K84R, as well as pHA-Mig1 have been described [26]. Plasmid pYCP414 overexpresses *TRK1* and derives from vector pCM262 [27]. Plasmid pOV84 expresses a Snf1-GFP protein under the *SNF1* promoter [28]. Plasmid pMM1039 was obtained in this study by cloning the *GLR1* open reading frame under the control of the *tetO<sub>7</sub>* promoter in the centromeric vector pCM189 [29]. P1116 is a multicopy plasmid overexpressing *GLR1* under its own promoter [22].

### Growth Media and Culture Conditions

YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or synthetic SC medium were usually employed for *S. cerevisiae* cell growth. For glucose starvation conditions, concentration of glucose in the medium was 0.05%. YPGal and YPGly contain respectively 2% galactose or 3% glycerol instead of glucose. When required, YPD medium was supplemented with exogenous iron by addition of 90  $\mu$ M BPS (phosphate buffered saline) plus 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> [40]. To control phosphate concentration in the growth medium, SD broth with 2% glucose w/o phosphate (Formedium) was employed as phosphate-depleted basal medium, to which KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was added at 0.2 mM (low phosphate conditions) or 7.3 mM (normal phosphate conditions). In the former case, KCl was added up to 7.3 mM final concentration. Media were solidified with 2% agar. Sodium selenite (Sigma) was added at the concentration indicated in each case. Cells were grown at 30°C, with shaking in the case of liquid cultures.

## Genetic Methods

Standard protocols were used for DNA manipulations and transformation of yeast cells. Single null mutants were generated using the short-flanking homology approach after PCR amplification of the *natMX4* cassette and selection for nourseothricin resistance [30]. Disruptions were confirmed by PCR analysis. Null mutations in some genes were moved from the BY4741 or other genetic backgrounds to the W303 background after PCR amplification of the corresponding disruption cassette plus about 300 bp flanking genomic regions in the donor mutant, and subsequent transformation of the amplified fragment into wild type W303 cells. Multiple mutants were obtained by crossing the parental mutant strains, followed by diploid sporulation, tetrad analysis, and selection of the mutant combinations.

### Determination of Growth Sensitivities

Sensitivity to selenite was determined in plate growth assays by spotting serial 1:10 dilutions of exponential cultures onto YPD or SC plates containing sodium selenite, and recording growth after 2 or 3 days of incubation at 30°C. Growth of several strains in liquid medium under parallel separate treatments was automatically recorded (optical density at 600 nm) at one-hour intervals during 24 hours, using individual 0.5 ml cultures in shaken microtiter plates sealed with oxygen-permeable plastic sheets, in a Power-Wave XS (Biotek) apparatus at controlled temperature. Identical cell numbers ( $2 \times 10^7$ ) were inoculated initially in each parallel culture.

### Northern Blot Analyses

RNA isolation and electrophoresis, probe labeling with digoxigenin, hybridization, and signal detection were done as described previously [29]. 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.

### Immunoblot Analyses of Snf1 Phosphorylation at Thr210

From cell samples obtained at the indicated times in each experiment, protein extracts were prepared by the heat inactivation/alkaline treatment method [31]. They were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-Thr172-AMPK (Cell Signaling Technology) at 1:1,000 dilution. Membranes were reprobed to determine total Snf1 levels with rabbit polyclonal anti-Snf1 antibodies [12] at 1:1,000 dilution.

### Microscopy Methods

GFP-tagged proteins were visualized with an Olympus BZ51 fluorescence microscope, after nuclear staining of cell samples with Hoesch (5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, 6 min). U-MNUA2 and U-MNUA3 filters were employed respectively for Hoesch and GFP staining. Immunofluorescence experiments to localize HA-tagged Mig1 were done with 3F10 rat anti-HA (Roche) and Alexa488 goat anti-rat (Molecular Probes) and parallel nuclear staining with DAPI.

### Analytical Methods

Cellular concentrations of oxidized and reduced glutathione were determined by using the Ellman's reagent method in culture samples quenched by 5-sulfosalicylic acid [32]. Cell concentration and cell volume values were respectively determined in formaldehyde-fixed and non-fixed samples using a Coulter Z2 analyzer, and were employed to calculate glutathione concentrations. Glucose-6-phosphate intracellular concentration was determined by electrospray mass spectrometry from 20 mg cells (dry weight).

**Table 1.** Strains employed in this study.

Strain	Genotype	Source and comments
W303-1A	<i>MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 can1-1</i>	Wild type
Wsnf1	W303-1A <i>snf1::HIS3</i>	From Francisco Estruch
WΔ3	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i> .	From Joaquin Ariño
MML348	W303-1A <i>aft1-Δ5::URA3</i>	From our laboratory
MML1304	W303-1A <i>pho84::natMX4</i>	This work
MML1370	W303-1A <i>sak1::natMX4</i>	This work
MML1387	W303-1A <i>sak1::natMX4 elm1::kanMX4</i>	This work, <i>elm1::kanMX4</i> mutation from YPDahl21
MML1389	W303-1A <i>sak1::natMX4 tos3::TRP1</i>	This work, <i>tos3::TRP1</i> mutation from YPDahl19
MML1390	W303-1A <i>elm1::kanMX4 tos3::TRP1</i>	This work, <i>elm1::kanMX4</i> and <i>tos3::TRP1</i> mutations from YPDahl21 and YPDahl19
MML1392	W303-1A <i>sak1::natMX4 elm1::kanMX4 tos3::TRP1</i>	This work, <i>elm1::kanMX4</i> and <i>tos3::TRP1</i> mutations from YPDahl21 and YPDahl19
MML1396	W303-1A <i>sip4::kanMX4</i> .	This work
MML1401	W303-1A <i>snf1::HIS3 pho84::natMX4</i>	This work
MML1407	W303-1A <i>snf4::kanMX4</i>	This work
MML1408	W303-1A <i>mig1::kanMX4</i>	This work
MML1417	W303-1A <i>cat8::natMX4</i>	This work
MML1419	W303-1A <i>adr1::natMX4</i> .	This work
MML1442	W303-1A <i>reg1::URA3</i>	This work, from MCY3278 [6]
MML1445	W303-1A <i>sip1::natMX4 sip2::kanMX4</i>	This work
MML1447	W303-1A <i>snf1::HIS3 trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	This work, from WΔ3
MML1452	W303-1A <i>sip1::natMX4 gal83::HIS3</i>	This work, <i>gal83::HIS3</i> mutation from MSY558 [34]
MML1454	W303-1A <i>sip2::kanMX4 gal83::HIS3</i>	This work, <i>gal83::HIS3</i> mutation from MSY558 [34]
MML1459	W303-1A <i>sip1::natMX4 sip2::kanMX4 gal83::HIS3</i>	This work, <i>gal83::HIS3</i> mutation from MSY558 [34]
MML1724	W303-1A <i>snf1::HIS3 elm1::kanMX4</i>	This work
YPDahl19	W303-1A <i>tos3::TRP1</i>	From Stefan Hohmann [13]
YPDahl21	W303-1A <i>elm1::kanMX4</i>	From Stefan Hohmann [13]
DLY4033	<i>MATa his3 ura3 lys2 trp1</i>	Wild type, from Gislene Pereira [38]
AKY516	<i>MATa his3 ura3 lys2 trp1 ELM1-GFP::kanMX4</i>	Derived from DLY4033 [38]

doi:10.1371/journal.pone.0058283.t001

Sample quenching and extraction was made using tricine buffer pH 7.4 [33]. The methanol/water phase was evaporated in vacuum and resuspended in 100  $\mu$ l of water/ethanol (50/50, v/v). An Agilent 1290 LC system coupled to an ESI-Q-TOF MS/MS 6520 instrument (Agilent Technologies) was used, employing a column with 1.8  $\mu$ m particle size. MassHunter Qualitative Analysis Software (Agilent Technologies) was used for integration and extraction of peak intensities. The m/z value for quantification was 259.0224 [M-H]<sup>-</sup>. Levels were adjusted to internal standard (phenylalanine-C13, m/z 165.076 [M-H]<sup>-</sup>).

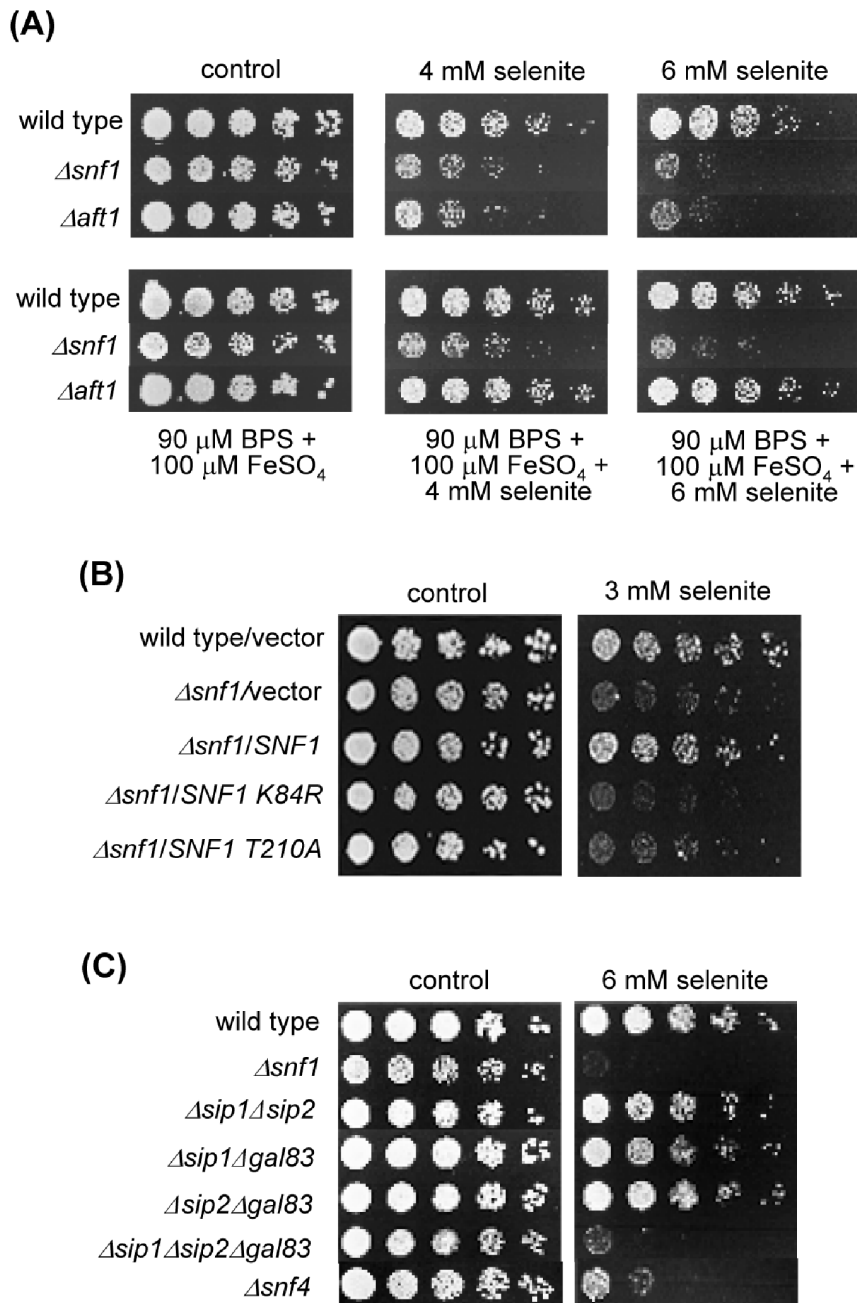
## Results

### Snf1 Activity Protects Against Selenite Toxicity

We initially determined the sensitivity of a *S. cerevisiae* *Δsnf1* null mutant to selenite stress. The mutant was more sensitive to the agent than wild type cells (Figure 1A). Given that selenite treatment of yeast cells induces expression of Aft1-dependent genes of the high affinity mechanism for iron uptake [25], in parallel we determined the selenite sensitivity of a *Δaft1* mutant. This was also hypersensitive to the agent, but while its hypersensitivity to selenite was rescued in iron-repletion conditions, this was not the case for the *Δsnf1* mutant (Figure 1A). The observation supports an iron-independent protective role of the Snf1 kinase against selenite toxicity.

Next, we determined whether Snf1 activity is required for protection after selenite treatment, by employing yeast mutants expressing two mutated forms of Snf1. The *snf1-K84R* mutant expresses a Snf1 form which lacks a Lys84 residue required for ATP binding, and consequently has a very low kinase activity, while the *snf1-T210A* mutant expresses a Snf1 form lacking the Thr210 residue subjected to activating phosphorylation [3–5]. None of the two Snf1 mutant forms expressed from a plasmid rescued the selenite hypersensitivity of the *Δsnf1* null strain, compared with a control wild type Snf1 form (Figure 1B). This therefore confirms that the Snf1 kinase activity is needed either for the response or for recovery from selenite stress.

Snf1 activity requires one of the three  $\beta$  subunits Sip1, Sip2 or Gal83, which confer substrate specificity to the complex [28,34]. Under glucose deprivation, Gal83 internalizes into the nucleus together with Snf1, while Sip1 becomes vacuole-associated and Sip2 remains dispersed at the cytosol [28,35]. Although in these glucose-minus conditions Gal83 seems to be the main Snf1 activator, the other two  $\beta$  subunits may have redundant roles as shown from the growth phenotypes of the respective single and double mutants in glucose-deprived medium [34]. Using a similar approach, we explored the participation of the three  $\beta$  subunits in protection against selenite. The strain lacking all three  $\beta$  subunits was as sensitive to selenite as the *Δsnf1* mutant, while the strains



**Figure 1. Snf1 activity is required for protection against selenite.** (A) Growth assays of serial dilutions of the respective strains on YPD medium with the indicated additions. Growth was recorded after 48 hours at 30°C. Strains employed: wild type (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1) and  $\Delta aft1$  (MML348). (B) Growth assays of serial dilutions of the following strains, plated on SC medium with sodium selenite: wild type (W303-1A) and  $\Delta snf1$  (Wsnf1) cells transformed with vector pWS93, and  $\Delta snf1$  cells transformed with pWS-Snf1, pWS-Snf1-T210A and pWS-Snf1-K84R. Growth was recorded after 3 days at 30°C. (C) As in (A), with the following strains in addition to wild type and  $\Delta snf1$ :  $\Delta sip1\Delta sip2$  (MML1445),  $\Delta sip1\Delta gal83$  (MML1452),  $\Delta sip2\Delta gal83$  (MML1454),  $\Delta sip1\Delta sip2\Delta gal83$  (MML1459) and  $\Delta snf4$  (MML1407). doi:10.1371/journal.pone.0058283.g001

expressing only one of the three subunits displayed a wild type phenotype (Figure 1C). Therefore, any of the Sip1, Sip2 and Gal83 proteins alone may activate Snf1 with full efficiency against selenite toxicity. Consistently with the role of the Snf4  $\gamma$  subunit on Snf1, a  $\Delta snf4$  strain was also hypersensitive to selenite, although it displayed a slightly milder phenotype than mutants in the  $\alpha$  or  $\beta$  subunits (Figure 1C).

### Elm1 Kinase Plays an Important Role in Protection Against Selenite Toxicity

Three upstream kinases (Sak1, Elm1 and Tos3) participate in Thr210 phosphorylation and activation of Snf1 in response to glucose depletion and other stresses. They act redundantly, although in many cases (for instance in glucose-minus conditions) Sak1 plays the most relevant role [3]. We tested the selenite sensitivity of the individual null mutants in each of the three Snf1

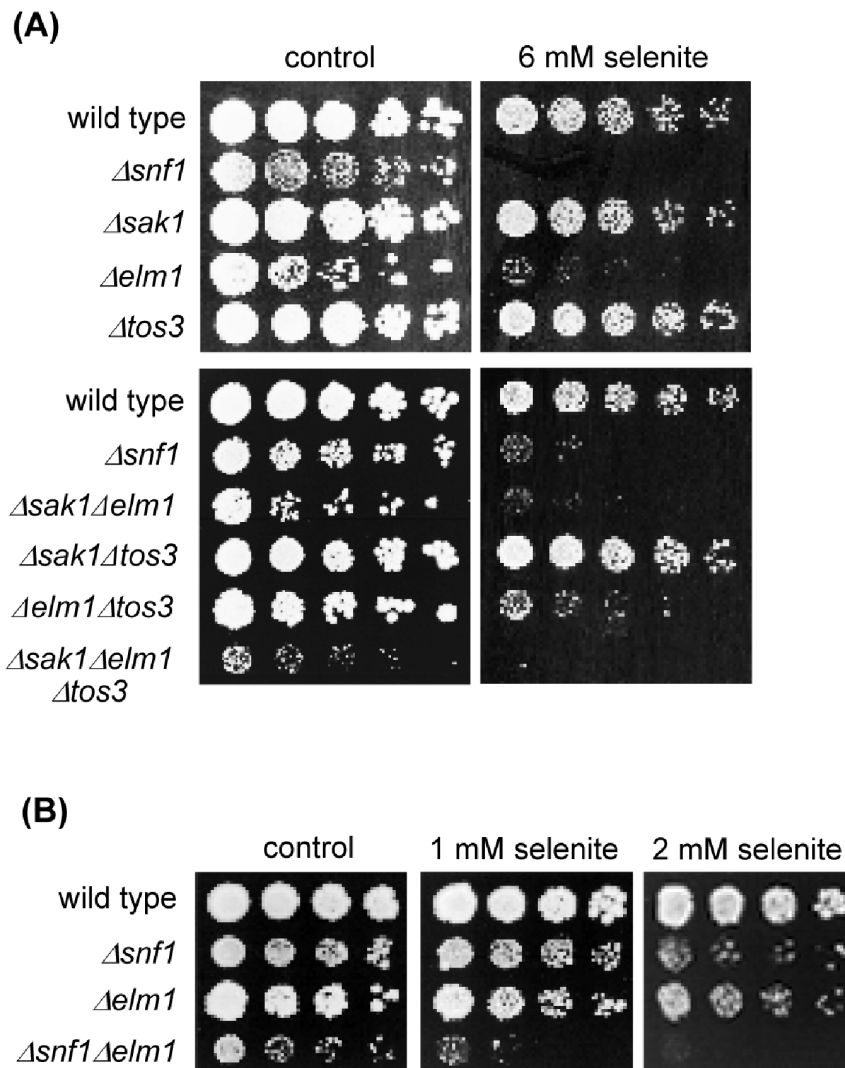
kinases (Figure 2A). Only the *Δelm1* mutant was more sensitive than the wild type strain, displaying almost the same sensitivity levels as the *Δsnf1* mutant, which suggests an important role for Elm1 in the selenite stress response. This was confirmed when the sensitivity of the double mutants was tested (Figure 2A). Cells expressing only Tos3 were as sensitive to selenite as the *Δsnf1* mutant or the mutant lacking all three upstream kinases, indicating that Tos3 plays no protective role at all. Cells expressing only Sak1 displayed an intermediate sensitivity phenotype, while cells expressing only Elm1 had the same sensitivity to selenite as wild type cells. Therefore, Elm1 is sufficient for protection against this agent, although in its absence Sak1 would perform some protection.

Elm1 and Snf1 carry out partially independent parallel roles in the response to sodium stress [13], contrary to the response to glucose deprivation in which both kinases participate in the same pathway. We therefore determined whether the former was also the case in the protective response to selenite. With this objective, we studied the sensitivity to the agent in the double *Δsnf1Δelm1*

mutant compared to the single *Δsnf1* and *Δelm1* mutants. The double mutant displayed additive sensitivity (Figure 2B), indicating that besides its activating role on Snf1, Elm1 carries out protective functions against selenite which are Snf1-independent.

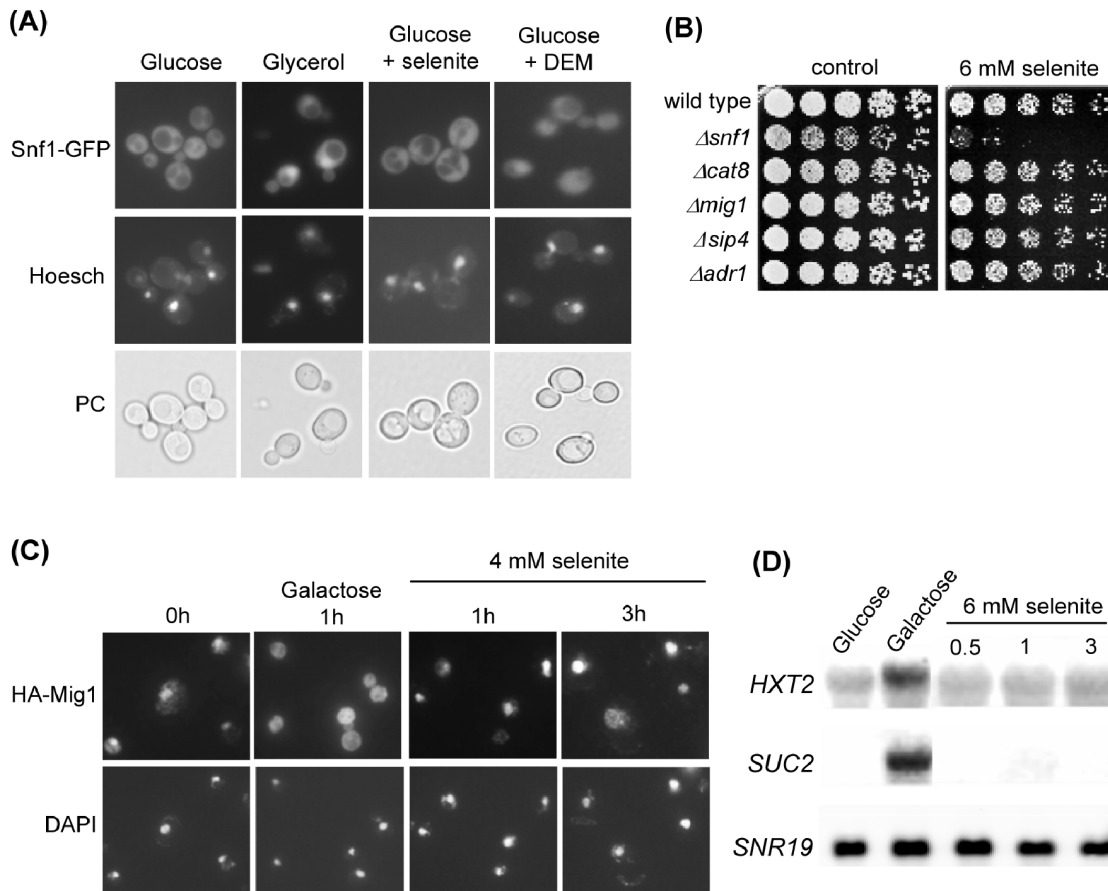
### Snf1 Remains at the Cytosol Upon Selenite Treatment

A fraction of Snf1 molecules localize to the nucleus upon glucose depletion, under regulation by Gal83 [28]. Alkaline stress also causes Snf1 nuclear localization [12]. Using a Snf1-GFP construction, we determined its location after application of a selenite stress. Snf1 remained at the cytosol during the entire period of treatment, contrary to cells that had been shifted to glycerol medium (Figure 3A). These results suggested that protection against selenite does not require the nuclear pool of activated Snf1, and are in accordance with the main role of Elm1 as activator of Snf1 upon selenite stress. In fact, Elm1 has been characterized as a bud neck-associated kinase playing important roles in septin organization and cytokinesis [36,37] and in the spindle position checkpoint [38,39]. Using a functional Elm1-GFP



**Figure 2. Protection against selenite preferentially requires the Elm1 kinase.** (A) Growth assays of serial dilutions of the following strains on YPD medium with sodium selenite: wild type (W303-1A), *Δsnf1* (Wsnf1), *Δsak1* (MML1370), *Δelm1* (YPDahl21), *Δtos3* (YPDahl19), *Δsak1Δelm1* (MML1387), *Δsak1Δtos3* (MML1389), *Δelm1Δtos3* (MML1390) and *Δsak1Δelm1Δtos3* (MML1392). (B) As in (A) with the strains: wild type, *Δsnf1*, *Δelm1* and *Δsnf1Δelm1* (MML1724).

doi:10.1371/journal.pone.0058283.g002



**Figure 3. Protection against selenite toxicity does not require activity of the known nuclear effectors of Snf1.** (A) Localization of Snf1 upon different treatments. The Snf1-GFP protein expressed in pOV84-transformed wild type cells was visualized by fluorescence microscopy in cells growing in SC medium without treatment (Glucose) or after 2 hours treatment with 4 mM sodium selenite or 1 mM DEM. In parallel, cell samples were shifted to YPGly and observed one hour later (Glycerol). Prior to observations, samples were stained with Hoesch for nuclei localization. The corresponding phase contrast fields (PC) are shown. (B) Growth assays of serial dilutions of the following strains on YPD medium with sodium selenite: wild type (W303-1A),  $\Delta snf1$  (Wsnf1),  $\Delta cat8$  (MML1417),  $\Delta mig1$  (MML1408),  $\Delta sip4$  (MML1396) and  $\Delta adr1$  (MML1419). (C) Localization of HA-Mig1 upon different treatments. Cells transformed with pHA-Mig1 were grown in SC medium and treated with selenite for the indicated times or shifted to medium with 2% galactose instead of glucose. Cells were observed by immunofluorescence experiments with anti-HA antibodies, with parallel nuclear staining with DAPI. (D) Northern blot expression analysis of the indicated genes in wild type (W303-1A) cells growing in YPD medium without (Glucose) or with selenite for the indicated times (hours), or in YPGal medium (Galactose) for 1 hour. *SNR19* was employed as loading control. The same blotted membrane was successively hybridized with the three probes after extensive washings. doi:10.1371/journal.pone.0058283.g003

form [38], we could determine that Elm1 protein remains at the bud neck in selenite-treated cells (Figure S1).

Other experiments confirmed the nucleus-independent function of Snf1 in selenite stress signaling. First, mutants in nuclear effectors of Snf1 such as Cat8, Mig1, Sip4 or Adr1 [3,10] were as sensitive to selenite as wild type cells (Figure 3B), supporting that none of them is involved in protection against the agent. Next, we employed Mig1 localization as reporter of Snf1-mediated signal transduction to the nucleus. Thus, upon glucose depletion Snf1 phosphorylates Mig1 promoting its export from the nucleus and consequent derepression of glucose-repressed genes [26]. While shifting the cells from glucose to galactose-based medium caused rapid exit of Mig1 from the nucleus, extensive nuclear Mig1 staining was still observed after 3 hours of selenite treatment (Figure 3C). In parallel, we determined the mRNA levels of two genes, *HXT2* and *SUC2*, whose expression is repressed by Mig1 in glucose medium and activated in a Snf1-dependent manner upon shifting to alternative carbon sources. In contrast to control cells after 1 hour in galactose medium, no detectable derepression of

the expression of *HXT2* and *SUC2* was observed even after 3 hours of treatment with selenite (Figure 3D). Overall, these experiments support that the selenite-induced signal does not regulate the activity of nuclear effectors of Snf1 such as Mig1, and that Snf1 plays its protective role at the cytosol.

### Phosphorylation of Snf1 does not Correlate with Protection Against Selenite Toxicity

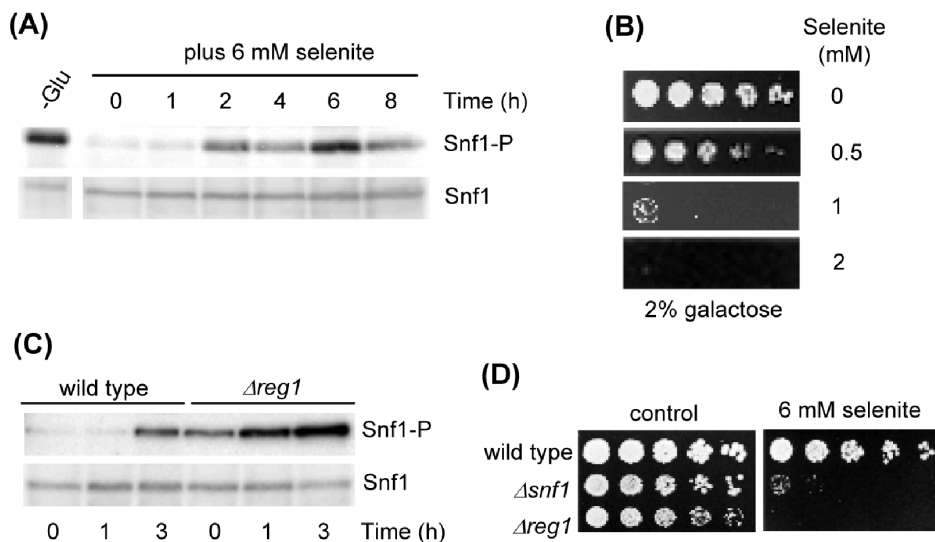
We next studied whether Snf1 becomes phosphorylated at Thr210 upon selenite addition. Western blot analyses using an antibody specifically recognizing the Snf1 form phosphorylated at the T-loop Thr residue demonstrated a moderate phosphorylation of Thr210 after selenite addition, which was only manifested after 2 hours of treatment and at later times (Figure 4A). This Snf1 phosphorylation therefore occurred in growth medium with normal glucose levels (2% concentration), and did not reach the Thr210 phosphorylation levels observed upon glucose depletion. Lower selenite concentrations provoked a weaker and less sustained response (data not shown). The delayed Snf1 phosphor-

ylation response upon selenite treatment could reflect indirect effects not necessarily related to the protective role of Snf1 against the agent. Additional observations by us confirmed that phosphorylation of Snf1 is not required for protection against selenite. Thus, in spite of the fact that Snf1 becomes phosphorylated at Thr210 when yeast cells are grown in carbon sources alternative to glucose, the sensitivity of the yeast cells in front of selenite was increased when growing with galactose (Figure 4B) or glycerol [24] as only carbon sources compared to cells growing in glucose-based medium. We also determined the sensitivity to selenite of a null *Δreg1* mutant that displays constitutive Snf1 phosphorylation in glucose medium [7,8]. In this mutant, selenite caused additional phosphorylation of Snf1 over the basal levels at earlier times than in wild type cells (Figure 4C). However, the *Δreg1* mutant did not display higher resistance to selenite than wild type cells, and in fact was as sensitive to the agent as *Δsnf1* cells (Figure 4D). This may point to interfering effects of selenite on Reg1 and probably other phosphatases (see Discussion). In any case, the above results together indicate that although Snf1 activity mediated by Thr210 phosphorylation is required for protection against selenite toxicity, increased phosphorylation over the basal levels does not cause further protection.

#### The Selenite Toxic Effects are not Due to Glucose Deprivation by the Agent

The delayed phosphorylation of Snf1 upon selenite treatment seems to indicate that this agent does not cause immediate glucose deprivation effects and therefore discards this as an explanation for the growth sensitivity effects of the mutant. That selenite does not induce expression of *HXT2* or *SUC2* also argues against occurrence of glucose deprivation effects caused by the agent. However, we further addressed this point using several approaches. First, we asked whether the hypersensitivity of the *Δsnf1* mutant could be caused by selenite effects at the cell surface not able to be counteracted in the absence of Snf1 function. Thus, plasma

membrane depolarization induced by selenite could inhibit glucose uptake and consequently activate Snf1. The high affinity potassium transport system formed by Trk1 and Trk2 is a main determinant of the yeast plasma membrane electrochemical potential [40]. In case that selenite provokes membrane depolarization, hyperpolarized *Δtrk1Δtrk2* mutants would be less sensitive to selenite and the absence of Trk1 and Trk2 would at least partially rescue the selenite sensitivity of *Δsnf1* cells [11]. Similarly, overexpression of *TRK1* depolarizes the plasma membrane [27] and this would exacerbate the selenite sensitivity of *Δsnf1* cells. However, these hypothesis were not confirmed (Figure S2A), which argues against selenite effects on plasma membrane polarization. Next, we determined whether growing cells in medium with higher glucose concentration than normal rescued selenite toxicity. Contrary to other stresses such as alkaline treatment [15], the selenite sensitivity of *Δsnf1* compared to wild type cells was not affected by growing cells in 5% glucose (Figure S2B). Finally, we determined intracellular glucose-6-phosphate levels upon selenite treatment to determine possible effects of the agent on glucose uptake. Wild type cells treated during 4 hours did not show a decrease of the levels of glucose-6-phosphate (Figure S2C). On the contrary, intracellular levels of this metabolite increased at initial times to regain the initial levels at 4 hours. This initial increase may be related to the selenite-mediated transcriptional upregulation of carbohydrate synthesis genes described in Ref. 25. In *Δsnf1* cells, a similar kinetics of the evolution of intracellular glucose-6-phosphate was observed, although concentrations of the metabolite were lower than in wild type cells at all treatment times as well as in untreated cultures (Figure S2C), indicating that this is a selenite-independent effect. In summary, the experiments argue against an intracellular glucose-depletion effect by selenite, and support that Snf1 phosphorylation at advanced treatment times is not due to glucose deprivation.



**Figure 4. Phosphorylation levels of Snf1 at Thr210 do not correlate with protection against selenite treatment.** (A) Western blot analysis of phosphorylated Snf1 at Thr210 with anti-phospho-Thr172-AMPK (upper panel). Blots were rehybridized with anti-Snf1 antibodies for total Snf1 (lower panel). Samples were obtained from wild type (W303-1A) exponential cultures in YPD treated with sodium selenite for the indicated times. Control samples were run from YPD-grown wild type cells that were shifted for 1 hour to YPGly (-Glu). (B) Growth assays of serial dilutions of wild type (W303-1A) cells in YPGal medium with the indicated concentrations of selenite. (C) As in (A) with samples from wild type and *Δreg1* (MML1442) cells. (D) Growth assays of serial culture dilutions of wild type (W303-1A), *Δsnf1* (Wsnf1) and *Δreg1* (MML1442) strains on YPD medium with selenite.

doi:10.1371/journal.pone.0058283.g004

## Toxicity by Selenite Requires Entry of the Agent into the Cells

To further address the causes of the hypersensitivity of *Δsnf1* mutant cells to selenite, we studied whether the mutant was still hypersensitive to selenite when entry of this agent into the cells was inhibited. In fermentative growth conditions such as those employed in the current study, selenite enters *S. cerevisiae* cells through the high affinity phosphate transporters Pho84 in low phosphate medium, and through both the high affinity and the low affinity transporters in normal phosphate medium [21]. We took advantage of the fact that expression of *PHO89*, which codes for the alternative high affinity transporter Pho89, is induced by selenite and is under the control of Snf1 in both low and normal phosphate medium (Figure S3). Therefore, in *Δsnf1Δpho84* cells in low phosphate conditions no expression of the high affinity phosphate transporters occurs and phosphate transport may be compromised. This situation would be exacerbated in the presence of 3 mM selenite, which competes with the low phosphate amounts for entrance through the poorly operational low affinity transport system [21]. The resulting phosphate starvation conditions would explain the poor growth displayed by the *Δsnf1Δpho84* cells in the presence of selenite under low phosphate conditions (Figure 5). However, in normal phosphate conditions the susceptibility of the double mutant to selenite is similar to wild type cells (Figure 5). That is, in the absence of the Pho84/Pho89 high affinity transporter and when the high phosphate concentration (7.3 mM) is advantageously competing with 3 mM selenite for the low affinity transporter [21], then selenite toxicity is decreased in a *Δsnf1* background. Altogether, these observations support that the severe effects of selenite on *Δsnf1* cells require entry of the agent into the cells.

## Sensitivity of Snf1-deficient Cells to Selenite is Related to Alterations in Glutathione Metabolism

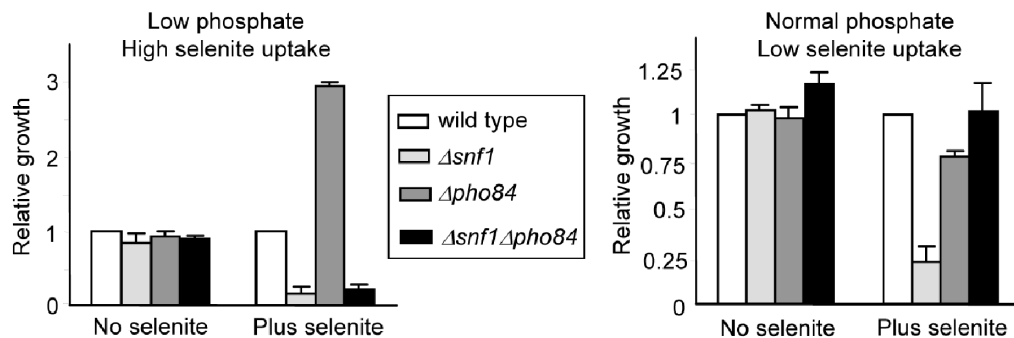
The tripeptide glutathione (L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH and GSSG respectively in its reduced and oxidized forms) is an essential thiol redox regulator [41]. Selenite causes depletion of GSH in yeast [20] as well as in other organisms [18]. Accordingly, overexpression of the *S. cerevisiae* glutathione reductase gene (*GLR1*) rescues selenite sensitivity [22]. In addition, in yeast cells selenite induces expression of *GLR1* and another key gene for GSH metabolism, *GSH1* (for L-γ-glutamyl-L-cysteine synthetase) [25]. Alteration of GSH metabolism could therefore

explain the differential toxic effects of selenite on *Δsnf1* cells, and we explored this possibility.

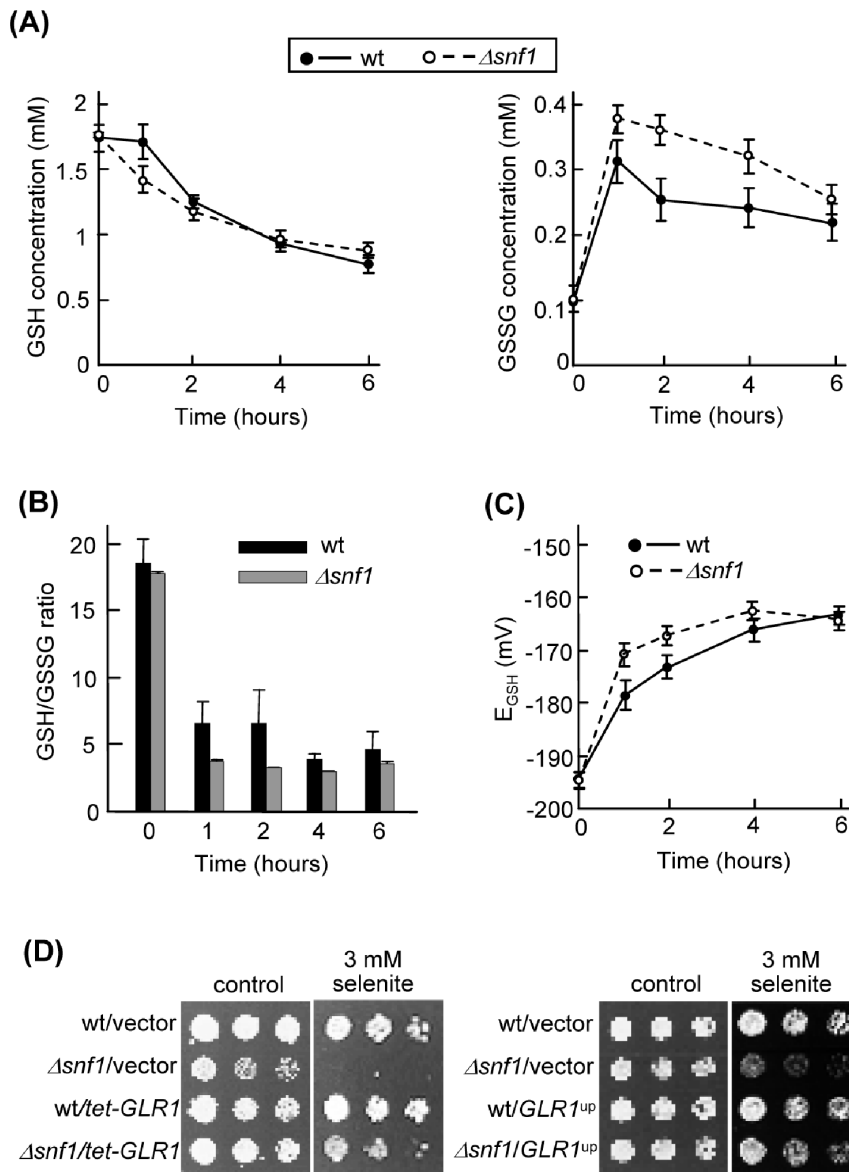
First, we observed that selenite causes a more pronounced transitory induction of *GLR1* and *GSH1* expression in *Δsnf1* than in wild type cells, which may be indicative of more intense alteration in glutathione pools in the mutant (Figure S4). In order to confirm this, we measured GSH and GSSG intracellular concentration upon selenite treatment in the wild type and mutant strains (Figure 6A). The GSH pool decreased in both strains during the next 6 hours after selenite addition, following similar kinetics. On the contrary, GSSG accumulated at significantly higher levels in *Δsnf1* cells, particularly during the initial 4 hours of treatment. Consequently, the mutant cells exhibited a lower GSH/GSSG ratio during initial treatment times (Figure 6B). When the GSH redox potential ( $E_{GSH}$ ) was calculated from the GSH/GSSG concentrations, it began with almost identical values in untreated cultures of both strains but increased ~16 mV in wild type cells and ~24 mV in mutant cells after one hour of selenite treatment, and only returned to similar values for both strains after 6 hours of treatment (Figure 6C). These results confirmed that glutathione homeostasis is more dramatically altered by selenite in the absence of Snf1. To correlate the effects on the GSH/GSSG ratio with the growth effects of selenite, we overexpressed *GLR1* from a multicopy plasmid or from the *telO<sub>7</sub>* promoter in both wild type and *Δsnf1* cells. With both overexpression strategies the relative hypersensitivity of *Δsnf1* cells in selenite plates was significantly rescued (Figure 6D). This therefore supported the explanation that the inhibitory effects of selenite on *Δsnf1* cells are caused by the accumulation of GSSG relative to GSH.

## Snf1 Kinase Activity Protects Against Agents Causing GSH Oxidation

The previous observations pointed to a general role of Snf1 in the defense against glutathione oxidation. To test this hypothesis, we carried out several experiments. First, we employed other agents that provoke changes in GSH homeostasis by oxidizing this molecule, such as diethyl maleate (DEM) [42] or diamide [43]. Absence of the Snf1 activity either in cells lacking Snf1 or the three β subunit components caused hypersensitivity to both DEM and diamide (Figure 7A). This is in contrast with the normal sensitivity of the mutants to *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), which discards a general protective role of Snf1 activity in oxidative stress conditions. To confirm that Snf1 activity is required to counteract the



**Figure 5. Effect of selenite on growth in low or normal phosphate conditions.** Relative growth of wild type (W303-1A), *Δsnf1* (Wsnf1), *Δpho84* (MML1304) and *Δsnf1Δpho84* (MML1401) cells in low or normal phosphate medium without or with 3 mM selenite. Growth in shaken microtiter plates was automatically recorded and the growth values reached by each strain after 24 hours were made relative to the growth of wild type cells, which was given the unit value for each growth condition considered. The mean of three independent experiments ( $\pm$  s.d.) is represented. Note that different scales of the y-axis are employed in both panels. doi:10.1371/journal.pone.0058283.g005



**Figure 6. The ratio of reduced vs oxidized glutathione is altered upon selenite treatment.** (A) Intracellular concentration of GSH (left) and GSSG (right) in cells treated with 2 mM sodium selenite for the indicated times. Wild type (W303-1A, continuous lines) and mutant  $\Delta snf1$  (Wsnf1, dashed lines) cells were grown in SC medium. Values ( $\pm$  s.d.) are the mean of three independent experiments. (B) GSH/GSSG ratio as determined from the concentration values shown in part (A). (C) GSH redox potential ( $E_{GSH}$ ) in wild type (continuous lines) and mutant  $\Delta snf1$  (dashed lines) cells treated with selenite.  $E_{GSH}$  was calculated from the GSH and GSSG concentration values in each of the three experiments indicated in part (A), using the Nernst equation for the GSH/GSSG pair. The mean ( $\pm$  s.d.) is represented. (D) Growth assays in SC medium of serial dilutions of the strains indicated in part (A) transformed with vector pCM189 or its derivative pMM1039 (*tetO-GLR1*), or of the same strains transformed with the multicopy vector YEplac195 or its derivative P1116 overexpressing *GLR1* (right panels). doi:10.1371/journal.pone.0058283.g006

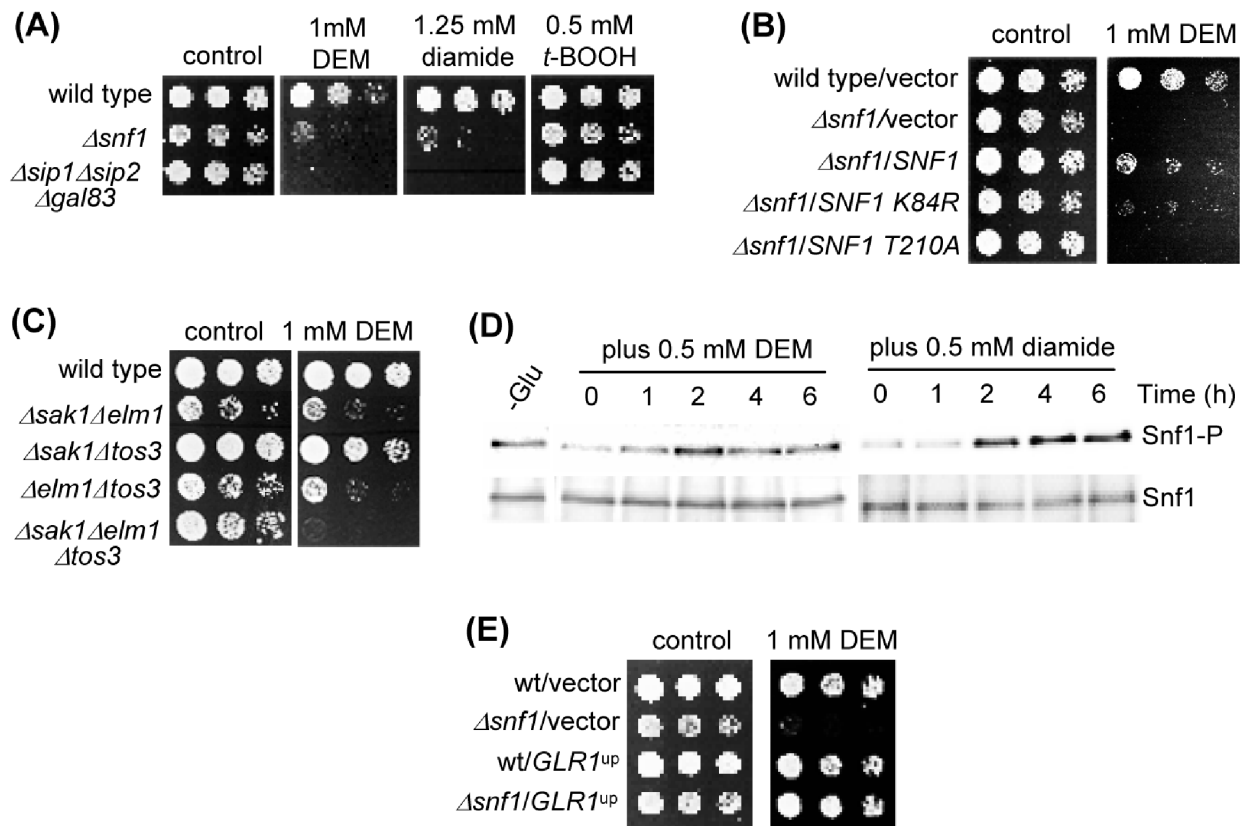
effects of GSH-oxidizing agents, we showed that the *snf1-K84R* and *snf1-T210A* mutations do not complement the DEM-sensitive phenotype of a  $\Delta snf1$  mutant, in contrast to the wild type form (Figure 7B). As in the case of selenite, the presence of the upstream kinase Elm1 alone was sufficient to confer wild type levels of DEM sensitivity to yeast cells (Figure 7C), and DEM did not provoke migration of Snf1 into the nucleus (Figure 3). Also as with selenite, both DEM and diamide caused phosphorylation at Snf1 Thr210 but only after 2 hours of treatment (Figure 7D). Finally, we confirmed that overexpression of *GLR1* protected the mutant against DEM toxicity (Figure 7E).

Summarizing, our results showed that Snf1 activity has a general protective role in yeast cells in situations that lead to glutathione oxidation such as the presence of selenite, DEM or diamide.

## Discussion

AMPK/Snf1 responds to metabolic stress in yeast cells, its kinase activity being required for adaptation to glucose limitation and growth in alternative carbon sources [3]. Snf1 also plays a defense function against a number of environmental stresses (see Introduction), although this role does not always require additional





**Figure 7. Snf1 is required for protection against glutathione-oxidizing agents.** (A) Growth assays of serial dilutions of the following strains on YPD medium with DEM, diamide or *t*-BOOH: wild type (W303-1A), *Δsnf1* (Wsnf1) and *Δsip1Δsip2Δgal83* (MML1459). (B) Growth assays of serial dilutions of the following strains, plated on SC medium with DEM: wild type (W303-1A) and *Δsnf1* (Wsnf1) cells transformed with vector pWS93, and *Δsnf1* cells transformed with pWS-Snf1, pWS-Snf1-T210A and pWS-Snf1-K84R. (C) Growth assays of serial dilutions of the following strains on YPD medium with DEM: wild type (W303-1A), *Δsak1Δelm1* (MML1387), *Δsak1Δtos3* (MML1389), *Δelm1Δtos3* (MML1390) and *Δsak1Δelm1Δtos3* (MML1392). (D) Western blot analysis of Thr210-phosphorylated Snf1 (Snf1-P) and of total Snf1. The same membrane was successively hybridized with the corresponding antibodies. Samples were from wild type (W303-1A) exponential cultures in YPD treated with DEM or diamide. Control samples were from YPD-grown wild type cells shifted for 1 hour to YPGly (-Glu). (E) Growth assays of wild type (W303-1A) and *Δsnf1* (Wsnf1) cells transformed with multicopy vector YEplac195 or its derivative P1116 overexpressing *GLR1*, in SC medium with DEM. doi:10.1371/journal.pone.0058283.g007

activation of Snf1 over basal levels [14,16]. In contrast, oxidative stress by peroxide also activates Snf1, but in this case the kinase does not seem to participate in protection of yeast cells against peroxide toxicity [12,16, and this work]. In the present study we have shown that Snf1 activity is required for defense of *S. cerevisiae* cells upon selenite treatment. Although we observed phosphorylation of Snf1 Thr210 at advanced treatment times, the basal activity of Snf1 is sufficient to protect against the agent, and nutritionally or genetically provoked situations where Snf1 becomes permanently phosphorylated at Thr210 do not provide additional selenite resistance. Since Snf1 phosphorylation levels are mainly regulated by the activity of Reg1 [7,8], the late phosphorylation of Snf1 provoked by selenite could be due to inactivation of Reg1 (and alternative PP1- or PP2A-type phosphatases) by the agent. Inhibitory modulation of the activity of PP1 phosphatases by selenite has been described in human cells [44]. The proposition that in yeast cells selenite could affect the activity of Reg1 and other phosphatases is supported by the observations that: (i) a *Δreg1* mutant is also hypersensitive to the agent (this work), and (ii) a *Δppz1* mutant is also unable to grow in the presence of selenite (our unpublished results). Ppz1 is a phosphatase with large homology to PP1-type phosphatases whose

roles in the regulation of cation homeostasis and other yeast cell processes have been characterized [40].

We have shown that selenite toxicity and the requirement of Snf1 for protection against it is not related to plasma membrane depolarization effects and/or glucose depletion, and that such protection requires the entry of the agent into the cell mostly through the high affinity mechanism of phosphate uptake, which is the main mediator of selenite entry in glucose-grown yeast cells [21]. Once into the cell, selenite does not provoke migration of Snf1 into the nucleus, in contrast to the activation of Snf1 by glucose deprivation and the consequent response. Thus, at least the upstream steps of the Snf1-mediated response to selenite seem to occur entirely at the cytoplasm. In addition, none of the characterized transcription regulators participating in the response to metabolic stress by glucose deprivation (Cat8, Mig1, Sip4 or Adr1) appear to be individually important in protection against selenite. Our results are reminiscent of earlier studies [4,13] which showed that exposure of cells to high sodium led to increased phosphorylation of Snf1 without phosphorylation of Mig1 and without induction of glucose-controlled genes. Noteworthy, Snf1 does not only regulate nuclear targets, but also modulates the function of cytosolic proteins, such as the arrestin-related protein Rod1, which coordinates endocytosis of alternative carbon source transporters in response to glucose

presence in the medium [45]. Thus, Snf1 may have a wider range of targets (both cytosolic and nuclear) than previously expected. The important function of Elm1 during the selenite response seems surprising. In addition to its overlapping role with Sak1 and Tos3 in Snf1 activation during glucose depletion, Elm1 is required for the organization of the septin network at the bud neck [36,37] and coordinates the spindle position checkpoint through activation of the Kin4 kinase [38,39]. Different regions of the protein molecule could participate in such diversity of Elm1 functions [38,39,46]. Selenite does not provoke significant alterations in the yeast cell cycle or in cell morphogenesis [22,24], neither delocalizes Elm1 from the bud neck (Figure S1). This argues against, although it does not entirely prove, the participation of the bud neck-associated Elm1 pool in the selenite response, and supports additional functions for cytoplasmic Elm1 molecules. In any case, Elm1 has a role in defense against selenite which is in part independent of the Snf1 role, a similar situation to the participation of Snf1 and Elm1 in protection against salt stress [13].

How selenite signaling is related to Snf1 activity? Selenite provokes a reduction of GSH and an increase of GSSG in yeast cells [20,47]. Such decrease of the ratio GSH/GSSG is exacerbated in cells lacking Snf1 up to four hours of treatment. Differences between wild type and mutant cells were mainly due to a relative increase of GSSG in the latter rather than to differences in the GSH pool between both strains. Overexpression of the *GLR1* glutathione reductase gene protects yeast cells against the toxic effects of selenite [22]. Along this line, overexpression of *GLR1* in *Δsnf1* cells allows growth of the mutant in the presence of selenite up to similar levels as the wild type. This fact points to the changes (compared to wild type cells) of the redox potential of the GSH/GSSG pair as the cause of the hypersensitivity of *Δsnf1* cells to selenite. Accordingly, yeast cells lacking Snf1 are also hypersensitive to agents such as DEM or diamide, which increase the GSSG pools relative to GSH. In addition, overexpression of *GLR1* also allows growth of *Δsnf1* cells at the same level as wild type cells in the presence of DEM. Therefore, the relationship between selenite toxicity and cell protection mediated by Snf1 reflects a more general role of this kinase in sensing and responding to intracellular redox changes due to an increase of oxidized glutathione. Again, both DEM and diamide provoke a late phosphorylation of Snf1, which indicates that the possible alteration of the modulatory mechanisms of Snf1 phosphorylation is not circumscribed to selenite, but extends to a broader range of agents acting on intracellular redox homeostasis.

The signaling role of Elm1/Snf1 in inducing a protective response to a sudden increase of the GSSG/GSH ratio does not seem to involve previous functions assigned to Elm1 and Snf1, and as discussed above such role would not require the already characterized nuclear effectors of Snf1. Recent studies point to functions of Snf1 other than those previously characterized as metabolic regulator. Thus, analysis of the yeast kinase-protein interactome using protein microarrays has revealed common targets between Snf1 and the Akl1 kinase involved in cytoskeletal functions [48]. Another study integrating transcriptomic, proteomic and metabolomic data using a systemic approach revealed that in addition to modulating other metabolic processes, Snf1 could be a regulator of redox homeostasis through the activity of Yap1, a transcription factor of genes participating in the oxidative stress response [49]. In human cell lines, hydrogen peroxide activates AMPK as part of a protective signaling mechanism mediated by mTORC1 [50]. In another study with human colon cancer cells, selenate provoked a late activation of AMPK through ROS formation and this AMPK activation was essential to inhibit cell proliferation by downregulating the COX2-mediated pathway [51]. An additional work with human cell lines

also demonstrated activation of AMPK by redox changes in the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits induced by hydrogen peroxide [52]. The present study in yeast cells suggests that changing the redox pair GSH/GSSG to a more oxidant status induces a pathway mediated by Snf1 resulting in cell protection against oxidant conditions, for instance by rescuing the function of some redox-sensitive molecule essential for cell proliferation. Alternatively, although not in contradiction with the previous hypothesis, Snf1 could activate cell functions cooperating with the GSH-reducing system in maintenance of the GSH redox homeostasis in the presence of selenite and other oxidants. Based on all those observations, the participation of AMPK activity in regulation of cellular redox homeostasis could be a general property in eukaryotic cells. Further studies are required to characterize the downstream effectors of Snf1/AMPK that are important in the response to changes in the GSH/GSSG ratio, as well as to determine how the complex senses such changes.

## Supporting Information

**Figure S1 Location of Elm1 protein upon selenite treatment.** Strain AKY516 expressing *ELM1-GFP* derivative was grown in YPD medium with 4 mM selenite for the indicated times. Cells were immediately visualized by fluorescence and phase contrast microscopy using an Olympus BZ51 apparatus. (TIF)

**Figure S2** Selenite sensitivity is not associated to alterations in plasma membrane polarization or intracellular glucose deprivation. (A, left) Growth assays of serial dilutions of the following strains on YPD medium with selenite: wild type (W303-1A), *Δsnf1* (Wsnf1), *Δtrk1Δtrk2* (WΔ3) and *Δsnf1Δtrk1Δtrk2* (MML1447). The medium was supplemented with 100 mM NaCl to improve growth of *Δtrk* cells. (A, right) Growth assays of serial dilutions of wild type (W303-1A) and *Δsnf1* (Wsnf1) cells transformed with vector pCM262 or its derivative pYcp414 overexpressing *TRK1*, in SC medium with selenite. (B) Growth assays of serial dilutions of wild type (W303-1A) and *Δsnf1* (Wsnf1) cells in YPD medium with the indicated concentrations of glucose plus selenite. (C) Relative amount of glucose-6-phosphate per cell. Samples were taken from wild type (W303-1A) or *Δsnf1* (Wsnf1) cells growing exponentially in YPD medium and treated with selenite for the indicated times. Values ( $\pm$  s.d., mean of six experiments) were made relative to the unit value corresponding to untreated wild type cells (absolute concentration of the relative unit value:  $4.8 \times 10^{-11}$  nmols per cell). (TIF)

**Figure S3 Expression of *PHO89* is induced by selenite under the control of Snf1.** Northern blot expression analysis of the indicated genes in wild type (W303-1A), *Δsnf1* (Wsnf1), *Δpho84* (MML1304) and *Δsnf1Δpho84* (MML1401) cells in low or normal phosphate cultures treated with 3 mM selenite. *SNR19* was employed as loading control. (TIF)

**Figure S4 Northern blot expression analysis of *GSH1* and *GLR1* in selenite-treated cells.** Exponential cultures of wild type (W303-1A) and *Δsnf1* (Wsnf1) cells in YPD medium were treated with 6 mM sodium selenite for the indicated times. *SNR19* was employed as loading control. (TIF)

## Acknowledgments

We thank Pascual Sanz for helpful suggestions and critical reading of the manuscript, and Joaquin Ariño, Bertrand Daignan-Fornier, Stefan Hohmann, Gislene Pereira, Pascual Sanz, Olivier Vincent and Lynne

Yenush for the gift of biological reagents. We thank Mariona Jové (Servei de Metabolòmica, IRBLleida) for metabolite determinations.

## References

- Hardie DG (2011) AMP-activated protein kinase- an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 25: 1895–1908.
- Sanz P (2003) Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast. *Biochem Soc Trans* 31: 178–181.
- Hedbacker K, Carlson M (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* 13: 2408–2420.
- McCartney RR, Schmidt MC (2001) Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* 276: 36460–36466.
- Hong SP, Leiper FC, Woods A, Carling D, Carlson M (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8839–8843.
- Sanz P, Alms GR, Haystead TAJ, Carlson M (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 20: 1321–1328.
- Rubenstein EM, McCartney RR, Zhang C, Shokat KM, Shirra MK, et al. (2008) Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PPI phosphatase. *J Biol Chem* 283: 222–230.
- Castermans D, Somers I, Kriel J, Louwet W, Wera S, et al. (2012) Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PPI in yeast. *Cell Res* 22: 1058–1077.
- Ruiz A, Xu X, Carlson M (2011) Roles of two protein phosphatases, Reg1-Glc7 and Sit4, and glycogen synthesis in regulation of SNF1 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 6349–6354.
- Young ET, Dombek KM, Tachibana C, Ideker T (2003) Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J Biol Chem* 278: 26146–26158.
- Portillo F, Mulet JM, Serrano R (2005) A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Lett* 579: 512–516.
- Hong SP, Carlson M (2007) Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J Biol Chem* 282: 16838–16845.
- Ye T, Elbing K, Hohmann S (2008) The pathway by which the yeast protein kinase Snf1p controls acquisition of sodium tolerance is different from that mediating glucose regulation. *Microbiology* 154: 2814–2826.
- Ohdate T, Izawa S, Kita K, Inoue Y (2009) Regulatory mechanism for expression of *GPX1* in response to glucose starvation and Ca<sup>2+</sup> in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of Snf1 and Ras/cAMP pathway in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Genes Cells* 15: 59–75.
- Casamayor A, Serrano R, Platara M, Casado C, Ruiz A, et al. (2012) The role of the Snf1 kinase in the adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to alkaline pH stress. *Biochem J* 444: 39–49.
- Dubacq C, Chevalier A, Mann C (2004) The protein kinase Snf1 is required for tolerance to the ribonucleotide reductase inhibitor hydroxyurea. *Mol Cell Biol* 24: 2560–2572.
- Thorsen M, Perrone GG, Kristiansson E, Traini M, Ye T, et al. (2009) Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 10: 105.
- Brozmanová J, Mániková D, Vlčková V, Chovanec M (2010) Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol* 84: 919–938.
- Spallholz JE (1997) Free radical generation by selenium compounds and its prooxidant toxicity. *Biomed Environ Sci* 10: 260–270.
- Tarze A, Dauplais M, Grigoras I, Lazard M, Ha-Duong NT, et al. (2007) Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenide against *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282: 8759–8767.
- Lazard M, Blanquet S, Fiscicaro P, Labarraque G, Plateau P (2010) Uptake of selenite by *Saccharomyces cerevisiae* involves the high and low affinity orthophosphate transporters. *J Biol Chem* 285: 32029–32037.
- Pinson B, Sagot I, Daignan-Fornier B (2000) Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 36: 679–687.
- Letavayová L, Vlášková D, Spallholz JE, Brozmanová J, Chovanec M (2008) Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 638: 1–10.
- Izquierdo A, Casas C, Herrero E (2010) Selenite-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*: protective role of glutaredoxins. *Microbiology* 156: 2608–2620.
- Salin H, Fardeau V, Piccini E, Lelandais G, Tanty V, et al. (2008) Structure and properties of transcriptional networks driving selenite stress response in yeasts. *BMC Genomics* 9: 333.
- Treitel MA, Kuchin S, Carlson M (1998) Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18: 6273–6280.
- Yenush L, Merchan S, Holmes J, Serrano R (2005) pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* 25: 8683–8692.
- Vincent O, Townley R, Kuchin S, Carlson M (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific  $\beta$  subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev* 15: 1104–1114.
- Belli G, Gari E, Aldea M, Herrero E (1998) Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* 14: 1127–1138.
- Goldstein AL, McCusker JH (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 1541–1553.
- Orlova M, Barrett L, Kuchin S (2008) Detection of endogenous Snf1 and its activation state: application to *Saccharomyces* and *Candida* species. *Yeast* 25: 745–754.
- Ayer A, Tan SX, Grant CM, Meyer AJ, Dawes IW, et al. (2010) The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome. *Free Rad Biol Med* 49: 1956–1968.
- Castrillo JI, Hayes A, Mohammed S, Gaskell SJ, Oliver SG (2003) An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* 62: 929–937.
- Schmidt MC, McCartney RR (2000)  $\beta$ -subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *EMBO J* 19: 4936–4943.
- Hedbacker K, Carlson M (2006) Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase. *Eukaryot Cell* 5: 1950–1956.
- Sreenivasan A, Kellogg D (1999) The Elm1 kinase functions in a mitotic signaling network in budding yeast. *Mol Cell Biol* 19: 7983–7994.
- Bouquin N, Barral Y, Courbeyrette R, Blondel M, Snyder M, et al. (2000) Regulation of cytokinesis by the Elm1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 113: 1435–1445.
- Caydasi AK, Kurtulmus B, Orrico ML, Hofmann A, Ibrahim B, et al. (2010) Elm1 kinase activates the spindle position checkpoint kinase Kin4. *J Cell Biol* 190: 975–989.
- Moore JK, Chudalayandi P, Heil-Chapdelaine RA, Cooper JA (2010) The spindle position checkpoint is coordinated by the Elm1 kinase. *J Cell Biol* 191: 493–503.
- Ariño J, Ramos J, Sychrová H (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 95–120.
- Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D, Tacnet F (2007) The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Lett* 581: 3598–3607.
- Plummer JL, Smith BR, Sies H, Bend JR (1981) Chemical depletion of glutathione *in vivo*. *Meth Enzymol* 77, 50–59.
- Kosower NS, Kosower EM, Wertheim B (1969) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun* 37, 593–596.
- Celik HA, Kircelli F, Saydam G, Aydin HH (2007) Potential involvement of serine/threonine protein phosphatases in apoptosis of HepG2 cells during selenite treatment. *Biol Trace Element Res* 117: 65–75.
- Becue M, Vieira N, Lara D, Gomes-Rezende J, Soares-Cunha C, et al. (2012) A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J Cell Biol* 196: 247–259.
- Rubenstein EM, McCartney RR, Schmidt MC (2006) Regulatory domains of Snf1-activating kinases determine pathway specificity. *Eukaryot Cell* 5: 620–627.
- Lazard M, Ha-Duong NT, Mounié S, Perrin R, Plateau P, et al. (2011) Selenodiglutathione uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar ATP-binding cassette transporter Ycf1p. *FEBS J* 278: 4112–4121.
- Fasolo J, Shoner A, Sun MGF, Yu H, Chen R, et al. (2012) Diverse protein kinase interactions identified by protein microarrays reveal novel connections between cellular processes. *Genes Dev* 25: 767–778.
- Usaita R, Jewett MC, Oliveira AP, Yates III JR, Olsson L, et al. (2009) Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy modulator. *Mol Syst Biol* 5: 319.
- Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, et al. (2010) ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 4153–4158.
- Hwang JT, Kim YM, Surh YJ, Baik HW, Lee SK, et al. (2006) Selenium regulates cyclooxygenase-2 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways by activating AMP-activated protein kinase in colon cancer cells. *Cancer Res* 66: 10057–10063.
- Zmijewski JW, Banerjee S, Bae H, Figgeri A, Lazarowski ER, et al. (2010) Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 285: 33154–33164.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MPS CC EH. Performed the experiments: MPS CC. Analyzed the data: MPS CC EH. Contributed reagents/materials/analysis tools: EH. Wrote the paper: EH.